

Universidad Autónoma de la Ciudad de México  
*Nada humano me es ajeno*

**UACM**

**PARTICIPACIÓN DE TREM-1 COMO SEÑAL TEMPRANA DE  
INFECCIÓN, EN LA EVOLUCIÓN DE PACIENTES  
QUIRÚRGICOS, CON RESPUESTA INFLAMATORIA  
SECUNDARIA**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS  
P R E S E N T A  
DELIA NOEMI ESQUIVEL CALLEJAS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

CO-DIRECTOR: DRA XOCHITL MADRIZ GARCÍA

MEXICO, D.F.

2006

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Isibasi, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por preocuparse en mi futuro.

Al Dr. Eduardo Ferat, por su enorme apoyo, amistad y la participación tan importante en la realización de este proyecto.

Al Dra Esther Orozco y a los profesores del posgrado en Ciencias Genómicas por su apoyo y paciencia.

A Rosalía Aduna, por su apoyo como compañera y amiga.

# ÍNDICE

	Página
Abreviaturas .....	III
Resumen .....	VI
Relación de figuras .....	VIII
Relación de tablas .....	IX
1.- Introducción .....	1
2.- Justificación .....	11
3.- Hipótesis .....	12
4.- Objetivos .....	13
5.- Material y Métodos .....	14
Diseño de estudio .....	14
Universo de trabajo .....	14
Criterios de selección .....	15
Descripción de variables .....	16
Selección de la muestra .....	18
Consideraciones éticas .....	19
Procedimiento en general .....	20
Cuantificación de citocinas .....	21

Determinación de TREM-1 Y HLA-DR por citometria de flujo .....	22
Procedimiento quirúrgico .....	25
Análisis estadístico .....	26
Recursos para el estudio .....	26
6.- Resultados .....	27
7.- Discusión .....	37
8.- Conclusiones .....	42
9.- Perspectivas .....	42
10.- Bibliografía .....	43
11.- Anexos .....	50

## ABREVIATURAS

AP-1	Proteína de Activación 1
CARS	Síndrome de respuesta anti-inflamatoria Compensadora
DAP12	Proteína adaptadora de 12 KDa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias monocito macrófago
GRB2	Proteína 2 que une al factor de crecimiento
HLA	Antígeno leucocitario humano
I $\kappa$ B	Inhibidor del factor nuclear $\kappa\beta$
I $\kappa$ K	Cinasa de I $\kappa$ B
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IL-1RA	Antagonista del receptor de interleucina 1
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRF	Factor de respuesta a interferón
ITAM	Dominio de activación del inmunoreceptor basado en tirosina
LPB	Proteína que une al lipopolisacarido
LPS	Lipopolisacarido
MAP	Protein-cinasas activadas por mitógeno

MASP	Serín-proteasas asociadas a MBL
MBL	Lectina que une manosa
MCP-1	Proteína 1 quimioatrayente de neutrofilos
mTREM	RNA mensajero de TREM-1
MyD88	Factor de diferenciación mieloide de 88 Kda
MHC-II	Moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reductasa
NFA3	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear κB
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células T con receptores de las células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
NOD	Proteína con dominios de oligomerización de Nucleotidos
PCR	Proteína C Reactiva
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidil-inositol-3- cinasa
sTREM	Forma soluble de TREM-1
sv TREM	Variante de splicing de TREM-1
TIR	Dominio intracelular compartido por TLRs e IL-1R
TLRs	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TREM	Receptor activador expresado en células mieloides

## RESUMEN

La inflamación forma parte de la respuesta Inmune Innata, que se genera como consecuencia de una agresión, la magnitud de la respuesta inflamatoria depende del tipo y duración del estímulo. Dentro de los estímulos que pueden llevar al desarrollo de una respuesta inflamatoria están: infecciones, traumatismos, enfermedades inflamatorias agudas, intervenciones quirúrgicas mayores, entre otros. La mayoría de las veces la inflamación es autolimitada y circunscrita al sitio afectado, lo que facilita el restablecimiento de la homeostasis; en otras, la respuesta inflamatoria se generaliza, constituyendo el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS por sus siglas en inglés)<sup>1</sup>. La excesiva respuesta inflamatoria, junto con una dramática parálisis de la inmunidad mediada por células, secundaria a cirugía mayor, parecen ser las responsables de un aumento en la susceptibilidad al desarrollo de infecciones, principalmente sepsis (definida como SIRS secundario a una infección), siendo la causa de una elevada morbi-mortalidad en pacientes quirúrgicos.

En el presente trabajo evaluamos la participación de TREM-1 como marcador de procesos infecciosos, para lo cual se estudio a 61 pacientes sometidos a cirugía del tracto gastrointestinal y a procedimientos para la plastia de hernias ventrales e inguinales, así como 25 pacientes sépticos (como grupo control positivo a infección) y 50 controles sanos (como grupo control negativo). Se comparó la expresión de TREM-1 y HLA-DR, en monocitos de sangre periférica por citometria de flujo así como los valores de las citocinas: IL-6, IL-12 e IL-10 en suero, mediante la técnica de ELISA, en la muestra preoperatoria de los pacientes quirúrgicos, y en la primer muestra de los pacientes séptico.

Los pacientes sépticos se caracterizaron por presentar niveles de expresión significativamente menores de MHC II y los valores mayores de IL-6 e IL-10 con respecto al grupo quirúrgico y controles sanos. En cuanto a la expresión de TREM-1 no hubo diferencias significativas entre los tres grupos.

Los valores de IL-12 fueron estadísticamente mayores en el grupo de controles sanos, mientras que el grupo de sépticos presentó los valores más bajos de esta citosina.

Al dividir a los pacientes quirúrgicos en dos grupos: sobrevivientes y aquellos que fallecieron, encontramos que los pacientes que fallecieron presentaron valores estadísticamente menores de MHC II, niveles de IL-6 mayores con respecto a los sobrevivientes, en cuanto a TREM-1, IL-12 e IL-10 no hubo diferencias entre los dos grupos.

Al considerar a MHC II como factor de riesgo para muerte en base a los resultados anteriores, se analizaron los datos, para encontrar un punto de corte con mejor significancia estadística, encontrando que cuando se presentaron valores de Moléculas de Clase II en la evaluación preoperatoria  $\leq 55$  %, el paciente tuvo 13.7 veces más la probabilidad de morir después del evento quirúrgico para el que fue programado. Respecto a TREM-1 se encontró un comportamiento muy similar, pero con un punto de corte  $\geq 70$  IMF y con un riesgo de 5.8 veces, pero con menor significancia estadística, debido al poder muestral obtenido en el presente estudio. Por lo cual no pudimos encontrar asociación entre TREM-1 y la presencia de un proceso infeccioso, sin embargo sí encontramos asociación entre MHC II y TREM-1 como predictores de mortalidad, aunque para poder considerar a TREM-1 como factor pronóstico respecto a mortalidad, se necesita un número mayor de pacientes.

## RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	TLRs y sus principales ligandos	3
2	Vías de señalización de los TLR	4
3	Fases de la respuesta inflamatoria sistémica	5
4	RNA mensajero de TREM-1	8
5	Representación de la vía de señalización de TREM-1	9
6	Análisis de monocitos en sangre	24
7	Expresión de HLA-DR en los grupos de pacientes	30
8	Expresión de TREM-1 en los grupos de pacientes...	31
9	Niveles séricos de IL-6	32
10	Niveles séricos IL-12	32
11	Niveles séricos de IL-10	33
12	Expresión de HLA-DR en pacientes quirúrgicos	34
13	Expresión de TREM-1 en pacientes quirúrgicos	34
14	Expresión de IL-6 en pacientes quirúrgicos	35

## TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
I.	Datos demográficos	27
II.	Diagnostico y procedimientos en pacientes quirúrgicos	28
III.	Complicaciones en pacientes quirúrgicos	29
IV.	Asociación de MHC II y TREM-1 con muerte	36

## 1. INTRODUCCIÓN

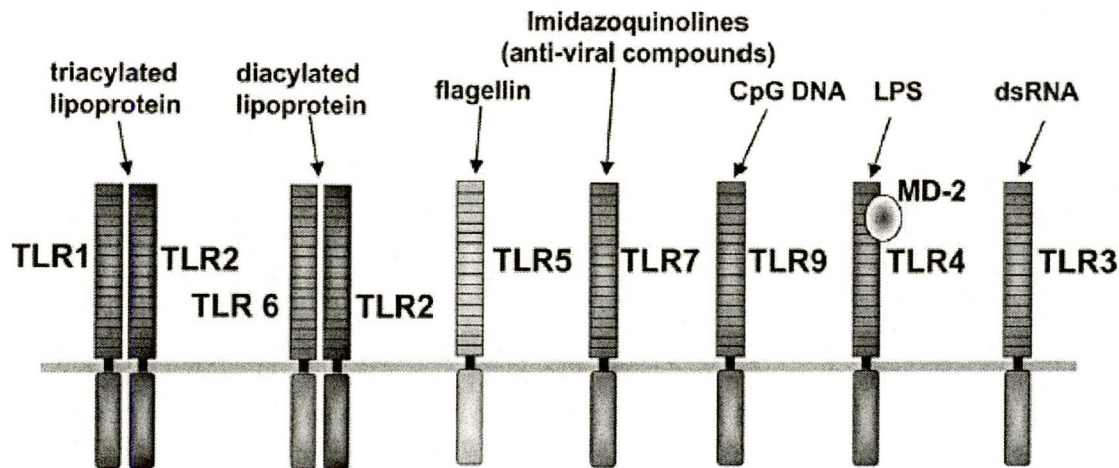
La inflamación se genera como consecuencia de una agresión y la magnitud depende del tipo y duración de la primera. La mayoría de las veces es autolimitada y circunscrita al sitio afectado, lo que facilita el restablecimiento de la homeostasis; en otras, la respuesta inflamatoria se generaliza, constituyendo el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS por sus siglas en inglés)<sup>1</sup>. En ocasiones los micro-organismos patógenos generan un SIRS, pero también existen otras situaciones que se relacionan con el desarrollo de este síndrome (traumatismos, enfermedades inflamatorias agudas, intervenciones quirúrgicas mayores, entre otras), y que no se asocian a procesos infecciosos. Sin embargo, cuando la invasión de un patógeno desencadena un SIRS, a lo que se conoce como sepsis, el estado de salud del paciente se compromete seriamente y la mortalidad en esos casos es elevada<sup>2</sup>. La sepsis es la principal causa de muerte en pacientes graves y en los últimos años ha habido un incremento en su incidencia, a pesar del desarrollo tecnológico en el área de la medicina clínica y la investigación básica<sup>3-5</sup>.

En general, la inflamación se caracteriza por vasodilatación, incremento en la permeabilidad, infiltración celular y, en algunos casos, activación de la cascada de coagulación. La vasodilatación facilita la llegada de células y mediadores inflamatorios y se produce por la acción del óxido nítrico (producido en leucocitos activados a partir de la enzima óxido nítrico sintasa inducible) y las prostaglandinas generadas a partir del ácido araquidónico. El edema se produce como resultado de la fuga de líquido intravascular rico en proteínas, al espacio extracelular por acción de sustancias como la histamina, bradisinina, leucotrienos, complemento, sustancia P y el factor activador plaquetario, entre otros. Estas alteraciones incrementan la presión hidrostática intravascular y la presión coloidsmótica intersticial que, en un inicio, facilita la llegada de anticuerpos y proteínas de fase aguda al sitio donde la inflamación se genera<sup>6</sup>. La infiltración celular la inician los neutrófilos a través de una serie de pasos que implican

marginación, rodamiento, adhesión y diapédesis celular, hacia el sitio de la inflamación. Este fenómeno es facilitado por la interacción de glicoproteínas presentes en la superficie de las células endoteliales (selectinas e integrinas), que se unen a sus ligandos correspondientes en las células inflamatorias, y a la quimiotaxis generada por quimiocinas, producidas por los propios neutrófilos <sup>7</sup>. Finalmente, la cascada de la coagulación también se activa, especialmente durante los procesos infecciosos, por lo que ambos procesos, la inflamación y la coagulación, van de la mano. De las dos vías de la coagulación, la vía extrínseca (a partir del factor tisular), es la que principalmente se activa en el caso de SIRS y sepsis <sup>8</sup>.

