



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN
INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL:

**HUELLA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE PACIENTES SÉPTICOS Y
ESTIMACIÓN DEL RIESGO DE MORTALIDAD EN
PACIENTES CON SHOCK POSQUIRÚRGICO**

Presentada por Dña. Marta Aragón Camino
para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Eduardo Tamayo Gómez
Dra. María Heredia Rodríguez
Dr. Emilio P. García Morán



Universidad de Valladolid



Documento / Document 8T

INFORME DEL DIRECTOR O DIRECTORA DE TESIS PARA VALIDAR LA SOLICITUD DE DEPÓSITO / THESIS SUPERVISOR'S REPORT TO VALIDATE THE DEPOSIT REQUEST

Esta autorización debe estar firmada por todos los directores o directoras de la tesis / This authorisation must be signed by all the thesis supervisors.

Dr./Dra: EDUARDO TAMAYO GÓMEZ

con D.N.I./Pasaporte / *with National Identity Card/Passport Number:*

email:

como Director/a de la Tesis Doctoral titulada / *as Director/Supervisor of the Doctoral Thesis entitled*

Huella molecular para el diagnóstico de pacientes sépticos y estimación del riesgo de mortalidad en pacientes con shock posquirúrgico.

realizada por D./D^a / *written by Mr./Ms* Marta Aragón Camino

Programa de Doctorado / *Doctoral Programme*

Investigación en ciencias de la salud

autoriza la solicitud del depósito de la misma, considerando que / *authorises the application to deposit this thesis, considering that*

La estructura y ejecución de este trabajo se ajusta a los objetivos propuestos inicialmente en su redacción y por ello puede ser presentada como trabajo original para la obtención del Título de Doctor.

Valladolid, a fecha de firma electrónica / *Valladolid, as of the date of the electronic signature*
(firma de todos los directores o directoras / *signature of all the directors*)

**PRESIDENCIA DE LA COMISIÓN DE TESIS DOCTORALES
PRESIDENT OF THE DOCTORAL THESIS COMMITTEE**



Universidad de Valladolid



Documento / Document 8T

INFORME DEL DIRECTOR O DIRECTORA DE TESIS PARA VALIDAR LA SOLICITUD DE DEPÓSITO / THESIS SUPERVISOR'S REPORT TO VALIDATE THE DEPOSIT REQUEST

Esta autorización debe estar firmada por todos los directores o directoras de la tesis / This authorisation must be signed by all the thesis supervisors.

Dr./Dra: **MARÍA HEREDIA RODRÍGUEZ**

con D.N.I./Pasaporte / *with National Identity Card/Passport Number:*

email:

como Director/a de la Tesis Doctoral titulada / *as Director/Supervisor of the Doctoral Thesis entitled*

Huella molecular para el diagnóstico de pacientes sépticos y estimación del riesgo de mortalidad en pacientes con shock posquirúrgico.

realizada por D./D^a / *written by Mr./Ms* Marta Aragón Camino

Programa de Doctorado / *Doctoral Programme*

Investigación en ciencias de la salud

autoriza la solicitud del depósito de la misma, considerando que / *authorises the application to deposit this thesis, considering that*

Ha participado en todo el proceso de su elaboración y cumple los criterios para ser defendida

.

Valladolid, a fecha de firma electrónica / *Valladolid, as of the date of the electronic signature*
(firma de todos los directores o directoras / *signature of all the directors*)

**PRESIDENCIA DE LA COMISIÓN DE TESIS DOCTORALES
PRESIDENT OF THE DOCTORAL THESIS COMMITTEE**



Universidad de Valladolid



Documento / Document 8T

INFORME DEL DIRECTOR O DIRECTORA DE TESIS PARA VALIDAR LA SOLICITUD DE DEPÓSITO / THESIS SUPERVISOR'S REPORT TO VALIDATE THE DEPOSIT REQUEST

Esta autorización debe estar firmada por todos los directores o directoras de la tesis / This authorisation must be signed by all the thesis supervisors.

Dr./Dra: EMILIO P. GARCÍA MORÁN

con D.N.I./Pasaporte / *with National Identity Card/Passport Number:*

email:

como Director/a de la Tesis Doctoral titulada / *as Director/Supervisor of the Doctoral Thesis entitled*

Huella molecular para el diagnóstico de pacientes sépticos y estimación del riesgo de mortalidad en pacientes con shock posquirúrgico.

realizada por D./D^a / *written by Mr./Ms* Marta Aragón Camino

Programa de Doctorado / *Doctoral Programme*

Investigación en ciencias de la salud

autoriza la solicitud del depósito de la misma, considerando que / *authorises the application to deposit this thesis, considering that*

Reúne todos los requisitos para la presentación, lectura y defensa de esta tesis.

Valladolid, a fecha de firma electrónica / *Valladolid, as of the date of the electronic signature*
(firma de todos los directores o directoras / *signature of all the directors*)

**PRESIDENCIA DE LA COMISIÓN DE TESIS DOCTORALES
PRESIDENT OF THE DOCTORAL THESIS COMMITTEE**

Las investigaciones que se describen en esta tesis han sido posibles gracias a la financiación por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; nº de concesión PI15/01451) y por la Gerencia Regional de Salud (Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León; nº de concesión 1255/A/16).

A mis hijas, Sofia y Blanca.

*“Me pregunto si las estrellas no estarán
iluminadas para que cada uno pueda
un día encontrar la suya”*

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me vienen a la mente cuando pienso en dar GRACIAS. Todas ellas han constituido peldaños de la escalera que me ha permitido llegar hasta aquí.

En primer lugar, a mis directores de tesis.

Eduardo, capitán de este barco, fuente incansable de proyectos, te estaré eternamente agradecida por tu infinita paciencia, por creer en mí, aun cuando yo no lo hacía, mientras permanecía “pensando en debutar”; por estar disponible siempre que te he necesitado. GRACIAS por brindarme la oportunidad de ser doctora con esta maravillosa investigación.

Emilio, gracias por tu entusiasmo y dedicación; por enseñarme que hay un inmenso mundo, que antes desconocía: la bioinformática.

María, hace muchos años que echo de menos verte. Gracias por estar al otro lado del teléfono en todas mis llamadas. No sólo he de agradecer tu ayuda con esta tesis, sino también, tus enseñanzas en el mundo de la anestesiología.

Gracias Pedro, porque has sido un pilar básico para que estas investigaciones vean la luz.

Lucía, parte fundamental del trabajo de laboratorio; gracias por tu amabilidad y dedicación.

Gracias Raquel por ser guía en mis comienzos, por sumergirme en el mundo de la transcriptómica y por tus pautas para afrontar una tesis.

Gracias a todos los miembros del grupo Biocritic, siempre entregados a la mejora del conocimiento.

Gracias a mis compañeros del servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Han sido 10 años maravillosos y a la vez duros, en los que me he formado como profesional, capaz de alcanzar todas las metas que hasta ahora me he propuesto. Volveré, os lo prometo.

Por supuesto, quiero dar las gracias a mi familia, a todos: abuelos, tíos, primos... por ser incondicionales; porque, literalmente, he estado media vida lejos de ellos, pero sintiéndolos siempre cerca. A mis padres, Miguel y Encarni; me brindasteis la mejor de las oportunidades, sacrificasteis todo por que yo llegara lejos, creo que lo habéis conseguido. Os quiero.

A mi familia política, por acogerme como una más. Por entender el estudio como un pilar fundamental en la vida. Sé que ellos también se sienten orgullosos de mis logros. Gracias Mercedes, por estar siempre dispuesta a todo. No sabes hacer otra cosa mas que ayudar a quien te lo pide. Sin ti, no hubiera terminado de escribir esta tesis.

Por último, y no menos importante, sino todo lo contrario, quiero agradecer a mi compañero de vida, mi marido, Fernando. Gracias por todos los sacrificios que has hecho para que yo pudiera llevar a cabo mis proyectos, imposible hacerlos sin tu ayuda. Por tu empeño, tus ideas, tus ilusiones, por animarme a creer que yo podía, por confiar siempre en mí. Te debo muchas, no sé si seré capaz. Gracias porque hemos formado una bonita familia, en la que nuestras hijas, Sofía y Blanca, son las protagonistas. Tengo que darle las gracias también a ellas, a quienes va dedicada esta tesis, por comprender que “mamá tiene que estudiar”. Espero saber trasmitiros que sólo con esfuerzo y dedicación podréis llegar donde vosotras deseéis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Listado de abreviaturas	1
Índice de tablas	4
Índice de figuras	6
Resumen	9
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Reseña histórica.....	15
1.2. Definiciones de consenso.....	18
1.3. Epidemiología de la sepsis.....	23
1.4. Fisiopatología de la sepsis y el shock séptico.....	24
1.5. Biomarcadores en sepsis y shock.....	28
1.6. Escalas de gravedad en pacientes críticos.....	29
1.7. Estudio de los perfiles de expresión génica.....	33
2. JUSTIFICACIÓN	39
3. HIPÓTESIS	45
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivos principales.....	49
4.2. Objetivos secundarios.....	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Diseño del estudio.....	53
5.2. Microarrays expresión génica.....	56
5.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	61
5.4. Análisis estadístico.....	63

6. RESULTADOS	
6.1. Huella molecular diferencial entre shock séptico y shock no séptico.....	67
6.2. Huella molecular diferencial entre alto y bajo riesgo de mortalidad.....	79
7. DISCUSIÓN.....	90
7.1. Huella molecular diferencial entre shock séptico y shock no séptico.....	90
7.2. Huella molecular diferencial entre alto y bajo riesgo de mortalidad.....	94
7.3. Aplicación práctica.....	96
7.4. Limitaciones.....	97
8. CONCLUSIONES.....	101
9. BIBLIOGRAFÍA.....	105
10. ANEXOS	
9.1. Consentimiento informado.....	118
9.2. Artículos publicados.....	123

Abreviaturas

°C: grados centígrados.

µg: microgramos

A: adrenalina

a.C.: antes de Cristo

ACP: análisis de componentes principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Condition (escala de fisiología aguda y condición de salud crónica)

ARFRP1: Proteína relacionada con el factor de ribosilación ADP 1

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: trifosfato de adenosina

ATS: American Thoracic Society (Sociedad Torácica Americana)

AUC: área bajo la curva

ACCP: American College of Chest Physicians (Colegio Americano de Médicos del Tórax)

CALC-1: polipéptido relacionado con la calcitonina 1

CD177: molécula de CD177

DA: dopamina

DAMP: damage associated molecular patterns (patrones moleculares asociados peligro)

DBT: dobutamina

d.C.: después de Cristo

dl: decilitro

EE.UU.: Estados Unidos

ESICM: European Society of Intensive Care Medicine (Sociedad Europea de Medicina en Cuidados Intensivos)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos)

FiO²: fracción de oxígeno inspirado

GDE: genes diferencialmente expresados

HMG20B: Grupo de alta movilidad 20 B

IGHG1: Inmunoglobulina pesada constante gamma 1

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

IL1R2: receptor de interleucina tipo 2

INF: interferón

IRF7: factor regulador de interferón 7

HMGB1: High Mobility Group Box 1 (proteína de caja de grupo de alta movilidad 1)

INR: international normalized ratio (índice internacional normalizado)

K: potasio

Kg: kilogramo

kPa: kilopascales

l: litro

LCN2: lipocaína 2

lpm: latidos por minuto

LTF: lactotransferrina

mg: miligramo

Min: minuto

ml: mililitro

mmHg: milímetros de mercurio

mmol: milimoles

MMP: matriz metaloproteínasa

mm³: milímetro cúbico

m²: metro cuadrado

NA: noradrenalina

Na: sodio

OLFM4: olfactomedina 4

PaCO₂: presión arterial de dióxido de carbono

PaO₂: presión arterial de oxígeno

PAM: presión arterial media

PAS: presión arterial sistólica

PCR: proteína C reactiva

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCT: procalcitonina

PC: componente principal

PGE2: prostaglandina E2

PPI: interacción proteína-proteína

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

qSOFA: quickSOFA

RETN: resistina

ROC: característica operativa del receptor

rpm: respiraciones por minuto

RN7SK: ribonucleoproteína nuclear 7SK

SAPS: Simplified Acute Physiology Score (escala simplificada e fisiología aguda)

SCCM: Society of Critical Care Medicine (Sociedad Médica de Cuidados Críticos)

SD: standard deviation (desviación estándar)

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SIS: Surgical Infection Society (Sociedad de Infección Quirúrgica)

SNC: sistema nervioso central

SNS: shock no séptico

SOFA: The Sequential Organ Failure Assessment (evaluación secuencial de fallo de órgano)

SS: shock séptico

SvcO₂: saturación venosa central de oxígeno

TNFα: factor de necrosis tumoral alfa

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

WASH5P: Familia de proteínas WAS homóloga 5, pseudogen

WBC: white blood count (recuento de glóbulos blancos)

Índice de tablas

Tabla 1. Definiciones de sepsis según ACCP/SCCM 1991

Tabla 2. Criterios diagnósticos de sepsis 2001

Tabla 3. Sistema PIRO de estadificación

Tabla 4. Escala SOFA

Tabla 5. Criterios qSOFA

Tabla 6. Puntuación APACHE II

Tabla 7. Escala SAPS II

Tabla 8a. Cebadores usados para qRT-PCR de genes humanos (SS vs SNS)

Tabla 8b. Cebadores usados para qRT-PCR de genes humanos (mortalidad)

Tabla 9. Características pacientes Shock Séptico/Shock no séptico

Tabla 10. Área bajo la curva genes biomarcadores.

Tabla 11. Área bajo la curva en conjunto.

Tabla 12. Área bajo la curva en conjunto. Modelo de regresión

Tabla 13. Características clínicas de los pacientes

Tabla 14. Valores AUC para diferentes biomarcadores

Índice de figuras

Figura 1. Papiro de Ebers

Figura 2. Hipócrates

Figura 3. Girolamo Fracastoro

Figura 4. Microscopio Leeuwenhoek

Figura 5. Ignaz Semmelweis

Figura 6. Fisiopatología de la sepsis

Figura 7. Microcirculación

Figura 8. Metabolismo anaerobio

Figura 9. Expresión génica

Figura 10. Procesamiento de microarrays

Figura 11. Diseño del estudio (SS/SNS)

Figura 12. Diseño del estudio (mortalidad)

Figura 13. Tubos PAXgene

Figura 14. Bioanalizador de ARN Experion

Figura 15. Espectrofotómetro NanoDrop 1000

Figura 16. Sistema de escáner de microarrays de Agilent Technologies

Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP)

Figura 18. Análisis log-fold change

Figura 19. Volcano plot

Figura 20. Gráfico de mapa de calor de genes de interés

Figura 21. Enriquecimiento biológico funcional

Figura 23. Curvas ROC genes biomarcadores (análisis de los genes de forma individual)

Figura 24. Curva ROC genes biomarcadores (modelo de regresión logística)

Figura 25. Curva ROC procalcitonina

Figura 26. Curva ROC PCR

Figura 27. Curva ROC Neutrófilos

Figura 28. Curva ROC en conjunto

Figura 29. Modelo de regresión logística: IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8, OLFM4, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina

Figura 30. Modelo de regresión logística: procalcitonina, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina

Figura 31. Modelo de regresión logística: proteína C reactiva, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina

Figura 32. Modelo de regresión logística: neutrófilos, edad, sexo, urgencias y bilirrubina

Figura 33. Modelo de regresión logística: comparación

Figura 34. Gráfico de mapa de calor de genes de interés

Figura 35. Análisis log-fold change

Figura 36. Gráfica volcano plot

Figura 37. Red PPI de los GDE entre supervivientes y no supervivientes

Figura 38. Gráfica de Kaplan-Meier

Figura 39. Niveles relativos de ARNm de LCN2, RETN, MMP8 y CD177 en pacientes con shock posquirúrgico (supervivientes y no supervivientes), medidos por qRT-PCR

Figura 40. Curvas ROC GDE

Figura 41. Regresión multivariante

Resumen

Introducción:

La sepsis se define como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. Habitualmente, se complica con disfunción de órgano, dando lugar, en su forma más extrema, al shock séptico. Éste último, puede presentar las mismas características clínicas que el shock debido a otra etiología, sin poder diferenciar el origen séptico ante un mismo cuadro clínico.

La sepsis constituye un importante problema de salud a nivel mundial, con una elevada incidencia en países desarrollados, lo que supone un gran gasto de recursos sanitarios. Su mortalidad es elevada, puede rondar el 30%, alcanzando valores aún mayores cuando se presenta en estado de shock (50-60%), siendo la principal causa de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos. La sepsis se considera como una “enfermedad tiempo dependiente”, ya que el retraso en su tratamiento disminuye las probabilidades de supervivencia. Por este motivo, las investigaciones para desarrollar herramientas de diagnóstico precoz han sido constantes. Tradicionalmente, se han utilizado marcadores como la procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (PCR) y niveles de leucocitos en sangre para su diagnóstico, pero no son específicos de infección.

Así pues, el primer objetivo de este trabajo es evaluar la existencia de genes diferencialmente expresados entre pacientes con shock séptico y aquellos que presentan shock de otra etiología, con el fin de poder identificar biomarcadores que nos ayuden al diagnóstico de sepsis en este tipo de pacientes.

Por otro lado, se pretende estudiar la probabilidad de supervivencia de pacientes con shock posquirúrgico. Hoy en día se emplean diversas escalas como APACHE II o SOFA. Son sistemas basados en datos clínicos, sin tener en cuenta los cambios a nivel molecular, y su aplicación depende de los criterios de los médicos de la UCI. El desarrollo de pruebas que evalúen cambios moleculares a través del análisis de patrones de transcripción, podría mejorar la predicción de mortalidad en estos pacientes. Por tanto, el segundo objetivo de este estudio es identificar los patrones de expresión génica que puedan estratificar a los pacientes con shock postquirúrgico en pacientes con alto o bajo riesgo de mortalidad.

Material y Métodos:

El estudio se realizó con pacientes postquirúrgicos del Hospital Clínico Universitario de Valladolid que presentaban shock de cualquier etiología.

Se dividió a los pacientes de una primera cohorte en dos grupos: shock séptico y shock no séptico y se estudiaron sus perfiles de expresión génica mediante el análisis de microarrays. Los datos se verificaron en una segunda cohorte con pacientes de las mismas características, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados obtenidos se compararon con los biomarcadores clásicos utilizados en el diagnóstico de sepsis (PCT, PCR y neutrófilos), mediante el análisis de curvas ROC. Con el fin de mejorar el área bajo la curva (AUC), se realizó un modelo de regresión incluyendo las variables de ajuste sexo, edad, cirugía urgente y niveles sanguíneos de neutrófilos y bilirrubina.

En segundo lugar, se seleccionaron los pacientes de la cohorte descubrimiento que presentaban un lactato mayor de 2 mmol/L, parámetro definitorio de shock. Y se dividieron en dos grupos según su mortalidad a los 30 días del diagnóstico: supervivientes y no supervivientes. Del mismo modo, se analizó la huella transcriptómica de estos pacientes mediante microarrays, confirmando los resultados obtenidos en una segunda cohorte de validación a través de qRT-PCR. La sensibilidad y especificidad de los genes obtenidos se cuantificaron mediante el análisis de curvas ROC, comparándolas con las que presentaban las escalas clásicas de riesgo de mortalidad. Se realizó un modelo de regresión en el que se incluyeron las siguientes variables: urgencia, sexo, edad y niveles sanguíneos de creatinina, bilirrubina, lactato y leucocitos, con lo que se consiguió mejorar el AUC del conjunto de genes diferencialmente expresados (GDE).

Resultados:

De la comparación entre pacientes con shock séptico y shock no séptico se obtuvieron seis GDE, cuyas AUC derivadas del análisis ROC fueron las siguientes: 0.797 (IGHG1), 0.719 (LTF), 0.698 (OLFM4), 0.677 (LCN2), 0.637 (MMP8) y 0.632 (IL1R2). Estos valores resultaron mejores que las que presentaron los biomarcadores clásicos PCT (0.598), PCR (0.692) y neutrófilos (0.613)

Los genes IL1R2, CD177, RETN y OLFM4 se sobreexpresaron en los pacientes del grupo de no supervivientes en comparación con el de supervivientes. Del análisis ROC se obtuvieron AUC de 0.653, 0.669, 0.739 y 0.782 para IL1R2, CD177, RETN y

OLFM4 respectivamente, con mejores valores que para las escalas APACHE II (0,647) o SOFA (0,580).

Conclusiones:

La huella molecular diferencial entre pacientes con shock séptico y pacientes con shock no séptico constituye una buena herramienta de diagnóstico de sepsis en pacientes posquirúrgicos, con mejores resultados que los que ofrecen los marcadores tradicionales PCT, PCR y neutrófilos.

Se han identificado biomarcadores basados en patrones de transcripción capaces de clasificar a los pacientes con shock postquirúrgico en grupos de alto o bajo riesgo de mortalidad, con mayor precisión que las escalas clásicas APACHE II y SOFA.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Breve reseña histórica

La primera referencia al concepto de sepsis se encontró en el *Papiro de Ebers*, uno de los tratados médicos más antiguos conocidos hasta la fecha, que data del año 1600 a.C. ⁽¹⁾ (Figura 1). En él se describe una de las *fuerzas enfermantes* (“*whdw*”) que en condiciones de normalidad se encuentra en el intestino y en determinadas circunstancias puede “pasar” a la sangre y al resto del cuerpo y producir una serie de síntomas entre los que se encuentra la supuración y la fiebre.

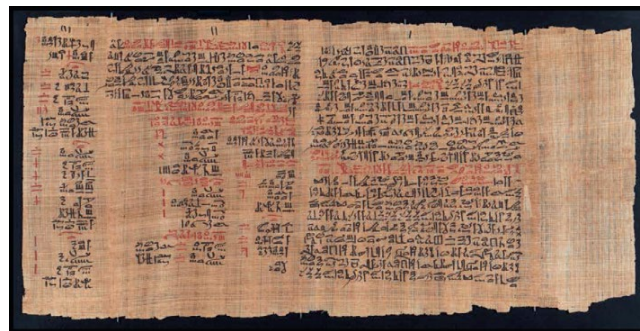


Figura 1. Papiro de Ebers ⁽²⁾

En la Antigua Grecia, el concepto de sepsis se generalizó entre los médicos de la época, y cobró tanta importancia que el propio Homero hizo referencia a ella en *La Ilíada*. Es entonces cuando aparece la palabra *sepsis*, aludiendo a la “*descomposición de la materia orgánica vegetal o animal en presencia de bacterias*” ⁽³⁾. Hipócrates (460-370 a.C.) la define como “*el proceso de decaimiento y muerte que se asocia con la enfermedad, la putrefacción y el mal olor*” ⁽⁴⁾. (Figura 2)

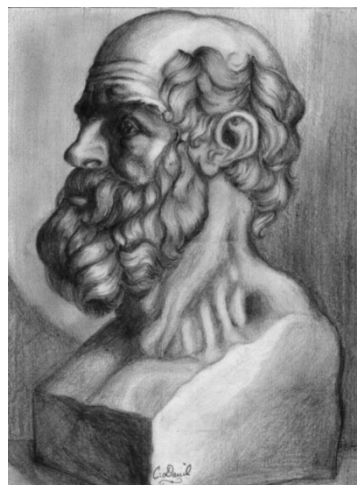


Figura 2. Hipócrates ⁽⁵⁾

Los médicos del imperio romano heredaron gran parte de la sabiduría griega, poniendo en práctica sus teorías y remedios ⁽⁶⁾. En esta época, Aulus Cornelius Celsus (25-50 d.C.) describió los cuatro signos cardinales de la inflamación: calor, rubor, dolor y tumor ⁽⁷⁾.

Tras el auge de la medicina romana, recogieron el testigo los árabes. Médicos como Hunain, Avicena, Rhazes y Averroes fueron acumulando y traduciendo textos clásicos que servirían de referencia durante toda la Edad Media. Durante este periodo, los avances en el conocimiento de la sepsis fueron escasos, debido a la creencia de que la salud estaba relacionada con lo sagrado y la enfermedad se debía a fuerzas oscuras ⁽⁸⁾.

A comienzos del siglo XVII, el médico y poeta italiano Girolamo Fracastoro (1476-1553) describió lo que hoy conocemos como *contagio*, aunque en su época, este descubrimiento tuvo poca relevancia, ya que no podía demostrar la etiología del contagio ⁽⁹⁾. (Figura 3)



Figura 3. Girolamo Fracastoro ⁽¹⁰⁾

En 1676, Antonie van Leeuwenhoek, describió formas de vida microscópicas utilizando un microscopio de una sola lente creado por él mismo, gracias a los trabajos previos de Zacharias Janssen y Galileo, que ya habían dado lugar a este instrumento. (Figura 4)



Figura 4. Microscopio Leeuwenhoek ⁽¹¹⁾

John Pringle (1740-1780) fue el primero en hacer observaciones sobre las infecciones nosocomiales. Además, defendió la teoría del contagio como responsable de ellas e introdujo el término *antiseptia* ⁽¹²⁾.

En el siglo XIX, gracias a los aportes de Lister, Semmelweis, Pasteur y Koch se produjeron grandes avances en el origen de la sepsis tal como la conocemos hoy en día. Se rechazó por completo la teoría de la generación espontánea de las enfermedades infecciosas y se aceptó la existencia de microorganismos como su única causa ⁽¹³⁾.