Parte de la respuesta inflamatoria anteriormente descrita, corresponde a la respuesta inmune innata a la infección y los componentes esenciales de esta son los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK (natural killer) y los mediadores inflamatorios que estas producen, que regulan y amplifican la respuesta inflamatoria (citocinas, quimiocinas, etc). Estos mecanismos, en principio protectores, en ocasiones pueden llevar al desarrollo de complicaciones que comprometen la vida. Estas células inflamatorias tienen funciones específicas, pero los macrófagos y las células dendríticas, se distinguen por su capacidad para producir estos mediadores, tras el reconocimiento de micro-organismos a través de receptores de superficie que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Unos de estos receptores son los Receptores tipo Toll (Toll Like Receptors-TLRs), que pertenecen al grupo de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), dentro de los que se encuentran también otros receptores de la superficie celular (ej. receptor de manosas), receptores intracelulares (ej. NOD), receptores solubles (ej. LBP) <sup>9</sup>. Hasta el momento se han descrito once TLRs en humanos, agrupados de acuerdo al tipo de ligandos que ellos reconocen y se encuentran distribuidos en diferentes tipos de células (figura 1). Las estructuras basadas en lípidos son reconocidas por TLR2 en combinación con TLR1 o TLR6, formando heterodímeros; TLR4, formando homodímeros, reconoce al lipopolisacárido bacteriano (LPS); ácidos nucleicos bacterianos y/o

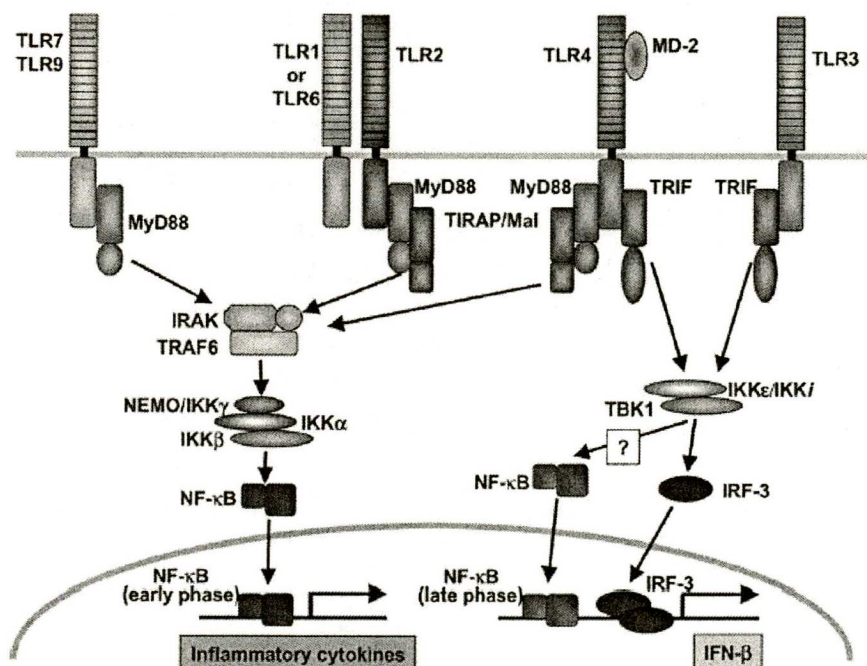
virales, son reconocidos por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9; TLR 5 y TLR11 reconocen flagelina y profilina respectivamente <sup>10</sup>.



**Figura 1. TLRs y sus ligandos.** TLR1 – TLR7 y TLR9 reconocen componentes microbianos. TLR1 y TLR6 asociados con TLR2 discriminan entre triacyl y diacyl lipopeptido respectivamente. TLR4 reconoce LPS. Tomado de Akira, Seminars in Immunology 16 (2004) 3-9.

Los receptores TLRs forman complejos con otras moléculas tras la unión de su ligando, y posteriormente desencadenan la activación de la señalización intracelular que lleva a la translocación de factores de transcripción que inducen la transcripción genética de los mediadores inflamatorios (figura 2). De estos últimos, quizá uno de los primeros que producen los macrófagos, es el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Se libera en cuestión de minutos y es responsable de modular la actividad de células inflamatorias (neutrófilos y mononucleares), de otras citocinas (Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 8 (IL-18), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 12 (IL-12), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )) y de diferentes mecanismos de defensa antimicrobianos. Estas citocinas, descritas principalmente como pro-inflamatorias, se encuentran reguladas por otro tipo de mediadores, con funciones anti-inflamatorias, como la IL-10 y el factor de transformación beta (TGF- $\beta$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el receptor soluble de TNF- $\alpha$ , el receptor antagonista de la interleucina 1 (IL-1ra) y algunas prostaglandinas. Por su parte, la IL-10 especialmente, se encarga de inhibir la

producción de citocinas pro-inflamatorias, especialmente de IL-12, con la consecuente disminución de  $\text{INF-}\gamma$ <sup>11-14</sup>.

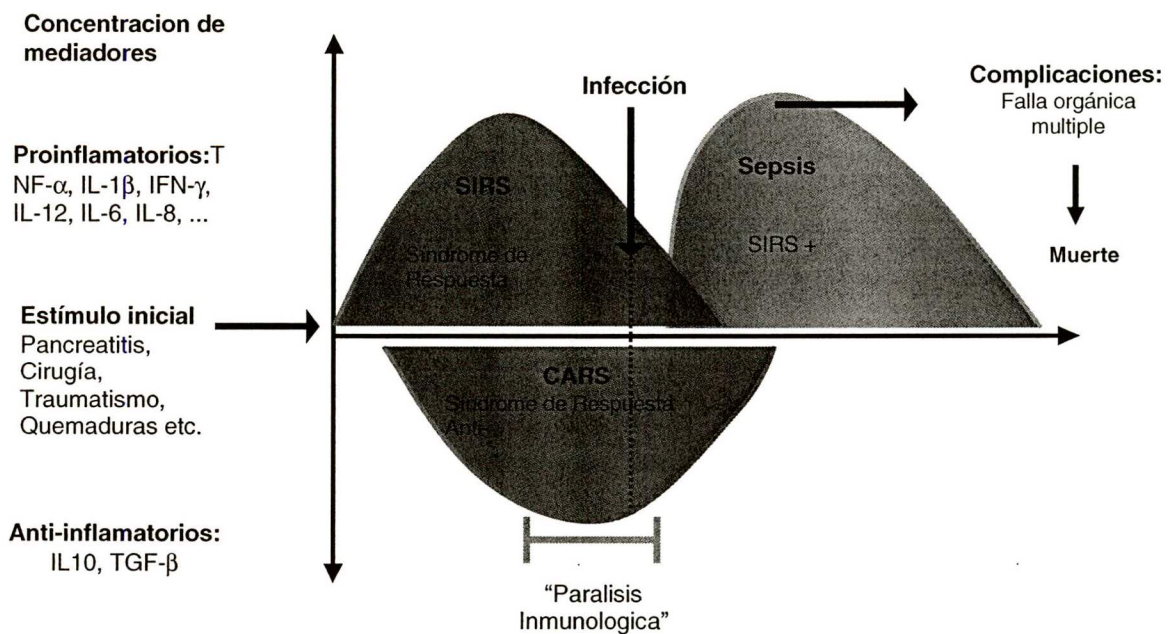


**Figura 2. Vías de señalización de los TLR.** En esta figura se muestran las principales vías de señalización activadas por la unión de TLRs a sus ligandos. Tomado de Akira, *Seminars in Immunology* 16 (2004) 3-9.

Para lograr la homeostasis, el SIRS generalmente se compensa por una respuesta anti-inflamatoria que se le conoce como Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria compensadora (CARS), a través de estos mediadores inflamatorios<sup>15</sup> (figura 3). Con el tiempo se empiezan a conocer otros participantes fundamentales de la respuesta inflamatoria. Es el caso del sistema nervioso central a través de múltiples mecanismos<sup>16</sup>. La comunicación entre el sistema nervioso central y el sitio de infección ocurre a tres niveles: El primero implica componentes microbianos o mediadores inflamatorios que estimulan fibras sensoriales a nivel del sitio de afección que inducen una respuesta del sistema nervioso. Segundo: cantidades pequeñas de citocinas, prostaglandinas (E2) o agonistas microbianos, difunden desde los tejidos afectados hasta la circulación, alcanzando el hígado en donde, a través del nervio vago, activan el eje hipotálamo-pituitario-adrenal.

Tercero, grandes cantidades de mediadores ejercen sus efectos en el tallo cerebral y en el hipotálamo. El sistema nervioso incrementa la producción de la hormona adrenocorticotrópica, la hormona estimulante de los alfa-melanocitos, epinefrina, cortisol, polipéptido intestinal vasoactivo y otros, que tienen un potente efecto anti-inflamatorio <sup>17</sup>. Recientemente Tracey y colaboradores reportaron que la acetilcolina inhibe la producción de HMGB1 (High Mobility Group Box-1), que es un mediador tardío pro-inflamatorio <sup>18</sup>.

### LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTEMICA



**Figura 3. Fases de la respuesta inflamatoria sistémica.** La repuesta inflamatoria sistémica puede iniciar como respuesta a una infección (sepsis) o aun estímulo no infecciosos. En este último caso, la respuesta anti-inflamatoria incrementa la susceptibilidad a infecciones y en consecuencia al desarrollo de sepsis.

El SIRS se caracteriza por fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia y un estado hiperdinámico. Estas manifestaciones se encuentran también presentes en los procesos sépticos como consecuencia de una respuesta sistémica a la infección, pero como se comentó previamente, existen otras condiciones capaces de generar un SIRS, de tal forma que, en ocasiones, no es sencillo diferenciar las causas de SIRS, especialmente cuando esta es secundaria a un proceso infeccioso, especialmente en sus momentos iniciales. El CARS por su parte, no tiene manifestaciones clínicas conocidas hasta el momento, pero se puede caracterizar desde el punto de vista molecular a través del análisis de la expresión las moléculas de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad por debajo de 30% (por citometría de flujo) y el incremento en la producción de IL-10. La disminución en la expresión en el número de moléculas de clase II, predispone al desarrollo de infecciones por la alteración en la presentación de antígenos microbianos a través de las células presentadoras de antígenos y la consecuente activación de linfocitos T <sup>19</sup>. Esto tiene implicaciones importantes, por un lado, pasar por alto la presencia de un proceso infeccioso puede llevar al desarrollo de falla orgánica múltiple y muerte, por otro, el propio CARS predispone a la adquisición de infecciones intra-hospitalarias, entre ellas las neumonías nosocomiales <sup>20</sup>.

En ocasiones, el diagnóstico de un proceso infeccioso en pacientes hospitalizados con SIRS no es fácil. En primer lugar porque los criterios originales para definir el SIRS son inespecíficos, limitados en número y subjetivos, por lo que tienen poca especificidad y carecen de significancia pronóstica <sup>21</sup>. Además, en ocasiones la presencia del proceso infeccioso es sugestivo, por lo que se requiere de cultivos, que en muchas ocasiones no desarrollan los micro-organismos responsables, a pesar de la presencia de estos <sup>22</sup>. Rangel Frausto y colaboradores reportaron que los pacientes sépticos con cultivos negativos y aquellos con cultivos positivos, tienen índices similares de morbilidad y mortalidad <sup>23</sup>. La asociación de una falla orgánica al paciente con sospecha de sepsis se le conoce como sepsis grave y cuando las alteraciones hemodinámicas se caracterizan por hipotensión, se clasifica como choque séptico. La mortalidad de la sepsis grave y del choque

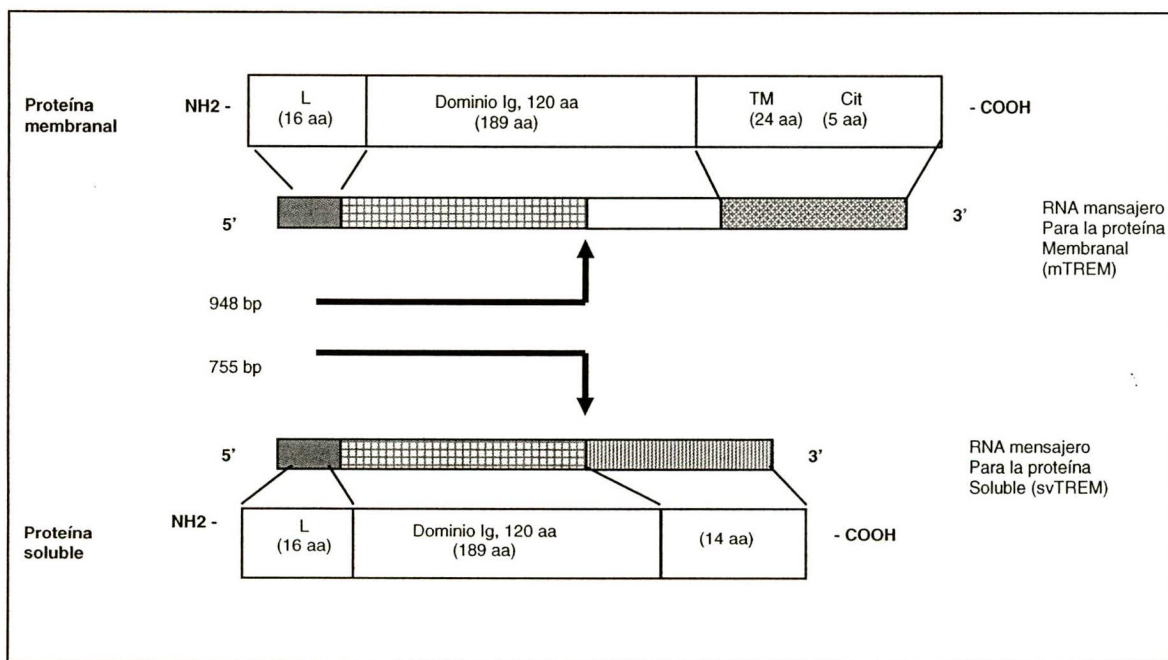
séptico son mayores todavía (aunque existe la duda de que estas entidades representen un continuo). Por lo anterior, es probable que en algunos pacientes en los que sospechamos sepsis o sepsis severa (por la presencia de falla orgánica múltiple), en los que no existe desarrollo de micro-organismos en los cultivos, estemos enfrentando el desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica con falla orgánica sin la presencia de infección, o bien, con la presencia de ésta. Existen reportes de moléculas endógenas que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica o magnificarla, actuando como ligandos de TLRs y otros receptores de la superficie celular. De estos, quizá HMGB1 sea uno de los más estudiados junto con las proteínas de choque térmico.

Todo lo anterior ha motivado el interés por caracterizar el comportamiento de diferentes moléculas involucradas en el SIRS y el CARS, y en las diferentes formas de sepsis, para encontrar marcadores moleculares que detecten la presencia de infecciones y/o predigan el curso de la enfermedad, de manera temprana, para poder tomar una conducta terapéutica oportuna y de esta manera evitar las complicaciones que pueden llevar a la muerte en estos pacientes.

Una molécula propuesta como marcador temprano de infección es TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1) <sup>24</sup>. TREM-1 es un receptor que se expresa en células mieloides, principalmente en monocitos y neutrófilos, es una glicoproteína de 243 aminoácidos y 30 kDa, que tiene una región extracelular con un dominio parecido a los de inmunoglobulina tipo V, de alrededor de 120 aminoácidos y un cuello de 70 aminoácidos, una región transmembranal con un residuo cargado positivamente (lisina), y una cola citoplásmica corta, de 5 aminoácidos, que no transduce señales <sup>25</sup>. TREM-1 interactúa en forma no covalente con la proteína adaptadora DAP12, con la cual forma un complejo para la transducción de señales río abajo <sup>26</sup>.

Se han identificado 5 genes *Trem*, cuatro de los cuales (*Trem* 1-4) codifican glicoproteínas tipo I transmembranales, potencialmente funcionales <sup>27</sup>. El gen de TREM-1 se localiza en el cromosoma humano 6p21.1, <sup>25</sup> y está compuesto por cuatro exones y tres intrones, el último exón codifica los dominios transmembranal

y citoplásmico<sup>28</sup>. Cuando el gen se transcribe da como resultado un mensajero de 948 pares de bases<sup>28</sup>, el cual se traduce en una proteína de 242 aa y 30 Kda. Sin embargo se ha visto que el mRNA de TREM-1 puede presentar una forma de corte alternativo (svTREM-1), a la cual le falta la secuencia del tercer exón. Si este RNA se tradujera, daría lugar a una forma de TREM-1 sin los dominios transmembranal y citoplásmico, que al parecer sería una proteína no anclada a la membrana, es decir sería una proteína soluble (figura 4).



**Figura 4. El RNA mensajero de TREM-1 y su forma de corte alternativo.** Cada rectángulo de los RNA representa un exón. El cuarto exón de mTREM codifica los dominios transmembranar (TM) y citoplásmico (Cit). A svTREM le falta el tercer exón y tiene el cuarto exón fuera del marco de lectura, por lo que codifica una proteína sin los dominios TM y Cit. L, péptido líder; slg, dominio de inmunoglobulina.

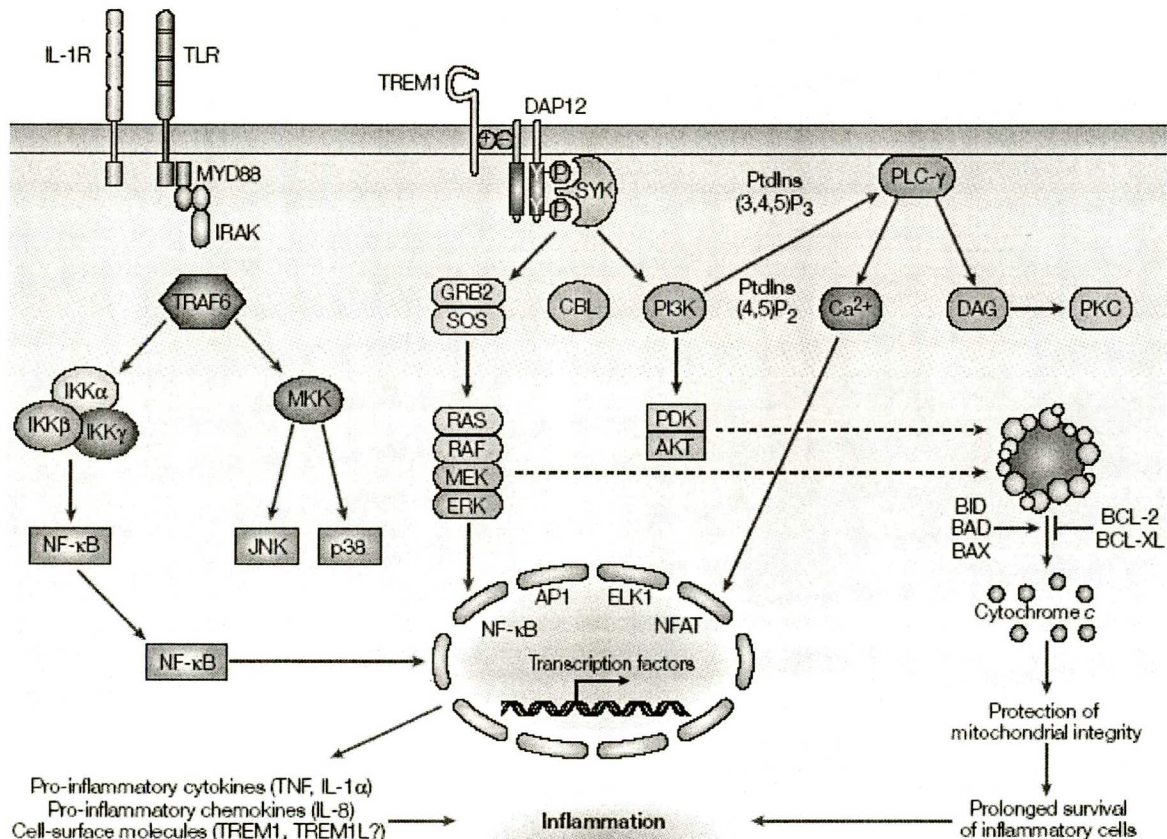


Figura 5.- Representación esquemática de la vía de señalización de TREM-1. Tomado de Colona Nature Review 2003.

Aunque su ligando no se conoce hasta el momento, TREM-1 contribuye a la amplificación del fenómeno inflamatorio<sup>24</sup>. En monocitos la ligación de TREM-1 con un anticuerpo monoclonal agonista estimula la producción de IL-8, MCP-1, MCP-3 y MIP-1α y GM-CSF, especialmente cuando se usa LPS como coestímulo. Por otro lado cuando los monocitos son tratados con un anticuerpo anti-TREM-1 no producen TNF α, IL-1β ni GM-CSF<sup>25,29</sup>; sin embargo, la combinación de anticuerpo y LPS sí induce la producción de estas citoquinas y además inhibe la producción de IL-10. Esto indica que TREM-1 amplifica las respuestas inflamatorias que son iniciadas por TLRs<sup>30</sup>. La expresión de TREM-1 puede ser controlada por NF-κβ, el cual es activado por vías de señalización de TLRs (Figura 5). Al parecer una vez que TREM-1 reconoce a su ligando, DAP12 se fosforila en su dominio ITAM, lo cual proporciona un sitio de anclaje para Syk. SYK recluta y fosforila a CBL así como a GRB2, llevando a la activación de PI3K y ERK. Estas vías inducen la movilización de calcio y activación de factores de

transcripción, incluyendo ELK1, NFAT, AP1 y NF- $\kappa$ B, los cuales transcriben genes que codifican citocinas proinflamatorias, quimiocinas proinflamatorias y moléculas de superficie celular. La cascada de señalización de TREM-1 sinergiza con las vías de señalización de IL-1R y TLRs. La ligación de TLRs e IL-1R activan vías de señalización que llevan a la activación de NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción y sobre regulación de la expresión de TREM-1 por granulocitos y monocitos<sup>30</sup>.

La asociación de TREM-1 con la sepsis parte de un reporte de Bouchon y colaboradores en el que encuentran que la expresión de TREM-1 se incrementa en neutrófilos y monocitos en presencia de padecimientos inflamatorios infecciosos (bacterias extracelulares y hongos), pero no en procesos inflamatorios no infecciosos. En este mismo reporte se menciona del incremento en la expresión de TREM-1 en los neutrófilos peritoneales de pacientes con choque séptico, contrario a lo observado en células obtenidas de lavado peritoneal de pacientes con SIRS, sin sepsis<sup>24</sup>. Con este trabajo, el autor propone a TREM-1 como una molécula que amplifica la respuesta inflamatoria desencadenada por microorganismos patógenos, a través del incremento en la expresión de TREM-1 generada por estos. De esta manera, TREM-1 señala para la producción de citocinas pro-inflamatorias; sin embargo, bloqueando la participación de TREM-1 (con un anticuerpo anti-TREM), se puede prevenir la producción de choque séptico en modelos murinos, a través de la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios; lo que llevó a especular que podría ser blanco terapéutico en los casos de sepsis. Posteriormente, Gibot y colaboradores, encuentran incremento de la forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) en pacientes con neumonía. El mismo autor, publica un estudio prospectivo en el que analizan TREM-1 de membrana y encuentran incremento en su expresión en pacientes con choque séptico<sup>31</sup>. Isibasi y colaboradores, reportaron que el incremento en la expresión de TREM-1 de membrana, junto con la disminución en la expresión de moléculas de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad, se asocian con mal pronóstico en pacientes quirúrgicos<sup>32</sup>.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes que tienen un padecimiento susceptible de ser corregido quirúrgicamente en forma electiva, presentan una respuesta inflamatoria que, dependiendo de la magnitud del procedimiento, puede ser leve, autolimitada y sin traducción clínica; o puede llevar al desarrollo del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El estudio de los pacientes con SIRS nos permitirá conocer el inicio de la fase inflamatoria y de la anti-inflamatoria, que permite recuperar la homeostasis. Esta fase compensadora en ocasiones puede ser tan intensa que desencadena el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS), que en muchas ocasiones lleva al paciente a un estado de "Parálisis Inmunológica". Cuando se establece el CARS, los pacientes habitualmente no son portadores de infecciones; pero la presencia de un proceso infeccioso en este estadio, es una de las causas que impiden la pronta recuperación del paciente y puede llevar al desarrollo de sepsis y eventualmente a la falla orgánica múltiple, lo cual tiene una elevada morbi-mortalidad y un impacto económico muy elevado. Lo anterior nos da la pauta para analizar si el aumento en la expresión de TREM-1 de membrana, pueden considerarse como una señal interna temprana, del establecimiento de un padecimiento infeccioso o como un marcador pronóstico temprano en la evolución postoperatoria de este tipo de pacientes. Esto nos permitirá actuar en forma oportuna para la prevención de complicaciones a través de una conducta terapéutica mejor dirigida.

### 3. HIPÓTESIS

Durante la evolución post-quirúrgica de los pacientes que desarrollan una respuesta inflamatoria sistémica sin relación a un proceso infeccioso, el nivel de expresión de TREM-1 de membrana en monocitos de sangre periférica estará normal.

El estado de “parálisis inmunológica” como consecuencia del CARS favorecerá el establecimiento de la infección y por lo tanto el aumento del nivel de expresión de TREM-1 de membrana en monocitos de sangre periférica como indicador del inicio de la fase infecciosa.

La disminución de la expresión de moléculas de clase II del MHC y su persistencia en niveles bajos, asociada con el incremento en la expresión de TREM-1 de membrana, predicen una mala evolución clínica del paciente en relación con el desarrollo de complicaciones médico-quirúrgicas en relación o no con el evento quirúrgico.

## **4. OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar el comportamiento molecular de TREM-1 de membrana en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos.

### **Particulares**

- a. Analizar si el incremento en la expresión de TREM-1 de membrana se asocia con el establecimiento de un proceso infeccioso en pacientes después de ser sometidos a un procedimiento quirúrgico.
- b. Analizar si la disminución en la expresión de HLA-DR en pacientes quirúrgicos se asocia con una evolución post-operatoria desfavorable.
- c. Determinar las concentraciones de IL-6, IL-10 e IL-12 en pacientes antes y después de ser sometidos a un procedimiento quirúrgico.
- d. Establecer una correlación con los niveles de TREM-1 de membrana, moléculas de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad, citocinas pro y anti-inflamatorias y la evolución clínica del paciente.

## **5. METODOLOGÍA**

### **Diseño del estudio**

Estudio de cohorte (observacional, comparativo, longitudinal y prospectivo).

El estudio comprendió la evaluación de los pacientes que fueron sometidos a cirugía electiva, de urgencia y la determinación de mediadores inflamatorios, en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMI), del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (HE CMN). Para lograr los objetivos del trabajo se conformaron 3 grupos de sujetos: Grupo A, compuesto por personas sanas, a los que se les realizaron las mismas determinaciones que a los pacientes y sirvieron para establecer los valores basales de cada una de las determinaciones y punto de comparación con los siguientes grupos. Grupo B, compuesto por pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente. A estos pacientes se les realizó una toma de sangre en el preoperatorio y posteriormente los días 1, 3, 5 y 7 del post-operatorio. Grupo C, conformado por pacientes con diagnóstico de Sepsis, con las mismas determinaciones que el grupo B que sirvieron para establecer los valores de cada una de las determinaciones en situaciones en las que la infección se encontró comprobada.

### **Universo de trabajo**

Quedó constituido por pacientes del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (HECMN), que fueron programados de manera electiva y de urgencia, por el Servicio de Gastrocirugía (Grupo B), para ser sometidos a cirugía en el período comprendido de septiembre del 2004 a diciembre del 2005 y que cumplieron con los criterios de inclusión. Los pacientes con sepsis que conformaron el grupo C, también fueron del HE CMN, internados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y en el área de hospitalización del Servicio de Cirugía del Aparato Digestivo del HE CMN. Las personas que conformaron el grupo A, fueron donadores de banco de sangre.