El obstetra Ignaz Semmelweis (1818-1865) estudió la fiebre puerperal en el Hospital de Viena. Observó que la tasa de infección de los partos que tenían lugar en la primera división del Hospital era mayor que los que se atendían en la segunda división. Esto era debido a que, en la primera, los partos se realizaban por estudiantes de medicina, que previamente habían practicado autopsias sin el empleo de guantes, mientras que, en la otra zona, los llevaban a cabo las parteras. A partir de estas observaciones, introdujo el lavado de manos como media de asepsia, disminuyendo notablemente la mortalidad ^(14,15). (Figura 5)

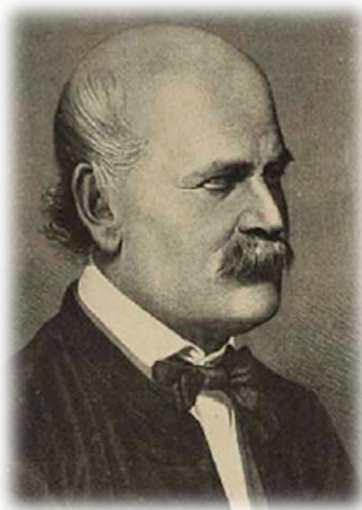


Figura 5. Ignaz Semmelweis ⁽¹⁶⁾

En esta época se produjo un crecimiento exponencial de los procedimientos quirúrgicos, motivados, en parte, por el desarrollo de los fármacos anestésicos. Con este aumento del número de intervenciones quirúrgicas se observó un incremento paralelo en la incidencia de la sepsis ^(13, 14).

En el siglo XX se produjo una revolución en el tratamiento de las infecciones gracias al desarrollo de los primeros antibióticos. En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina de manera fortuita, siendo galardonado con el Premio Nobel en 1945, junto con Florey y Chain, por sus trabajos en el campo de los antimicrobianos ⁽¹⁵⁾.

De forma casi simultánea, durante este periodo se desarrollaron grandes avances en la fisiopatología de la sepsis. Se comenzó a hablar sobre la implicación de citocinas como el TNF- α o la IL-1, el sistema de coagulación, endotoxinas, el complemento...⁽¹⁷⁾.

Todo ello contribuyó a desarrollar el interés no sólo por el control del foco de infección mediante el empleo de antibióticos, sino también de la respuesta sistémica del huésped a esta agresión.

1.2. Definiciones de consenso

En 1991 se celebró la primera Conferencia de Consenso entre el Colegio Americano de Médicos del Tórax y la Sociedad Médica de Cuidados Críticos (ACCP/SCCM 1991), en la que se definió la sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) debido a una infección. Además, se describieron los conceptos de sepsis grave, shock séptico y fallo multiorgánico ⁽¹⁸⁾. (Tabla 1)

Tabla 1. Definiciones se sepsis según ACCP/SCCM 1991 ⁽¹⁸⁾
<p>SIRS Dos o más criterios: Temperatura > 38 ° C o <36 ° C Frecuencia cardíaca > 90 / min Frecuencia respiratoria > 20 / min o PaCO₂ <32 mm Hg (4,3 kPa) Recuento de leucocitos > 12 000 / mm³ o <4000 / mm³ o > 10% de bandas inmaduras</p>
<p>Sepsis: Dos o más criterios de SIRS causados por una infección confirmada o sospechada</p>
<p>Sepsis grave: sepsis que conlleva disfunción de órgano, hipotensión o signos de hipoperfusión, como acidosis láctica, oliguria o alteración grave del estado mental.</p>
<p>Shock séptico: sepsis con hipotensión persistente a pesar de la reposición adecuada con líquidos, que requiere el empleo de vasopresores, y que se acompaña de signos de hipoperfusión periférica.</p>
<p>Fallo multiorgánico: Presencia de disfunción orgánica en paciente con patología aguda cuya homeóstasis no puede ser mantenida sin intervención</p>

Diez años más tarde tuvo lugar una segunda reunión de expertos, la *Conferencia Internacional de Definiciones de Sepsis 2001* en la que participaron la Sociedad de Medicina en Cuidados Críticos (SCCM), La Sociedad Europea de Medicina en Cuidados Intensivos (ESICM), El Colegio Americano de Médicos del Tórax (ACCP), La Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad de Infección Quirúrgica (SIS). Su objetivo fue la de revisar y actualizar los criterios establecidos en la Conferencia de 1991.

Se validaron los conceptos de *sepsis*, *sepsis grave* y *shock séptico* que se definieron en 1991. El término *SIRS* se mantuvo en vigor, pero se cuestionó su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de sepsis, de tal modo que se ampliaron sus criterios⁽¹⁹⁾. (Tabla 2)

Tabla 2. Criterios diagnósticos de Sepsis ⁽¹⁹⁾
Infección documentada o sospechada y alguno de los siguientes factores:
Parámetros generales: <ul style="list-style-type: none"> - Fiebre (temperatura corporal > 38°C) - Hipotermia (temperatura corporal < 36°C) - Frecuencia cardiaca > 90 lpm o > 2 SD sobre el valor normal según edad. - Taquipnea (> 30 rpm) - Alteración del estado mental - Edema significativo o balance positivo de fluidos (> 20 ml/kg en 24 horas) - Hiperglucemia (glucosa plasmática > 110 mg/dl o 7,7 mmol/l) en ausencia de diabetes
Parámetros inflamatorios: <ul style="list-style-type: none"> - Leucocitosis (recuento de células blancas, WBC, > 12000/ml) - Leucopenia (recuento de células blancas, WBC, < 4000/ml) - WBC normal con > 10% de formas inmaduras - Proteína C reactiva en plasma >2 SD sobre el valor normal - Procalcitonina en plasma >2 SD sobre el valor normal
Parámetros hemodinámicos: <ul style="list-style-type: none"> - Hipotensión arterial (PAS < 90 mmHg, PAM < 70, o disminución > 40 mmHg PAS en adultos o < 2 SD sobre la normal según edad) - Saturación de oxígeno venosa mixta > 70% - Índice cardiaco > 3,5 l/min/m² - Parámetros de disfunción de órgano - Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ < 300) - Oliguria aguda (producción de orina < 0,5 ml/kg/h) - Incremento de creatinina ≥ 0,5 mg/dl) - Alteraciones de la coagulación (INR > 1,5 o TTPA > 60 s) - Íleo (ausencia ruido intestinal) - Trombocitopenia (recuento plaquetas < 100000/ml) - Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total en plasma > 4 mg/dl o 70 mmol/l)
Parámetros de perfusión tisular: <ul style="list-style-type: none"> - Hiperlactacidemia (> 3 mmol/l) - Disminución del relleno capilar o moteado

Se destacó la importancia de que los criterios propuestos fueran útiles para un diagnóstico rápido en la práctica clínica, a pie de cama del paciente, y no como elementos para la investigación, y se planteó la utilidad de un sistema de estadificación para la sepsis, con el fin de mejorar el manejo de estos pacientes. Este sistema rudimentario de estadiaje, tenía en cuenta factores predisponentes del paciente, como su condición premórbida, enfermedades concomitantes y factores

genéticos, comenzándose ya a plantear para futuras investigaciones la existencia de polimorfismos genéticos en la sepsis y su relación con el riesgo de mortalidad en esta enfermedad ⁽¹⁹⁾. (Tabla 3)

P	Predisposición genética del paciente
I	Infección, dependiendo del agente causal, localización o extensión. O tiempo hasta inicio del tratamiento antibiótico
R	Respuesta inflamatoria del organismo que implica liberación de mediadores proinflamatorios y citoquinas que dan lugar a fallo orgánico.
O	Disfunción Orgánica como principal factor de mal pronóstico en pacientes sépticos.

Además de los factores predisponentes, el sistema *PIRO* de estadificación que se planteó, tenía en cuenta la naturaleza de la infección subyacente, la respuesta del huésped a la misma y el grado de disfunción orgánica resultante ⁽¹⁹⁾, que podía ser evaluado mediante la escala *SOFA* (Sequential Organ Failure Assessment score) ⁽²⁰⁾. (Tabla 4)

Variables	Puntuación SOFA				
	0	1	2	3	4
SNC* Escala Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Respiración PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	<400	<300	<200 ^a	<100 ^a
Cardiovascular Tensión arterial (PAM)	≥70mmHg	<70 mmHg	DA <5 o DBT ^b	DA 5,1-15 o A≤0,1 o NA ≤0,1 ^b	DA >15 o A ≥0,1 o NA ≥0,1 ^b
Coagulación Plaquetas (10 ³ /mm ³)	>150	<150	<100	<50	<20
Función hepática Bilirrubina (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
Función renal Creatinina (mg/dL) o flujo urinario (mL/día)	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 <500	>5,0 <200

*SNC= sistema nervioso central. ^aValores con soporte respiratorio. ^bDA= dopamina, DBT= dobutamina (a cualquier dosis), A= adrenalina, NA= noradrenalina. Agentes adrenérgicos administrados durante al menos una hora (dosis mcg/kg/min)

Años más tarde, debido a los avances en la patobiología, manejo y epidemiología de la sepsis ⁽²¹⁾, surgió la necesidad de evaluar y actualizar nuevamente las definiciones de sepsis y shock séptico, de tal modo que se llevó a cabo el Tercer Consenso Internacional para la Sepsis y Shock Séptico, al que se denominó como *Sepsis-3*, siendo el último celebrado hasta la fecha actual.

La sepsis fue definida como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección ⁽²¹⁾.

Debido a esta mortalidad intrínseca a cualquier paciente séptico, se consideró redundante el término *sepsis grave*, anteriormente acuñado, por lo que, a partir de entonces, quedó eliminado de las definiciones de sepsis. De tal modo, que desde ese momento sólo quedaron establecidos dos estados mórbidos en esta enfermedad: *sepsis* y *shock séptico*.

El shock séptico se presenta como el grado más extremo de gravedad de un paciente séptico, definido por la necesidad de vasopresores para mantener una presión arterial media (PAM) mayor o igual a 65 mmHg y un nivel de lactato sérico superior a 2 mmol/L (>18 mg/dL) en ausencia de hipovolemia ⁽²¹⁾.

Otro de los temas tratados en esta última Conferencia fue cómo detectar la disfunción orgánica en estos pacientes. Desde las definiciones de sepsis del año 2001, se extendió el uso de la escala SOFA para tal fin, pero requiere de datos de laboratorio no disponibles de forma inmediata y difíciles de manejar fuera del contexto de los cuidados críticos. Por ello, se planteó una nueva escala para la identificación clínica de pacientes sépticos fuera de las Unidades de Cuidados Intensivos, la escala quickSOFA (qSOFA), que considera que un paciente presenta disfunción orgánica si cumple 2 de los siguientes criterios: alteración del estado mental, presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg o frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm. (Tabla 5)

Tabla 5. Criterios qSOFA ⁽²¹⁾

Alteración del estado mental
Presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg
Frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm

1.3. Epidemiología

La sepsis constituye un importante problema de salud a nivel mundial. En la actualidad, debido a su elevada incidencia, conlleva gran gasto de recursos hospitalarios ⁽²²⁾ y supone para el paciente un aumento de la morbimortalidad.

La incidencia mundial de sepsis podría situarse en torno a 48,9 millones de casos al año ⁽²³⁾, aunque los datos de países de bajos ingresos son difíciles de esclarecer debido a la escasez de estudios epidemiológicos. En países con altos ingresos, entre los que se incluye el nuestro, se estima una incidencia de 300-480 casos por cada 100.000 personas ^(24,25). Esta cifra es superior a la registrada para patologías con importante impacto social en nuestro medio como son la insuficiencia cardíaca, el cáncer de mama, el cáncer de colon o el SIDA ^(26, 27).

De los pacientes ingresados en los hospitales de países desarrollados, un 2% va a desarrollar sepsis a lo largo de su estancia, de los cuales, más del 50% requerirá cuidados intensivos debido a esta patología ⁽²⁴⁾.

La sepsis constituye la principal causa de muerte en las unidades de cuidados intensivos (UCI) no coronarias de los hospitales de países desarrollados ^(24, 28). En un estudio realizado en 198 UCIs de 24 países europeos, se notificó una mortalidad del 27% en pacientes sépticos ⁽²⁴⁾.

La mortalidad anual atribuible a sepsis severa es de 135.000 casos en Europa y superior a 200.000 casos en Estados Unidos ^(29,30). Al año, se van a producir 17.000 fallecimientos en España a causa de la sepsis y 1.400 muertes diarias en todo el mundo, cifras que son superadas sólo discretamente por las muertes por infarto agudo de miocardio.

Por otra parte, el shock, de cualquier etiología, supone una complicación común en pacientes intervenidos de cirugía mayor y una causa de ingreso en UCI, con aumento de la gravedad de las enfermedades coexistentes, las intervenciones específicas de la UCI y la necesidad del incremento del número de camas de cuidados críticos ^(24,31,32). En España, se estima una incidencia de 31 casos por 100.000 habitantes y año para el shock de origen séptico, con una mortalidad superior a la de la sepsis, llegando a cifras de hasta el 50-60% ^(33,34).

En cuanto a los costes derivados del tratamiento de los pacientes sépticos y en situación de shock, se estiman en 16,7 billones de dólares anuales en Estados Unidos y 7,6 billones de euros en la Comunidad Económica Europea ⁽²⁹⁾. En España, el gasto anual de la asistencia a estos pacientes, podría suponer unos 345 millones de

euros⁽³²⁾. El estudio realizado por Álvaro-Meca y colaboradores a comienzos del siglo XXI, que incluyó 2.646.445 pacientes con sepsis ingresados en diferentes hospitales públicos españoles, declaró un coste hospitalario medio por paciente de 9.090 euros⁽³¹⁾.

Atendiendo a la epidemiología de diversos estudios de pacientes sépticos, los microorganismos más frecuentemente aislados en los cultivos positivos son bacterias gramnegativas, seguidas de grampositivas, hongos y, en un porcentaje no despreciable, nos encontramos pacientes con infecciones polimicrobianas^(35, 36).

Según un estudio realizado por Vincent y colaboradores en el año 2017, en el que se incluyeron pacientes ingresados en UCIs de 88 países, en el 67% de pacientes con cultivos positivos, se aislaron microorganismos gramnegativos, en el 37% se identificaron grampositivos y en el 16% hongos. Entre los gramnegativos, las bacterias más frecuentes fueron *Klebsiella* spp. (27%), *Escherichia coli* (25%), *Pseudomona* spp. (24%) y *Acinetobacter* spp. (17%). En los pacientes con cultivos grampositivos, se aisló *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en un 5%⁽³⁷⁾.

1.4. Fisiopatología de la sepsis y del shock séptico

La sepsis es un síndrome que comienza con una infección desarrollada por un microorganismo que invade al huésped^(38, 39, 40). Su mecanismo fisiopatológico es complejo, y diversas teorías han intentado explicar los fenómenos que ocurren en esta enfermedad.

El modelo clásico o microbiológico considera que es la propia infección la causante de todas las alteraciones que se producen en el huésped. El microorganismo presente en un foco primario, como puede ser el abdomen o el pulmón, se replica y libera toxinas de características antigénicas capaces de estimular la liberación por parte del huésped de mediadores endógenos (TNF- α , IL-1, IL-6, HMGB1, PGE2, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos...) que originan la respuesta inflamatoria que va a desembocar en daño celular y disfunción de órgano⁽⁴¹⁾.

El modelo inmunológico defiende que, tras el desarrollo de una infección, se desencadena una respuesta inflamatoria en el huésped que es capaz de ser controlada, eliminando así los microorganismos patógenos y sus toxinas. Pero si esta respuesta es insuficiente a nivel local se torna excesiva y aparece un estado de inflamación sistémico que se vuelve independiente de la infección inicial y es el responsable de la disfunción de órgano que aparece en la sepsis, siendo la propia

respuesta del organismo a la infección la que origina los problemas que aparecen en el paciente séptico y su mortalidad, y no el microorganismo por sí mismo, como se creía en un principio ⁽⁴¹⁾.

Sin embargo, la teoría del desarrollo de una inflamación excesiva, no explica por sí misma todos los fenómenos que acontecen en la sepsis ⁽⁴²⁾. Los mecanismos que ocurren a nivel celular son extremadamente complejos; además de un desequilibrio en la respuesta inflamatoria y un estado de inmunosupresión en el huésped, va a producirse daño mitocondrial, coagulopatía, anomalías de la red inmunitaria neuroendocrina, estrés del retículo endoplásmico, fenómenos de autofagia y otros procesos fisiopatológicos que van a desembocar en disfunción orgánica ⁽⁴³⁾. (Figura 6)

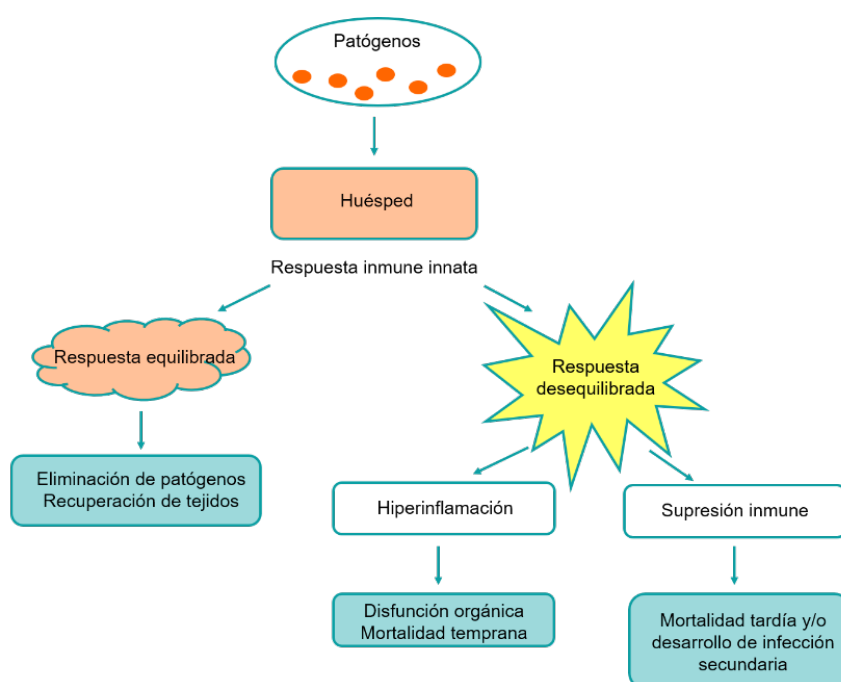


Figura 6. Fisiopatología de la sepsis ⁽⁴²⁾

La activación inmunitaria se inicia con la interacción entre el microorganismo agresor y el huésped, mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) ⁽⁴⁴⁾, dando lugar a la liberación de patrones moleculares asociados al peligro (DAMP) o alarminas.

Las alarminas son moléculas liberadas cuando se produce una lesión tisular, ya sea infecciosa o estéril, como un traumatismo o lesión quirúrgica, estimulando la activación de la inmunidad innata ⁽⁴²⁾. Este mecanismo sugiere que los fenómenos que producen daño orgánico en la sepsis, son similares a los que van a acontecer en la patología crítica de origen no infeccioso ⁽⁴⁵⁾.

Esta activación de la inmunidad innata produce una migración de los neutrófilos y macrófagos al lugar de la inflamación, donde reconocen y fagocitan patógenos, además de liberar diversas citocinas y mediadores proinflamatorios, como interleuquina (IL)-1, IL-6, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor regulador 7 de interferón (IFN) (IRF7) o proteína adaptadora (AP)-1 ⁽⁴⁶⁾. Asimismo, se estimula la producción de células T, que promueven aún más la movilización de macrófagos y participan en la secreción de otros mediadores inflamatorios que, ante una liberación masiva, provocan daño celular y fibrosis de tejidos ⁽⁴⁷⁾.

A su vez, se van a producir una serie de respuestas contrarreguladoras de la inflamación, que pueden conducir a un estado hipoinflamatorio. Uno de los mecanismos que contribuyen a la inmunosupresión inducida por sepsis, es la apoptosis celular, protagonizada por la pérdida de células efectoras del sistema inmune, como las células dendríticas y linfocitos T ^(48, 49).

El endotelio vascular juega un papel importante en la respuesta inmune, además de ser el órgano diana fundamental en la sepsis ⁽⁵⁰⁾. Los microorganismos patógenos interfieren con él por acción directa o indirecta a través de la inducción de factores endoteliales derivados del huésped en respuesta a una agresión externa. Los fenómenos principales de estas alteraciones se producen por una disminución de la disponibilidad al óxido nítrico a nivel molecular ⁽⁵¹⁾ y, a nivel celular, por la apoptosis de células endoteliales ⁽⁵²⁾. Se ha demostrado, a través de modelos experimentales, que este deterioro en la microcirculación afecta a la extracción de oxígeno capilar ⁽⁵³⁾, lo que constituye un elemento clave en la disfunción de órgano y mortalidad del paciente séptico ^(54, 55). Además, la pérdida de la barrera endotelial es la responsable de la extravasación de líquido intravascular al espacio intersticial, provocando la aparición de edema subcutáneo y en cavidades corporales y dando lugar a la hipovolemia que se produce en el paciente séptico ⁽⁵⁶⁾. (Figura 7)

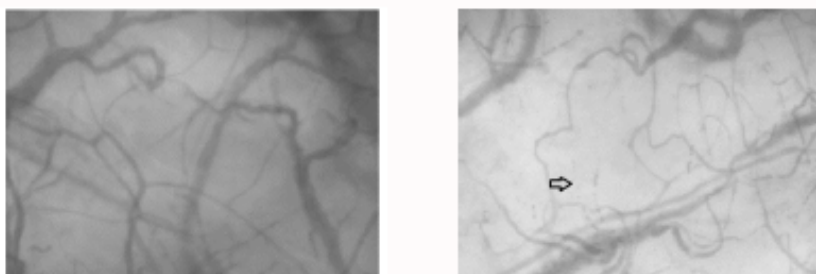


Figura 7. Alteraciones de la microcirculación ⁽⁴¹⁾

La inflamación excesiva produce alteraciones en la coagulación, que se inician a partir de la generación de trombina estimulada por el factor tisular expresado por los monocitos activados y el endotelio dañado. A su vez, los mecanismos anticoagulantes fisiológicos están inhibidos por la liberación de citocinas inflamatorias, principalmente IL-6 y TNF- α . Estos desequilibrios conducen a un estado procoagulante que favorece la aparición de microtrombos, y, consecuentemente, un deterioro aún mayor del estado de la microcirculación ⁽⁵⁷⁾. Por otra parte, la activación de los factores de la coagulación no sólo contribuye a las alteraciones hemostáticas que se producen en la sepsis, sino que, además, favorece los mecanismos que perpetúan la inflamación sistémica ⁽⁵⁸⁾.

El shock se produce como resultado de un aporte deficiente de oxígeno a los tejidos en el que intervienen diversos factores, siendo los más relevantes la hipotensión mantenida y la trombosis microvascular ⁽³⁸⁾. Si esta situación de hipoxia celular se perpetúa, el daño orgánico se hace irreversible y aumenta la mortalidad.

El metabolismo celular normal para la obtención de energía se realiza mediante glucólisis aerobia. En situaciones en las que la disponibilidad de oxígeno disminuye, se pone en marcha la glucólisis anaerobia, con disminución de la cantidad final de trifosfato de adenosina (ATP) y mediante la degradación de glucosa a piruvato y éste a lactato, produciéndose un aumento de lactato plasmático, siendo éste un signo de perfusión tisular inadecuada. Además de la hiperlactacidemia, se produce también un aumento en la concentración plasmática de hidrogeniones y otros productos del metabolismo anaerobio, llevando a una situación de acidosis metabólica. (Figura 8)

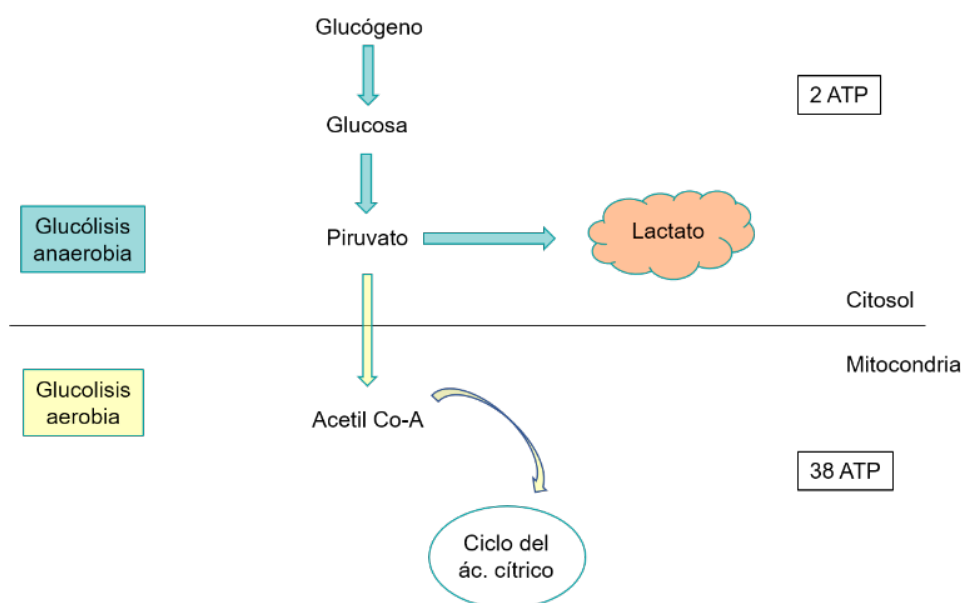


Figura 8. Metabolismo anaerobio ⁽⁵⁹⁾

1.5. Biomarcadores en sepsis y shock

La sepsis es considerada como una emergencia médica. Un retraso en el inicio del tratamiento conlleva un aumento considerable de la mortalidad ⁽²⁸⁾. Por este motivo, la evidencia científica actual resalta la importancia del diagnóstico precoz del paciente séptico, en el que una actuación temprana mejora de forma significativa la supervivencia ^(26,60). No obstante, en ocasiones es una patología difícil de identificar, puesto que sus manifestaciones clínicas no difieren de la de otras situaciones mórbidas, especialmente en pacientes postquirúrgicos, en los que se observa frecuentemente la aparición de una respuesta inflamatoria sistémica de origen no infeccioso.