## **Criterios de selección**

### **Criterios de inclusión:**

- a. Pacientes de cualquier sexo sometidos a cirugía electiva y de urgencia.
- b. Pacientes de cualquier sexo con diagnóstico de sepsis, con alguna patología que involucró al aparato gastrointestinal y por tanto requirieron de la valoración de los cirujanos del Servicio de Gastrocirugía del HE CMN.
- c. Pacientes que aceptaron participar en el estudio.
- d. Pacientes entre 18 y 90 años de edad.

### **Criterios de no-inclusión:**

- a. Pacientes programados para lavado abdominal quirúrgico por primera ocasión. Excepto los incluidos en el grupo de cirugía programada.
- b. Pacientes operados en los últimos 3 meses. Excepto los incluidos en el grupo de cirugía programada.
- c. Pacientes en tratamiento con inmunosupresores por ser portadores de Virus de Inmunodeficiencia Humana con SIDA y hepatitis crónica por Virus de Hepatitis C o alguna otra enfermedad crónica que pudiera comprometer el estado inmunológico del paciente (Enfermedades del tejido conectivo en tratamiento).
- d. Embarazo.
- e. Pacientes que rehusaron participar en el estudio o continuar en el mismo.
- f. Descompensación de alguna enfermedad crónico-degenerativa (DM, Hipertensión arterial, Insuficiencia Renal Crónica), en los casos de cirugía electiva.

### **Criterios de exclusión:**

- a. Pacientes que decidieron retirarse del estudio.
- b. Pacientes cuyas muestras sanguíneas no fueron factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma.

## **Descripción de las variables según la metodología**

### **Variables independientes:**

- Procedimiento quirúrgico electivo y de urgencia.
- Sepsis.

### **Variables dependientes:**

- Expresión de TREM-1
- Producción de IL-6, IL-10 e IL-12.
- Expresión de MHC II.
- SIRS.
- CARS.
- Falla Orgánica Múltiple.

### **Variables de control**

- Edad.
- Sexo.

## **Definición operacional de variables**

### **Variables independientes**

Procedimiento quirúrgico electivo.

Se entiende por cualquier procedimiento quirúrgico, realizado en forma programada, en los quirófanos del HE CMN por parte del servicio de Cirugía del Aparato Gastrointestinal del HE CMN.

Sepsis.

Es la presencia de un proceso infeccioso, demostrado mediante cultivos o cuando se tiene evidencia objetiva a través de la exploración física en el paciente o a través de algún estudio de gabinete y que reúne criterios diagnósticos de SIRS. El SIRS se diagnostica cuando se tienen dos o más de los siguientes criterios:

- a. temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$
- b. frecuencia cardiaca  $>90$  latidos/min
- c. frecuencia respiratoria  $>20/\text{min}$  o  $\text{PaCO}_2 <28$  mmHg
- d. cuenta de leucocitos  $>12\ 000/\text{mm}^3$ ,  $<4\ 000/\text{mm}^3$  ó  $>10\%$  de bandas.

### **Variables Dependientes**

#### **IL-6:**

Proteína soluble de bajo peso molecular, involucrada en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica inflamatoria. Su determinación es mediante ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

#### **HLA-DR:**

Molécula de tipo II del complejo principal de histocompatibilidad, encargada de la presentación de antígenos exógenos a las células T y localizada en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Su determinación es a través de citometría de flujo.

#### **IL-10:**

Citocina involucrada en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta anti-inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica anti-inflamatoria compensadora. Su determinación es mediante ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

#### **IL-12:**

Proteína soluble de bajo peso molecular, participa en la regulación de la actividad celular, particularmente de la respuesta inmune. Tiene efectos predominantes en la respuesta inflamatoria y se encuentra involucrada en la generación de la respuesta sistémica inflamatoria. Su determinación es mediante ELISA y el resultado se expresa en picogramos por ml, es una variable cuantitativa continua.

#### TREM-1:

Receptor activador expresado en células Mieloides (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells). Es una proteína que pertenece a la Ig-SF. Se expresa en neutrófilos y monocitos CD14<sup>alto</sup> y principalmente en células que infiltran tejidos infectados por bacterias. Difícilmente detectable en tejidos inflamados no infectados. No se conoce ligando y su activación induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios, presentando un efecto sinérgico en presencia de LPS

#### SIRS.

Los criterios para diagnosticar un SIRS se comentan en párrafos anteriores.

#### CARS.

Se presenta cuando la producción de citocinas anti-inflamatorias excede a la producción de las inflamatorias y se caracteriza por la disminución en la expresión de moléculas de clase II por debajo del 30%.

#### **Variables de control**

Edad: expresada en años en una escala cuantitativa discreta.

Sexo: expresado en una escala cualitativa nominal. Masculino, Femenino.

#### **Selección de la muestra**

Se incluyeron, en forma consecutiva, todos los pacientes operados electivamente y de urgencia así como aquellos que se encontraron con diagnóstico de sepsis, y que cumplieron con los criterios de selección.

#### **Tamaño de la muestra**

Se incluyeron todos los pacientes que fueron captados durante el tiempo de duración del proyecto.

### **Consideraciones éticas**

Buenas prácticas clínicas. Todo el trabajo clínico que se desarrolló en el protocolo, estuvo sujeto a los lineamientos de las buenas prácticas clínicas. El presente protocolo obtuvo la aprobación documentada por el Comité de Ética e Investigación del Hospital y el consentimiento informado antes de iniciar el estudio de acuerdo a la organización y regulación de las normas y leyes locales.

### **Consentimiento Informado**

Cada paciente debió otorgar su autorización. Ésta estuvo constatada en un documento llamado "Consentimiento Informado", en el que se desglosó de manera detallada y con lenguaje claro al paciente, los beneficios y los posibles riesgos que se tuvieron al estar sujeto a la investigación (Ver Anexo).

Al obtener y documentar el consentimiento informado, el investigador cumplió con los requerimientos regulatorios aplicables de adhesión a las buenas prácticas clínicas y a los principios éticos que tienen su origen en la Declaración de Helsinki y sus enmiendas.

Antes de ser admitido en el estudio, el equipo de investigación o una persona designada informo al paciente o su representante legal, en caso de que el paciente no pudiera otorgar su autorización, sobre todos los aspectos pertinentes del estudio, incluyendo información escrita y la aprobación favorable para la conducción del estudio (protocolo) y de la hoja de Consentimiento Informado del paciente por parte del Comité de Investigación y Ética del Hospital.

## **Procedimiento para la elección de pacientes**

Para conocer los pacientes candidatos a cirugía electiva se revisó la lista de programación de cirugías diariamente. El paciente hospitalizado, se visitó en la habitación del mismo y se le realizó una historia clínica resumida para saber si cumplía con los criterios de inclusión. De ser así, se le explicó que fue candidato a participar en un estudio clínico y las características del mismo. De estar de acuerdo, firmó la hoja de consentimiento (Anexo Hoja de consentimiento informado).

El seguimiento de la evolución postoperatoria de los pacientes, se realizó por parte de los integrantes del protocolo. Fue responsabilidad del médico tratante, perteneciente al Servicio de Cirugía Gastrointestinal, la identificación y resolución de los problemas que surgieron a lo largo de su estancia hospitalaria. El seguimiento clínico del paciente se hizo hasta su egreso, independientemente del desenlace.

La toma de muestra (sangre) se realizó por los integrantes del proyecto, así mismo la realización del procedimiento en particular.

## **Procedimiento en particular para la toma de muestra**

A los pacientes candidatos a cirugía se les extrajeron 15 mL de sangre antes de la intervención y posteriormente por las mañanas en el primero, tercero, quinto, y séptimo día de post-operado. Lo anterior dependió del tiempo de permanencia del paciente. Así, los pacientes que ameritaron permanecer por más tiempo, fue necesariamente porque su condición clínica así lo requirió. Aquellos pacientes con estancia corta (inferior a dos días), se les consideró únicamente el número de muestras que se alcanzaron a tomar durante su internamiento. A los pacientes con diagnóstico de sepsis se les realizó el mismo número de muestras que a los pacientes quirúrgicos del grupo de estudio y al grupo de personas sanas, se les realizó una sola toma de sangre con las mismas determinaciones.

Para la obtención de la muestra de pacientes que no contaron con un catéter central, se tomó la muestra por punción bajo el siguiente protocolo: asepsia de la región con torundas alcoholadas, aplicación de un torniquete con tubo de látex en el tercio distal del brazo seleccionado. Se puncionó al paciente con aguja Vacutainer 0.8 x 38 y adaptador Vacutainer, en la vena mediana preferentemente. La muestra se obtuvo en tubos especiales por presión negativa. Para aquellos que contaron con catéter central, se inició con la asepsia del conector del catéter, extracción de 8 ml de sangre y posteriormente lavado de catéter con 10 ml de solución salina y en los casos en los que el catéter se encontró cerrado, se heparizó con 0.5 ml de heparina de 1000 unidades. En todos los casos cuidando los pasos críticos de asepsia.

## **Determinación de citocinas en suero**

La sangre destinada para la determinación de citocinas se tomó en el mismo momento que aquella destinada para la determinación de TREM-1 y moléculas de clase II, pero en tubos diferentes.

Se obtuvieron 7 mL de sangre en tubos sin heparina y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 8 grados centígrados. Se extrajo el suero con pipetas de precisión y puntas desechables. Se hicieron alícuotas de 250  $\mu$ L cada una en tubos Eppendorf de 0.5 mL. Posteriormente se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Identificando cada uno de los tubos de cada paciente.

Se utilizaron las alícuotas de 250  $\mu$ L de suero de paciente previamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se llevó a cabo el método de ELISA para la detección de las siguientes citocinas: IL-6, IL-10, IL-12. Se utilizó el kit OptEIA™ (Pharmingen) correspondiente a cada una de las citocinas y el método de acuerdo al inserto de las mismas. El procedimiento en general se explica a continuación:

Se utilizaron placas de 96 pozos y se cubrieron con 50 $\mu$ L de anticuerpo de captura diluido en solución reguladora (la concentración dependió de la citocina, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante). Se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$

(en cuarto frío) y al día siguiente se lavaron 3 veces con solución reguladora de lavado (PBS con Tween-20 al 0.05%).

Los pozos fueron cubiertos con 200  $\mu$ L de solución reguladora de bloqueo (PBS con FBS 10%, pH 7.0) y permanecieron en incubación por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución reguladora de lavado.

Se prepararon diluciones seriadas del estándar de acuerdo al inserto de la citocina correspondiente y por duplicado se colocaron 100  $\mu$ L de cada concentración estándar y 100  $\mu$ L por duplicado de cada muestra y controles. Las placas permanecieron en incubación por dos horas a temperatura ambiente y se lavaron cinco veces con solución reguladora de lavado.

Se añadieron 100  $\mu$ L de solución detectora (Anticuerpo de detección más estreptavidina-HRP) a cada pozo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron siete veces con solución reguladora de lavado.

Se añadieron 100  $\mu$ L de solución sustrato (tetrametilbenzidina más peróxido de hidrógeno) a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se añadieron 50  $\mu$ L de solución de paro (ácido sulfúrico 2 N) y 30 minutos después se leyó la absorbancia a 450 nm en el Fluoroskan.

## **Separación de mononucleares y determinación de MHC II y TREM-1 por citometría de flujo.**

La muestra de sangre en tubos con anticoagulante se colocó en tubos Falcón de 50 ml, se diluyó 1:2 con solución salina al 0.9%.

En tubos falcón de 15 ml se colocaron 2 ml de Ficoll y se agregaron 11 ml de sangre previamente diluida, se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se transfirió la fase de mononucleares a tubos falcón de 15 ml, se lavaron con solución salina isotónica, llevando cada tubo hasta un volumen de 15 ml, se centrifugó a 1500 rpm a 12°C, se decanto y resuspendió el botón celular, se

hicieron dos lavados mas con solución salina isotónica por 10 minutos a 12 °C, con centrifugados a 1,100 y 1000 rpm respectivamente.

Al termino del último lavado se removió el sobrenadante y se resuspendió el botón en 2 ml de solución salina.

Se realizó el conteo celular en cámara de Newbauer haciendo una dilución 1:10 en azul tripan.

Se rotularon 5 tubos FACS con las iniciales de cada paciente y fecha, se agrego el anticuerpo correspondiente a cada tubo como sigue:

Tubo 1: Sin anticuerpo.

Tubo 2: 4 µl de anti CD14 marcado con FITC.

Tubo 3: 5 µl de anti TREM-1 marcado PE.

Tubo 4: 4 µl de anti HLA-DR marcado con Cychrome.

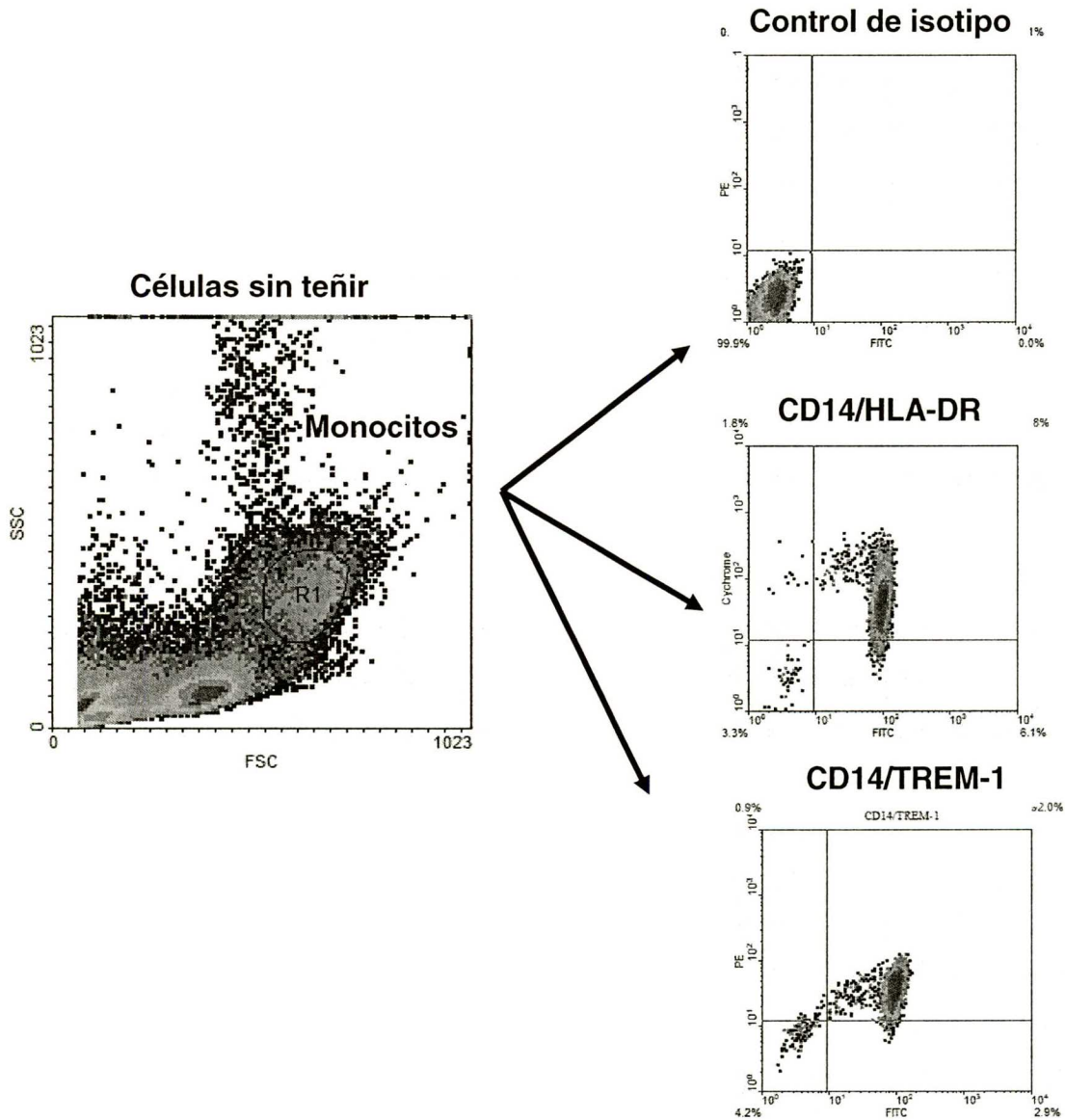
Tubo 5 : 4 µl de anti CD14 FITC.+ 5 µl de anti TREM-1 PE + 4 µl de anti HLA-DR Cychrome.

A cada tubo se agregaron 2 millones de células (mononucleares), se agito suavemente (vortex) e incubo en la oscuridad a 4 °C por 20 minutos.

Se agregaron 300 µl de solución de lisis a cada tubo, se agitó suavemente e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.

Al termino de la incubación se agregaron 1000 µl de solución fisiológica, se agitó suavemente y centrifugó a 2500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, al termino se decantó y resuspendió el botón celular, se agregaron 200 µl de solución fisiológica, se taparon los tubos y guardaron en la oscuridad a 4 °C para su lectura (fig 6).

## Análisis de Monocitos en sangre periférica



**Figura 6. Determinación de HLA-DR y TREM-1 en monocitos de sangre periférica.** A partir de células sin teñir, se selecciona la región de monocitos por tamaño y granularidad, posteriormente se ajusta autofluorescencia y se corrobora el bloqueo con el control de isotipo. A continuación se compensa la sobreposición de la fluorescencia de los fluorocromos empleados (FITC y PE). Por último se analizan las muestras con tinción doble (CD14/HLA-DR y CD14/TREM-1).

## **Procedimiento quirúrgico**

Procedimiento del paciente programado en forma electiva.

Estos pacientes ingresaron por admisión hospitalaria cuando menos un día previo a su intervención quirúrgica. El día previo a su cirugía se realizó una valoración preoperatoria por parte de los Servicios de Medicina Interna y Anestesiología. Los exámenes preoperatorios fueron tomados antes de la valoración preoperatoria y junto con estos, se tomó la primera muestra para el estudio. La técnica anestésica fue anestesia general balanceada o bloqueo peridural, dependiendo del tipo de cirugía y de la elección del anestesiólogo. El tipo de procedimiento quirúrgico dependió de la patología de base. Los pacientes operados pasaron del quirófano a la sala de recuperación por un período aproximado de 3 horas. Los médicos anestesiólogos fueron los encargados de dar de alta de recuperación al paciente. Se consignó en la hoja quirúrgica correspondiente, el tipo de procedimiento realizado, los hallazgos quirúrgicos y las complicaciones en los casos que se presentaron. Así mismo, fueron consignados en la hoja de recolección de datos (Ver Anexo), los datos demográficos del paciente, antecedentes personales no patológicos, antecedentes patológicos, padecimiento actual, tipo de intervenciones realizadas y sus hallazgos, así como la evolución durante el tiempo de seguimiento. También quedaron consignados los medicamentos utilizados durante el procedimiento y después del mismo (analgésicos, antibióticos, aminos vasoactivas) y también la administración de productos hemáticos (plasma, paquetes globulares, crioprecipitados, etc.).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables medidas en escala cualitativa, se expresaron con frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables medidas en escala cuantitativa se expresaron en promedio y desviación estándar. La contrastación de las diferencias entre los grupos de estudio para las variables cualitativas se realizó con prueba chi cuadrada

En las variables cuantitativas se utilizó una comparación de promedios para muestras independientes a través de la prueba t de Student. En las muestras dependientes se usó la prueba t pareada o t de Wilcoxon. Además se realizaron pruebas de normalidad para conocer el tipo de distribución de los datos y decidir el uso de estadística paramétrica o no paramétrica.

En todos los casos se considerará como estadísticamente significativo un valor de probabilidad menor o igual a 0.05.

### **Recursos para el estudio**

#### **Recursos humanos**

Médicos Especialistas, Maestros en Ciencias y Doctores en Ciencias adscritos a la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI IMSS (HECMN). Médicos adscritos al servicio de Gastrocirugía y médicos residentes del HE CMN. Médicos Residentes de Cuidados intensivos, de la UCI del HECMN.

#### **Recursos materiales**

Instalaciones de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica y Quirófanos del HE CMN.

Reactivos y equipo de la UIM en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del CMN siglo XXI.

Instrumental y equipamiento del Servicio de Quirófano, de Gastrocirugía y Cuidados Intensivos del Hospital de Especialidades del CMN siglo XXI.

## 6. RESULTADOS

En el lapso de septiembre del 2004 a diciembre del 2005 se capturaron 136 sujetos, de los cuales 61 conformaron el grupo de pacientes quirúrgicos, 25 el de pacientes sépticos y 50 los controles sanos. El promedio de edades para el grupo quirúrgico fue de 55.7 años (19-86), para el grupo de sépticos de 56.5 años (23-88) y para del grupo de sujetos sanos fue de 33.8 años (19-51), sin diferencia estadísticamente significativa entre el grupo quirúrgico y séptico, sin embargo, encontramos diferencia significativa entre el grupo de controles sanos con respecto al grupo quirúrgico y séptico, en lo que a edad se refiere. La distribución por sexo se muestra en la tabla I.

Tabla I. Datos demograficos

Variables	Quirúrgicos		Sépticos		Sanos	Total	
	Electivos	Urgencia	Sepsis	S. severa			
Número	46	15	9	16	50	136	
Sexo	F	21	9	5	4	11	50
	M	25	6	4	12	39	83
Edad (promedio)	55.9	53.2	57.3	56.1	33.8		
Complicaciones	11 (23.9%)	7 (46.6%)				18	
C. Infecciosas	7 (15.2%)	5 (33.3%)				12	
C. no infecciosas	4 (8.6%)	2 (13.3%)				6	
Mortalidad	4 (8.6%)	2 (13.3%)	4 (16%)	13 (52%)		23	

En el grupo de los pacientes quirúrgicos se incluyeron a los pacientes intervenidos de manera electiva (n=46) y los intervenidos en forma urgente (n=15). El tipo de procedimientos realizados a los pacientes del grupo quirúrgico dependió de la patología que estos presentaron e involucró cirugías del tracto gastrointestinal y plastías de hernias ventrales e inguinales, como se muestra en la Tabla II.

**Tabla II. Pacientes quirúrgicos**

	<b>Diagnósticos</b>	<b>Procedimientos</b>	
<b>Electivos</b>	Enfermedad por reflujo gastroesofagico	Funduplicatura	
	Patología vesicular: Colecistitis litiásica	Colecistectomía	
	Lesión de vía biliar	Reconstrucción de vía biliar	
	Coledocolitiasis	Colédoco duodeno anastomosis	
	Quiste de colédoco	Derivación biliodigestiva	
	Varices esofágicas	Gastro-gastro anastomosis	
	Hernias	Plastía con malla	
	Cáncer	Páncreas Colon Colangiocarcinoma	Pancreatectomía Resección intestinal Derivación biliodigestiva
Drenaje de quiste hepático con cistoyeyuno anastomosis		Cierre de yeyunostomía	
<b>Urgencias</b>	Patología vesicular: Colecistitis litiasica	Colecistectomía	
	Piocollecisto	Colecistectomía	
	Lesión vía biliar	Colédoco duodeno anastomosis	
	Cáncer	Colangiocarcinoma Adenocarcinoma de Ampula de vater	Colédoco duodeno anastomosis Colédoco duodeno anastomosis
	Patología intestinal	Trombosis mesentérica Diverticulitis Apendicitis aguda Oclusión intestinal	Resección intestinal Sigmoidectomía/colostomía Apendicetomía Liberación de adherencias

Las complicaciones se presentaron en 29.5% (n=18), correspondientes a ambos grupos, clasificadas en aquellas de tipo infeccioso con 19.6% (n=12), y las no infecciosas 9.8% (n=6) (Tabla III).

Dentro del grupo de cirugía electiva, las complicaciones se presentaron en 23.9% (n=11) y en los pacientes con cirugía de urgencia en 15.2% (n= 7). En relación a la presencia de complicaciones de tipo infeccioso, representaron 33.3% (n=5) del grupo con cirugía de urgencia y 15.2% (n=7) en el grupo de pacientes con cirugía programada (p=0.041). La mortalidad en el grupo quirúrgico, tanto de pacientes con cirugía programada como aquellos con cirugía de urgencia, fue de 9.8% (n=6). La mortalidad en los pacientes que presentaron complicaciones (18 pacientes) de ambos grupos, fue de 33.3% (n=6); distribuida en 22.2% (n=4) para los electivos y 11.1% (n=2) para los pacientes con cirugía de urgencia (Tabla I).

**Tabla III Complicaciones en pacientes quirúrgicos**

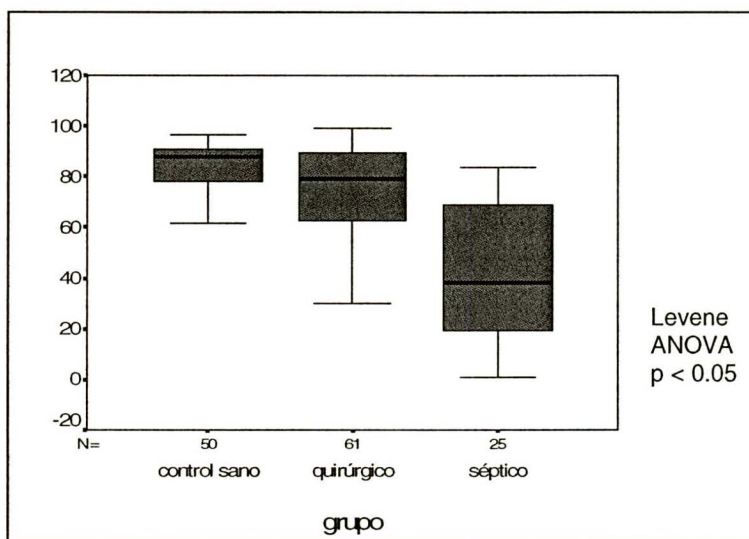
	<b>Tipo de complicación</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>
	Sin complicaciones	43	70.5
Infecciosas	Infección de herida quirúrgica	1	1.6
	Neumonía	4	6.6
	Infección abdominal	6	9.8
	Infección sistémica	1	1.6
No infecciosas	Hematoma de herida quirúrgica	1	1.6
	Sangrado de tubo digestivo alto	2	3.3
	Oclusión intestinal	2	3.3
	Complicaciones cardiovasculares	1	1.6
	Total	61	100

En el grupo de pacientes sépticos se incluyeron aquellos que reunieron los criterios diagnósticos de sepsis, de acuerdo a la definición de la American Association of Chest Physicians (AACP) <sup>1</sup>, con un promedio de 5.6 días de evolución desde el momento del diagnóstico hasta el momento de la toma de la primera muestra. La mortalidad para este grupo fue de 68% (n=17) (Tabla I), distribuida en dos grupos de acuerdo a la severidad: sepsis 16% (n=4), sepsis severa y choque séptico de 52% (n= 13) (Tabla I).