Se han investigado multitud de biomarcadores con el fin de conseguir un diagnóstico precoz y certero del paciente séptico. Los marcadores clásicos más utilizados han sido la procalcitonina (PCT) y la proteína C reactiva (PCR) ^(61, 62), seguidos niveles de lactato y leucocitos en sangre. Actualmente, se ha propuesto el empleo de proadrenomedulina, presepsina o marcadores endoteliales, entre otros, pero los estudios disponibles presentan resultados contradictorios en cuanto a la utilidad para confirmar o descartar la presencia de sepsis por sí mismos ^(63, 64, 65).

Procalcitonina

La procalcitonina (PCT), hormona precursora de la calcitonina, es sintetizada por las células C del tiroides en condiciones fisiológicas y presenta unos niveles sanguíneos bajos en sujetos sanos (0,05 ng/mL). En el paciente séptico, el aumento de citocinas proinflamatorias estimula la expresión del gen CALC-1, localizado en el cromosoma 11 y responsable de la síntesis de procalcitonina, por lo que sus niveles aumentan al ser sintetizada por diversos tejidos del huésped, como hígado, pulmón, riñón, cerebro, intestino, piel, bazo, glándulas suprarrenales y páncreas ^(66, 67).

Constituye un marcador de infección utilizado habitualmente como guía para el inicio y duración del tratamiento antibiótico ⁽⁶⁸⁾, sin embargo, su aumento se puede observar también en otras circunstancias frecuentes en pacientes críticos: traumatismos, cirugía mayor, daño neurológico, fracaso renal... por lo que, en estos casos, no sería un marcador fiable para el diagnóstico definitivo de sepsis, debiendo ser interpretada junto a la historia clínica y los resultados microbiológicos ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

Proteína C reactiva (PCR)

La PCR es considerada como un reactante de fase aguda, liberada por el hígado tras la estimulación de citocinas proinflamatorias, especialmente por IL-6, IL-1 y TNF. Sus valores normales en individuos sanos son menores a 10 mg/l. Cuando se produce la agresión desencadenante del proceso inflamatorio en el huésped, sus niveles aumentan rápidamente, del mismo modo que lo hace cuando se resuelve el cuadro, por lo que es de gran utilidad para el control y seguimiento de patologías inflamatorias como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal ⁽⁷²⁾.

Frecuentemente, se utiliza para la detección de infección en pacientes médicos, aunque su rendimiento diagnóstico es menor que el de la PCT de forma aislada ⁽⁷³⁾.

Al igual que la PCT, los niveles sanguíneos de PCR se encuentran elevados en sangre por diferentes patologías no infecciosas, como traumatismo, isquemia, quemaduras, cirugía o enfermedades reumáticas, siendo un buen indicador de inflamación, pero no necesariamente de infección; por tanto, tampoco constituye una solución aplicable en la práctica clínica para el diagnóstico de sepsis en pacientes posquirúrgicos ^(74, 75).

Lactato

El lactato es un marcador de hipoperfusión tisular y, desde las últimas definiciones de sepsis, forma parte del diagnóstico de shock ⁽²¹⁾. Se ha demostrado que los niveles de lactato se correlacionan con la probabilidad de supervivencia, observándose una disminución de ésta con niveles mayores a 2 mmol/L de lactato en plasma ^(76, 77). Podemos tomarlo como marcador de utilidad pronóstica en cuanto a mortalidad ^(28, 75, 78), pero no como dato para la detección precoz de infección. Si bien, la hiperlactacidemia no es específica de un estado hipóxico; los niveles de lactato pueden elevarse también en otras situaciones con perfusión tisular adecuada, como, por ejemplo, en la disfunción hepática ⁽⁷⁹⁾.

1.6. Escalas de gravedad en pacientes críticos

Para el manejo de pacientes en las unidades de cuidados intensivos se han desarrollado diferentes escalas de gravedad, útiles como herramienta de valor pronóstico de mortalidad. Estos datos sirven como guía para enfocar los tratamientos, proporcionar información a familiares y enfermos y para la clasificación en estudios de investigación. Las más utilizadas, por su fiabilidad, son la “*Acute Physiology And*

Chronic Health Condition II” (APACHE II), la “Sequential Organ Failure Assessment” (SOFA) y la “Simplified Acute Physiology Score II” (SAPS II).

La escala APACHE II consta de 12 ítems que registran los peores valores de diversos parámetros fisiológicos obtenidos dentro de las primeras 24 horas de ingreso del paciente en la UCI, además tiene en cuenta la edad y la patología del enfermo. (Tabla 6)

Tabla 6. Puntuación APACHE II (80)																		
APS	4	3	2	1	0	1	2	3	4									
Temp. rectal (°C)	> 40,9	39,9-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	<30									
PAM (mmHg)	>159	130-159	110-129		70-109		50-69		<50									
FC (lpm)	>179	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<40									
FR (rpm)	>49	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<6									
Oxigenación																		
FiO ₂ > 0,5 (AaDO ₂)	499	350-499	200-349		>200													
FiO ₂ < 0,5 (PaO ₂)					<70	61-70		56-70	<56									
pH arterial	>7,9	7,60-7,69		7,50-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15									
Na plasma (mmol/L)	>179	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	<111									
K plasma (mmol/L)	>6,9	6,0-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		<2,5									
Creatinina (mg/dL)	>3,4	2,0-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6											
Hematocrito (%)	>59,9		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20									
Leucocitos (x1000)	>39,9		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1									
Suma de puntos																		
Total APS																		
15 - GCS																		
Enfermedad crónica	Edad		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Puntos APS (A)</th> <th>Puntos GCS (B)</th> <th>Puntos edad (C)</th> <th>Puntos enfermedad previa (D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Puntos APS (A)	Puntos GCS (B)	Puntos edad (C)	Puntos enfermedad previa (D)					<table border="1"> <tr> <td>Total de puntos APACHE II A+B+C+D =</td> <td></td> </tr> </table>		Total de puntos APACHE II A+B+C+D =	
							Puntos APS (A)	Puntos GCS (B)	Puntos edad (C)	Puntos enfermedad previa (D)								
Total de puntos APACHE II A+B+C+D =																		
Preoperatorio programado	2	<44	0															
		45-54	2															
		55-64	3															
Preoperatorio urgente o médico	5	65-74	5															
		≥75	6															

Temp. =+ temperatura; PAM= presión arterial media; FC= frecuencia cardiaca; FR: frecuencia respiratoria. Na = sodio; K=potasio

La escala SOFA fue descrita en un primer momento para evaluar el grado de fallo de órgano en el paciente séptico y, por tanto, su gravedad ⁽⁸¹⁾. Se calcula dentro de las primeras 24 horas de ingreso en UCI y cada 48 horas para la reevaluación del paciente. La puntuación obtenida presenta buena correlación con la probabilidad de fallecimiento, que aumenta si existe un incremento en la puntuación de las reevaluaciones frente al estadiaje en el ingreso. Posteriormente, se demostró que era de gran utilidad no sólo en sepsis sino en las diferentes patologías de los pacientes críticos, por lo que es actualmente la escala más utilizada para predecir disfunción orgánica en UCI ⁽⁸²⁾. (Tabla 4)

Tabla 4. Escala de Evaluación Secuencial de la Insuficiencia Orgánica					
(The Sequential Organ Failure Assessment, SOFA) ⁽⁸¹⁾					
Variables	Puntuación SOFA				
	0	1	2	3	4
SNC* Escala Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Respiración PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	>400	<400	<300	<200 ^a	<100 ^a
Cardiovascular Tensión arterial (PAM)	≥70mmHg	<70 mmHg	DA <5 o DBT ^b	DA 5,1-15 o A ≤0,1 o NA ≤0,1 ^b	DA >15 o A ≥0,1 o NA ≥0,1 ^b
Coagulación Plaquetas (10 ³ /mm ³)	>150	<150	<100	<50	<20
Función hepática Bilirrubina (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
Función renal Creatinina (mg/dL) o flujo urinario (mL/día)	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 <500	>5,0 <200

*SNC= sistema nervioso central. ^aValores con soporte respiratorio. ^bDA= dopamina, DBT= dobutamina (a cualquier dosis), A= adrenalina, NA= noradrenalina. Agentes adrenérgicos administrados durante al menos una hora (dosis mcg/kg/min)

La escala SAPS II se describió en 1993 siguiendo el modelo de la APACHE II para evaluar la gravedad del paciente al ingreso en UCI. Se puntúan las variantes de la normalidad de diversos datos fisiológicos y de laboratorio, medidos en las primeras 24 horas de su ingreso, así como la edad, el estado de salud previo y la causa del estado actual del paciente, sin reevaluaciones posteriores, como ocurre con la escala SOFA ⁽⁸³⁾. (Tabla 7)

Tabla 7. Escala SAPS II ⁽⁸³⁾								
Variable	Rango	Puntos	Variable	Rango	Puntos	Variable	Rango	Puntos
Edad (años)	<40	0	Escala de coma de Glasgow	14-15	0	Nivel de sodio (mEq/l)	< 125	5
	40-59	7		11-13	5		125-144	0
	60-69	12		9-10	7		≥ 145	1
	70-74	15		6-8	13	Nivel de bicarbonato (mEq/l)	< 15	6
	75-79	16		<6	26		15-19	3
	≥80	18		> 1	0		≥ 20	0
Tipo de admisión	Cirugía programada	0	Producción de orina (l/24h)	0,5- 0,99	4	Nivel de bilirrubina (mg/dl)	< 4	0
	Patología médica	6		< 0,5	11		4- 5,9	4
	Cirugía urgente	8	Recuento de glóbulos blancos (x/mm ³)	< 1000	12		≥ 6	9
Temperatura (°C)	< 39	0		1000- 19000	0	PaO ₂ /FiO ₂ (si ventilación mecánica) (mmHg)	< 100	11
	≥ 39	3		≥ 20000	3		100-199	9
Presión arterial sistólica (mmHg)	≥ 200	2	Nitrógeno ureico en sangre (mmol/l)	> 30	10		SIDA	≥ 200
	100-199	0		10- 29	6	Sí		17
	70-99	5		< 10	0	Carcinoma metastásico	No	0
	≤ 70	13		Nivel de potasio (mEq/l)	< 3		3	Sí
Ritmo cardíaco (lpm)	160	7	3- 4,9		0	Neoplasia maligna hematológica	Sí	10
	120-159	4	> 5		3		No	0
	70-119	0						
	40-69	2						
	< 40	11						

Estas escalas han sido evaluadas y se ha demostrado su buena discriminación; sin embargo, la fiabilidad de sus resultados se relaciona con la precisión de los datos obtenidos, que van a depender de la calidad de los procesos de la UCI, por lo que no siempre se realizan. Un estudio ha estimado su uso en UCIs de EEUU, concluyendo que tan sólo eran empleadas de rutina en el 10-15% de estas unidades ⁽⁸⁴⁾.

Otro inconveniente que presentan es que, al basarse únicamente en el uso de datos fisiológicos y clínicos, no tienen en cuenta los cambios a nivel molecular cuando existe fallo de órgano. Para dar respuesta a esta carencia, se ha propuesto la evaluación de perfiles de expresión génica como fuente para el descubrimiento de marcadores pronósticos ⁽⁸⁵⁾. Este elemento ha sido estudiado sobre todo en el campo de la oncología ^(86,87). En el contexto de los pacientes críticos, las investigaciones al respecto son menores, sin embargo, en los últimos años, algunos estudios realizados con pacientes sépticos correlacionaron las firmas de expresión génica con la insuficiencia orgánica y la mortalidad, lo que aporta resultados prometedores para el desarrollo de nuevas herramientas de evaluación pronóstica ^(88, 89, 90, 91).

1.7. Perfiles de expresión génica

La expresión génica es el proceso por el cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en el ADN en las proteínas necesarias para el desarrollo y funcionamiento celular. Esta conversión tiene lugar mediante una molécula intermediaria llamada ARN mensajero (ARNm), que codifica la información biológica. (Figura 9)



Figura 9. Expresión génica

La transcriptómica trata del estudio del ARN expresado por una célula o tejido en determinado momento, lo que permite identificar las proteínas que intervienen en las diferentes situaciones fisiopatológicas. Existen diversas técnicas dentro de este campo, entre las que se incluyen los microarrays y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Microarrays

El análisis de microarrays constituye una herramienta de diagnóstico molecular que nos permite el estudio de multitud de genes en un mismo tiempo. A través de ellos, se pueden medir el ARN o ADN expresado por una célula. Consiste en un portaobjetos de vidrio, denominado *chip*, el cual contiene en su base multitud de celdas con miles de sondas de oligonucleótidos, sobre los cuales se enfrenta el material genético objeto de estudio ⁽⁹²⁾.

El proceso comienza con el aislamiento del ARN mensajero (ARNm) de la muestra, debiendo evaluarse detenidamente la cantidad y calidad, puesto que se trata de un material muy frágil en el laboratorio. Debido a esta fragilidad, el ARNm se transforma en ADN complementario (ADNc) mediante transcriptasa inversa. Cuando el ADNc de la muestra, previamente marcado, es hibridado con la matriz de ADN que se encuentra

en el chip del microarray, emite luz fluorescente que puede ser detectada mediante un escáner específico. (Figura 10)

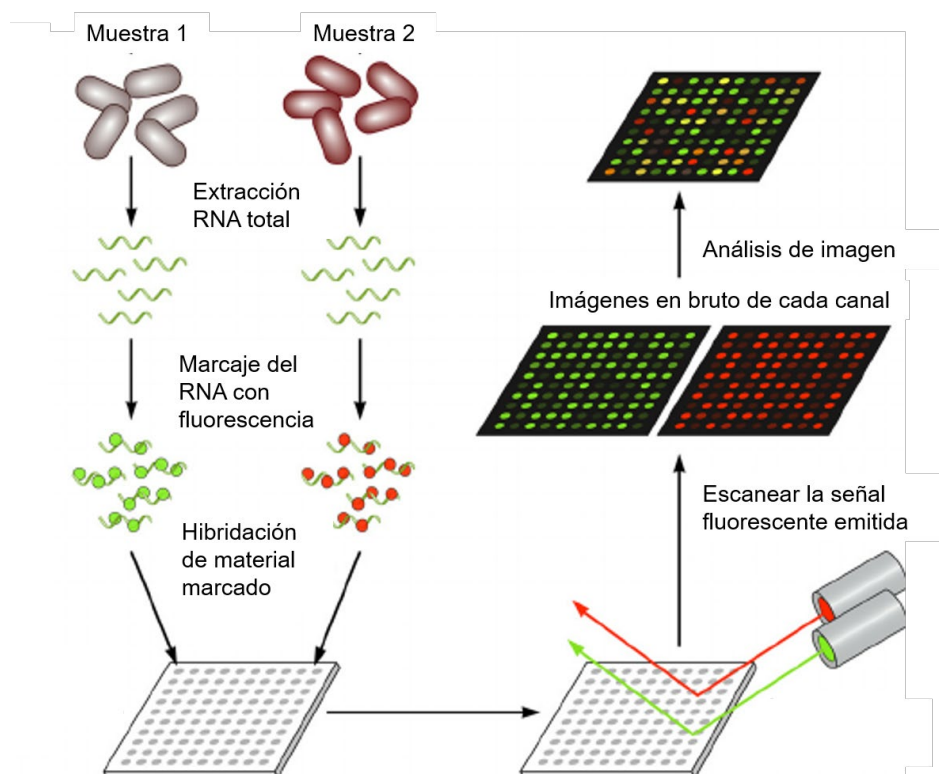


Figura 10. Procesamiento de microarrays ⁽⁹³⁾

Así podemos identificar las huellas moleculares expresadas en diferentes estados patológicos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en estudios oncológicos ⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾, y es una herramienta prometedora en otras áreas de la medicina como reumatología ⁽⁹⁸⁾ o cardiología ⁽⁹⁹⁾.

En pacientes con sepsis y shock, el estudio de los perfiles de expresión génica en sangre periférica mediante la tecnología de microarrays es empleado cada vez más para la realización de estudios fisiopatológicos destinados a identificar qué genes y funciones biológicas se encuentran alterados en estas situaciones ^(100- 102). Los datos obtenidos, acompañados del análisis bioinformático, los podemos utilizar para entender las diferencias a nivel molecular que se producen entre los diferentes grupos de pacientes según su clínica, o agruparlos por sus características moleculares, como uno de los estudios liderado por Wong en sepsis pediátrica, en el que clasifica a los pacientes con shock séptico en diferentes subtipos según sus perfiles de expresión génica ⁽¹⁰¹⁾.

El análisis mediante microarrays supone una aproximación inicial a perfiles de expresión génica. Para aumentar la robustez de los resultados, es conveniente realizar una segunda prueba de confirmación, como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRt-PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es otra técnica de diagnóstico molecular ampliamente utilizada en la rutina asistencial de laboratorios clínicos, desarrollada en la década de 1980 ^(103, 104). Tradicionalmente ha sido empleada para la detección de agentes infecciosos, sobre todo en el campo de la virología, pero su uso se extiende más allá y, desde la aparición de la PCR en tiempo real (qRT-PCR), es una técnica bien establecida para estudios de investigación génica ⁽¹⁰⁵⁾.

El proceso de amplificación y detección de ADN mediante *PCR convencional* consta de tres etapas: extracción y purificación de ADN de la muestra, amplificación de un segmento seleccionado mediante reacción en cadena de la polimerasa y, por último, detección del producto de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. El resultado proporciona una medición cualitativa, siendo positivo o negativo para un transcrito, pero no muestra la cantidad del mismo.

En la *PCR a tiempo real (qRT-PCR)*, los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea. Además, se utilizan sondas fluorescentes, lo que permite cuantificar durante la amplificación el ADN existente en cada momento, ya que la cantidad de fluorescencia emitida resulta proporcional a la de ADN sintetizado. La ventaja que nos proporciona la PCR a tiempo real no es sólo su mayor rapidez, si no que, al utilizar un sistema cerrado para toda la reacción, el riesgo de contaminación disminuye y tiene la capacidad de llevar a cabo diferentes ensayos en un mismo equipo ⁽¹⁰⁶⁾.

2. Justificación

2. JUSTIFICACIÓN

La sepsis es definida como una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. En su forma más extrema da lugar al shock séptico, caracterizado por la necesidad de vasopresores para mantener una presión arterial media mayor o igual a 65 mmHg y un nivel de lactato sérico superior a 2 mmol/L en ausencia de hipovolemia ⁽²¹⁾.

La sepsis supone un importante problema de salud a nivel mundial, debido a su elevada incidencia y mortalidad, incluso en países desarrollados, en los que conlleva un elevado gasto de recursos sanitarios ⁽³¹⁾. Constituye la principal causa de muerte de las unidades de cuidados intensivos no coronarias ^(28, 37). Sus niveles de mortalidad actualmente se mantienen bastante elevados, situándose en torno al 30% ^(37, 29, 30), cifra que se describe aún mayor cuando se presenta en estado de shock (50-60%) ^(33, 34), y que supera a la de patologías con importante impacto social en nuestro medio como el infarto agudo de miocardio, el accidente cerebrovascular, el cáncer de mama o el SIDA.

Está considerada como una “enfermedad tiempo dependiente”. Del mismo modo que ocurre con otras emergencias médicas, como el ictus o el infarto agudo de miocardio, el diagnóstico y tratamiento precoces mejoran de manera significativa la supervivencia y, por el contrario, un retraso en la aplicación de estas medidas, influye negativamente en los resultados ^(26, 28).

Los pacientes intervenidos de cirugía mayor, a menudo desarrollan un SIRS debido a la agresión quirúrgica, con manifestaciones clínicas similares a un paciente séptico. Además, durante el periodo perioperatorio pueden presentar shock de cualquier etiología.

El tratamiento de un paciente en estado de shock se basa principalmente en la resucitación hemodinámica guiada por objetivos, acompañada de estrategias protectoras de ventilación pulmonar, en el caso en el que la requiera, y de buen soporte nutricional. Además, en el shock séptico es crucial el control precoz de la infección y el tratamiento antibiótico adecuado. Sin embargo, distinguir entre el shock séptico y el shock no séptico a menudo resulta complicado, debido a que ambas situaciones presentan características clínicas similares. Como consecuencia de un diagnóstico erróneo, en muchas ocasiones, se emplea una terapia antimicrobiana de amplio espectro en pacientes en situación de shock no séptico, favoreciendo la proliferación de microorganismos multirresistentes y la aparición de complicaciones

derivadas del tratamiento, como, por ejemplo, reacciones alérgicas, daño renal, trombocitopenia, colonización por bacterias como *Clostridium difficile* o la temida aparición de resistencias a los antimicrobianos ⁽²⁸⁾.

A pesar de la gran importancia de llevar a cabo un diagnóstico precoz y certero del paciente séptico para implementar una terapia antibiótica temprana, en la actualidad todavía no existen herramientas diagnósticas de precisión para estas situaciones. Por este motivo, se han desarrollado multitud de investigaciones en búsqueda de marcadores específicos de sepsis.

El biomarcador que ofrece mejores resultados es la PCT, ya que sus niveles aumentan al inicio de la infección bacteriana. Su determinación está bien establecida en los laboratorios hospitalarios y se usa de manera rutinaria como guía para el inicio y duración de la terapia antimicrobiana ⁽⁶⁸⁾, sin embargo, sus niveles pueden encontrarse aumentados en otras patologías frecuentes en pacientes críticos, como en cirugía mayor, fracaso renal o traumatismos. Otros biomarcadores clásicos utilizados en el paciente séptico son la PCR o los niveles séricos de lactato y leucocitos, con peores resultados que la procalcitonina en cuanto a valor predictivo de sepsis, puesto que también se encuentran alterados en otras situaciones habituales, no aportando una solución aplicable en clínica a este problema diagnóstico ^(65, 69).

Todos estos marcadores, pueden presentarse elevados a causa de una agresión quirúrgica, por tanto, no son los más adecuados para diferenciar el origen del shock en pacientes intervenidos de cirugía mayor. Así pues, discriminar, según parámetros clínicos, entre shock séptico y no séptico, es todo un reto si no se dispone de las herramientas adecuadas.

El análisis de expresión génica en sangre periférica se ha revelado como un instrumento útil para identificar las alteraciones moleculares que ocurren en determinados estados patológicos. Esto ha llevado a investigar sobre la huella molecular de los pacientes sépticos, por lo que en los últimos años han aumentado las referencias sobre la búsqueda de biomarcadores en sepsis. Pero estos estudios se han limitado a analizar los diferentes perfiles transcriptómicos en el paciente séptico ^(88,107-109) y no existe comparación con pacientes que presenten características similares por otra patología. Así, con este trabajo se pretende obtener un patrón de diagnóstico molecular útil para la identificación de pacientes sépticos.

Por otra parte, el shock de cualquier etiología, tanto séptico como no séptico, sigue siendo una complicación frecuente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos tras someterse a una cirugía mayor. Es un síndrome clínico caracterizado por una perfusión tisular insuficiente para satisfacer las demandas metabólicas de los tejidos, dando lugar a hipoxia celular. Su mortalidad es mayor aún que la del paciente séptico ^(33, 34). Según un estudio realizado por Van Wagenberg y colaboradores en el año 2017, la causa más común de muerte en la UCI postquirúrgica fue el shock, incluido el shock séptico y el shock hipovolémico ⁽¹¹⁰⁾.

Para la valoración del estado de gravedad y de la probabilidad de mortalidad de pacientes críticos, se emplean diversas escalas cuyo valor pronóstico está bien documentado, como la “*Acute Physiology And Chronic Health Condition II*” (APACHE II), la “*Sequential Organ Failure Assessment*” (SOFA) y la “*Simplified Acute Physiology Score II*” (SAPS II). Estos sistemas de estadiaje, tienen en cuenta datos fisiológicos y clínicos del paciente, pero no evalúan las alteraciones a nivel molecular, y su aplicación va a depender de los criterios de los médicos de la UCI. Según el estudio de Breslow y Badawi, solo se utilizan de rutina en el 10-15% de las UCIs de EEUU ⁽⁸⁴⁾.

Así, el desarrollo de pruebas que evalúen cambios moleculares a través del análisis de patrones de transcripción, podría mejorar la predicción de mortalidad en estos pacientes. Por tanto, el segundo objetivo de este estudio es identificar los patrones de expresión génica que puedan estratificar a los pacientes con shock postquirúrgico como pacientes con alto o bajo riesgo de mortalidad.