### **Comportamiento de HLA-DR y TREM-1 en sanos, quirúrgicos y sépticos.**

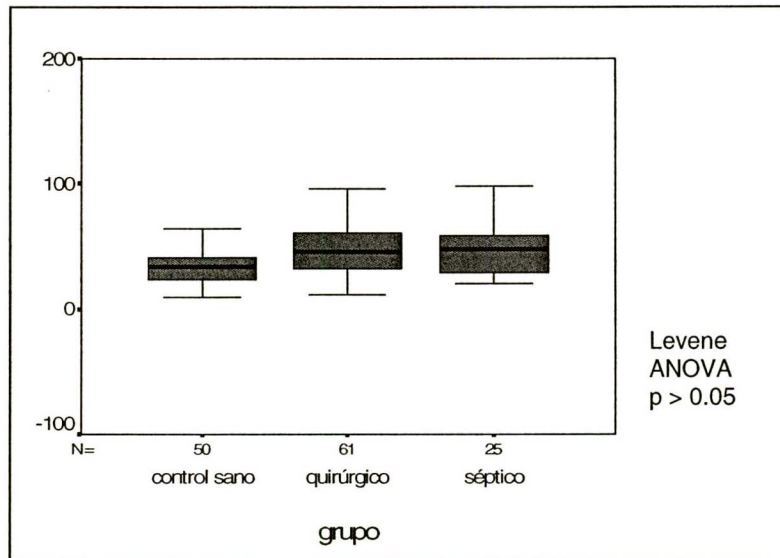
Se analizó y comparó el comportamiento de moléculas de Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-II) en los tres grupos. Debido a que no todos los pacientes contaron con las cinco determinaciones que se habían propuesto en forma inicial en el proyecto, sea por alta por mejoría, muerte prematura, exclusión voluntaria del paciente o problemas técnicos para el procesamiento de las muestras, se decidió utilizar la primera determinación para el análisis de los resultados, de todas las moléculas involucradas, con la intención de evaluar, en una primera aproximación, el comportamiento molecular de nuestros

pacientes y, eventualmente, realizar el análisis del resto de las muestras. En sanos el promedio de expresión de MHC-II fue de 80%, en pacientes quirúrgicos, la determinación pre-operatoria fue de 72% y en el grupo de sépticos de 41.6%, existiendo diferencias estadísticamente significativas al comparar los tres grupos (Figura 7).



**Figura 7. Comparación de los niveles de HLA-DR.** Los datos se presentan en mediana (líneas negra), percentiles (25-75%) y valores extremos, de los niveles de expresión obtenidos para los grupos quirúrgico, séptico y controles sanos.

Al hacer la misma comparación, pero con respecto a TREM-1, el promedio de expresión en controles sanos fue de 35 unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF) y en los pacientes quirúrgicos y sépticos, los promedios fueron 50.4 IMF y 50.07 IMF respectivamente (Figura 8).



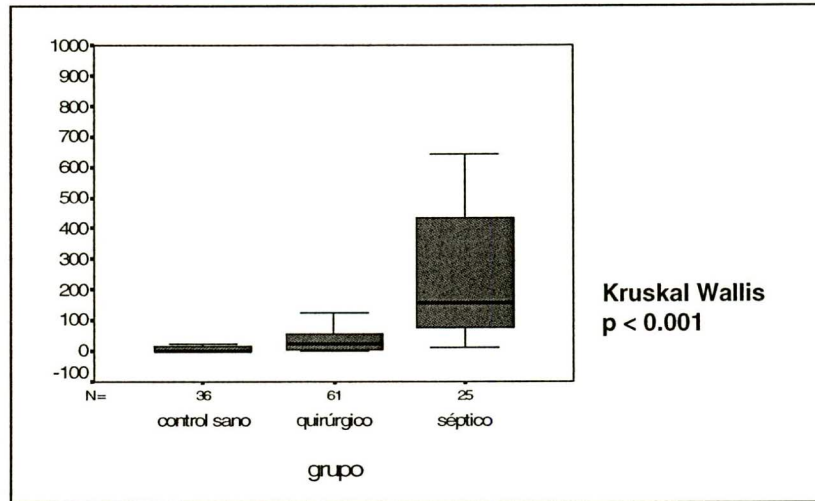
**Figura 8. Comparación de los niveles de TREM-1.** Grafica de cajas y brazos. Los datos se presentan en mediana (líneas negra), percentiles (25-75%) y valores extremos, de los niveles de expresión obtenidos para los grupos quirúrgico, séptico y controles sanos.

### Comportamiento de citocinas en sanos, quirúrgicos y sépticos.

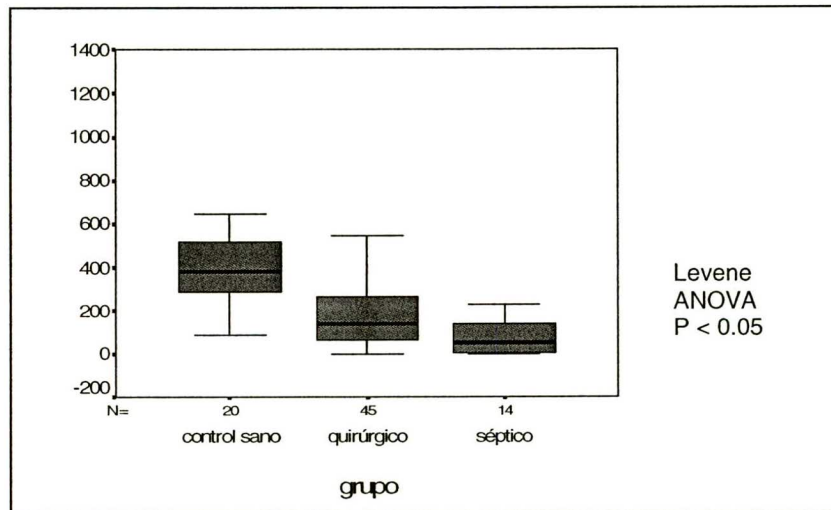
Se analizó la primera determinación de IL-6, IL-10 e IL-12. Con respecto a IL-6, los controles sanos tuvieron un promedio de 34 pg/ml, mientras que el grupo de pacientes quirúrgicos fue de 104.53 pg/ml y en sépticos de 418.11 pg/ml ( $p < 0.01$ ) (Figura 9).

Al analizar el comportamiento de IL-12 encontramos que los controles sanos tuvieron un promedio de 400 pg/ml, el de pacientes quirúrgicos fue de 200 pg/ml y en el grupo de pacientes sépticos fue de 100 pg/ml ( $p < 0.05$ ) (Figura 10).

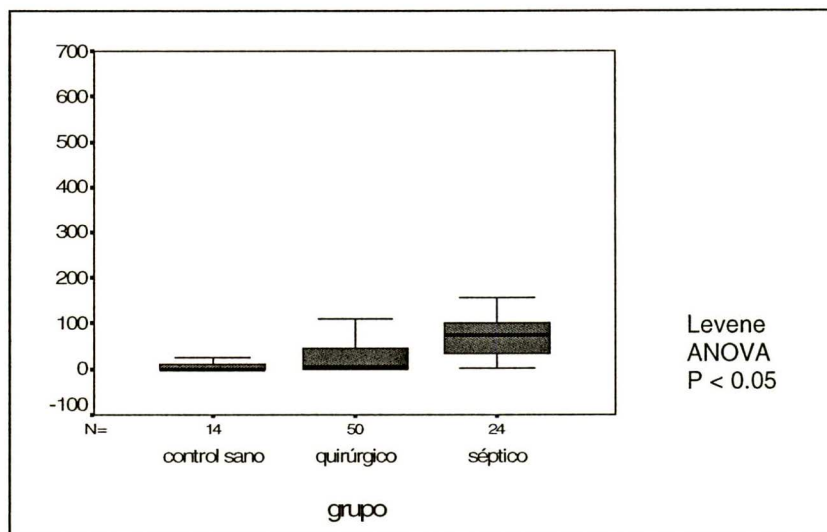
En cuanto a IL-10, el promedio en controles sanos fue de 16.9 pg/ml, en pacientes quirúrgicos de 25 pg/ml y en pacientes sépticos de 91.52 pg/ml, con diferencias significativas entre los tres grupos ( $p = 0.001$ ) (Figura 11).



**Figura 9. Niveles séricos de IL-6.** Los datos se presentan en mediana (líneas negra), percentiles (25-75%) y valores extremos, de los niveles de expresión obtenidos para los grupos quirúrgico, séptico y controles sanos.



**Figura 10. Niveles séricos de IL-12.** Los datos se presentan en mediana (líneas negra), percentiles (25-75%) y valores extremos, de los niveles de expresión obtenidos para los grupos quirúrgico, séptico y controles



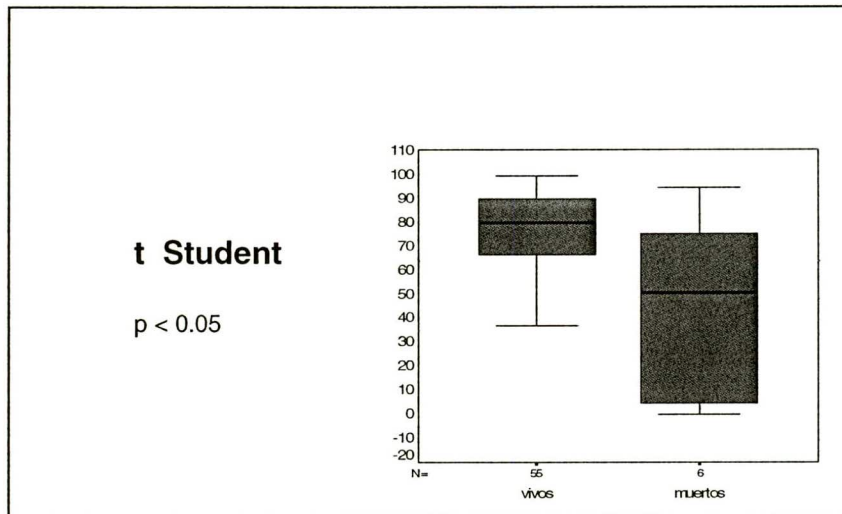
**Figura 11. Niveles séricos de IL-10.** Los datos se presentan en mediana (líneas negra), percentiles (25-75%) y valores extremos, de los niveles de expresión obtenidos para los grupos quirúrgico, séptico y controles

## Comportamiento de Moléculas de Clase II , TREM-1 y citocinas en relación a morbi-mortalidad de pacientes quirúrgicos.

Se comparó la expresión de MHC-II y TREM-1 en los pacientes con base a su evolución final, es decir aquellos que vivieron y aquellos que fallecieron.

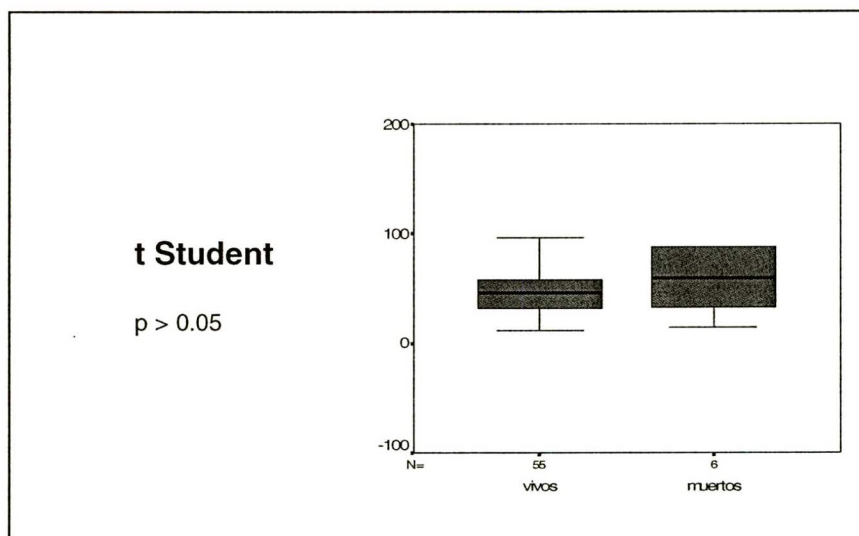
El promedio de edad del grupo quirúrgico entre aquellos que sobrevivieron de aquellos que fallecieron fue heterogéneo, debido a que el promedio de edad en estos últimos fue mayor ( $p < 0.05$ ).

Se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas para identificar diferencias en los promedios de valores obtenidos para la expresión de MHC-II en los pacientes del grupo quirúrgico que sobrevivieron, así como en los que fallecieron, encontrando niveles estadísticamente más bajos en los fallecidos con promedio de 45.8%, mientras que en los pacientes que sobrevivieron el promedio fue de 74.8%, (Figura 12 ).



**Figura 12. Expresión de HLA-DR.** Grafica comparativa del nivel de expresión en pacientes quirúrgicos que vivieron y aquellos que fallecieron.

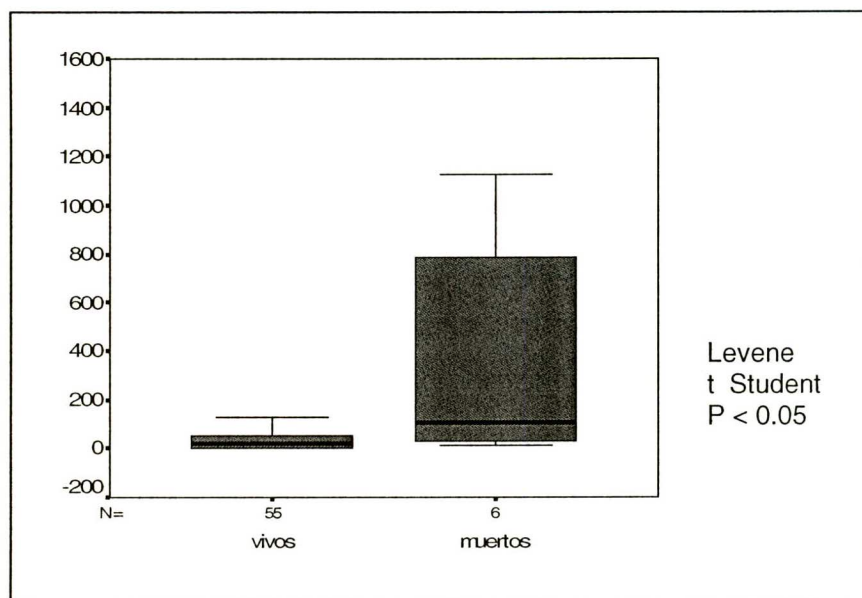
Respecto a TREM-1, con el mismo tipo de comparación, en estos mismos pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 13).



**Figura 13. Expresión de TREM-1.** Grafica comparativa del nivel de expresión en pacientes quirúrgicos que vivieron y aquellos que fallecieron.

En relación a citocinas, encontramos que para IL-6 los pacientes que fallecieron tuvieron niveles más altos con un promedio de 150 ng/ml, mientras que en los

pacientes que sobrevivieron el promedio fue de 20 ng/ml, existiendo diferencias significativas (Figura 14).



**Figura 14. Niveles séricos de IL-6.** Grafica comparativa de niveles sericos en pacientes quirúrgicos que vivieron y aquellos que fallecieron.

En cuanto a las citocinas IL-12 e IL-10 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que fallecieron y aquellos que sobrevivieron (Graficas no mostradas).

Respecto a MHC-II considerándolas como factor de exposición, se realizó la exploración de los datos para encontrar puntos de corte con mejor significancia estadística, encontrando que con el punto de corte de  $\leq 60\%$ , presentó un valor de  $p= 0.012$ , siendo aún mejor con el punto de corte de  $\leq 55 \%$ , representando por  $p= 0.001$ . Es pertinente para su relevancia clínica, el identificarlo como riesgo, y dado que se identificó el punto de corte post estudio, se considera casos y controles, y se identifica mediante OR (odds ratio, razón de momios, etc), siendo para el punto de corte de  $< 55 \%$ ,  $OR = 13.7$   $p= 0.006$ , IC al 95% (2.1 - 89.2), con poder muestral del 85.3 %. Queriéndonos decir lo anterior que tenemos el 85.3 % de certidumbre que cuando se presentan valores de MHC-II en la evaluación preoperatorio iguales o menores a 55 %, el paciente tendrá 13.7 veces más la

probabilidad de morir después del evento quirúrgico para el que esta programado (Tabla IV).

**Tabla IV. Asociación de valores en primera muestra con muerte (n = 61)**

CII	Sobrevida				Total	
	Muertos		Vivos		n	%
	n	%	n	%		
≤ 55	4	(6.5)	7	(11.4)	11	(18)
> 55	2	(3.3)	48	(78.6)	50	(82)
Total	6	(9.8)	55	(90.2)	61	(100)
<b>TREM-1</b>						
≥ 70	3	(4.9)	8	(13.2)	11	(18)
< 70	3	(4.9)	47	(77)	50	(82)
Total	6	(9.8)	55	(90.2)	61	(100)

Respecto A TREM-1 a pesar de que no se encontraron diferencias también se exploraron los datos, encontrando un comportamiento muy similar, pero con un punto de corte  $\geq 70$  IMF, con un riesgo de 5.8 veces y con menor significancia estadística, debido al poder muestral obtenido en el presente estudio (Tabla IV).

Se analizó y comparo la expresión de MHC-II y TREM-1 en los pacientes del grupo quirúrgico, con base al desarrollo de complicaciones infecciosas durante su estancia hospitalaria, para lo cual se dividieron los pacientes en aquellos que desarrollaron (n=12) o no (n=49), alguna infección durante su estancia en el hospital.

En cuanto a la expresión de MHC-II tomando como punto de corte  $\leq 55\%$ , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos. Respecto a la expresión de TREM-1 en estos mismos pacientes, pero tomando como punto de corte valores promedio  $\geq 70$  IMF, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos.

## 7. DISCUSIÓN

La principal causa de muerte en pacientes sometidos a cirugías mayores es la presencia de falla orgánica, generalmente asociada a la presencia de un micro-organismo. Esta asociación involucra la respuesta inflamatoria dependiente de diferentes tipos celulares y de múltiples mediadores inflamatorios. Los monocitos juegan un papel fundamental como células efectoras, a través de la secreción de mediadores inflamatorios y la expresión de diferentes moléculas en su superficie celular. Su función puede afectarse por diversas situaciones, entre otras, los casos de cirugía mayor<sup>33</sup>. Esta alteración depende de la disminución de la capacidad para presentar antígenos, para la adherencia y transmigración y para la fagocitosis; todas fundamentales para la protección del organismo en caso de invasión por algún micro-organismo. Aunque es común encontrar disminución en la expresión de MHC-II en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos mayores, sin que ello implique la presencia de complicaciones<sup>34</sup>; hay reportes que asocian la disminución en la expresión en monocitos periféricos, con la presencia de infecciones o incluso con mal pronóstico<sup>35,36</sup>. Aparentemente la disminución de la expresión de MHC-II está en relación con la severidad<sup>37</sup>, incluso hay quienes reportan que la expresión del MHC-II no parece tener correlación con la evolución postoperatoria<sup>38</sup>. Sin embargo, este resultado contrasta con el de Gogos y colaboradores, en el que reporta como mejor predictor de mortalidad en pacientes sépticos, la expresión de MHC-II al momento de la admisión, encontrando que el 100% de los pacientes que sobrevivieron tuvieron valores de MHC II > 30 %<sup>39</sup>. En nuestro estudio el promedio de la expresión de MHC-II en sujetos sanos fue mayor del 80%; en los pacientes quirúrgicos, en la primera muestra antes de la cirugía, el promedio fue de 72%. Pero el promedio en la expresión en pacientes sépticos fue de 41.6%. Nuestros resultados apoyan algo similar a lo observado por Gogos en lo referente al comportamiento de MHC-II como predictor de mortalidad, pero en el grupo de pacientes quirúrgicos, y aportando algo nuevo, un punto de corte diferente. Los pacientes con valores  $\leq 55$  % de MHC-II antes de la cirugía tuvieron 13.7 veces mayor riesgo de morir después del evento quirúrgico en el transcurso

de la evolución postoperatoria. Aunque nuestros resultados tienen significancia estadística, habrá que ser cautos en su interpretación, ya que existe un reporte previo que demuestra que la expresión de MHC-II tan baja como de 0.1% fue suficiente para la estimulación de células T (por lo que estrictamente hablando, no existiría un fenómeno de inmunoparálisis). Este dato sugiere que la capacidad de presentación antigénica y activación de los monocitos y de las células T <sup>40</sup>, no se encuentra suprimida después de cirugía, a pesar de la disminución en la expresión de estas moléculas; por lo que la correlación entre la disminución en su expresión y el mal pronóstico reportado en diferentes estudios, puede estar basado en otros mecanismos. Sin embargo, ya que existen evidencias bien documentadas de la correlación entre complicaciones infecciosas y mal pronóstico con la disminución en la expresión de MHC-II en monocitos circulantes, proponemos que la disminución, con este nuevo punto de corte, está en relación a mal pronóstico en pacientes quirúrgicos. Como se señaló previamente, la disminución en la expresión de moléculas del MHC-II predispone al desarrollo de infecciones, sin embargo, nuestros resultados no apoyan lo anterior.

TREM-1 es un receptor de células mieloides involucrado en la respuesta inflamatoria, y su incremento se asocia a la presencia de micro-organismos patógenos <sup>41</sup>. En nuestro grupo de individuos sanos, los valores de TREM-1 son inferiores a los encontrados en pacientes quirúrgicos y sépticos, pero sin diferencia estadística entre estos dos últimos. Una de las intenciones de incluir un grupo con pacientes sépticos, fue para corroborar que la expresión de TREM-1 en pacientes con una infección corroborada y de reciente inicio, se encontraba incrementada con respecto a los grupos control y quirúrgico. Sin embargo, su expresión no fue mayor que en el grupo de pacientes quirúrgicos. Gibot y colaboradores, reportaron que el incremento en la expresión de TREM-1 en pacientes con choque séptico fue mayor en pacientes que fallecieron, con respecto al mismo tipo de pacientes, con choque séptico, pero que sobrevivieron. En nuestros pacientes con sepsis no logramos encontrar esta relación. En cuanto a nuestros pacientes quirúrgicos, el incremento en la expresión de TREM-1  $\geq 70$  IMF en la primera muestra pre-operatoria, se asoció con incremento en la

mortalidad, comparado con aquellos pacientes que sobrevivieron y que expresaron valores  $\leq 70$  de IMF, sin embargo, el número de pacientes no permite que el resultado se estadísticamente significativo.

Este comentado estado de inmunosupresión de los pacientes quirúrgicos se ha visto asociado con la concentración sérica de citocinas, que a su vez está en relación a la activación de diferentes tipos celulares. Sin embargo, es importante comentar que, además de las citocinas, existen otros mediadores inflamatorios involucrados en situaciones de estrés, tal es el caso de los eicosanoides. El incremento en los niveles de estos, a expensas de prostaglandinas y leucotrienos, se observa al poco tiempo de producido el estímulo, y como en lo referente a las citocinas, también existen eicosanoides que favorecen la respuesta inflamatoria y aquellas que favorecen la respuesta anti-inflamatoria <sup>42</sup>. Experimentalmente se ha visto que las primeras citocinas liberadas son el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6; y aunque son diferentes los tipos celulares que las producen, parece que los macrófagos del hígado, las células de Kupffer, son de los principales productores de estas. El incremento de IL-6 obedece al incremento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas dos últimas citocinas no se determinaron en nuestro trabajo, ya que su vida media es muy corta y la identificación sérica, a través del método de ELISA, es difícil, de acuerdo a nuestras propias observaciones.

De la misma forma que las moléculas previas (MHC-II y TREM-1), se analizó la primera determinación de citocinas en todos los pacientes. Los valores de IL-6 en nuestros pacientes quirúrgicos se encontraron incrementados con respecto a los valores de los controles sanos, mientras que los pacientes sépticos presentaron los valores más altos con respecto a los grupos quirúrgico y controles sanos. La única diferencia estadísticamente significativa se encontró en los pacientes que fallecieron, ya que presentaron valores superiores de IL-6 con respecto aquellos que sobrevivieron. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a IL-10 e IL-12. IL-6 es una citocina que tradicionalmente se ha considerado pro-inflamatoria, y la responsable de la producción de proteínas de fase aguda. Quizá por eso, entre otras factores que comentaremos más adelante,

# BIBLIOTECA UACM

puede considerarse además como una citocina anti-inflamatoria; ya que estas proteínas están destinadas a unirse a diferentes componentes de microorganismos, con el fin de controlar la infección. Xing y colaboradores, reportaron el papel anti-inflamatorio local y sistémico de IL-6 utilizando células presentadoras de antígenos de ratones IL-6<sup>-/-</sup> estimuladas con LPS. Encontraron incremento evidente en la producción de TNF- $\alpha$ , MIP-2, GM-CSF e INF $\gamma$ , en el grupo de ratones dobles negativos, en comparación con la disminución en su expresión en los ratones IL-6<sup>+/+</sup><sup>43</sup>.

En pacientes sépticos los valores de IL-10 fueron superiores que en los otros grupos estudiados. IL-10 por su parte, tiene un papel anti-inflamatorio<sup>44</sup>, y uno de sus efectos es la regulación negativa en la expresión del MHCII<sup>45</sup>, probablemente a través de la inducción de la endocitosis de estas últimas<sup>46</sup>. Sin embargo, Hiesmayr en pacientes sometidos a cirugía cardiaca/torácica, no encontró tal correlación, ya que la disminución en la expresión de MHC-II fue simultánea al incremento en la producción de IL-10. En nuestros pacientes quirúrgicos, aparentemente se encuentra esta correlación, por lo que es probable que la disminución en la expresión de MHC-II en pacientes quirúrgicos, se encuentre en relación con diferentes factores que tendrán que analizarse posteriormente (ej. Anestésicos)<sup>47</sup>.