3. Hipótesis

3. HIPÓTESIS

A través del análisis de perfiles de expresión génica en sangre periférica podemos obtener biomarcadores que ayuden en el diagnóstico diferencial entre pacientes con shock séptico y shock de otra etiología; así como realizar una estratificación pronóstica según su riesgo de mortalidad en pacientes con shock posquirúrgico.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos principales

- a) Identificar en los pacientes operados de cirugía mayor la huella molecular que diferencia el shock séptico del shock no séptico.
- b) Identificar los patrones de expresión genética que pueden distinguir entre el riesgo de mortalidad en pacientes con shock posquirúrgico.

4.2. Objetivos secundarios

- a) Comparar la capacidad de los genes propuestos para diferenciar los casos de shock séptico de los de shock no séptico frente a la de los biomarcadores clásicos PCT, PCR y leucocitos.
- b) Contrastar la eficacia de la expresión génica diferencial que discrimina a los pacientes con shock posquirúrgico según su riesgo de mortalidad con la de las escalas pronósticas tradicionales APACHE II y SOFA.

5. Material y Métodos

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional prospectivo, llevado a cabo con pacientes de la Unidad de Reanimación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid sometidos a cirugía mayor entre enero de 2014 y diciembre de 2018.

Para el estudio de nuestro primer objetivo, se recogieron muestras sanguíneas y datos clínicos de una primera cohorte, a la que llamamos *cohorte descubrimiento*, de 113 pacientes, de los cuales 80 presentaban shock séptico y 33 shock no séptico. En ella se evaluaron los niveles de expresión génica mediante el análisis de microarrays. Con el fin de comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos, se realizó un estudio mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), para la que se obtuvo una segunda cohorte, llamada *validación*, formada por 167 pacientes (108 diagnosticados de shock séptico y 59 de shock no séptico). (Figura 11)

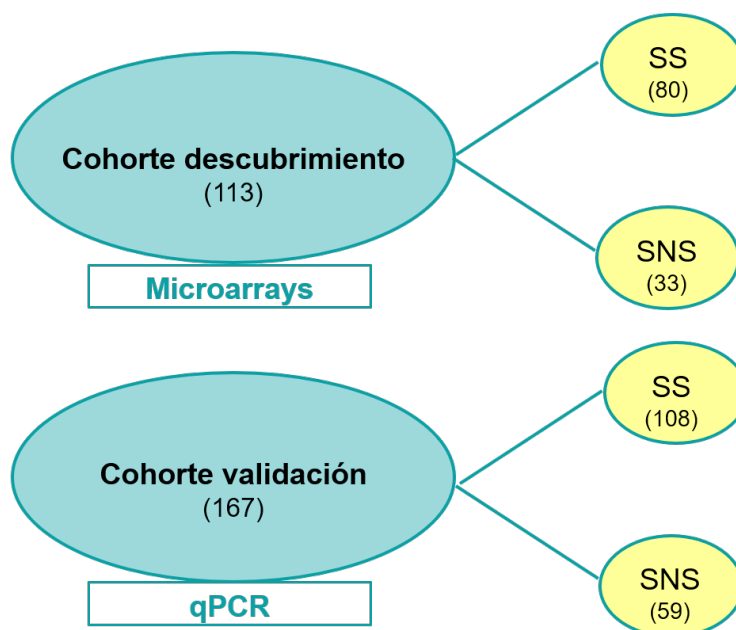


Figura 11. Diseño del estudio (SS/SNS)

Para el estudio de mortalidad, se seleccionaron únicamente aquellos pacientes con un valor de lactato en sangre igual o mayor a 2 mmol/L ⁽²¹⁾ en algún momento durante las primeras 24 horas del periodo postoperatorio. De la cohorte descubrimiento se obtuvieron 117 pacientes para el análisis de microarrays y de la cohorte validación se recopilaron 112 pacientes, para la confirmación de los resultados mediante qRT-PCR. El punto de corte de mortalidad se estableció en 30 días tras la intervención quirúrgica. (Figura 12)

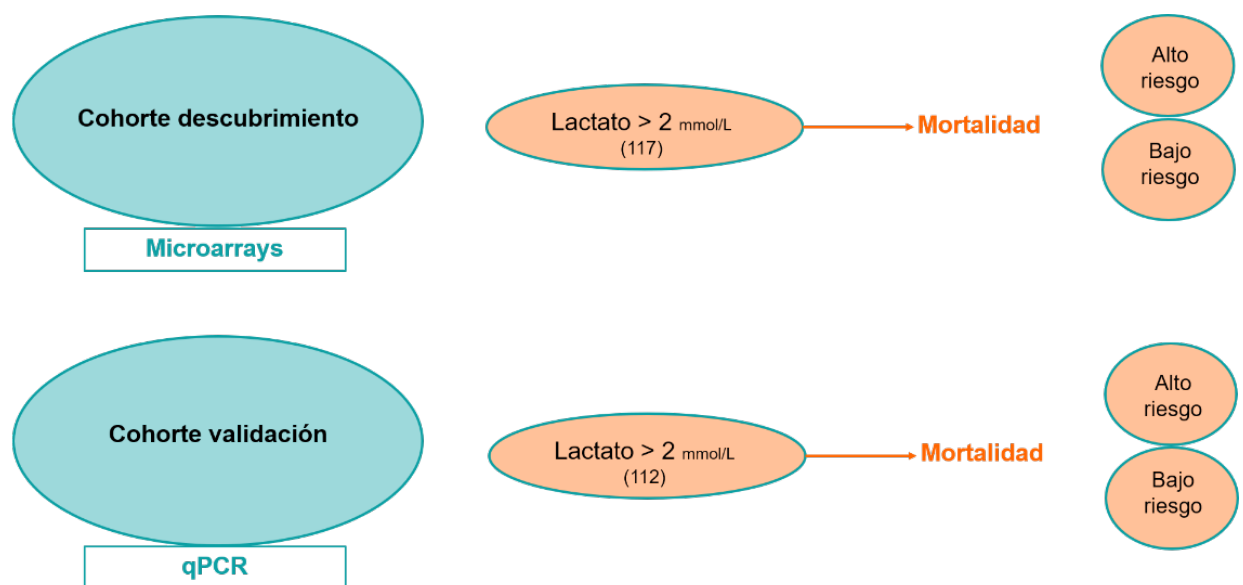


Figura 12. Diseño del estudio (mortalidad)

Para la normalización de los datos de expresión génica se reclutaron muestras de 15 voluntarios sanos del personal de la Universidad de Valladolid de edades similares a los pacientes incluidos en el estudio.

Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años ingresados en la Unidad de Reanimación tras someterse a cirugía mayor que desarrollaron shock de cualquier etiología durante el periodo postoperatorio.

Criterios de exclusión

Fueron excluidos del estudio pacientes de raza no caucásica, embarazadas, aquellos que no firmaron el consentimiento informado, los que fallecieron en las primeras 24 horas tras el diagnóstico y aquellos con diagnóstico de shock no séptico que desarrollaron infección confirmada durante la hospitalización.

Comité ético. Consentimiento informado

Siguiendo el código de ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki), se creó un protocolo de estudio de los aspectos científicos y éticos, con aprobación del Comité Científico para la Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. El consentimiento informado se obtuvo directamente de cada paciente antes de su inclusión en el estudio, o de un representante legal ante la imposibilidad de éste.

Recogida de muestras

En las primeras 24 horas tras el diagnóstico de shock, se recogió una muestra de 2,5 ml de sangre mediante tubos de extracción de sangre venosa PAXgene (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU). Los tubos PAXgene contienen una combinación de reactivos que estabiliza el ARN, protegiéndolo de la degradación por ARNasas y eliminando la inducción de expresión génica ex vivo ⁽¹¹¹⁾. (Figura 13)



Figura 13. Tubos PAXgene ⁽¹¹²⁾

Variables clínicas

De forma simultánea a la recolección de muestras sanguíneas, se recopilaban los datos clínicos a través de un cuestionario que incluía la historia clínica médica, la exploración física y pruebas complementarias como el estudio hematológico, bioquímico, radiológico y microbiológico.

Tratamiento

Las decisiones de tratamiento no fueron estandarizadas para todos los pacientes, sino que fueron tratados según los criterios de los médicos que habitualmente trabajaban en la Unidad de Reanimación, siguiendo los mismos protocolos que para el resto de pacientes ingresados en la Unidad.

Diagnóstico clínico y microbiológico

El diagnóstico de shock séptico se estableció según la *Tercera definición de consenso internacional para la sepsis y shock séptico (Sepsis-3)*. Para la definición de shock no séptico se siguieron las mismas directrices, demostrando la ausencia de infección ⁽²¹⁾.

Ante la sospecha de infección, se recogieron muestras biológicas que se enviaron al laboratorio de microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid para su análisis microbiano. Las muestras se trataron mediante tinción de Gram y cultivo en medios de uso general (agar-sangre, agar-chocolate y los diferentes medios de agar MacConkey y agar Chapman). Para el diagnóstico de infección fúngica, las muestras se cultivaron en agar Sabouraud. El aislamiento de microorganismos o la sospecha clínica de infección, sin la administración de antibióticos, no se consideró infección.

5.2. Microarrays expresión génica

El procesamiento de las muestras recogidas para el estudio de expresión génica mediante el análisis de microarrays se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Extracción del ARN total

La extracción del ARN total de las muestras sanguíneas se realizó desde los tubos PAXgene utilizando los equipos “PAXgene blood RNA kit” (PreAnalytix, Hombrechtikon, Suiza) siguiendo los protocolos del fabricante. La limpieza del ARN

extraído se llevó a cabo añadiendo ADNasa a la muestra para eliminar los restos de ADN. Se concentraron hasta 1750 ng de cada muestra de ARN con el kit de limpieza RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, obteniendo así ARN purificado, listo para ser utilizado en los siguientes procesos.

Evaluación de calidad y cantidad de ARN total

Las reacciones de amplificación del ARN pueden variar según el grado de integridad y pureza del ARN inicial. Por tanto, tras la extracción del ARN total, resulta imperativo evaluar la calidad del material, comprobando que no esté degradado ni contaminado con otras proteínas o restos de ADN. Dicha evaluación se realizó mediante el Bioanalizador de ARN Experion (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). (Figura 14)



Figura 14. Bioanalizador de ARN Experion

Además de comprobar la calidad del ARN obtenido tras la purificación, se determinó la cantidad con el espectrofotómetro de amplio espectro (220-270nm) NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU), que determina la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm. (Figura 15)

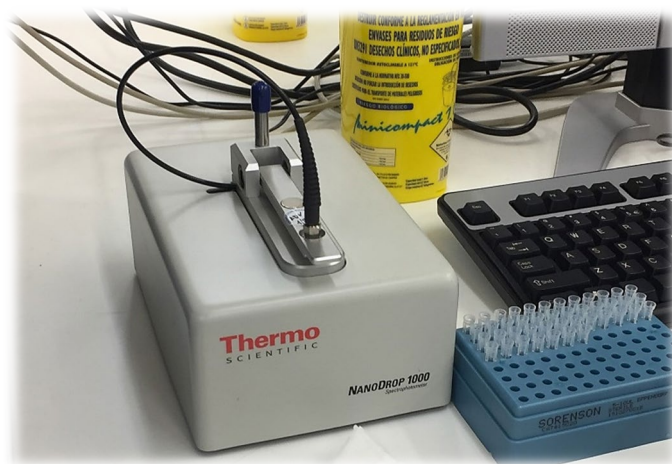


Figura 15. Espectrofotómetro NanoDrop 1000

Ambos pasos, resultan fundamentales para obtener unos resultados reproducibles y comparables en el análisis de microarrays de expresión génica. Así, los perfiles de expresión génica se evaluaron únicamente en aquellas muestras que presentaron una calidad y cantidad adecuadas.

Amplificación y marcaje de la muestra

El proceso de amplificación y marcaje se llevó a cabo usando el kit de etiquetado Quick Amp Labelling (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 100 µg de ARN total para producir ARN complementario (ARNc) marcado con una sustancia fluorescente, en nuestro caso cianina 3-CTP. Nuevamente, las muestras se purificaron con el kit RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo los mismos protocolos. Finalmente, el ARNc purificado, se almacenó a -80°C para su posterior utilización.

Preparación de la hibridación

Del mismo modo que se midió la cantidad del ARN de partida, fue necesario la cuantificación de ARNc purificado antes de llevar a cabo la hibridación de las muestras con los chips de expresión génica. Para ello volvimos a hacer uso del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU).

Hibridación

Siguiendo el protocolo de análisis de expresión génica basado en microarrays de un color, versión 5.7 (Agilent, Santa Clara, CA EE. UU.) ⁽¹¹³⁾, se hibridaron 3 µg de ARNc marcado con el kit de microarrays de genoma humano completo (GPL10487; Agilent, Palo Alto, CA EE. UU.). Cada array contiene 41.000 genes humanos únicos y sondas de transcripción diferentes, por lo que ofrece cobertura de todo el transcriptoma.

La técnica de hibridación de Agilent se basa en unas finas láminas de vidrio sobre las que se encuentran una serie de oligonucleótidos inmovilizados en microesferas localizadas sobre micropocillos en la superficie de la matriz. Sobre estas sondas se va a hibridar el ARNc marcado con cianina. La excelente calidad y reproductibilidad de este sistema se debe al gran número de sondas redundantes en cada array.

Procesado de la imagen y análisis de datos

Las matrices se escanearon en un sistema de escáner de microarrays Agilent G2565BA (Agilent, Wilmington, DE, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y los datos se extrajeron utilizando el software Agilent Feature Extraction versión 9.5.3 siguiendo el protocolo Agilent GE1-v5_95_Feb07 y el conjunto métrico QC GE1_QCMT_Jan08. (Figura 16)



Figura 16. Sistema de escáner de microarrays de Agilent Technologies

Los archivos de datos sin procesar se importaron al entorno de programación de R-Bioconductor utilizando la función `read.maimages` del paquete `limma`. Las sondas de repetición se agregaron por su valor medio. El preprocesamiento se continuó mediante la corrección de fondo utilizando el método `normexp` ('sillín') con un valor de compensación de 50. La normalización entre las matrices se realizó mediante el método cuantil. La matriz de expresión se resumió para un análisis posterior mediante la selección del decil superior de las sondas en variación.

El análisis de expresión diferencial entre pacientes con shock séptico y shock no séptico se continuó utilizando la función `lmFit` del paquete `limma` para obtener cambios de pliegue logarítmico entre ambos grupos. El enriquecimiento funcional de los genes más relevantes se realizó mediante ontología *Gene Ontology Biological Processes* (GO-BP).

Para el estudio de riesgo de mortalidad en pacientes con shock se realizó un procedimiento de agrupación en la matriz de expresión para definir grupos de pacientes (agrupación en columnas) y grupos de genes (agrupación de `rowwise`) de relevancia. La función de agrupamiento era `hclust` del paquete `stats` R usando la distancia euclidiana y el método de agregación `Ward.D2`. Los grupos de pacientes se compararon en términos de análisis de supervivencia. Realizamos la expresión diferencial en el análisis de la matriz de expresión utilizando la función `lmFit` del paquete `limma` para obtener cambios `logFold` de los genes que distinguirían mejor entre grupos de pacientes, suponiendo que

el grupo se realizaría como método de descubrimiento de clase. El grupo de genes más significativo fue validado funcionalmente mediante la entrada en el sitio web Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes versión 11 (STRING; Instituto Suizo de Bioinformática) para probar la interacción proteína-proteína significativa y el enriquecimiento de las etiquetas GO (Ontología Genética). Para el análisis de STRING, la puntuación de confianza de interacción media se estableció en 0,4 como un valor umbral.

El conjunto de datos de microarrays se ha depositado en el Omnibus de expresión génica de NCBI y se puede acceder a través del número de acceso de la serie GEO GSE131761 para el estudio de comparación entre shock séptico y shock no séptico, y GSE132897 para el estudio de mortalidad.

Los genes diferencialmente expresados (GDE) entre los grupos shock séptico y shock no séptico, así como los que se diferenciaban para la predicción de mortalidad, fueron probados en las cohortes de validación mediante qRT-PCR.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Para validar la fiabilidad de los datos obtenidos mediante análisis de microarrays, se seleccionaron una serie de genes en función de los cambios de pliegue y el valor p de microarrays, y sus niveles de expresión se evaluaron mediante qRT-PCR en la cohorte de validación. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Proteómica y Genómica de la Universidad de Lérida.

Para obtener el ADNc, se realizó la transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc avanzado iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando el ARN aislado de los pacientes. El ADNc se utilizó como plantilla en la qRT-PCR para evaluar el perfil de expresión de ARNm de los genes IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 y OLFM4, que se distinguían entre los grupos de shock séptico y shock no séptico tras el estudio de microarrays. Del mismo modo, para el estudio de mortalidad, se analizó el perfil de expresión de los genes IL1R2, CD177, RETN y OLFM4 en los grupos de pacientes supervivientes y no supervivientes.

qRT-PCR se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando PrimeTime® Gene Expression Master Mix y las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos y 45 ciclos de

desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos; recocido y alargamiento a 62 °C durante 15 segundos.

El gen de actina se empleó como gen de referencia para la normalización de los datos, y se compararon los patrones de expresión génica obtenidos por qRT-PCR entre los grupos de pacientes con shock séptico y shock no séptico, y los patrones de expresión diferencial entre supervivientes y no supervivientes.

Las secuencias de los cebadores para los genes seleccionados se enumeran en las Tablas 8a y 8b. En el caso de los genes IGHG3, IGHG2, IGHA1 e IGHA2, se diseñó un par de cebadores para amplificar todas las clases de IgG.

Tabla 8a. Cebadores usados para qRT-PCR de genes humanos (SS vs SNS)			
Gen	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')	Eficiencia
<i>Actina</i>	CCTTGACATGCCGGAG	ACAGAGCCTCGCCTTTG	87.2%
<i>IGHG1</i>	ACGGCGTGGAGGTGCATAATG	GTTGGAGACCTTGCACCTTGTACTC	96.9%
<i>IL1R2</i>	GCATCTGTATTCTCAAAAACCTCTGA	GGTGCTCTGTGGCTTCTG	96.9%
<i>LCN2</i>	TCTCCCAGCTCCCTCAATG	AACTTCATCCGCTTCTCCAA	97.2%
<i>LTF</i>	CTGCAAGACAGTGACATCTTTC	TCTGTGCTCTGTGTATTGGC	94.3%
<i>MMP8</i>	GCATCAACTTTACTCTCTATTCCCTG	CATACTTCTTTGTAAATGACCAATTCTG	94.5%
<i>OLFM4</i>	TGCTGATGTTACCCACACC	CTGAAGACCAAGCTGAAAGAGT	92.2%

Tabla 8b. Cebadores usados para qRT-PCR de genes humanos (mortalidad)			
Gen	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')	Eficiencia
<i>Actina</i>	CCTTGACATGCCGGAG	ACAGAGCCTCGCCTTTG	87.2%
<i>IL1R2</i>	GCATCTGTATTCTCAAAAACCTCTGA	GGTGCTCTGTGGCTTCTG	96.9%
<i>CD177</i>	AAGAGATTACCAGCCACAGAC	GCTGAACTGTCCCAAACCTG	90.0%
<i>RETN</i>	GCCGGATTTGGTTAGCTGA	CATGGAGCACAGGGTCTTG	99.7%
<i>OLFM4</i>	TGCTGATGTTACCCACACC	CTGAAGACCAAGCTGAAAGAGT	92.2%

La eficiencia de amplificación por PCR se estableció utilizando curvas de calibración. Para cada gen, se produjo una curva estándar basada en cinco diluciones de una mezcla equimolar de muestras de ADNc por triplicado para verificar la eficiencia de amplificación. Cada muestra se procesó en pocillos por triplicado. Los valores del umbral del ciclo (Ct) se obtuvieron con el software Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se convirtieron a niveles relativos de expresión génica utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 24 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.) y el paquete estadístico R versión 3.4.1 (The R Foundation, Viena, Austria).

Las variables recogidas se compararon entre los distintos grupos de estudio con el fin de evaluar las posibles diferencias significativas. Para las variables categóricas se utilizó la prueba χ^2 de Pearson, mientras que el análisis de las variables continuas se realizó mediante la prueba t de Student. La distribución normal y la homogeneidad de la varianza de los datos se evaluó mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para los análisis de supervivencia se usó el método de Kaplan-Meier con prueba de log-rank.

Para cuantificar la sensibilidad y especificidad de los genes diferencialmente expresados por qRT-PCR entre los grupos shock séptico y shock no séptico, se realizó un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) con el área bajo la curva (AUC) de cada uno de los genes por separado y en su conjunto. Además, estas AUC se compararon con las de los diferentes biomarcadores utilizados en la actualidad para el diagnóstico y evolución del shock séptico: procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (PCR) y neutrófilos. Con el fin de mejorar el AUC, se realizó un modelo de regresión logístico multivariante avanzado incluyendo las variables de ajuste sexo, edad, cirugía urgente y niveles sanguíneos de neutrófilos y bilirrubina.

Para los genes diferencialmente expresados entre los grupos de alto y bajo riesgo de mortalidad se evaluaron la sensibilidad y especificidad midiendo el área bajo la curva (AUC) con los mismos criterios. Se compararon con las escalas actuales de riesgo de mortalidad SOFA y APACHE II, así como con biomarcadores como PCT, PCR, lactato, leucocitos y neutrófilos. Para mejorar el AUC se incluyeron las variables de ajuste sexo, edad, cirugía urgente y niveles sanguíneos de bilirrubina, creatinina, lactato y leucocitos.

En todos los casos, se consideró un valor $p \leq 0,05$ para indicar significación estadística.

6. Resultados

6. RESULTADOS

Como se ha descrito en el apartado de material y métodos, este estudio se realizó con pacientes de la Unidad de Reanimación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, que presentaron shock en algún momento del periodo posoperatorio.

Dentro de las primeras 24 horas de diagnóstico de shock, se obtuvieron muestras de sangre periférica y datos clínicos de una primera cohorte de pacientes (cohorte descubrimiento), clasificándolos en dos grupos: shock séptico y shock no séptico. Se extrajo el RNA total de las muestras sanguíneas para su hibridación mediante microarrays. Los resultados obtenidos se procesaron mediante análisis bioinformático. De todo este proceso, se obtuvo una serie de 6 genes diferencialmente expresados entre ambos grupos.

Para estudiar el riesgo de mortalidad en pacientes con shock postquirúrgico se seleccionaron en la cohorte de validación aquellos pacientes que presentaban un nivel de lactato en sangre mayor a 2 mmol/L, y se dividieron en dos grupos: supervivientes y no supervivientes a los 30 días de la cirugía. Siguiendo la misma metodología en el procesamiento de microarrays, se obtuvieron 4 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos.

Con el fin de verificar la fiabilidad de los datos obtenidos a través del análisis de microarrays, los genes con resultado significativo se analizaron mediante qRT-PCR utilizando una segunda cohorte de validación obtenida mediante muestras de otros pacientes siguiendo los mismos criterios.

6.1. Huella molecular diferencial entre shock séptico y shock no séptico

Características de los pacientes

Las características clínicas de los pacientes posquirúrgicos incluidos en el estudio se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Características pacientes Shock séptico/Shock no séptico						
	Cohorte descubrimiento			Cohorte validación		
	SS (n= 80)	SNS (n= 33)	p	SS (n= 108)	SNS (n= 59)	p
Características						
Edad	70.68	65.52	0.056	69.05	66.75	0.273
Sexo masculino [n (%)]	58.75 (47)	48.48 (16)	0.318	58.33 (63)	66.10 (39)	0.325
Comorbilidades [n (%)]						
Hipertensión arterial	66.25 (53)	60.61 (20)	0.568	62.96 (68)	59.32 (35)	0.644
Enfermedad cardiovascular crónica	51.25 (41)	57.58 (19)	0.540	33.33 (36)	22.03 (13)	0.125
Enfermedad respiratoria crónica	15.00 (12)	9.09 (3)	0.400	17.59 (19)	15.25 (9)	0.824
Fallo renal crónico	11.25 (9)	6.06 (2)	0.397	8.33 (9)	8.47 (5)	0.975
Fallo hepático crónico	1.25 (1)	0.00 (0)	0.519	1.85 (2)	1.24 (1)	0.942
Diabetes mellitus	23.75 (19)	15.15 (5)	0.310	23.15 (25)	13.56 (8)	0.137
Cáncer	28.75 (23)	12.12 (4)	0.059	25.93 (28)	13.56 (8)	0.063
Inmunosupresión	7.50 (6)	0.00 (0)	0.271	5.56 (6)	3.39 (2)	0.531
Curso del tiempo y resultado						
Estancia hospitalaria	33.60	23.36	0.025	30.79	20.44	0.011
Estancia en Reanimación	12.24	7.30	0.350	10.06	7.81	0.187
Mortalidad [% (7 días)]	13.58 (11)	15.15 (5)	0.706	13.89 (15)	20.34 (12)	0.209
Mortalidad [% (28 días)]	30.86 (25)	30.30 (10)	0.869	30.56 (33)	35.59 (21)	0.295
Mortalidad [% (90 días)]	45.68 (37)	30.30 (10)	0.184	37.96 (41)	37.29 (22)	0.880
Fuente de infección [n (%)]						
Tracto respiratorio	40.00 (32)	18.19 (6)	0.026	30.56 (33)	11.86 (7)	0.007
Abdomen	31.25 (25)	0.00 (0)	0.000	29.63 (32)	0.00 (0)	0.000
Tracto urinario	21.25 (17)	6.06 (2)	0.050	17.59 (19)	8.47 (5)	0.108
Bacteriemia	46.25 (37)	3.03 (1)	0.000	37.96 (41)	6.78 (4)	0.000
Microbiología [n (%)]						
Gram +	65.00 (52)	21.21 (7)	0.000	62.04 (67)	18.64 (11)	0.000
Gram -	76.25 (61)	27.27 (9)	0.000	66.67 (72)	16.95 (10)	0.000
Hongos	28.75 (23)	12.12 (4)	0.059	26.85 (29)	11.86 (7)	0.024
Mediciones al diagnóstico [media (RIQ)]						
Bilirrubina total (mg/dL)	0.80	0.82	0.899	0.82	1.02	0.183
Glucosa (mg/dL)	157	166	0.139	160	192	0.019
Recuento plaquetas (cels/mm ³)	148500	100000	0.019	179000	144000	0.017
INR	1.34	1.32	0.580	1.37	1.31	0.891
SvcO ₂	70.90	68.70	0.042	72.30	64.20	0.001
Proteína C-reactiva (mg/L)	220.95	90.60	0.000	139.45	98.30	0.000
Procalcitonina (ng/mL)	6.00	1.42	0.002	4.72	2.49	0.008
Lactato (mg/dL)	26	32	0.204	23	35	0.004
Leucocitos (cels/mm ³)	16575	13620	0.171	16250	13890	0.235
Neutrófilos (cels/mm ³)	15405	12009	0.026	15756	12500	0.033

SS: Shock séptico; SNS: Shock no séptico; INR: ratio internacional normalizado (*international normalized ratio*); SvcO₂: saturación venosa central de oxígeno.

Los datos cuantitativos están expresados como medias con rango intercuartílico (RIQ). Los datos cualitativos están representados como porcentajes y números absolutos. Se consideró como diferencia significativa un valor de $p \leq 0.05$

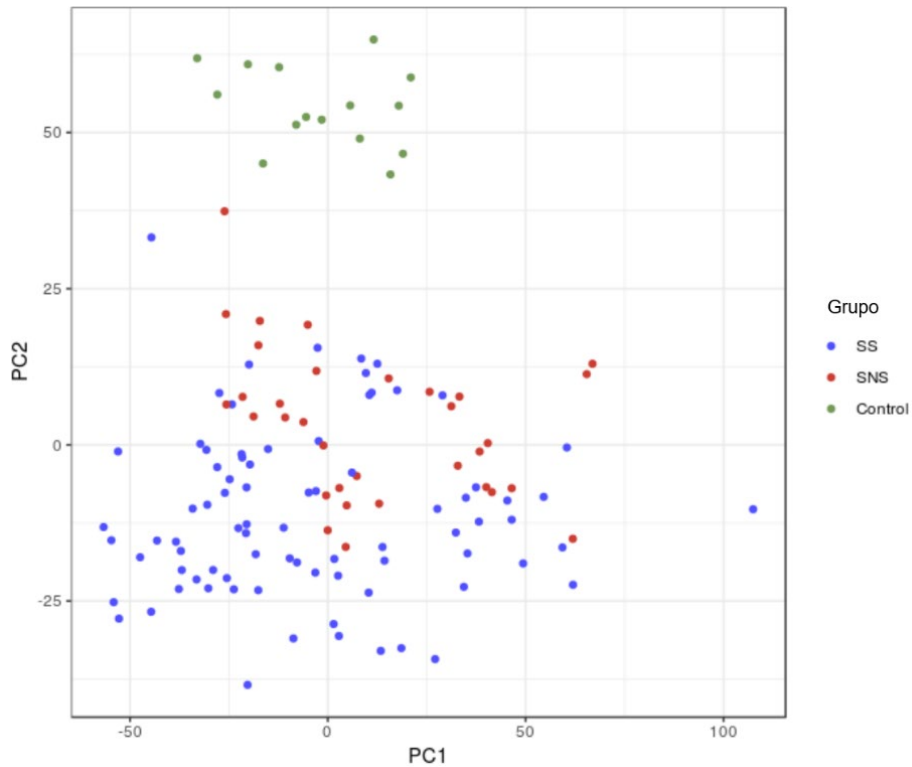
Tanto en la cohorte descubrimiento como en la cohorte validación, no se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, edad y comorbilidades entre los pacientes de los grupos de shock séptico y shock no séptico. La duración de la estancia hospitalaria fue mayor en los pacientes sépticos en ambas cohortes, mientras que no se observaron diferencias en cuanto a mortalidad, medida en los días 7, 28 y 90 del periodo postoperatorio.

En cuanto al origen de la infección en el grupo de pacientes sépticos, lo más frecuente fue el hallazgo de bacteriemia (46,25% en la cohorte descubrimiento y 37,96% en la cohorte validación), seguido de infección del tracto respiratorio (40% y 30,56% respectivamente), abdomen (31,25% y 29,63%) y tracto urinario (21,25% y 17,59%). Los microorganismos aislados más comunes fueron las bacterias gramnegativas (76.25% en la cohorte descubrimiento y 66.67% en la cohorte validación), seguidos de las bacterias grampositivas (65% y 62,4%) y hongos (28.75% y 26,85%).

Identificación de genes biomarcadores que discriminan shock séptico de shock no séptico

En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio de los datos calculando los componentes principales de la matriz de expresión génica, representado como diagrama de dispersión en la figura 17. Cada punto de la gráfica se corresponde con un paciente, representado en color verde, azul o rojo según pertenezca a los grupos control, shock séptico o shock no séptico respectivamente.

Como cabría esperar, esta primera reducción de la dimensionalidad muestra que el grupo control sano diverge notablemente en la expresión génica de los otros dos. Sin embargo, aunque los pacientes de los grupos shock séptico y shock no séptico se superpongan en el diagrama, se puede observar que aquellos con shock séptico permanecen en un nivel más bajo tanto en el *componente principal 1* (PC1) como en *componente principal 2* (PC2), por lo que ya se muestra cierta expresión diferencial entre ambos grupos. (Figura 17)



SS: shock séptico; SNS: shock no séptico. PC1: componente principal 1. PC2: componente principal 2

Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP)

Para confirmar este resultado se realizó un modelo de regresión lineal múltiple, que proporcionó un cambio pliegue logarítmico (log-fold change) y un valor de p estadísticamente significativo para cada transcripción (Figura 18).

##	Symbol	logFC	AveExpr	t	P.Value	
##	A_23_P169437	LCN2	1.875168	10.785110	4.781102	4.667493e-06
##	A_33_P3263319	IGHG3	1.707489	10.341171	4.634861	8.607187e-06
##	A_33_P3424591	IGHG2	1.702720	11.119200	4.556312	1.189689e-05
##	A_33_P3351180	IGHA1	1.555341	13.020675	4.130741	6.447685e-05
##	A_23_P166848	LTF	1.533540	11.314648	3.723054	2.926080e-04
##	A_23_P24493	MMP8	1.447919	8.227103	5.090098	1.232437e-06
##	A_23_P61042	IGHA2	1.446011	9.940523	4.191393	5.101892e-05
##	A_24_P181254	OLFM4	1.425667	10.213777	2.949489	3.778960e-03
##	A_33_P3350863	RETN	1.355142	13.309322	4.136175	6.314452e-05
##	A_32_P157213	<NA>	1.298464	11.198303	3.531556	5.732095e-04
##	A_23_P119222	RETN	1.282888	12.222852	4.089369	7.554108e-05
##	A_24_P63019	IL1R2	1.272861	11.794031	4.021599	9.768541e-05
##	A_33_P3257678	HIST2H3C	1.233130	8.658786	5.002119	1.810011e-06
##	A_23_P259863	CD177	1.228630	12.757732	3.059064	2.699551e-03
##	A_23_P167168	IGJ	1.216922	9.910537	3.850927	1.842122e-04
##	A_33_P3226154		1.187846	14.045240	3.729190	2.862531e-04
##	A_33_P3379039	IPLL5	1.181211	12.801303	3.659037	3.673778e-04
##	A_24_P144346		1.166004	9.029897	4.693194	6.752657e-06
##	A_33_P3369844	CD24	1.157589	10.146522	4.116037	6.821845e-05
##	A_23_P64372	TCN1	1.154503	9.436785	4.241358	4.199782e-05

Figura 18. Análisis log-fold change

La representación simultánea de $-\log_{10}(p)$ frente a los cambios de pliegue logarítmicos proporciona el diagrama del volcán (volcano plot) que se observa en la figura 19, donde cada punto refleja una transcripción. En este diagrama se puede observar un pequeño grupo de transcripciones que se diferencian de forma significativa de las demás, encontrándose por encima del umbral positivo de cambio de pliegue logarítmico mayor de 1,5, con un valor de p menor o igual a 0,05. Estas transcripciones pertenecen a una serie de genes que se sobreexpresaron en el grupo de pacientes con shock séptico, de los que seleccionamos los 9 primeros: LCN2, IGHG3, IGHG2, LTF, OLFM4, IGHA1, IGHA2, MMP8 e IL1R2. (Figura 19)

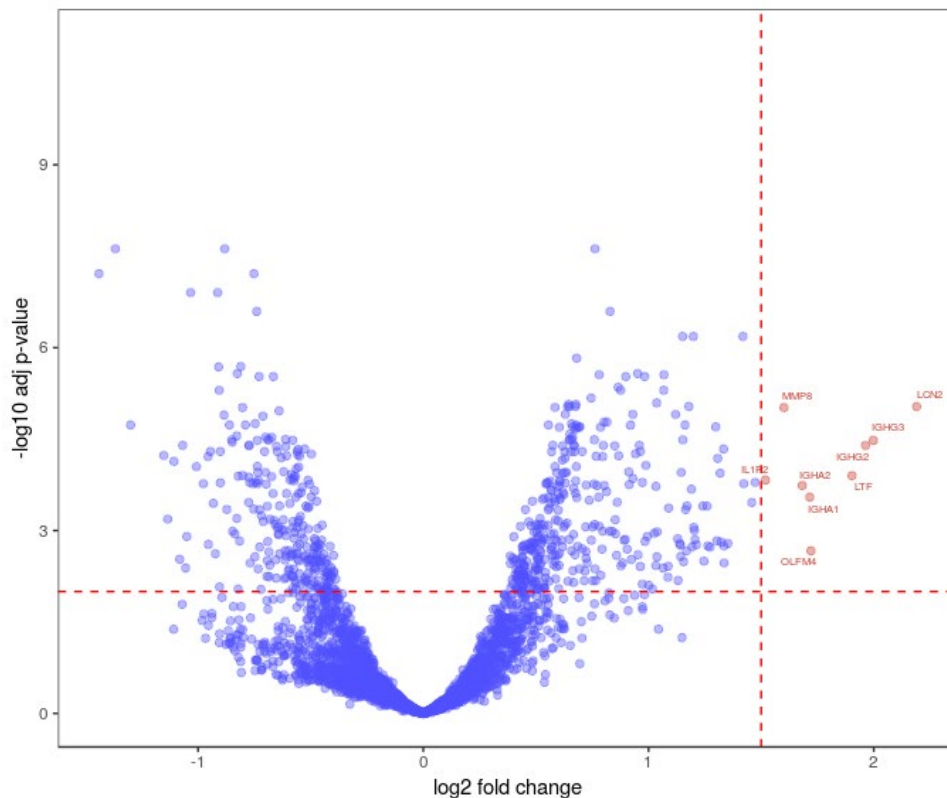


Figura 19. Volcano plot

La expresión de estos nueve genes para pacientes con shock séptico y shock no séptico se encuentra representada en el siguiente gráfico de mapa de calor (Figura 20). Las filas representan el valor de expresión génica correspondiente a cada uno de los genes estudiados, y las columnas corresponden a la muestra (en azul claro los pacientes del grupo de shock séptico y en azul oscuro los del grupo de shock no

séptico). El color verde indica la sobreexpresión de un gen, mientras que el color rojo su infraexpresión.

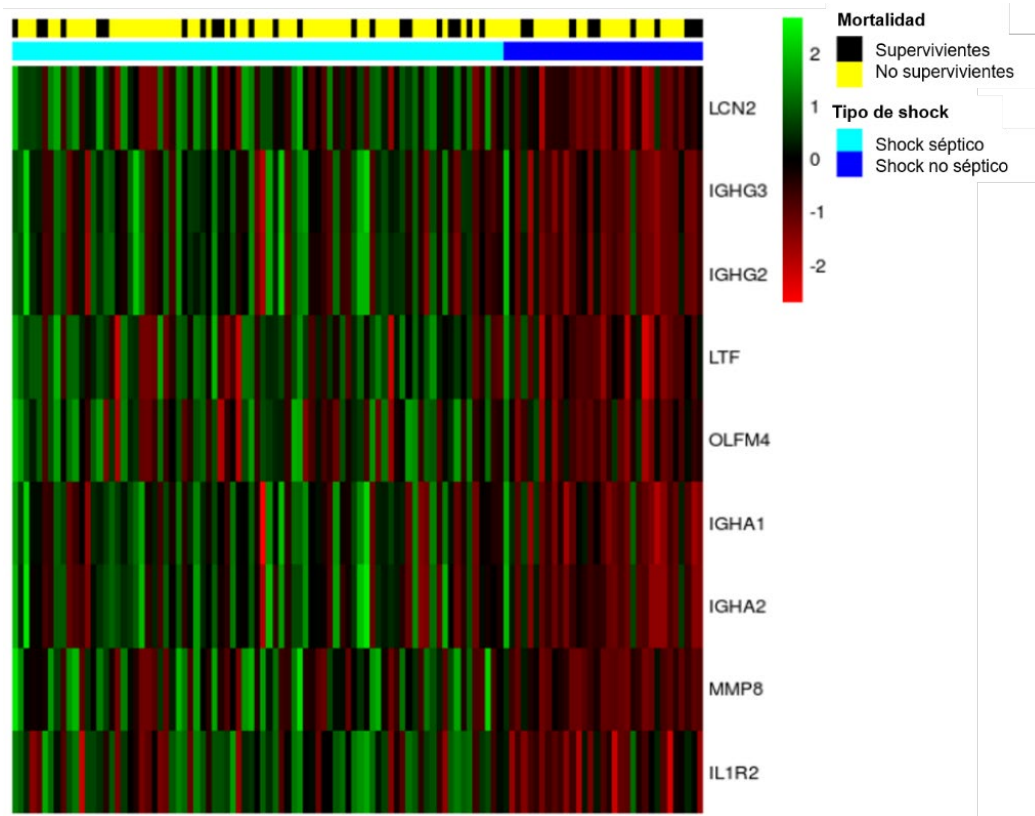


Figura 20. Gráfico de mapa de calor de genes de interés.

Estos nueve genes diferencialmente expresados entre ambos grupos poseen una característica común: sus vías de señalización están relacionadas con el sistema inmune, siendo la respuesta inmune humoral la característica más compartida. La caracterización funcional enriquecida está representada en la Figura 21.

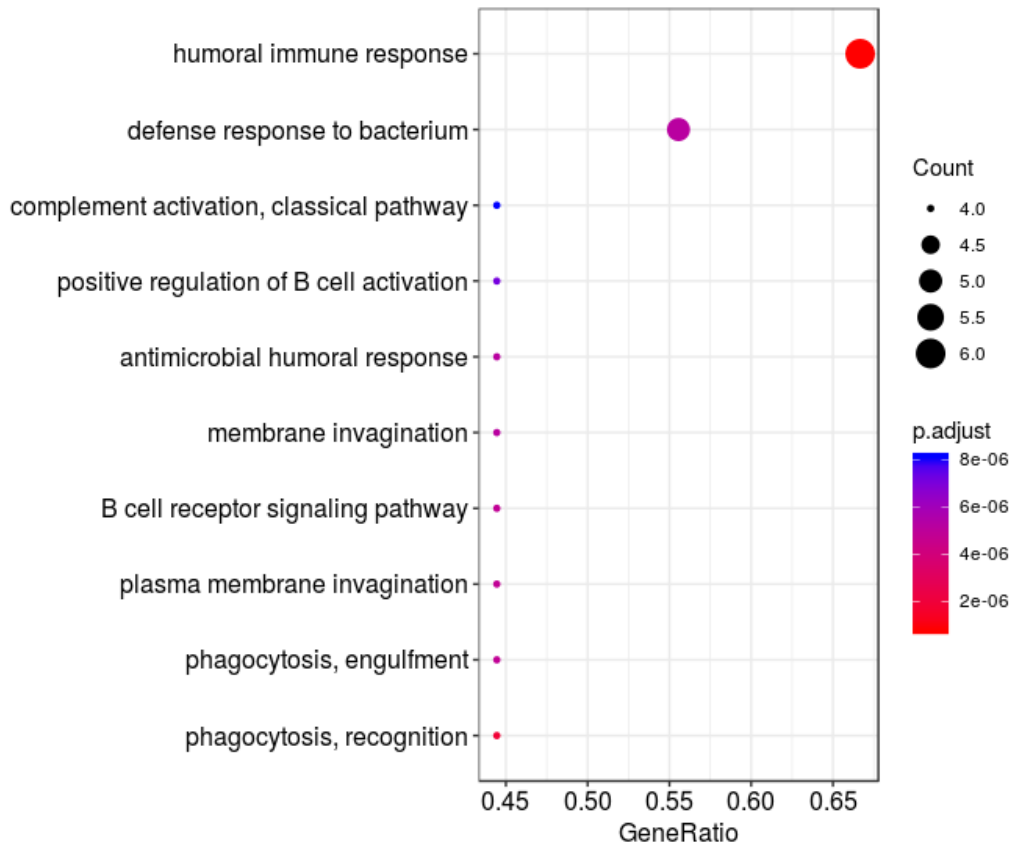


Figura 21. Enriquecimiento biológico funcional

Validación de los biomarcadores genéticos en una cohorte de validación

Para evaluar la robustez de los genes seleccionados como biomarcadores candidatos, estos fueron evaluados mediante qRT-PCR en una cohorte de estudio independiente (cohorte de validación). En concordancia con los datos de microarrays de la cohorte de descubrimiento, la actividad transcripcional de LCN2, IGHG3, IGHG2, LTF, OLFM4, IGHA1, IGHA2, MMP8 e IL1R2 en pacientes con shock séptico aumentó significativamente en comparación con la de pacientes con shock no séptico. (Figura 22)

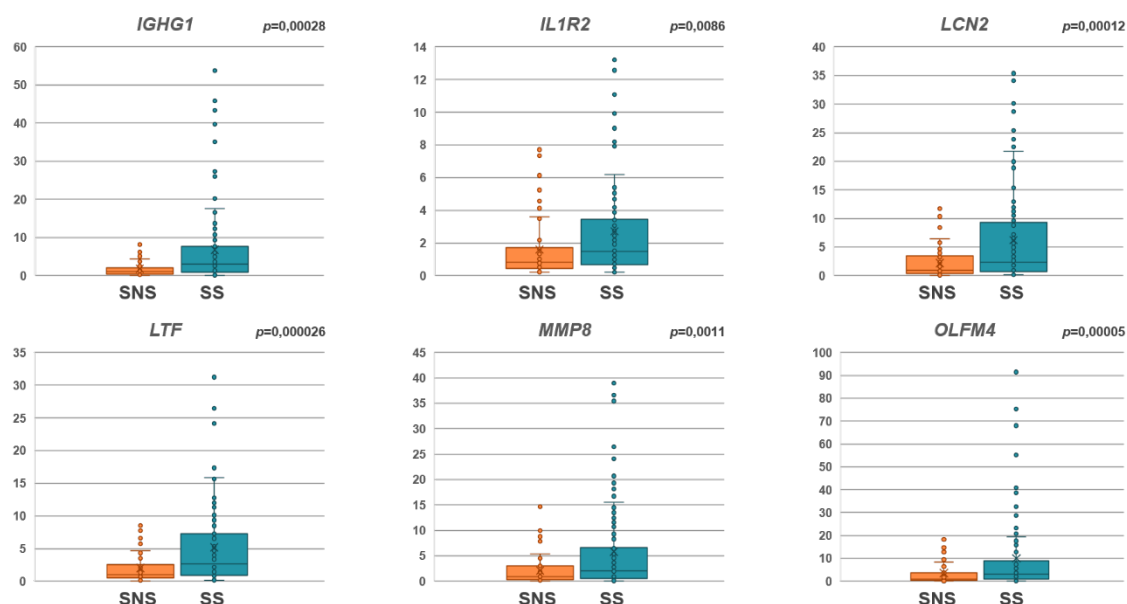


Figura 22. Niveles relativos de ARNm de IGHG1 (A), IL1R2 (B), LCN2 (C), LTF (D), MMP8 (E) y OLFM4 en pacientes con shock no séptico y shock séptico, medidos por qRT-PCR. (La línea horizontal dentro del cuadro indica la mediana, los límites del cuadro indican los percentiles 25 y 75, y los bigotes indican los valores más altos y más bajos).

En un primer paso, estos biomarcadores se evaluaron mediante el análisis de la curva ROC en la cohorte de validación, midiendo el AUC de cada uno de ellos para cuantificar su precisión. Como muestran la Figura 23 y la Tabla 10, el AUC más alto corresponde al gen IGHG1 (0.797; 0.727-0.867) seguido de LTF (0.719; 0.634-0.803), OLFM4 (0.698; 0.611-0.786), LCN2 (0.677; 0.590-0.764), MMP8 (0.637; 0.548-0.726) y el gen IL1R2 (0.632; 0.540-0.725).

Tabla 10. Área bajo la curva genes biomarcadores

Variables de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	Significación asintótica ^b	95% de intervalo de confianza asintótico	
				Límite inferior	Límite superior
<i>IGNG1</i>	0.797	0.036	0.000	0.727	0.867
<i>IL1R2</i>	0.632	0.047	0.008	0.540	0.725
<i>LCN2</i>	0.677	0.044	0.000	0.590	0.764
<i>LTF</i>	0.719	0.043	0.000	0.634	0.803
<i>MMP8</i>	0.637	0.045	0.006	0.548	0.726
<i>OLFM4</i>	0.698	0.045	0.000	0.611	0.786
En conjunto	0.841	0.032	0.000	0.779	0.904

^a Bajo el supuesto no paramétrico. ^b Hipótesis nula: área verdadera = 0.5

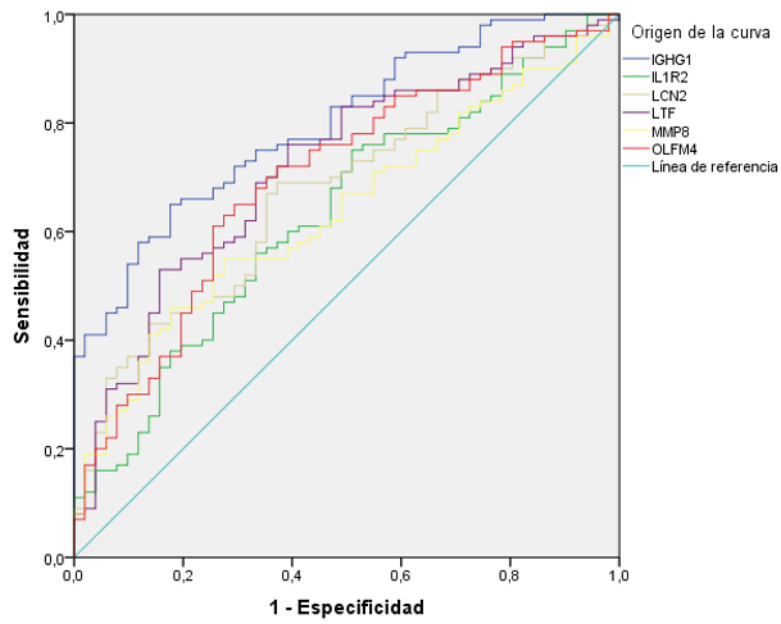


Figura 23. Curvas ROC genes biomarcadores (análisis de los genes de forma individual)

A continuación, se realizó un modelo de regresión multivariante incluyendo todos los genes evaluados con el fin de mejorar la precisión en los resultados, aumentando el AUC hasta 0.841 (Figura 24. Tabla 10).

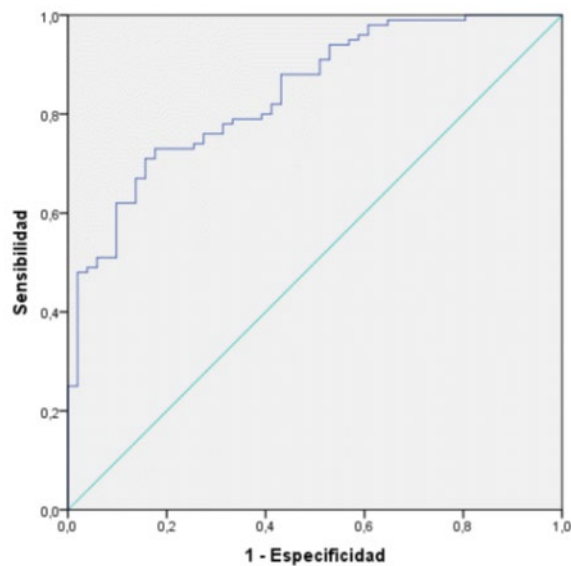


Figura 24. Curva ROC genes biomarcadores (modelo de regresión logística)

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con los biomarcadores utilizados actualmente en la práctica clínica para el diagnóstico y evolución del shock séptico, se evaluó la capacidad de discriminar los casos de shock séptico y no séptico entre los niveles de expresión génica y la PCT, PCR y neutrófilos. Los valores de los parámetros clínicos se recogieron en el momento de la extracción de la muestra de sangre para los estudios de expresión génica. Al analizar el AUC de los biomarcadores clásicos, se observaron peores resultados para diferenciar entre shock séptico y shock no séptico, con 0.598 (0.505-0.690) para PCT, 0.692 (0.598-0.786) para PCR y 0.613 (0.519-0.707) para neutrófilos. (Figuras 25-28) (Tabla 11)

Tabla 11. Área bajo la curva en conjunto				95% de intervalo de confianza asintótico	
Variables de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	Significación asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
Genes biomarcadores	0.841	0.032	0.000	0.779	0.904
Procalcitonina	0.598	0.047	0.060	0.505	0.690
PCR	0.692	0.048	0.000	0.598	0.786
Neutrófilos	0.613	0.048	0.027	0.519	0.707

^a Bajo el supuesto no paramétrico. ^b Hipótesis nula: área verdadera = 0.5)

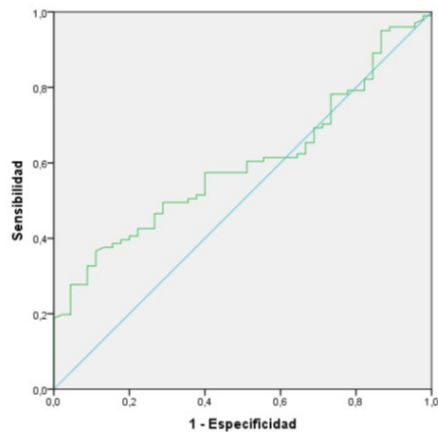


Figura 25. Curva ROC procalcitonina

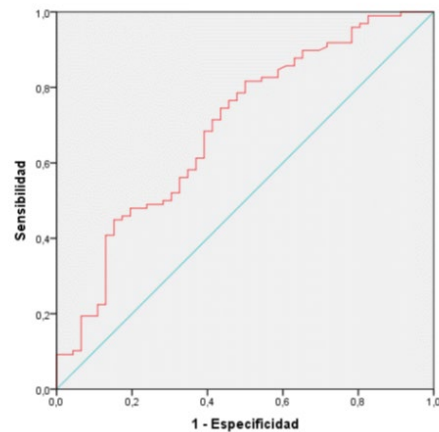


Figura 26. Curva ROC PCR

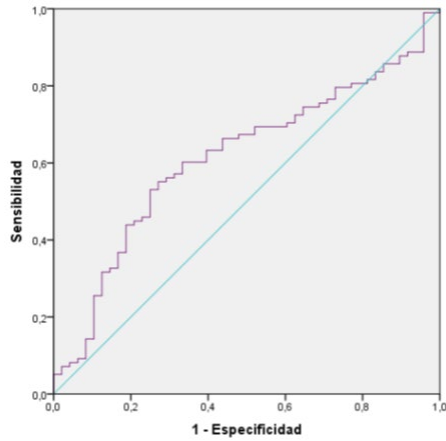


Figura 27. Curva ROC Neutrófilos

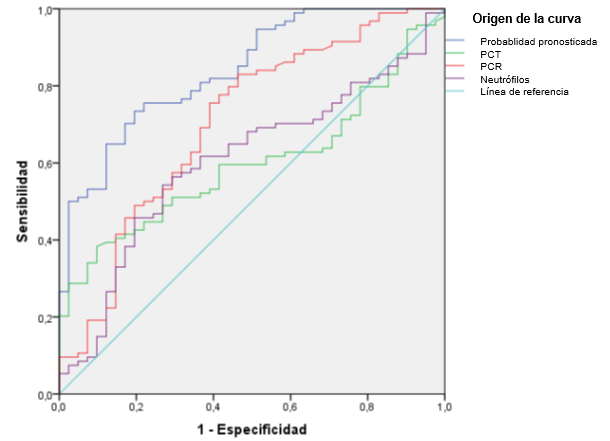


Figura 28. Curva ROC en conjunto

Para mejorar aún más el AUC se realizó un nuevo modelo de regresión multivariante para cada uno de los biomarcadores analizados, incluyendo las variables sexo, edad, cirugía urgente, neutrófilos y bilirrubina. Todas las AUC fueron mejores que las presentadas previamente, destacando el modelo de regresión para la expresión génica, que tuvo muy buena precisión en los pacientes estudiados, con AUC de 0.874. (Tabla 12) (Figuras 29-33)

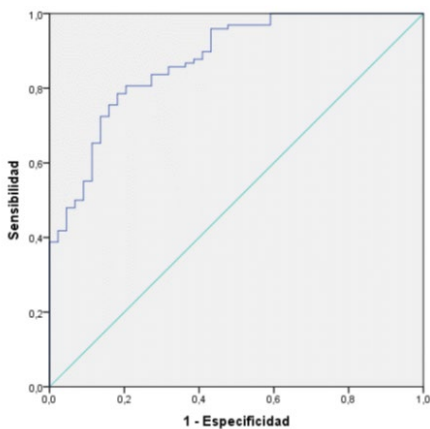


Figura 29. Modelo de regresión logística: IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8, OLFM4, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina.

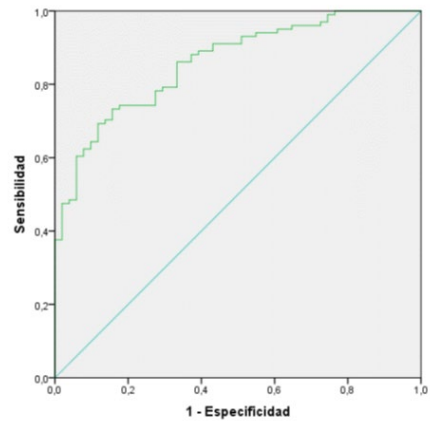


Figura 30. Modelo de regresión logística: procalcitonina, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina

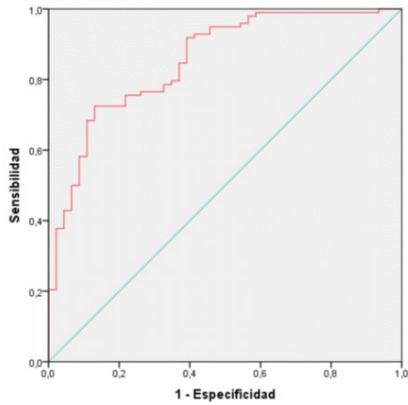


Figura 31. Modelo de regresión logística: proteina C reactiva, edad, sexo, urgencias, neutrófilos y bilirrubina

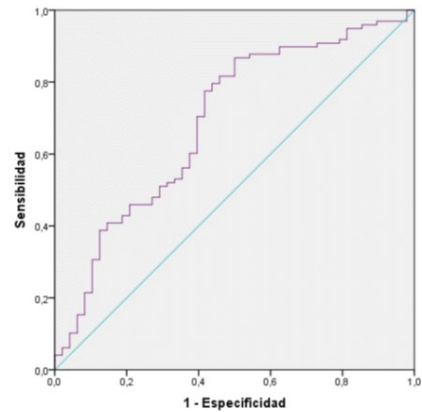


Figura 32. Modelo de regresión logística: neutrófilos, edad, sexo, urgencias y bilirrubina

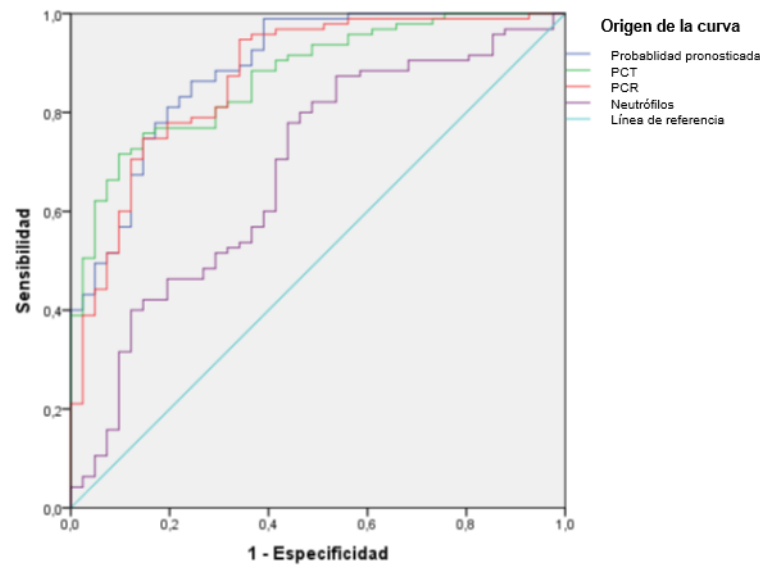


Figura 33. Modelo de regresión logística: comparación

Tabla 12. Área bajo la curva en conjunto. Modelo de regresión					
				95% de intervalo de confianza asintótico	
Variables de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	Significación asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
Genes biomarcadores	0,874	0,031	0,000	0,814	0,934
Procalcitonina	0,859	0,030	0,000	0,801	0,917
Proteína C reactiva	0,853	0,033	0,000	0,788	0,919
Neutrófilos	0,689	0,048	0,000	0,595	0,783

^a Bajo el supuesto no paramétrico. ^b Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

6.2. Huella molecular diferencial entre alto y bajo riesgo de mortalidad.

Características de los pacientes

En la tabla 13 se encuentran representadas las características clínicas de los pacientes reclutados para el estudio de mortalidad en shock postquirúrgico.

Tanto en la cohorte descubrimiento como en la de validación, se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes supervivientes y no supervivientes en términos de estancia hospitalaria y niveles de lactato, además los pacientes no supervivientes presentaron mayor puntuación en las escalas pronósticas en el momento del diagnóstico de shock. El resto de variables analizadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Tabla 13. Características paciente shock posquirúrgico						
	Cohorte descubrimiento			Cohorte validación		
	Supervivientes (n= 88)	No supervivientes (n= 29)	p	Supervivientes (n= 79)	No supervivientes (n= 33)	p
Características						
Edad	69.15	71.86	0.297	69,06	72,70	0,108
Sexo masculino [n (%)]	55 (63)	18 (62)	0.967	50 (63)	23 (70)	0.517
Comorbilidades [n (%)]						
Hipertensión arterial	64 (73)	19 (66)	0,458	46 (58)	23 (70)	0.255
Enfermedad cardiovascular crónica	53 (60)	14 (48)	0.259	20 (25)	10 (30)	0.587
Enfermedad respiratoria crónica	14 (16)	5 (17)	0.866	14 (18)	8 (24)	0.428
Fallo renal crónico	10 (11)	6 (21)	0.205	5 (6)	3 (9)	0.605
Fallo hepático crónico	3 (3)	0 (0)	0.314	1 (1)	0 (0)	0.516
Diabetes mellitus	25 (28)	7 (24)	0.655	16 (20)	6 (18)	0.801
Cáncer	23 (26)	5 (17)	0.330	17 (22)	9 (27)	0.511
Inmunosupresión	4 (5)	1 (3)	0.800	4 (5)	0 (0)	0.188
Curso del tiempo y resultado						
Estancia hospitalaria	30.51	18.31	0.011	37.22	12.21	0.000
Estancia en Reanimación	8.26	7.03	0.525	10.58	6.61	0.021
Mortalidad [% (7 días)]	0 (0)	14 (48)	0.000	0 (0)	15 (45)	0.000
Mortalidad [% (15 días)]	0 (0)	21 (72)	0.000	0 (0)	28 (85)	0.000
Fuente de infección [n (%)]						
Tracto respiratorio	19 (22)	9 (31)	0.301	20 (25)	8 (24)	0.905
Abdomen	15 (17)	5 (17)	0.981	17 (22)	8 (24)	0.752
Tracto urinario	12 (14)	4 (14)	0.983	13 (16)	2 (6)	0.141
Sitio quirúrgico	22 (25)	5 (17)	0.390	21 (27)	7 (21)	0.550
Bacteriemia	23 (26)	7 (24)	0.831	28 (35)	7 (21)	0.139
Microbiología [n (%)]						
Gram +	42 (48)	9 (31)	0.116	43 (54)	10 (30)	0.020
Gram -	46 (52)	14 (48)	0.709	40 (51)	13 (39)	0.277
Hongos	17 (19)	5 (17)	0.804	16 (20)	7 (21)	0.909
Mediciones al diagnóstico [media (RIQ)]						
Escala SOFA	7.00 (7.00)	10.00 (3.00)	0.000	9.00 (3.00)	10.00 (3.00)	0.351
Escala APACHE	13.00 (6.00)	16.00 (6.50)	0.000	13.00 (5.00)	16.00 (3.00)	0.006
Bilirrubina total (mg/dL)	0.72 (1.56)	0.99 (1.08)	0.324	0.98 (1.67)	1.27 (1.10)	0.662
Glucosa (mg/dL)	157 (65)	159 (97)	0.142	169 (76)	193 (145)	0.258
Recuento plaquetas (cels/mm ³)	131000 (96250)	100000 (131500)	0.415	149000 (163250)	123000 (137500)	0.565
INR	1.36 (0.37)	1.31 (0.49)	0.989	1.33 (0.33)	1.31 (0.49)	0.325
SvcO ₂	72.30 (11.9)	66.70 (17,1)	0.007	70,90 (18.00)	67.00 (19.10)	0.334
Proteína C-reactiva (mg/L)	107,80 (208.4)	186.00 (228.4)	0.012	208.6 (213.50)	184.40 (241.60)	0.417
Procalcitonina (ng/mL)	0.99 (9.82)	5.24 (19.49)	0.276	3.72 (23.10)	8.02 (20.46)	0.775
Lactato (mg/dL)	3.11 (1.86)	4.33 (5.50)	0.004	2.89 (2.11)	5.00 (5.00)	0.003
Leucocitos (cels/mm ³)	13370 (10540)	13560 (10490)	0.639	15470 (11960)	15350 (10605)	0.193
Neutrófilos (cels/mm ³)	11738 (9803)	12319 (10623)	0.585	13614 (11310)	12921 (10420)	0.192
SOFA: Escala secuencial de fallo de órgano (<i>sequential organ failure assessment</i>); APACHE: evaluación de fisiología aguda y salud crónica (<i>acute physiology and chronic health evaluation</i>); INR: ratio internacional normalizado (<i>international normalized ratio</i>); SvcO ₂ : saturación venosa central de oxígeno. Los datos cuantitativos están expresados como medias con rango intercuartílico (RIQ). Los datos cualitativos están representados como porcentajes y números absolutos. Se consideró como diferencia significativa un valor de $p \leq 0.05$						

Identificación de genes biomarcadores que identifican el riesgo de mortalidad en pacientes con shock postquirúrgico

La matriz de expresión de los genes de varianza del decil superior se muestra después de la agrupación en fila (genes) y en columna (pacientes). La representación gráfica del resultado se muestra en la Figura 34. La matriz se divide en dos bloques en columnas y filas, ya que esta división proporciona el paso más alto en la distancia entre grupos, lo que demuestra que la división óptima de pacientes y genes en dos grupos era la agrupación óptima. La escala de colores sugiere diferencias en los niveles de ARN de los genes entre los dos grupos de pacientes. La barra de anotación de color muestra la distribución de los sobrevivientes (amarillo) y no sobrevivientes (negro) en cada grupo de pacientes.

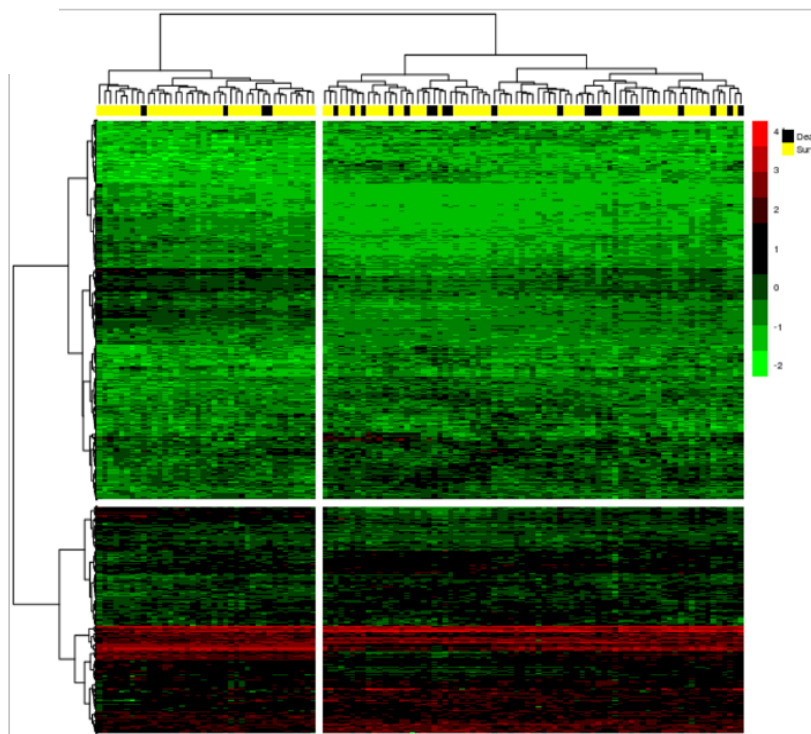


Figura 34. Gráfico de mapa de calor de genes de interés.

Todos los genes de la matriz de expresión han sido representados en la gráfica del volcán (volcano plot), que los clasifica como regulados al alza (extremo derecho) o regulados a la baja (extremo izquierdo) en los pacientes del grupo con alto riesgo de mortalidad. Atendiendo al umbral de cambio de pliegue logarítmico mayor de 1.5, con un valor de p menor o igual a 0.05, observamos un grupo de transcripciones

diferenciadas de las demás y pertenecientes a los genes sobreexpresados en los pacientes no supervivientes: IL1R2, CD177, RETN, OLFM4 y RN7SK. (Figuras 35-36)

La gráfica nos muestra una serie de genes subexpresados con valor significativo, entre los que destacan ARFRP1, HMG20B, WASH5P. Los perfiles funcionales obtenidos mediante GO-BP no estaban relacionados con la fisiopatología bien establecida del shock, por lo que no se usaron para la fase de validación de la cohorte independiente basada en qRT-PCR.

##	Symbol	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	
##	A_23_P169437	LCN2	0.9378016	11.453271	1.927292	0.057716744	0.7116304
##	A_23_P166848	LTF	0.8857990	12.037002	1.844480	0.069047585	0.7116304
##	A_23_P24493	MMP8	0.8646159	8.581508	2.441800	0.016962280	0.6835220
##	A_23_P131785	BPI	0.8311092	9.850017	2.422913	0.017800805	0.6835220
##	A_23_P380240	CEACAM8	0.8049090	10.168981	1.970297	0.052482374	0.7116304
##	A_33_P3382595	RN7SK	0.7916843	14.564542	1.909540	0.060003166	0.7116304
##	A_24_P63019	IL1R2	0.7892593	12.306115	2.027035	0.046200193	0.7107042
##	A_23_P74609	GOS2	0.7713822	9.747929	2.866991	0.005371657	0.6835220
##	A_33_P3257678	HIST2H3C	0.7713724	8.975350	2.672709	0.009220508	0.6835220
##	A_23_P64372	TCN1	0.7528404	9.915079	2.350674	0.021360088	0.6872845
##	A_33_P3244165	<NA>	0.7310880	17.579546	1.516434	0.133598184	0.7314452
##	A_33_P3211666	IL18R1	0.6971684	10.647390	2.188176	0.031759688	0.6959136
##	A_23_P104804	ZBTB16	0.6910355	8.930548	2.721828	0.008061971	0.6835220
##	A_32_P157213	<NA>	0.6903460	11.892542	1.706701	0.092000120	0.7145437
##	A_23_P25155	GPR84	0.6831904	10.397009	2.121601	0.037162642	0.7006903

Figura 35. Análisis log-fold change

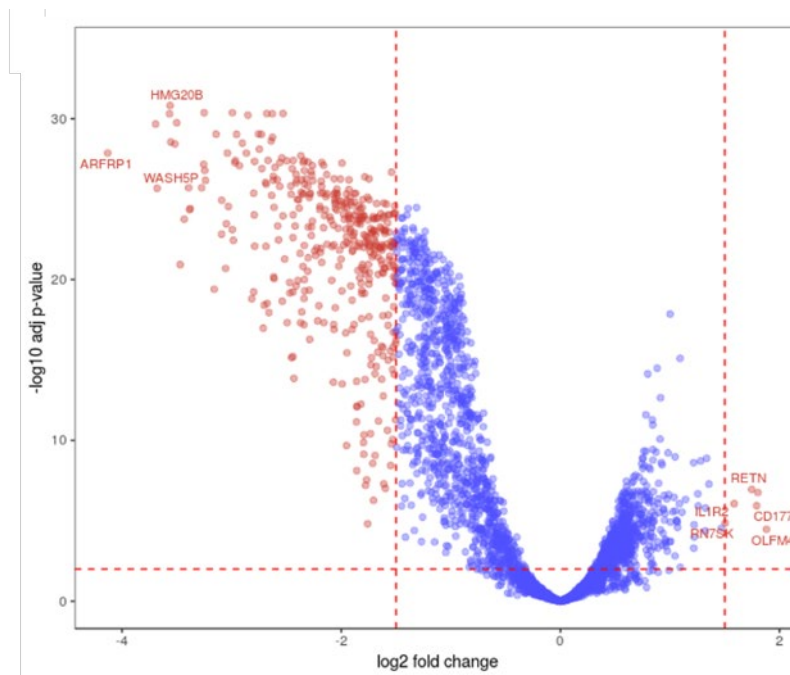


Figura 36. Gráfica volcano plot

La validación funcional de los GDE se organizó en un diagrama de redes de interacción proteína-proteína (PPI) que resultó en 301 nodos y 42 aristas, con un puntaje PPI de > 0.4 basado en la base de datos STRING. (Figura 37)

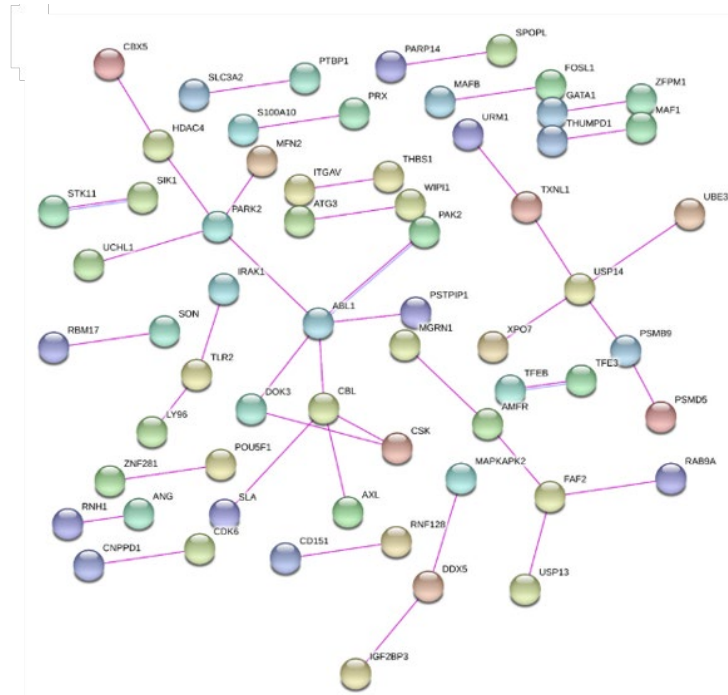


Figura 37. Red PPI de los GDE entre supervivientes y no supervivientes

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró diferencias significativas en cuanto a la probabilidad de supervivencia de dos grupos de pacientes (Figura 38). El *grupo 1* corresponde con el de alto riesgo de mortalidad y el *grupo 2* con el de bajo riesgo. Ambos grupos presentan diferente patrón de expresión génica, lo que sugiere que analizando estos patrones se puede estimar el riesgo de mortalidad de pacientes con shock postoperatorio.

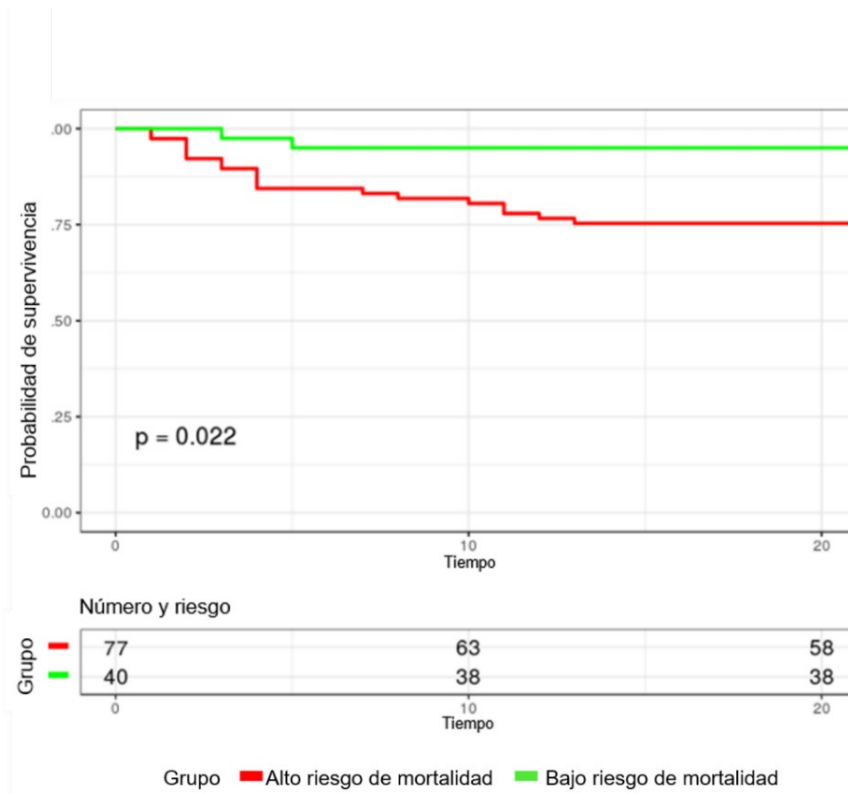


Figura 38. Gráfica de Kaplan-Meier

Validación de los biomarcadores genéticos en una cohorte de validación

Los hallazgos derivados del análisis de microarrays fueron validados en una cohorte independiente mediante qRT-PCR, que proporcionó resultados similares; confirmando que OLFM4, CD177, RETN e IL1R2 se sobreexpresaron de forma significativa en el grupo de pacientes no supervivientes. (Figura 39)

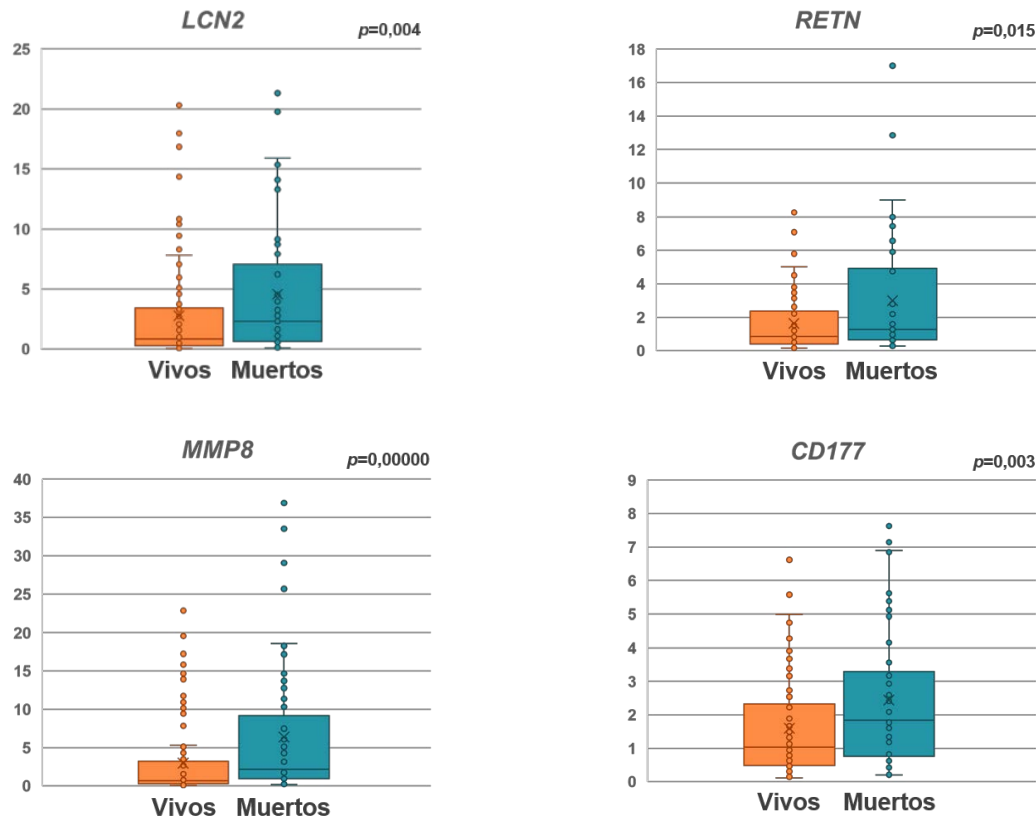


Figura 39. Niveles relativos de ARNm de LCN2, RETN, MMP8 y CD177 en pacientes con shock posquirúrgico (supervivientes y no supervivientes), medidos por qRT-PCR

La especificidad y sensibilidad de estos cuatro GDE como marcadores de riesgo de mortalidad se cuantificó mediante curvas ROC. El valor de AUC más alto fue para *OLFM4* (0.782; 0.687-0.877), seguido de *RETN* (0.739; 0.628-0.850), *CD177* (0.669; 0.544-0.794) e *IL1R2* (0.653; 0.535-0.771). El análisis de todos ellos en conjunto proporcionó un AUC de 0.760 (0.649–0.872), resultado que mejoró al realizar el modelo de regresión multivariante, en el que se incluyeron las variables sexo, edad, creatinina, bilirrubina, lactato, glóbulos blancos y cirugía de urgencia (AUC 0.800). (Figuras 40, 41)

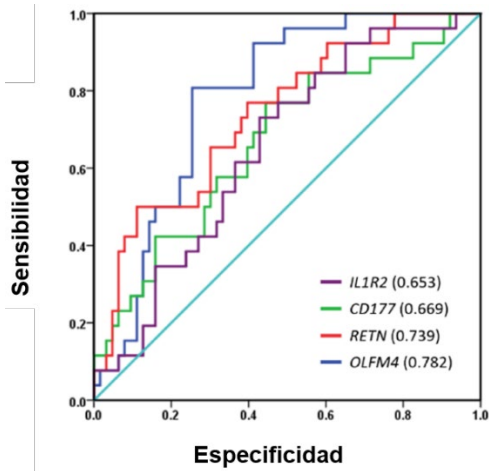


Figura 40. Curvas ROC GDE

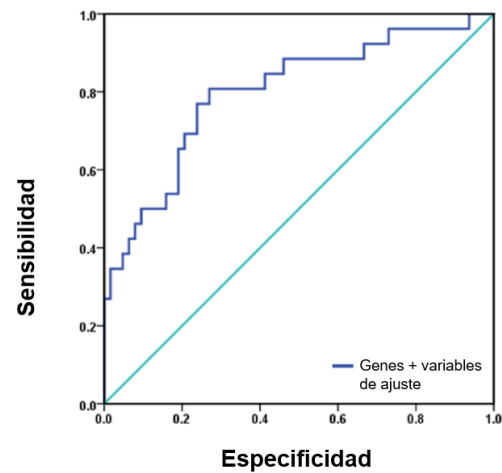


Figura 41. Regresión multivariante

Estos resultados fueron mejores que los valores de AUC obtenidos para las escalas tradicionales de gravedad APACHE II y SOFA, así como las de otros biomarcadores clásicos (lactato, procalcitonina o proteína C reactiva). (Tabla 14)

Tabla 14. Valores AUC para diferentes biomarcadores		
Biomarcador	Área	Intervalo de confianza asintótico del 95%
Escala SOFA	0.580	0.456 – 0.705
Escala APACHE	0.647	0.543 – 0.751
Lactato	0.730	0.629 – 0.831
Procalcitonina	0.589	0.478 – 0.699
Proteína C-reactiva	0.444	0.323 – 0.565
Células sanguíneas blancas	0.447	0.332 – 0.563
Neutrófilos	0.446	0.332 – 0.560

7. Discusión

7. DISCUSIÓN

El tratamiento precoz en el paciente séptico mejora los resultados en términos de supervivencia ^(26,60). Para ello, es fundamental el diagnóstico temprano de la enfermedad. Los marcadores más utilizados en la actualidad para el diagnóstico de sepsis son la PCT, PCR y leucocitos; sin embargo, no son específicos para esta patología ^(65, 69, 72, 74, 75). Podemos encontrarlos elevados en otras situaciones en las que la inflamación sea protagonista, como es el caso de los pacientes con shock posquirúrgico, en los que resulta complicado discriminar el origen séptico o no séptico del mismo.

Por otra parte, durante el periodo posoperatorio, frecuentemente los pacientes se complican con shock de cualquier etiología, lo que aumenta su probabilidad de fallecimiento.

En este estudio, se ha investigado la huella molecular de pacientes con shock posquirúrgico, con dos objetivos principales: discriminar a pacientes con shock séptico de los que presentaron shock no séptico durante el periodo posoperatorio; y, en segundo lugar, estratificar a los pacientes de mayor gravedad, según su huella molecular, como de alto o bajo riesgo de mortalidad.

7.1. Huella molecular diferencial entre shock séptico y shock no séptico

El análisis de expresión génica en sangre periférica ha sido ampliamente utilizado para estudiar los procesos moleculares que ocurren en la sepsis y explicar su compleja fisiopatología ^(109, 114-118). A raíz de estas investigaciones se ha planteado el empleo de la huella transcriptómica de pacientes sépticos para estratificarlos según su gravedad. Diversos estudios han obtenido conclusiones prometedoras en este campo.

Wong y colaboradores, en el año 2009, analizaron la huella molecular de pacientes pediátricos con shock séptico, descubriendo que, según su patrón transcriptómico, podían dividir al grupo total en 3 subclases de shock séptico, que a su vez coincidían con el fenotipo expresado ⁽¹⁰¹⁾.

Siguiendo la misma línea que Wong, años más tarde, el grupo de Maslove examinó los perfiles de expresión génica de pacientes con sepsis e identificaron 2 cohortes claramente diferenciadas, coincidiendo también con el estado de gravedad ⁽¹¹⁷⁾.

En el estudio de Burnham, se evaluó la transcriptómica de pacientes con sepsis cuyo origen fue peritonitis fecaloidea o neumonía adquirida en la comunidad. Concluyeron que el origen de la infección no presentaba diferencias en la expresión génica, pero sí el estado de gravedad del paciente, pudiendo constituir una herramienta útil para estudios posteriores de estratificación pronóstica ⁽¹⁰⁷⁾.

La aportación de nuestro estudio frente a todos los publicados anteriormente es que ninguno de ellos ha hecho la comparación entre shock séptico y shock no séptico. Esta confrontación resulta interesante porque, en la práctica clínica, son entidades que habitualmente presentan características muy similares, siendo difícil distinguir el verdadero origen del shock en muchas ocasiones.

Así pues, el presente trabajo evalúa, mediante la tecnología de microarrays, los perfiles de expresión génica en sangre periférica de una primera cohorte de pacientes a la que se dividió en dos grupos: shock séptico y shock no séptico. Tras el análisis de datos, se identificaron una serie de genes diferencialmente expresados (GDE) entre ambos grupos. De estos, se seleccionaron seis en función de sus cambios de pliegue logarítmico para ser analizados en otra cohorte de validación: IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 y OLFM4. Todos ellos tienen como característica común que codifican proteínas implicadas en el sistema inmune, concretamente en la respuesta inmune humoral, la defensa de respuesta a las bacterias, la activación del complemento y la regulación positiva de la activación de células B. Diversos estudios ya han demostrado el papel de la inmunidad como elemento clave en el desarrollo de sepsis, afirmando que esta patología es producida por una respuesta desregulada del huésped a una infección ^(49, 89, 119).

Dos de estos genes, IL1R2 y MMP8, han sido ya identificados como marcadores de sepsis en el estudio de Almansa y colaboradores en el que se correlacionan las alteraciones moleculares con el grado de disfunción de órgano en la sepsis ⁽⁸⁸⁾.

El gen IL1R2 también ha sido propuesto como biomarcador de infección en un estudio liderado por Lang en 2017, en el que analiza perfiles de expresión génica en sangre periférica de pacientes sépticos y ratones ⁽¹²⁰⁾.

Yazdan-Ashoori y colaboradores determinaron la concentración sanguínea de metaloproteinasas (MMP) en pacientes con sepsis grave mediante el análisis de microarrays, concluyendo que MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 y TIMP4 presentaron niveles más altos en estos pacientes respecto a los de pacientes sanos ⁽¹²¹⁾.

Bagshaw hizo un estudio en el que analizó los niveles de LCN2 en sangre y orina de pacientes críticos con fallo renal, observando que los niveles de este marcador se presentaron más elevados en el grupo de pacientes sépticos frente al de no sépticos, proponiéndolo como posible dato de diagnóstico de sepsis ⁽¹²²⁾.

Liu y colaboradores realizaron un análisis bioinformático de datos de expresión génica diferencial en sepsis de origen pulmonar e identificaron el gen LCN2, entre otros, como marcador de infección, corroborando sus hallazgos con animales de experimentación, en los que obtuvieron el mismo resultado ⁽¹²³⁾.

Todos estos estudios aportan conclusiones prometedoras para investigación de biomarcadores útiles con valor diagnóstico de sepsis, pero ninguno de ellos compara pacientes postquirúrgicos con shock séptico frente a shock no séptico.

Para demostrar la fiabilidad de los resultados obtenidos de nuestro análisis de microarrays, se ha validado la respuesta transcripcional de estos seis GDE mediante qRT-PCR, utilizando una segunda cohorte de las mismas características y dividiendo a los pacientes según el origen séptico o no séptico del shock, verificando así los resultados preliminares.

Las curvas ROC de cada uno de los genes seleccionados dan buenos valores de área bajo la curva (AUC) de manera individual, mejorando aún más la cifra cuando se analizan los seis genes en conjunto. Esto nos indica que de IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 y OLFM4 podrían servir como biomarcadores moleculares con buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de sepsis. Una vez llegada a esta conclusión, procedimos a comparar esta batería de genes con los biomarcadores clásicos.

Los más utilizados hasta la fecha actual han sido la procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (PCR) y niveles sanguíneos de leucocitos.

La procalcitonina es el biomarcador que mejores resultados ha proporcionado como guía para el inicio y duración del tratamiento antibiótico en pacientes sépticos ⁽⁶⁸⁾.

Müller fue de los primeros en investigar la PCT como marcador de infección e hizo un estudio en pacientes de una unidad de cuidados intensivos con diversas patologías médicas, comparando los niveles de PCT en sangre con los de PCR, IL-6 y lactato, demostrando la mejor correlación de la PCT con el diagnóstico de sepsis, frente a estos otros biomarcadores ⁽¹²⁴⁾.

El metaanálisis liderado por Schuetz, que analiza 14 ensayos en los que se emplea la PCT como guía para inicio y duración del tratamiento antibiótico, concluye que no encontraron una mayor mortalidad ni un mayor fracaso del tratamiento en los pacientes en los que la terapia se guio por los niveles de PCT, con un menor uso de los antibióticos en este grupo ⁽⁶⁸⁾. Una de las limitaciones que incluye trabajo es la población a estudio. Analizan pacientes muy heterogéneos con insuficiencia respiratoria aguda, desde los atendidos en atención primaria hasta los ingresados en las UCIs, sin valorar que la PCT es un marcador que puede estar elevado en diversas afecciones de pacientes posquirúrgicos (traumatismos, daño neurológico, daño renal, la propia cirugía...), por lo que no sería aplicable a los pacientes diana de nuestro trabajo. En esta línea, hay diversos estudios que lo demuestran, como el realizado por Heredia y colaboradores con pacientes en posoperatorio de cirugía cardíaca; afirmando que en aquellos en los que se presentó daño renal, los niveles de PCT resultaron más elevados, interfiriendo así en el empleo de la PCT como marcador de infección en este tipo de pacientes ⁽⁶⁹⁾.

La PCR fue detectada en sangre por primera vez en 1930 por Tillett y Francis. Analizaron el suero de pacientes con neumonía neumocócica y observaron que durante la fase aguda de la infección se producía un aumento de esta proteína, que disminuía a sus niveles basales poco tiempo después de la resolución del cuadro ⁽¹²⁵⁾. A partir de este hallazgo, se comenzó a estudiar en otras patologías infecciosas, observándose que en ellas también se producía un aumento. Esto dio lugar a investigar más sobre su fisiopatología, siendo catalogada años más tarde como “proteína de fase aguda” ⁽¹²⁶⁾. Los estudios como marcador de infección han sido contradictorios, y no han podido establecerlo como una buena herramienta diagnóstica.

Oosterhuis estudió su validez como prueba para el diagnóstico de apendicitis aguda, no resultando útil por sí misma, por su baja especificidad, pero sí como adyuvante para aumentar la precisión de otras pruebas diagnósticas ⁽¹²⁵⁾. En la misma línea se muestra el estudio de al-Saigh, que afirma que, en pacientes con clínica de abdomen agudo, una ecografía no patológica acompañada de niveles normales de PCR en sangre puede ser de utilidad para descartar apendicitis aguda, de manera que la PCR puede ser empleada como un complemento diagnóstico, pero no como marcador de infección en sí mismo, por su baja sensibilidad y especificidad ⁽¹²⁷⁾.

Mazlam estudia los niveles de PCR en diferentes patologías, tanto médicas como quirúrgicas, incluida la sepsis, y afirma su utilidad como elemento de monitorización del proceso inflamatorio y la respuesta al tratamiento ⁽¹²⁸⁾.

En el año 2001, la conferencia de consenso para las definiciones de sepsis ⁽¹⁹⁾ continuó con la definición vigente de sepsis como “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica debido a una infección”, pero consideraron poco específico el concepto de SIRS y ampliaron sus criterios, entre los cuales figura un aumento de PCR mayor de 2 desviaciones estándar por encima de su valor normal considerando una vez más a esta proteína como buen marcador de inflamación e infección.

Dentro de estos criterios, tiene un papel importante el recuento de glóbulos blancos, incluyendo valores mayores de 12.000 o menores de 4.000 como parámetros valorables para el diagnóstico de SIRS. Así pues, los niveles de leucocitos en sangre constituyen un marcador de infección clásico muy utilizado, no sólo como elemento de diagnóstico sino, también, de evaluación pronóstica ⁽¹²⁹⁾.

En nuestro trabajo, la comparación de las AUC de los biomarcadores clásicos, PCT, PCR y neutrófilos con los GDE propuestos, ofreció mejores resultados para el conjunto de genes derivados de nuestro análisis transcriptómico. Con esto se puede afirmar que IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 y OLFM4 se constituyen como una nueva herramienta de diagnóstico molecular para distinguir entre pacientes posoperatorios con shock séptico de los que presentan shock de otra etiología. Además, abren la puerta a futuros estudios que ofrezcan nuevas dianas terapéuticas en pacientes sépticos.

7.2. Huella molecular diferencial entre alto y bajo riesgo de mortalidad.

El empleo de perfiles de expresión génica en sangre periférica se ha demostrado útil como marcador pronóstico en diversas enfermedades como leucemia, cáncer gástrico, hepatitis, atresia biliar o enfermedad de Crohn ⁽¹³⁰⁻¹³⁵⁾. A esta lista, nosotros sumamos el shock, una complicación frecuente y grave en pacientes críticos posquirúrgicos. Así, la segunda parte de este estudio valora un grupo de pacientes ingresados en la UCI con shock posquirúrgico, dividiéndolo en supervivientes y no supervivientes según su mortalidad a los 30 días del diagnóstico. El diagnóstico de shock se realizó siguiendo las directrices de la Tercera Conferencia de Consenso para el diagnóstico de Sepsis (Sepsis-3), del año 2016, y se seleccionaron los pacientes con valor de lactato en sangre mayor o igual a 2 mmol/L ⁽²¹⁾.

Se obtuvieron una serie de GDE entre el grupo de supervivientes y no superviviente, seleccionándose cuatro de ellos en base a los resultados del análisis bioinformático: OLFM4, CD177, RETN e IL1R2, implicados con respuestas inmunes, la formación de coágulos de fibrina y las respuestas al estrés metabólico; procesos relacionados con la fisiopatología del shock.

OLFM4 codifica una glicoproteína de matriz extracelular de gránulos específicos de neutrófilos, facilitadora de la adhesión celular. Kangelaris y colaboradores analizaron su expresión en pacientes sépticos que acudían al servicio de urgencias del hospital, observando que se asociaba a aquellos pacientes de mayor gravedad, en estado de shock y con necesidad de ventilación mecánica, documentándolo como marcador independiente de mal pronóstico y mortalidad en pacientes sépticos no quirúrgicos⁽¹³⁶⁾.

El estudio liderado por Alder analizó datos transcriptómicos de pacientes pediátricos con shock séptico e identificó una mayor cantidad de neutrófilos OLFM4 positivos en aquellos que tuvieron un curso tórpido de la enfermedad, asociándolo también a una mayor mortalidad en estos pacientes⁽¹³⁷⁾.

El CD177 es otro gen codificante de una proteína de adhesión de neutrófilos. Hemos encontrado poca literatura que lo relacione con la gravedad de pacientes críticos, tan sólo un pequeño estudio exploratorio que evalúa la expresión de ARNm de unos pocos pacientes con shock séptico, identificando sobreexpresión de varios genes, sobre todo de CD177⁽¹³⁸⁾. Si bien, hay varias investigaciones que lo relacionan con patologías del sistema inmune⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾.

RETN codifica para una proteína implicada en el mecanismo de la glucosa y en procesos inflamatorios⁽¹⁴²⁾, identificada por primera vez en el año 2001 en ratones con diabetes mellitus y obesidad⁽¹⁴³⁾. Se ha identificado como elemento clave de la inmunosupresión⁽¹⁴⁴⁾ y ha sido propuesta como marcador de infección, junto con otros GDE, en diversos estudios^(145, 146). La primera investigación sobre la sobreexpresión de este gen como factor pronóstico de mortalidad fue realizada en 2013 por el grupo de Menzaghi. Analizaron niveles de ARNm de pacientes diabéticos de origen europeo, con y sin enfermedad cardiovascular, y observaron que la expresión de RETN estaba relacionada con la aparición de eventos críticos cardiovasculares y el aumento de mortalidad en esta población⁽¹⁴⁷⁾.

Para comprobar la capacidad de predicción del riesgo de mortalidad de OLFM4, CD177, RETN e IL1R2, los comparamos con las escalas clásicas de gravedad que se usan actualmente en las unidades de cuidados intensivos: APACHE II, SAPS II y

SOFA, obteniendo mejores resultados con el conjunto de nuestros GDE. Además, realizamos un modelo de regresión multivariante en el que incluimos las variables sexo, edad, cirugía urgente, neutrófilos y bilirrubina, y conseguimos mejorar la capacidad pronóstica combinando datos genómicos y clínicos. En este sentido, ya hay estudios que avalan que la combinación de ambos datos mejora la precisión en los modelos pronósticos. Pittman lo demostró ya en el año 2004 en pacientes con cáncer de mama⁽¹⁴⁸⁾. También en esta patología, el estudio liderado por Huang determinó que la combinación del análisis de un modelo genómico basado en rutas junto con las características clínicas mejoraba la predicción del riesgo de recurrencia en el cáncer de mama frente a dichos modelos de manera independiente ⁽¹⁴⁹⁾.

Así pues, proponemos este perfil transcriptómico como nueva herramienta de estratificación pronóstica, a través de la cual se podrían clasificar a los pacientes que presenten shock en periodo posoperatorio según su bajo o alto riesgo de mortalidad, e intensificar las medidas terapéuticas en aquellos en los que sea necesario.

Conocer los fenómenos que ocurren a nivel molecular en esta situación, puede servir también para dar explicación a los procesos clínicos que muestran estos pacientes. Casualmente, estos cuatro genes sobreexpresados en los pacientes no supervivientes están relacionados con vías del sistema inmunitario. Esto nos induce a pensar que pueden estar sufriendo etapas tempranas de un proceso séptico aun no reconocido, pudiendo ser esa la causa del fallecimiento, antes de que pueda diagnosticarse la infección ⁽²⁸⁾.

7.3. Aplicación práctica de las huellas moleculares propuestas

La Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU. (FDA) define *biomarcador* como "Una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención" ⁽¹⁵⁰⁾. Para que un nuevo biomarcador resulte útil en la práctica clínica debe ser confiable, preciso y repetible a un bajo costo.

Una de las ventajas de este estudio, es que los resultados obtenidos son fácilmente aplicables en la rutina asistencial actual de los hospitales. La qRT-PCR es una herramienta de diagnóstico molecular ampliamente utilizada por los laboratorios, no sólo en la investigación clínica, sino también como prueba de diagnóstico, ofreciendo resultados rápidos y precisos ⁽¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾, lo que resulta fundamental en patologías tiempo-dependientes y en enfermos críticos.

7.4. Limitaciones

En el estudio descrito en esta tesis ha de considerarse ciertas limitaciones.

En primer lugar, ha sido realizado en un solo centro, pudiendo estar influido por el manejo posoperatorio de los pacientes y el procesamiento de las muestras. Sería interesante elaborar un estudio multicéntrico que pudiera confirmar los resultados descritos, dar validez externa a nuestros hallazgos y prestar aplicación clínica en pacientes con shock posquirúrgico.

En segundo lugar, los patrones de expresión génica se han analizado al margen del patógeno implicado. Revisando la literatura previa, muchas investigaciones han reportado huellas moleculares comunes, independientes del organismo infeccioso. Sin embargo, hay estudios que han presentado respuestas transcripcionales moduladas por el patógeno ⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾, como el de Jenner y colaboradores, que defienden una respuesta común de huésped, modificada según el tipo de microorganismo invasor⁽¹⁵¹⁾.

En tercer lugar, no se analizó la evolución del perfil transcriptómico a lo largo del tiempo. Son necesarios futuros estudios para esclarecer si la huella molecular diferencial se expresa en sangre antes del diagnóstico de sepsis o shock, o es variable según el estado de la enfermedad.

8. Conclusiones

8. CONCLUSIONES

- a) El perfil transcriptómico formado por IGHG1, IL1R2, LCN2, LTF, MMP8 y OLFM4 puede distinguir el shock séptico del shock no séptico en pacientes intervenidos de cirugía mayor.
- b) Este conjunto de genes resulta mejor como biomarcador diagnóstico para diferenciar pacientes sépticos que los biomarcadores clásicos más utilizados: PCT, PCR y leucocitos.
- c) La huella molecular constituida por OLFM4, CD177, RETN e IL1R2 clasifica a los pacientes que presentan shock durante el periodo posoperatorio según su alto o bajo riesgo de mortalidad.
- d) Este perfil de expresión génica predice mejor la mortalidad que las escalas de riesgo tradicionales APACHE II y SOFA.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Breasted JH, ed. The Edwin Smith Surgical Papyrus- Hieroglyphic Transliteration, Translation, and Comentary. Vol 1. Whitefish (Montana): Kessinger; 2006: 175-200
2. Bou Khalil R, Richa S. When affective disorders were considered to emanate from the heart: the Ebers papyrus. *Am J Psychiatry*. 2014 Mar 1;171(3):375
3. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med*. 2006 Dec;32(12):2077. doi: 10.1007/s00134-006-0392-2. Epub 2006 Oct 13. PMID: 17131165.
4. Francis A. The genuine works of Hippocrates. 2 ed. New York: Gryphon Editions Ltd; 1985.
5. Daniel TM, Iversen PA. Hippocrates and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015 Apr;19(4):373-4
6. Haggard HW. El Médico en la Historia, 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Sudamericana; 1947. 455 pp.
7. PUIGBO, Juan José. Aulus Cornelius Celsus (25 a.C. - 50 d.C.) "De Medicina". *Gac Méd Caracas [online]*. 2002, vol.110, n.4
8. Botero H. Recuento histórico y análisis epistemológico de la sepsis secundaria a lesiones y su control quirúrgico: desde el papiro de Edwin Smith hasta el "pus bonum et laudabile". *Iatreia*. 2009;22(3):292-300
9. Howard-Jones N. Fracastoro and Henle: a re-appraisal of their contribution to the concept of communicable diseases. *Med Hist*. 1977 Jan;21(1):61-8.
10. Stratman-Thomas WK. Girolamo Fracastoro (1478-1553)-and Syphilis. *Cal West Med*. 1930 Oct;33(4):739-42
11. Cocquyt T. Positioning Van Leeuwenhoek's microscopes in 17th-century microscopic practice. *FEMS Microbiol Lett*. 2022 Apr 21;369(1):fnac031.
12. Robinson V. La Medicina en la Historia. Buenos Aires: Ediciones Tridente; 1947: 95-96
13. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin*. enero de 2009;25(1):83-101, viii.
14. De Costa CM. «The contagiousness of childred fever»: a short history of puerperal sepsis and its treatment. *Med J Aust*. 2 de diciembre de 2002;177(11-12):668-71.
15. Rosengart MR. Critical care medicine: landmarks and legends. *Surg Clin North Am*. 2006;86(6):1305-21.
16. Martini M. SARS-CoV-2 (COVID-19) and the Teaching of Ignaz Semmelweis and Florence Nightingale: a Lesson of Public Health from History, after the "Introduction of Handwashing" (1847). *J Prev Med Hyg*. 2021
17. Bone RC. Sepsis and coagulation. An important link. *Chest*. 1992 Mar;101(3):594-6. doi: 10.1378/chest.101.3.594. PMID: 1541114.

18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. junio de 1992;101(6):1644-55.
19. Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29, 530–538 (2003).
20. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, et al (2002) Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 286:1754–1758
21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801–10
22. Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2021 Apr 1;34(2):71-76.
23. Rudd KE, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200-211.
24. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344–53.
25. WHO, (2019). Global Health Observatory data repository [Online]. Available: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.HIVINCIDENCE?lang=en>. Accessed November 23, 2019
26. Ferrer R, et al. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA*. 2008; 299: 2294-303.
27. Rudd KE, Johnson SC, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200-211.
28. Evans L, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021 Nov;47(11):1181-1247.
29. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* 2001; 29(7):1303-1310.
30. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2019; 23: 196.
31. Álvaro-Meca A, Jiménez-Sousa MA, Micheloud D, et al. Epidemiological trends of sepsis in the twenty-first century (2000-2013): an analysis of incidence, mortality, and associated costs in Spain. *Popul Health Metr* 2018; 16: 4.
32. Inigo J, Sendra JM, Diaz R, Bouza C, Sarria-Santamera A. Epidemiology and costs of severe sepsis in Madrid. A hospital discharge study. *Med Intensiva* 2006; 30(5):197-203.
33. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations *American journal of respiratory and critical care medicine* 2016; 193: 259-272.

34. WHO, (2019). The Global Cancer Observatory [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr>. Accessed November 23,2019.
35. Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JM. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011). *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 21; 14:3863.
36. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med.* 2018 Dec;46(12):1889-1897.
37. Vincent JL, Sakr Y, Singer M et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. *JAMA.* 2020 Apr 21;323(15):1478-1487
38. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013 29; 369:840-51.
39. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy. *Virulence* 2014;5:80-97
40. Annane D, et al. Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63-78.
41. Eduardo Tamayo y col. *Medicina crítica y emergencias.* 1 ed. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2017
42. Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:32-43.
43. Huang M, Cai S, Su J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 29;20(21):5376
44. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):821-32.
45. James K. Chan, Alarmins: awaiting a clinical response *J Clin Invest.* 2012;122(8):2711-2719
46. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010, 11, 373–384.
47. Hou, J. Sphingosine 1-phosphate Receptor 2 Signaling Suppresses Macrophage Phagocytosis and Impairs Host Defense against Sepsis. *J. Am. Soc. Anesthesiol.* 2015, 123, 409–422.
48. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Feb;14(2):121-137
49. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):813-22.
50. T. Iba, J.H. Levy. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost.*, 16 (2018), pp. 231-241
51. Aupeix K, Hugel B, Martin T, et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 99:1546-1554

52. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 2004; 9:1118-1135
53. Ellis C.G., Bateman R.M., Sharpe M.D., et. al.: Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: pp. H156-H164.
54. De Backer D., Creteur J., Preiser J.C., et. al.: Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: pp. 98-104.
55. Sakr Y.L., Dubois M.J., De Backer D., et. al.: Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: pp. 1825-1831.
56. Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011; 3:88ps25-88ps25
57. Levi M.: The coagulant response in sepsis. *Clin. Chest Med.* 2008; 29: pp. 627-642. (viii)
58. Levi M., van der Poll T.: Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* 2010; 38: pp. S26-S34.
59. Tamayo E. Anestesiología, medicina crítica y emergencias. 1 ed. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2019.
60. Marshall JC, et al. The Surviving Sepsis Campaign: a history and a perspective. *Surg Infect* 2010;11: 275 -81.
61. Zhang H, Wang X, Zhang Q, Xia Y, Liu D. Comparison of procalcitonin and high-sensitivity C-reactive protein for the diagnosis of sepsis and septic shock in the oldest old patients. *BMC Geriatr* 2017; 17: 173.
62. Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Biochem* 2019; 120: 5852–9.
63. Jae Ha Lee. Clinical usefulness of biomarkers for diagnosis and prediction of prognosis in sepsis and septic shock *Medicine (Baltimore)*. 2022 Dec 2;101(48): e31895.
64. Fan SL, Miller NS, Lee J, Remick DG. Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta.* 2016 Sep 1; 460:203-10.
65. Pierrakos C, et al. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care Lond. Engl.* 2010;14: R15.
66. Becker KL, Nysten ES, White JC, Muller B, Snider RH Jr. 2004. Clinical review 167: procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1512–1525.
67. Morgenthaler NG, Struck J, et al. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res* 35:290–295
68. Schuetz P et al. Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012;55(5):651-62

69. Wacker C, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13:426 -35
70. Heredia-Rodríguez et al. Procalcitonin cannot be used as a biomarker of infection in heart surgery patients with acute kidney injury. *J Crit Care.* 2016 Jun; 33:233-9.
71. Meisner M et al. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med.* 1998 Jul;24(7):680-4.
72. B. Young, M. Gleeson, A.W. Cripps C-reactive protein: a critical review *Pathology*, 23 (1991), pp. 118-124
73. Uzzan B et al. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1996-2003.
74. Meisner M et al. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Crit Care.* 2006;10:R1
75. Santonocito C, De Loecker I, Donadello K, et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesth Analg* 2014; 119: 624–9
76. Casserly B, Phillips GS, Schorr C, et al. Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit Care Med.* 2015;43(3):567–573
77. Jansen TC, van Bommel J et al. The prognostic value of blood lactate levels relative to that of vital signs in the pre-hospital setting: a pilot study. *Crit Care.* 2008;12: R160.
78. Howell MD, Donnino M, Clardy P, Talmor D, Shapiro NI. Occult hypoperfusion and mortality in patients with suspected infection. *Intensive Care Med.* 2007;33(11):1892–9.
79. Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. *N Engl J Med.* 2014 Dec 11;371(24):2309-19.
80. Wagner DP, Draper EA. Acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II) and Medicare reimbursement. *Health Care Financ Rev.* 1984;Suppl(Suppl):91-105.
81. Vincent JL, Moreno R et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707-10.
82. Moreno R, Vincent JL, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med.* 1999 Jul;25(7):686-96.
83. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA.* 1993 Dec 22-29;270(24):2957-63.
84. Breslow MJ, Badawi O. Severity scoring in the critically ill: part 1 - Interpretation and accuracy of outcome prediction scoring systems. *Chest.* 2012;141(1):245-252.

85. Chen X, Sun X, Hoshida Y. Survival analysis tools in genomics research. *Human Genomics*. 2014; 8:21.
86. Chen, X.; Sol, X.; Hoshida, Y. Herramientas de análisis de supervivencia en la investigación genómica. *Tararear. genoma* 2014,8,21.
87. Chibon F. Cancer gene expression signatures - the rise and fall? *Eur J Cancer*. 2013 May;49(8):2000-9.
88. Almansa, R.; Heredia-Rodríguez, M.; Gomez-Sanchez, E.; Andaluz-Ojeda, D.; Iglesias, V.; Rico, L.; Ortega, A.; Gomez-Pesquera, E.; Liu, P.; Aragón, M.; et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J. Infect.* 2015, 70, 445–456.
89. Sweeney, T.E.; Wong, H.R. Risk stratification and prognosis in sepsis: ¿What have we learned from microarrays? *Clin. Chest Med.* 2016, 37, 209–218.
90. Davenport, E.E.; Burnham, K.L.; et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: A prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* 2016, 4, 259–271
91. Sweeney, T.E.; Perumal, T.M.; Henao, R.; Nichols, M.; Howrylak, J.A.; Choi, A.M.; Bermejo-Martin, J.F.; Almansa, R.; Tamayo, E.; Davenport, E.E.; et al. A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat. Commun.* 2018, 9, 694.
92. Christie J. Microarrays. *Crit Care Med.* 2005;33: S449–452
93. https://www.researchgate.net/figure/Workflow-summary-of-printed-microarrays-Probes-are-PCR-amplified-or-oligonucleotides_fig2_26888549
94. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347:1999–2009
95. Jansen MP, Foekens JA, et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 1;23(4):732-40. doi: 10.1200/JCO.2005.05.145. PMID: 15681518.
96. Lapointe J, Li C, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 20;101(3):811-6.
97. Golub TR, Slonim DK, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
98. Thornton S, Sowders D, et al. DNA microarray analysis reveals novel gene expression profiles in collagen-induced arthritis. *Clin Immunol.* 2002 Nov;105(2):155-68.
99. Barrans JD, Allen PD, Stamatiou D, Dzau VJ, Liew CC. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol.* 2002 Jun;160(6):2035-43.
100. Wong, H. R. Clinical review: sepsis and septic shock--the potential of gene arrays. *Crit. Care Lond. Engl.* 2012;16, 204.
101. Wong HR, Cvijanovich N, Lin R, et al. Identification of pediatric septic shock subclasses based on genome-wide expression profiling. *BMC Med.* 2009 Jul 22; 7:34

102. Tang BM, et al. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2010;14: R237.
103. Shampo MA, Kyle RA, Kary B, Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clin Proc*. 2002 Jul;77(7):606.
104. Saiki RK, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4
105. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol*. 1992 Mar;1(1):58-72.
106. Josep Costa. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-305
107. Burnham KL, Davenport EE, Radhakrishnan J, et al. Shared and distinct aspects of the sepsis transcriptomic response to fecal peritonitis and pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196: 328–39
108. Sweeney TE, Wong HR, Khatri P. Robust classification of bacterial and viral infections via integrated host gene expression diagnostics. *Sci Transl Med* 2016; 8: 346ra91
109. Tamayo E, et al. Quantification of IgM molecular response by droplet digital PCR as a potential tool for the early diagnosis of sepsis. *Critical Care*. 2014;18:433.
110. van Wagenberg L, Witteveen E, Wieske L, Horn J. Causes of Mortality in ICU-Acquired Weakness. *J Intensive Care Med*. 2020 Mar;35(3):293-296.
111. P. QIAGEN, 'PAXgene Blood RNA Kit Handbook'. PreAnalytiX, Versión 2, (2008).
112. www.preanalytix.com
113. Agilent Technologies "One-Color Microarray-based Gene Expression Analysis".
114. Prucha M, et al. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. *Shock*. 2004;22:29–33
115. Balamuth F, Alpern ER, et al. Expression Profiles in Children With Suspected Sepsis. *Ann Emerg Med*. 2020 Jun;75(6):744-754.
116. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. Inflamm and Host Response to Injury Large Scale Collab. Res. Program. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1032-7.
117. Maslove DM, Wong HR. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):204-13
118. Liu G, Liu Y, Tao J, Li Y, Wang Y, Li S, Liu D. [Differential gene expression and bioinformatics analysis in sepsis secondary to pneumonia]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2022 Feb;34(2):138-144. Chinese
119. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar;13(3):260-8.

120. Lang Y, Jiang Y, et al. Interleukin-1 Receptor 2: A New Biomarker for Sepsis Diagnosis and Gram-Negative/Gram-Positive Bacterial Differentiation. *Shock*. 2017 Jan;47(1):119-124.
121. Yazdan-Ashoori P, Liaw P et al. Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2011 Dec;26(6):556-65.
122. Bagshaw SM, Bennett M et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med*. 2010 Mar;36(3):452-61
123. Liu G, et al. [Differential gene expression and bioinformatics analysis in sepsis secondary to pneumonia]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2022 Feb;34(2):138-144.
124. Müller B, Becker KL, et al. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4):977-83.
125. W.S. Tillett, T. Francis Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the pneumococcus. *J Exp Med*, 52 (1930), pp. 561-571
126. T.J. Abernathy, O.T. Avery. The occurrence during acute infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effects of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus *J Exp Med*, 73 (1941), p. 173
127. Oosterhuis WP, Zwinderman AH, Teeuwen M, van Andel G, Oldenzijl H, Kerkhoff JF, Siebbeles HW, van der Helm HJ. C reactive protein in the diagnosis of acute appendicitis. *Eur J Surg*. 1993 Feb;159(2):115-9.
128. Mazlam MZ, Hodgson HJ. Why measure C reactive protein? *Gut*. 1994 Jan;35(1):5-7.
129. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13:818–829.
130. Metzeler, K.H.; Hummel, M. et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2008, 112, 4193–4201
131. Wang, P.; Wang, Y.; Hang, B.; Zou, X.; Mao, J.H. A novel gene expression-based prognostic scoring system to predict survival in gastric cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 55343–55351
132. Trépo, E.; Goossens, N. et al. Combination of gene expression signature and model for end-stage liver disease score predicts survival of patients with severe alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2018, 154, 965–975.
133. Luo, Z.; Shivakumar, P.; Mourya, R.; Gutta, S.; Bezerra, J.A. Gene expression signatures associated with survival times of pediatric patients with biliary atresia identify potential therapeutic agents. *Gastroenterology* 2019, 157, 1138–1152.
134. Cui J, Chen Y, Chou WC, et al. An integrated transcriptomic and computational analysis for biomarker identification in gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 1197–207

135. Palmieri O, Creanza TM, Bossa F, et al. Functional implications of microRNAs in Crohn's disease revealed by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1580
136. Kangelaris KN, Clemens R, et al. A neutrophil subset defined by intracellular olfactomedin 4 is associated with mortality in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2021 May 1;320(5): L892-L902.
137. Alder MN, Opoka AM, Lahni P, Hildeman DA, Wong HR. Olfactomedin-4 Is a Candidate Marker for a Pathogenic Neutrophil Subset in Septic Shock. *Crit Care Med*. 2017 Apr;45(4): e426-e432.
138. Demaret J, Venet F et al. Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients. *Immunol Lett*. 2016 Oct; 178:122-30.
139. Deng H, Hu N et al. Interaction between CD177 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 downregulates membrane-bound proteinase-3 (PR3) expression on neutrophils and attenuates neutrophil activation induced by PR3-ANCA. *Arthritis Res Ther*. 2018 Sep 20;20(1):213.
140. Hu N, Mora-Jensen H, Theilgaard-Mönch K, Doornbos-van der Meer B, Huitema MG, Stegeman CA, Heeringa P, Kallenberg CG, Westra J. Differential expression of granulopoiesis related genes in neutrophil subsets distinguished by membrane expression of CD177. *PLoS One*. 2014 Jun 13;9(6):e99671
141. Bai M, Grieshaber-Bouyer R et al. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood*. 2017 Nov 9;130(19):2092-2100.
142. Bokarewa M., Nagaev I., Dahlberg L., Smith U., Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol*. 2005; 174:5789–5795
143. C.M. Steppan, E.J. Brown et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001), pp. 502-506.
144. Miller L., Singbartl K et al. Resistin directly inhibits bacterial killing in neutrophils. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2019;7(1): p.30.
145. Li Y, Zhang H, Shao J, et al. Bioinformatics Analysis for Identifying Pertinent Pathways and Genes in Sepsis. *Comput Math Methods Med*. 2021 Nov 1; 2021:2085173.
146. Lu J, Chen R, et al. Characterization of immune-related genes and immune infiltration features for early diagnosis, prognosis and recognition of immunosuppression in sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2022 Jun; 107:108650.
147. Menzaghi C, Bacci S et al. Serum resistin, cardiovascular disease and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013 Jun 3;8(6): e64729.
148. Pittman J, Huang E, et al. Integrated modeling of clinical and gene expression information for personalized prediction of disease outcomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(22):8431-8436.
149. Huang S, Yee C, et al. A novel model to combine clinical and pathway-based transcriptomic information for the prognosis prediction of breast cancer. *PLoS computational biology*. 2014;10(9): e1003851.

150. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US)
151. Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3, 281–94
152. Sweeney TE, Wong HR, Khatri P. Robust classification of bacterial and viral infections via integrated host gene expression diagnostics. *Sci Transl Med* 2016; 8: 346ra91
153. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 972–7

10. ANEXOS

I. CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACION PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Proyecto de investigación: **“FASE III- HUELLA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PACIENTES SÉPTICOS Y ESTIMACIÓN DEL RIESGO DE MORTALIDAD EN PACIENTES CON SHOCK POSQUIRÚRGICO.**

Por favor, lea con atención este documento y formule las preguntas que quiera

INTRODUCCION

La sepsis constituye una enfermedad con una alta morbimortalidad. En presencia de sepsis la mortalidad se mantiene a un nivel inaceptablemente alto: 30% al 50%. Cuando se presenta shock séptico, está descrito que la mortalidad se dispara a cifras aún mayores: 50-60%. De tal forma, que la mortalidad hospitalaria de la sepsis es mayor que la de otras condiciones, como el accidente cerebrovascular (12%-19%) o el infarto agudo de miocardio (8%).

El diagnóstico de la sepsis sigue basándose en criterios exclusivamente clínicos, siendo difícil diferenciar los distintos estadios de evolución de la misma. Así mismo, todavía existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la génesis de esta enfermedad.

Durante el posoperatorio de cirugía mayor, surgen complicaciones que pueden desembocar en shock, una situación caracterizada por fallo multiorgánico, que conlleva alta mortalidad para el paciente. Poder hacer una estimación pronóstica cuando se presenta esta patología, puede ayudar al control de la misma, mediante medidas específicas de tratamiento. Pero hoy en día, las herramientas disponibles de estimación de la gravedad presentan poca especificidad para pacientes durante el periodo posoperatorio.

La aplicación de técnicas de análisis masivo de información biológica (high-throughput analysis), como el análisis de expresión génica por microarrays de transcriptoma humano completo, nos permitirá caracterizar las rutas de señalización intracelular y los grupos de genes implicados en la fisiopatología de la sepsis y el shock, así como obtener la “huella molecular” de estas enfermedades.

OBJETIVOS

Biocritic es un grupo de trabajo cooperativo y multidisciplinar que tiene como objetivo mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de la patología crítica. Una de nuestras líneas de investigación está volcada en la sepsis y el shock posoperatorio. Su objetivo es obtener nuevos conocimientos para resolver los problemas médico-quirúrgicos de estas situaciones (prevención, diagnóstico y tratamiento).

Desde Biocritic, estamos realizando la investigación arriba mencionada, para conocer las huellas moleculares de la sepsis y el shock.

La participación en este proyecto es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted. Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad.

Consideraciones éticas:

La confidencialidad de los datos personales y genéticos obtenidos estará asegurada, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad).

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki y los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano.

Todos los datos clínicos que puedan revelar su identidad (incluida cualquier publicación realizada a raíz de este estudio) se procesarán en la más estricta confidencialidad.

Descripción de los procedimientos

Vd. no va a ser sometido a ningún procedimiento extraordinario distinto del proceso diagnóstico habitual, excepto la extracción de una pequeña muestra de sangre (5cc).

En su caso se realizarán estudios de expresión génica relacionados la sepsis y el shock.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ SU PARTICIPACIÓN?

En el presente estudio le pedimos su colaboración en los siguientes aspectos

- A) disponer de sus datos contenidos en la historia clínica.
- B) extracción de una muestra de sangre venosa de unos 5 ml.

Muestras biológicas:

A partir de las muestras biológicas realizará análisis de ARN (Acido Ribo Nucleico).

Una vez finalizada dicha investigación, si aún quedase muestra, ésta será destruida o disociada de los datos de identificación.

Fuente de financiación:

Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.

Beneficios que se esperan alcanzar:

Los resultados de dichos estudios pueden suponer una revolución en el diagnóstico de la sepsis y el manejo del shock posquirúrgico, actualmente basado en criterios exclusivamente clínicos.

La monitorización de los cambios en la expresión génica a lo largo de la evolución del paciente podría servir para evaluar la eficacia del tratamiento empleado.

Riesgos:

Esta investigación no supone ningún riesgo para usted. Sólo si hubiera resultados individuales confirmados científicamente, relevantes y beneficiosos para su salud se le entregaría un informe de expresión génica específico, explicándole las consecuencias clínicas que tiene. Si Vd. no desea ser informado de modo individual, puede manifestarlo.

CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN.

Toda la información (clínica, genética, etc.) será recogida y tratada de forma confidencial por todo el personal. Únicamente el número de identificación permitirá a los investigadores responsables hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes. Dichas muestras serán almacenadas de forma adecuada, durante el tiempo que dure la investigación

Su participación en este estudio es voluntaria. Vd. puede decidir no participar.

Asimismo, Vd. puede decidir retirarse del estudio, en cualquier momento, sin que ello afecte a su atención médica o de sus familiares. Si así ocurriera, ha de contactar con algún miembro del equipo investigador, e indicarle cuál es su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares. Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de consentimiento informado anexo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Yo, (nombre y apellidos) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido

He hablado con: (nombre del investigador) _____

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

En caso de existir resultados genéticos individuales interesantes para mi salud

Si // No

Deseo ser informado personalmente

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En Valladolid, a ____ de _____ de _____

Fdo.: _____

El paciente

Fdo.: _____

El investigador

II. ARTÍCULOS PUBLICADOS

- **Título: Gene Expression Patterns Distinguish Mortality Risk in Patients with Postsurgical Shock**

Autores: Martínez-Paz P*, **Aragón-Camino M***, Gómez-Sánchez E, Lorenzo-López M, Gómez-Pesquera E, López-Herrero R, Sánchez-Quirós B, de la Varga O, Tamayo-Velasco Á, Ortega-Loubon C, García-Morán E, Gonzalo-Benito H, Heredia-Rodríguez M, Tamayo

*These authors contributed equally to this paper

Revista: Journal of Clinical Medicine 2020 Apr 28;9(5):1276.

Categoría: Medicina, General e Interna

Cuartil: Q1

Factor de impacto: 4,242

Ranking: 39/167

- **Título: Distinguishing septic shock from non-septic shock in postsurgical patients using gene expression**

Autores: Martínez-Paz P, **Aragón-Camino M**, Gómez-Sánchez E, Lorenzo-López M, Gómez-Pesquera E, Fadrique-Fuentes A, Liu P, Tamayo-Velasco Á, Ortega-Loubon C, Martín-Fernández M, Gonzalo-Benito H, García-Morán E, Heredia-Rodríguez M, Tamayo E.

Revista: Journal of infection. 2021 Aug;83(2):147-155.

Categoría: Enfermedades infecciosas

Cuartil: Q1 (1^{er} decil)

Factor de impacto: 38,637

Ranking: 4/95