Aunque el análisis de los resultados de citocinas se hizo con la primera determinación, se revisaron las tendencias en cuanto a la producción de citocinas de todas las determinaciones, en los tres grupos de pacientes. Los pacientes del grupo quirúrgico electivo que presentaron un SIRS preoperatorio mostraron incremento postoperatorio de IL-6 e IL-10, con disminución de IL-12. Los pacientes del mismo grupo, pero sin SIRS, la respuesta de estas citocinas fue similar pero menor en intensidad y duración. Estos resultados llaman la atención por dos razones, la primera es que podemos decir que los pacientes que presentan un estado de sensibilización pre-operatorio, fundamentado por la presencia de SIRS, tuvieron una reacción más intensa en relación con la producción de citocinas que aquellos del grupo quirúrgico electivo sin SIRS. Esta situación pudiera estar en relación con el desenlace de la evolución del paciente. Segundo, la asociación de

la disminución en la expresión de MHC-II, junto con el incremento de IL-6 e IL-10 y la disminución de IL-12, puede hablar de un ambiente anti-inflamatorio o CARS temprano postoperatorio, como resultado del SIRS preoperatorio en el que se encontraban. Estos resultados tendrán que someterse a un análisis estadístico con un mayor número de pacientes, sin embargo, parece que están en el mismo sentido que lo propuesto por Cavallion, que propone la teoría de la compartimentalización, en la que la presencia de SIRS y CARS es prácticamente simultánea, sin embargo, la primera se encuentra localizada en el sitio de agresión y la segunda se encuentra a nivel sistémico <sup>48</sup>.

## **8. CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

Los pacientes que presenten valores  $\leq 55\%$  de MHC-II en la primera muestra pre-operatoria tendrán 13.7 veces mas riesgo de fallecer después del evento quirúrgico para el que han sido programados. MHC-II es una molécula que predispone a la presencia de infecciones, sin embargo, en pacientes quirúrgicos, la disminución en su expresión se asoció a mal pronóstico, con un punto de corte de  $\leq 55\%$ , superior a lo que otros autores habían propuesto para definir CARS (30%), pero sin relación al pronóstico del paciente.

Los pacientes que presenten valores de TREM-1  $\geq 70$  IMF en la primera muestra pre-operatoria tendrán 5.8 veces mas riesgo de fallecer después del evento quirúrgico, pero se requiere un mayor número de pacientes para que estos datos puedan ser estadísticamente significativos, sin embargo, al igual que con MHC-II, no se pudo encontrar asociación de esta con la presencia de infecciones, ni siquiera en pacientes sépticos.

## **9. PERSPECTIVAS**

Actualmente se está realizando la caracterización de las moléculas del MHC-II y de TREM-1 en controles sanos mayores de 60 años, para tener un punto de comparación con nuestro grupo de pacientes quirúrgico mayores de 60 años.

Se realizarán estudios prospectivos, con otro tipo de pacientes y con mayor número de ellos, para corroborar que la disminución en la expresión de moléculas MHC-II y el incremento de TREM-1, en los puntos de corte establecidos, se asocian con mal pronóstico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-874.
2. Le G, Jr., Alberti C, Brun BC. [Epidemiology of infection and sepsis in intensive care unit patients]. *Bull Acad Natl Med* 2004; 188:1115-1125.
3. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138-150.
4. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112:460-467.
5. Lowry SF, Awad S, Ford H, Cheadle W, Williams MD, Qualy RL, McCollam JS, Bates BM, Fry DE. Static and dynamic assessment of biomarkers in surgical patients with severe sepsis. *Surg Infect (Larchmt)* 2004; 5:261-268.
6. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:385-405.
7. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 6:1182-1190.
8. Riewald M, Ruf W. Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. *Crit Care* 2003; 7:123-129.
9. Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 2005; 6:1198-1205.

10. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:3-9.
11. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med* 1997; 25:1813-1819.
12. Boontham P, Chandran P, Rowlands B, Eremin O. Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications. *Surgeon* 2003; 1:187-206.
13. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997; 226:450-458.
14. Weigand MA, Horner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18:455-475.
15. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24:1125-1128.
16. Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 2005; 6:558-564.
17. Munford RS, Tracey KJ. Is severe sepsis a neuroendocrine disease? *Mol Med* 2002; 8:437-442.

18. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 2004; 10:1216-1221.
19. Wolk K, Docke W, von B, V, Volk H, Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 1999; 67:253-256.
20. Dodek P, Keenan S, Cook D, Heyland D, Jacka M, Hand L, Muscedere J, Foster D, Mehta N, Hall R, Brun-Buisson C. Evidence-based clinical practice guideline for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* 2004; 141:305-313.
21. Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, Antonelli M, Goodman SV, Martin C, Moreno R, Ochagavia AR, Palazzo M, Werdan K, Le G, Jr. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:461-468.
22. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL, Jr., Platt R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278:234-240.
23. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273:117-123.
24. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410:1103-1107.

25. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2:S397-S401.
26. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 2000; 164:4991-4995.
27. Diefenbach A, Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:37-44.
28. Allcock RJ, Barrow AD, Forbes S, Beck S, Trowsdale J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol* 2003; 33:567-577.
29. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 2003; 170:3812-3818.
30. Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:445-453.
31. Gibot S, Le Renard PE, Bollaert PE, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Faure GC, Levy B. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Med* 2005; 31:594-597.
32. Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, duna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, studillo-de I, V, Sanchez-Fernandez P, rriaga-Pizano L, Villasis-Keever MA, Lopez-Macias C, Isibasi A. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in

sepsis and major abdominal surgery. *World J Gastroenterol* 2005; 11:7473-7479.

33. Faist E, Storck M, Hultner L, Redl H, Ertel W, Walz A, Schildberg FW. Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. *Surgery* 1992; 112:562-572.
34. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E. Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery . *Clin Exp Immunol* 1999; 115:315-323.
35. Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC, Jr. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection *Am J Surg* 1991; 161:639-645.
36. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment . *Nat Med* 1997; 3:678-681.
37. Gotzinger P, Sautner T, Spittler A, Barlan M, Wamser P, Roth E, Jakesz R, Fugger R. Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment . *Eur J Surg* 2000; 166:628-632.
38. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997; 65:2283-2291.

39. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:161-167.
40. Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation . *Science* 1990; 249:1028-1030.
41. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia . *N Engl J Med* 2004; 350:451-458.
42. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, Heberer G. Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma . *J Trauma* 1987; 27:837-848.
43. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101:311-320.
44. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77:3-15.
45. de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-1220.
46. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1475-1482.

47. Hiesmayr MJ, Spittler A, Lassnigg A, Berger R, Laufer G, Kocher A, Artemiou O, Boltz-Nitulescu G, Roth E. Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery . Clin Exp Immunol 1999; 115:315-323.
  
48. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS . J Endotoxin Res 2005; 11:311-320.

## 11. ANEXOS

### HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

#### “PARTICIPACIÓN DE TREM-1 COMO SEÑAL DE INFECCIÓN TEMPRANA EN LA EVOLUCIÓN DE PACIENTES QUIRÚRGICOS CON RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA”

Hoja 1

#### Identificación

Nombre.			
Filiación			
Iniciales Paciente	Apellidos y nombre		
Fecha ingreso Hospital		Fecha primera toma	
Edad		Teléfono	
Cama			

#### Antecedentes personales no patológicos

Peso		Talla		1 Hombre	2 Mujer	
1 Tabaco	2 Alergias	3 Alcohol	4 Transf.	5 Toxicom.		
6 Ninguno				Otros		

#### Antecedentes personales patológicos

Diabetes M	
Hipertensión Arterial	
Cardiopatía isquémica	
Cirugías Extra-gastrointestinales	
Cirugías gastrointestinales	

#### Grupos

#### Tipo de cirugía

Quirúrgico ( 1 )		Cirugía gástrica	
Séptico ( 2 )		Cirugía esofágica	
Qx. No Complicado ( 1 a )		Cirugía I. Delgado	
Qx. Complicado ( 1 b )		Cirugía colon	
Qx. Con RI Preop. ( 1.1 )		Cirugía Vesícula y VB	
Qx sin RI Preop. ( 1.2 )		Cirugía Páncreas	
		Cirugía bazo	
Qx Vivo ( C )		Cirugía hígado	
Qx. Fallecido ( D )		Cirugía hernias	

**Padecimiento actual**

Diagnóstico de Ingreso	
1.	
2.	
3.	
Fecha de inicio del padecimiento actual	
Diagnóstico pre-operatorio	
1.	
2.	
3.	
Fecha de cirugía	

**Diagnóstico Post-operatorio**

1.				
2.				
3.				
4.				
SIRS Pre op.		Fecha inicio		
SIRS Post op.		Fecha inicio		
Sepsis post op.		Fecha de inicio Sepsis		
APACHE II (en cuatro determinaciones)				
Ingreso	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta

**Procedimiento anestésico.**

Técnica Anestésica			
Parámetros Transop.	Preoperatorio	Transoperatorio	Fin de cirugía
Frecuencia Cardíaca			
pH			
Saturación arterial			
Exceso de Base			
Bicarbonato			
Saturación Venosa			
Hemoglobina			
Hematocrito			
Uso esteroides			

### Resumen estancia hospitalaria del paciente

Días de estancia hospitalaria			
Fecha de alta			
Motivo del alta	1 Recuperación	2 Defunción	
Diagnóstico egreso			
1.			
2			
3			
4			
5			

Hoja 2. Medicamentos. Nombre del paciente  
Número de expediente      Número de paciente

**Medicamentos.**

	<b>Dosis</b>	<b>Fecha de inicio</b>	<b>F. de termino</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Antibióticos</b>				
<b>Analgésicos</b>				
<b>Aminas</b>				



Hoja 4. Laboratorio. Nombre del paciente.

Número de expediente.

Número de paciente.

**Laboratorio: producto/día**

Producto										
Hemoglobina										
Hematocrito										
Glucosa										
Urea										
Creatinina										
Prot C reac.										
Plaquetas										
TP										
TTP										
Linfocitos										
Monocitos										
Neutrófilos										
Temperatura										
F C										
F R										
TA										
Pa O2										
Pa CO2										
Leucocitos										
Na <sup>+</sup> serico										
K <sup>+</sup> serico										
pH arterial										
HCO3 serico										
BT										
BD										
BI										







## Disfunción orgánica (SOFA)

Disfunción orgánica	0	1	2	3	4
Respiratoria PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub> (torr)	> 400	< 400	< 300	< 200 más ventilación mecánica	< 100 más ventilación mecánica
Coagulación Plaquetas (10 <sup>3</sup> dl)	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepática Bilirrubina total (mg/ dl) mmol/ L	< 1.2 < 20	1.2 - 1.9 20- 32	2.0 - 5.9 33 - 101	6.0 - 11.9 102 - 204	12.0 o más > 204
Cardiovascular Hipotensión o drogas vasoactivas	Sin hipotensión	TAM > 70 mmHg	Dopamina < 5 o Dobutamina en cualquier dosis	Dopamina > 5 Epinefrina < 0.1 Norepi < 0.1	Dopamina > 15 Epinefrina > 0.1 Norepi > 0.1
Nurológica Escala de Glasgow	15	13- 14	10- 12	6- 9	< 6
Renal Creatinina sérica (mg/dl) Flujo urinario (ml/día)	< 1.2	1.2 - 1.9	2.0- 3.4	3.5 - 4.9 < 500	< 5.0 < 200

## APACHE II

Variable fisiológica	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura rectal °C	> 41	39-40.9		38.5-38	36-38.4	34-35.9	32-33	30-31	<29.9
Presión arterial media mmHg	>160	130-159	110-129		70-109		50-69		<49
Frecuencia cardiaca	>180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<39
Frecuencia respiratoria	>50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<5
Oxigenación: A-aDO <sub>2</sub> ó PaO <sub>2</sub> (mmHg)									
a FiO <sub>2</sub> >0.5 con A-aDO <sub>2</sub>	>500	350-499	200-349		<200				
b FiO <sub>2</sub> <0.5 con PaO <sub>2</sub>					PO <sub>2</sub> >70	PO <sub>2</sub> 61-70		PO <sub>2</sub> 55-60	PO <sub>2</sub> <55
pH arterial	> 7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33- 7.49		7.25- 7.32	7.15-7.24	< 7.15
Sodio sérico mMol/L	> 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	< 110
Potasio sérico mMol/L	> 7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5
Creatinina sérica (mg/100ml)									
Doble puntuación con (IRA)*	>3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hematocrito	> 60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		<20
Leucocitos (mm <sup>3</sup> )	>40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		<1
Escala Glasgow: 15=valor actual									
APS= suma de las 12 variables									
HCO <sub>3</sub> sérico	> 52	41-51.9		32-40.9	22-31		18-21.9	15-17	<15

## Carta de consentimiento informado

México, D. F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200 \_\_\_\_.

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.  
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Servicio de Gastrocirugía.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado "PARTICIPACIÓN DE TREM-1 COMO SEÑAL DE INFECCIÓN EN LA EVOLUCIÓN EN PACIENTES POST-QUIRÚRGICOS CON SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA.

El objetivo del estudio es comprender mejor la respuesta inflamatoria en pacientes operados en forma electiva y en pacientes portadores de Sepsis, secundaria a procedimientos quirúrgicos realizados previamente, por patología gastrointestinal. Esto se logrará mediante la determinación de citocinas en suero (IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ ) y otras moléculas (TREM-1, HLA-DR) en la superficie de las células sanguíneas. Se me ha explicado que mi participación consistirá en la donación de 8 mL de sangre venosa cada 48 horas durante los primeros días de mi estancia en el hospital. La sangre se obtendrá mediante punción en vena periférica o a través de catéter central.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, y molestias, que se reducen a la incomodidad derivada de la punción en venas periféricas. Yo no obtendré beneficio al participar en este protocolo.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto. Así mismo, podré ser retirado del estudio en caso de que cumpla con alguno de los criterios de exclusión.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Podré contactar al investigador responsable en el teléfono 56-27-69-15 a nombre del Dr. Armando Isibasi A.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Dr. Armando Isibasi Araujo

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo