



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 27 de enero de 2020

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Carlos Eduardo Jiménez Canizales, con C.C. No. 1.110.475.645, Autor (es) de la tesis y/o trabajo de grado Titulado Estudio multicentrico para el desarrollo de una nueva prueba diagnóstica que predice Sepsis mediante Reprogramación Celular, reporte preliminar para Colombia presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Especialista en Medicina Interna;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS**



**CARTA DE AUTORIZACIÓN**

**CÓDIGO**

**AP-BIB-FO-06**

**VERSIÓN**

**1**

**VIGENCIA**

**2014**

**PÁGINA**

**1 de 2**

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores" , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Carlos Eduardo Jiménez Canizales

Firma:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: \_\_\_\_\_

**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:** Estudio multicentrico para el desarrollo de una nueva prueba diagnóstica que predice Sepsis mediante Reprogramación Celular. reporte preliminar para Colombia

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Jiménez Canizales	Carlos Eduardo

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Pinzón Tovar	Alejandro

**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Peña	Olga

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:** Especialista en Medicina Interna

**FACULTAD:** De Salud

**PROGRAMA O POSGRADO:** Especialización en Medicina Interna

**CIUDAD:** Neiva      **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2020      **NÚMERO DE PÁGINAS:** 95

**TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):**

Diagramas  Fotografías  Grabaciones en discos  Ilustraciones en general  Grabados   
 Láminas  Litografías  Mapas  Música impresa  Planos  Retratos  Sin ilustraciones   
 Tablas o Cuadros

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

**SOFTWARE** requerido y/o especializado para la lectura del documento:

**MATERIAL ANEXO:**

**PREMIO O DISTINCIÓN** (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Sepsis	Sepsis	6. _____	_____
2. Diagnóstico	Diagnosis	7. _____	_____
3. Reprogramación celular	Cellular reprogramming	8. _____	_____
4. Transcriptoma	Transcriptome.	9. _____	_____
5. Pacientes	Patients	10. _____	_____

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

Palabras Claves: Sepsis; Diagnóstico; Reprogramación Celular; Transcriptoma.

La sepsis es considerada un problema de salud pública. La reprogramación celular es un proceso amnesia inmune involucrada en el desarrollo de sepsis con disfunción orgánica. Identificar la expresión génica de este fenómeno permite identificar estos pacientes.

**OBJETIVO:** Determinar la expresión de genes relacionados con reprogramación celular de los pacientes que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en el hospital Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva- Huila, entre el años 2017-2019.

**METODOLOGIA:** Cohorte prospectiva, controlada, ciega, parte de un estudio multicéntrico llevado a cabo por la universidad de British Columbia en Vancouver con participación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo.

**RESULTADOS:** Se identificaron y seleccionaron los genes más variables (1130) y se agruparon 4 patrones de expresión génica por cluster para la cohorte de sepsis Colombia. Los genes expresados por cada ruta obtenida se agruparon según la vía dominante en: Señalización de interferón, señalización interleucina, cascada complemento/membrana extracelular y ciclo celular.

**CONCLUSIONES:** El análisis transcriptómico preliminar de los pacientes de la cohorte de reprogramación celular para Colombia muestran patrones de señalización concordantes con los encontrados en cohortes independientes de pacientes con sepsis

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

Sepsis is considered a public health problem. Cellular reprogramming is immune amnesia process involved in development of sepsis with organic dysfunction. Identifying the gene expression of this phenomenon allows identifying these patients.

**AIM:** To determine expression of genes related to cellular reprogramming of patients who have systemic inflammatory response syndrome and sepsis at the Hernando Moncaleano Perdomo hospital in the city of Neiva-Huila, 2017-2019.

**METHODOLOGY:** Prospective, controlled, blind cohort, part of a multicenter study carried out by the University of British Columbia in Vancouver with the participation of the Hernando Moncaleano Perdomo University Hospital.

**RESULTS:** Most variable genes were selected (1130 genes). Gene expression of clusters were summarized into enriched pathways. Interferon signalling, Interleukin signalling, Complement Cascade/Extracellular Membrane, Cell cycle.

**CONCLUSIONS:** Preliminary transcriptomic analysis of patients in the cellular reprogramming cohort for Colombia show signalling patterns consistent with those found in independent cohorts of patients with sepsis.

**APROBACION DE LA TESIS**

Nombre Presidente Jurado: *Luis Felipe Cardenas L*

Firma: *[Signature]*

Nombre Jurado: Diego Fernando Salina

Firma: *[Signature]*

Nombre Jurado: Adriana Zamora

Firma: *[Signature]*

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://www.usco.edu.co), link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

ESTUDIO MULTICENTRICO PARA EL DESARROLLO DE UNA NUEVA PRUEBA  
DIAGNOSTICA QUE PREDICE SEPSIS MEDIANTE REPROGRAMACION  
CELULAR, REPORTE PRELIMINAR PARA COLOMBIA

CARLOS EDUARDO JIMENEZ CANIZALES

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN MEDICINA INTERNA  
NEIVA – HUILA  
2020

ESTUDIO MULTICENTRICO PARA EL DESARROLLO DE UNA NUEVA PRUEBA  
DIAGNOSTICA QUE PREDICE SEPSIS MEDIANTE REPROGRAMACION  
CELULAR, REPORTE PRELIMINAR PARA COLOMBIA

CARLOS EDUARDO JIMENEZ CANIZALES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Especialista en  
Medicina Interna

Asesor:

ALEJANDRO PINZON TOVAR  
Médico Internista-Endocrinólogo  
Universidad Surcolombiana

Co-asesora:

OLGA M. PENA  
Bacterióloga-Doctora en Microbiología e Inmunología  
Centre for Microbial Diseases and Immunity Research  
University of British Columbia

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
ESPECIALIZACION EN MEDICINA INTERNA  
NEIVA – HUILA  
2020

Nota de aceptación:

Aprobado

-----  
-----  
-----  
-----



-----  
Firma del presidente del jurado



-----  
Firma del jurado



-----  
Firma del jurado

Neiva, agosto del 2019.



## DEDICATORIA

*“Mi dibujo no representaba un sombrero. Representaba una serpiente boa que digería un elefante...Las personas mayores me aconsejaron dejar de lado el dibujo de serpientes boas, abiertas o cerradas, e interesarme más bien en la geografía, la historia, el cálculo y la gramática.”*

El principito. Antoine De Saint-Exupéry.

*Inicio esta dedicatoria, manifestando mi profundo respeto por todos aquellos que han despertado en mí el interés continuo por la investigación científica como herramienta de transformación social y aprendizaje y con esto dedicar esta obra a todos aquellos que me han acompañado en el desarrollo de este trabajo y a los cuales siempre digo no dejen de soñar como el principito.*

*A mi región el Tolima grande que tiene personas maravillosas que dentro o fuera de ella se han esforzado por hacerla más grande.*

*A las coincidencias de la ciencia que me han puesto en el camino de grande científicos y personas hermosas que tienen esperanza en que a través de la cultura científica este país puede ser cada día un territorio de paz y amor.*

*Sin duda no puede faltar la dedicatoria a mi mamá (Betty) y a mi papá (Oliverio) y a esa linda coincidencia de comprensión y amor en mi vida (Kelly).*

*A todos ellos dedico este esfuerzo.*

CARLOS EDUARDO

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

A mi asesor Doctor Alejandro Pinzón, médico internista y mentor en medicina interna y otras áreas maravillosas como el metabolismo y la homeostasis hormonal, que me ha permitido mostrar y apoyar procesos en mi formación especializada que van más allá de los pasillos del hospital y las aulas universitarias.

A mi co-asesora externa Doctora Olga M. Peña, Bacterióloga que con su talante deja en alto el nombre de nuestro país a nivel internacional y en especial en Canadá, desde donde apoya continuamente el desarrollo científico de nuestra región del Tolima grande.

Al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la Ciudad de Neiva, Huila, por permitir desarrollar esta investigación y el honor de perfeccionar mis conocimientos en él.

Al laboratorio Hancock-Lab y al Centre for Microbial Diseases and Immunity Research de la British Columbia University en Vancouver-Canada y su director Dr. Bob Hancock por permitir a Colombia, nuestra universidad y hospital participar de este estudio pionero e innovador.

A los estudiantes y residentes de Medicina Interna de la Universidad Surcolombiana, por su apoyo en la recolección de la información.

A mi equipo de trabajo conformado por: Álvaro “wey” Mondragón Cardona, Natalia del Pilar “Nata” Delgado, Clery Cisneros, Luis “Lucho” Manuel Ariza, Cristian Daniel Ochoa y Juan Diego “El bello” Rivera, colegas y estudiantes que apoyaron el desarrollo de este valioso proyecto para la región y el país.

A los Doctores Arjun Baghela de la British Columbia University y el Doctor Carlos Calderón, por el análisis de los datos.

A todos ellos muchas gracias por su paciente, perseverancia y apoyo incondicional.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	17
1. JUSTIFICACION	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GENERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. ANTECEDENTES	26
4.1 SEPSIS Y RESPUESTA DEL HUÉSPED	27
4.2 CONFERENCIA SOBRE SEPSIS 1991	30
5. MARCO TEORICO	33
5.1 MARCO CONCEPTUAL SEPSIS	33
5.1.1 Choque séptico definición	33
5.2 SRIS vs SOFA vs <i>qSOFA</i>	35
5.3 META DE TENSION ARTERIAL MEDIA (TAM)	37

	pág.	
5.4	FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS	38
5.6	INFLAMACIÓN EXCESIVA EN SEPSIS	40
5.6.1	Iniciación de la inflamación	40
5.6.2	Activación del complemento	40
5.6.3	Coagulación y activación de células endoteliales	40
5.6.4	Trampas extracelulares de neutrófilos	41
5.6.5	Disfunción endotelial	41
5.6.6	El papel de las plaquetas	42
5.6.7	El rol de las células B	42
5.7	INMUNOSUPRESIÓN	43
5.7.1	Agotamiento de linfocitos y apoptosis	43
5.7.2	Reprogramación de células presentadoras de antígeno	44
5.8	BIOMARCADORES EN SEPSIS	46
5.9	BIOMARCADORES PROTEICOS	47
5.10	NUEVO MARCADORES DERIVADOS DE LAS ÓMICAS	48
5.11	BIOMARCADORES DE ARN	49
5.12	REPROGRAMACIÓN CELULAR O TOLERANCIA A ENDOTOXINA	50
6.	HIPOTESIS	53
7.	DISEÑO METODOLOGICO	54

		pág.
7.1	TIPO DE ESTUDIO	54
7.2	LUGARES	54
7.3	POBLACIÓN Y MUESTRA	54
7.4	SUJETOS DE ESTUDIO	55
7.5	CRITERIOS DE INCLUSION	56
7.6	CRITERIOS DE EXCLUSION	56
7.7	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACION	57
7.8	RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	57
7.8.1	Procesamiento de las muestras	57
7.9	ARN-seq	58
7.10	INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	59
7.11	ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN	60
7.12	PLAN DE ANÁLISIS	60
7.13	ASPECTOS ÉTICOS	62
7.14	ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	64
8.	ENTIDADES PARTICIPANTES Y TIPO DE PARTICIPACIÓN	66
9.	RESULTADOS	68

		pág.
9.1	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO POR ENDOTIPOS	69
9.2	VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS	72
9.3	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DESCRIPTIVO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SEPSIS COHORTE COLOMBIA	73
10.	DISCUSION	87
11.	CONCLUSIONES	90
	BIBLIOGRAFIA	91

## LISTA DE GRAFICAS

		pág.
Grafica 1	Tasa cruda de muerte por enfermedades infecciosas	17
Grafica 2	Epidemiología general de la sepsis a nivel global y en Colombia.	19
Grafica 3	Distribución porcentual por grupo etarios de los pacientes estudiados	72
Grafica 4	Distribución porcentual según el sexo	72
Grafica 5	Puntaje promedio de <i>Phred</i> sobre una longitud de lecturas de 100 pb para cada muestra.	73
Grafica 6	Tamaños de los bloques de las bibliotecas para los dos lotes de secuenciación	74
Grafica 7	Efecto de lote presente en la secuenciación identificado en el análisis del componente principal	75
Grafica 8	Estrategia de análisis de datos de expresión génica, para identificar la presencia de endotipos	76
Grafica 9	Vías de expresión génica agrupadas por cluster para la cohorte de sepsis Colombia	77
Grafica 10	Distribución en cajas y bigotes entre la edad y los clústeres	84
Grafica 11	Distribución en cajas y bigotes entre la qSOFA en la sala de urgencias y los clústeres	84
Grafica 12	Distribución en cajas y bigotes entre los días de estancia hospitalaria en la sala de urgencias y los clústeres	85

Grafica 13 Distribución en cajas y bigotes entre el puntaje SOFA a las 72 horas de observación en urgencias y los clústeres



## LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Línea de tiempo de la sepsis hasta la época moderna	30
Figura 2	Evolución de las definiciones de sepsis según las conferencias sepsis de 1991 a sepsis-3	34
Figura 3	Cambio del paradigma del entendimiento fisiopatológico de la sepsis	39
Figura 4	Fisiopatología de la sepsis, fenómenos involucrados en homeostasis en inmunidad protectora sin avance a sepsis (Azul), fenómenos involucrados en inflamación excesiva en paciente que evolucionan a sepsis (Naranja)	43
Figura 5	Fisiopatología de la sepsis, fenómenos involucrados en homeostasis en los mecanismos locales de reparación sin avance a sepsis (Azul), fenómenos involucrados en inmunosupresión en paciente que evolucionan a sepsis (verde)	45
Figura 6	Respuesta genómica de los leucocitos en sepsis	46
Figura 7	Modelos experimentales que han confirmado la reprogramación celular y el método usado para la identificación génica en nuestro estudio	51
Figura 8	Cadena de sucesos en la recolección de la muestra, el bloque superior la estrategia de toma de muestras y en el bloque inferior las estrategias de conservación y transporte de las muestras a Canadá	58
Figura 9	Flujograma recolección de información y muestras	68

## LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1	Modelo predisposición, insulto, respuesta, disfunción de órgano	32
Tabla 2	Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score	35
Tabla 3	Predicción de mortalidad intrahospitalaria entre pacientes con posible infección extra-hospitalaria	59
Tabla 4	Metadatos de los pacientes recolectados	59
Tabla 5	Cronograma de actividades	64
Tabla 6	Costos del proyecto a la fecha	65
Tabla 7	Número de pacientes agrupados (Clúster) por patrones de expresión génica	76
Tabla 8	Distribución de variables demográficas y clínicas según los cluster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia en < 24 horas después de la admisión a urgencias	78
Tabla 9	Distribución de clínicas según los clúster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia en 24-72 horas después de la admisión a urgencias	79
Tabla 10	Distribución de IMC*, comorbilidades e inmunosupresión según los clúster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia	80
Tabla 11	Distribución de tipo de cultivo, aislamiento microbiológico y perfil de resistencia según los clústeres/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia	81
Tabla 12	Distribución de los diagnósticos al egreso según los clústeres/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia	82

	pág.
Tabla 13 Riesgo relativo de desarrollar sepsis según criterios de Sepsis-3 en los pacientes estudiados	83
Tabla 14 Resumen de Variables clínicas que presentaron asociación estadística con los cada cluster en la prueba Kruskal-Wallis para la Cohorte Sepsis Colombia	86

## RESUMEN

La sepsis es considerada un problema de salud pública. La reprogramación celular es un proceso amnesia inmune involucrada en el desarrollo de sepsis con disfunción orgánica. Identificar la expresión génica de este fenómeno permite identificar estos pacientes.

Objetivo: Determinar la expresión de genes relacionados con reprogramación celular de los pacientes que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en el hospital Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva- Huila, entre los años 2017-2019.

Metodología: Cohorte prospectiva, controlada, ciega, parte de un estudio multicéntrico llevado a cabo por la universidad de British Columbia en Vancouver con participación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo.

Resultados: Se identificaron y seleccionaron los genes más variables (1130) y se agruparon 4 patrones de expresión génica por *cluster* para la cohorte de sepsis Colombia. Los genes expresados por cada ruta obtenida se agruparon según la vía dominante en: Señalización de interferón, señalización interleucina, cascada complemento/membrana extracelular y ciclo celular.

Conclusiones: El análisis transcriptómico preliminar de los pacientes de la cohorte de reprogramación celular para Colombia muestran patrones de señalización concordantes con los encontrados en cohortes independientes de pacientes con sepsis

Palabras claves. Sepsis; Diagnóstico; Reprogramación Celular; Transcriptoma, pacientes.

## SUMMARY

Sepsis is considered a public health problem. Cellular reprogramming is immune amnesia process involved in development of sepsis with organic dysfunction. Identifying the gene expression of this phenomenon allows identifying these patients.

**Aim:** To determine expression of genes related to cellular reprogramming of patients who have systemic inflammatory response syndrome and sepsis at the Hernando Moncaleano Perdomo hospital in the city of Neiva-Huila, 2017-2019.

**Methodology:** Prospective, controlled, blind cohort, part of a multicenter study carried out by the University of British Columbia in Vancouver with the participation of the Hernando Moncaleano Perdomo University Hospital.

**Results:** Most variable genes were selected (1130 genes). Gene expression of clusters were summarized into enriched pathways. Interferon signalling, Interleukin signalling, Complement Cascade/Extracellular Membrane, Cell cycle.

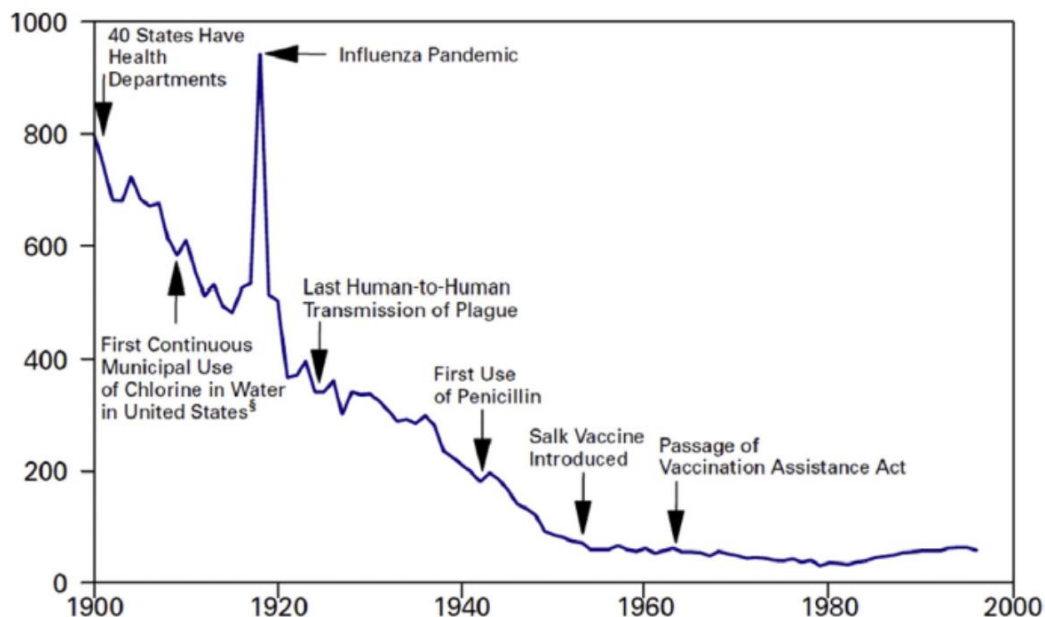
**Conclusions:** Preliminary transcriptomic analysis of patients in the cellular reprogramming cohort for Colombia show signalling patterns consistent with those found in independent cohorts of patients with sepsis.

**Key words.** Sepsis; diagnosis; cellular reprogramming; transcriptome, patients.

## INTRODUCCIÓN

La sepsis es considerada un problema de salud pública. Los datos internacionales han mostrado que esta contribuye a más de 5 millones de muertes al año y representa una alta carga de enfermedad (Martin, 2012; Reinhart et al., 2017). Aporta alrededor del 2% de todas las causas de hospitalización en los países desarrollados y del 6% al 30% en la unidad de cuidado intensivo (UCI), la sepsis severa se diagnostica alrededor de 70 por cada 100 personas, con una incidencia que ha variado dependiendo del momento histórico pero que en los estados unidos la tendencia es al aumento pasando de 83 a 240 por cada 100.000 personas desde 1979 al año 2000 (Ver grafica 1) (Martin, 2012; Martin, Mannino, Eaton, & Moss, 2003).

Grafica 1. Tasa cruda de muerte por enfermedades infecciosas.



**Grafica 1.** Tasa cruda de muerte por enfermedades infecciosas, en estados unidos 1900-1996. Achievements in public health, 1900-1999: control of infectious diseases. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999;48(29):621. **Disponible en:** <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>

La sepsis en la actualidad involucra diferentes mecanismos fisiológicos, patológicos y microbiológicos que aún no han sido aclarados en su totalidad y aunque se han realizado diferentes escenarios de consenso aún existen muchos vacíos en su

entendimiento, desde su evolución con la invención del microscopio y los postulados de Koch, permitió el entendimiento de la relación entre los microorganismos, el huésped y la infección asociada a su colonización ha tenido muchos avances, sin embargo su impacto en letalidad y en predicción de evolución a desenlaces clínicos fatales es aun sombría, no siendo muy alejado el escenario de los blancos terapéuticos para evitar su avance o respuesta inmune exagerada(Marshall, 2018).

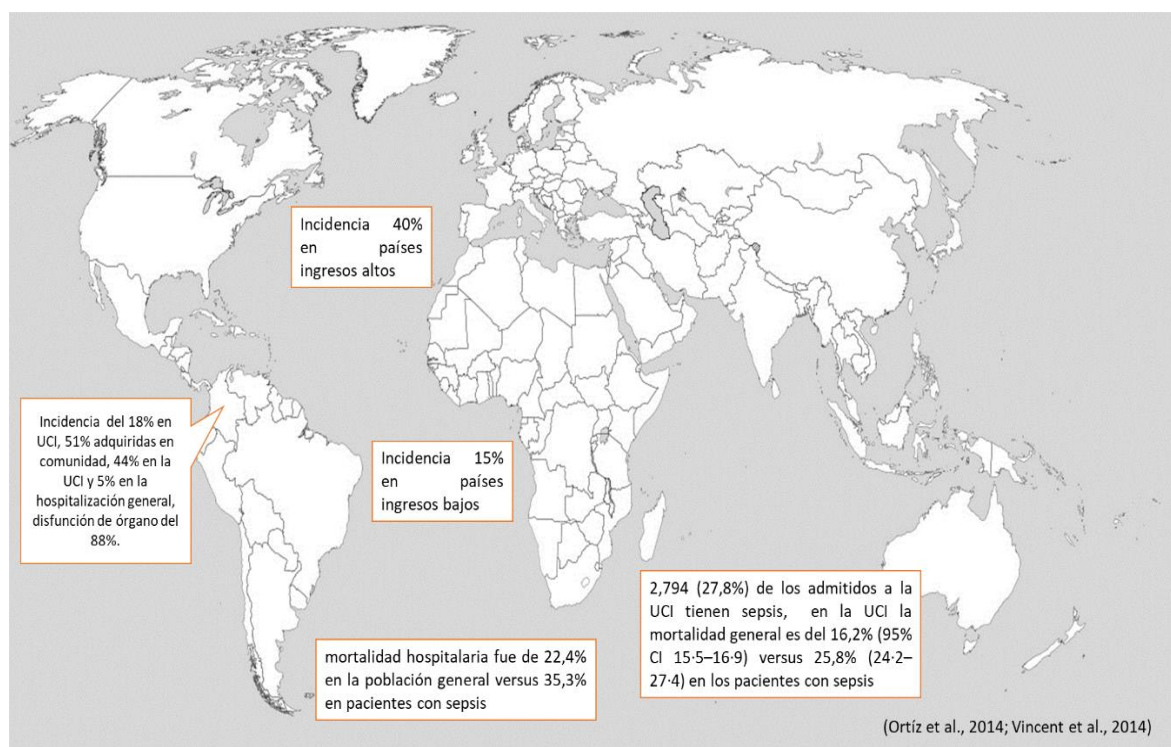
Aunque los avances incluyen nuevos antibióticos y vacunas, paquetes de manejo terapéutico y mejoría en el equipamiento y atención en las UCI, la mortalidad sigue estando alrededor del 30% (Pena et al., 2014; Rhodes et al., 2017). Aunque el aclaramiento de diferentes rutas fisiopatológicas ha creado la posibilidad de intervenirlas farmacológicamente los ensayos clínicos que han buscado esto no han tenido resultados concluyentes(Russell, Rush, & Boyd, 2018). Conllevando a un cambio en el foco de investigación, de los blancos terapéuticos al diagnóstico e identificación temprana de desenlaces adversos, no solo viendo la sepsis como una condición de hiperinflamación sino un proceso que involucra fases de inflamación y disfunción inmune, esta última con pocas investigaciones clínicas(Pena et al., 2014; Vincent & Grimaldi, 2018).

Una de las hipótesis planteadas y que se piensa desarrollar en este trabajo en población Colombiana, como replicación de estudios realizados por Peña y colaboradores en Canadá, busca identificar mediante modelos bioinformáticas de rutas de expresión génica previamente documentados, un fenómeno de reprogramación celular también conocido como tolerancia a endotoxina que se da de forma temprana en la sepsis, y que puede ser definido como una capacidad severamente reducida de respuesta celular durante la segunda exposición a endotoxinas y representa una amnesia inmune en reemplazo de una respuesta antiinflamatoria efectiva (Pena et al., 2014). Otros productos bacterianos pueden mostrar efectos de reprogramación celular similares. Sin embargo, a pesar de encontrar similitudes entre procesos de producción de citosinas, inducidos en modelos animales y pacientes con sepsis en fases tardías, aun no existe suficiente literatura que permita hacer una asociación robusta de estos procesos. Si se comprenden de forma más clara estas fases inflamatorias, inmunosupresoras incluyendo sus formas de identificación clínica se podrán sin duda mejorar en algún momento los desenlaces en sepsis (Pena et al., 2014).

## 1. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de sepsis en países de bajos ingresos es del 15% versus 29,7% de los países de altos ingresos, lo que puede ser explicado por un subregistro y un diagnóstico tardío (Martin et al., 2003). El estudio de carga de enfermedad hospitalaria mostro que la tasa de mortalidad hospitalaria fue de 22,4% en la población general versus 35,3% en pacientes con sepsis. 2,794 (27,8%) de los admitidos a la UCI tienen sepsis, en la UCI la mortalidad general es del 16,2% (95% CI 15.5–16.9) versus 25,8% (24.2–27.4) en los pacientes con sepsis (Tillmann & Wunsch, 2018; Vincent et al., 2014) (Ver grafica 2).

Grafica 2. Epidemiología general de la sepsis a nivel global y en Colombia. Diseñado por el autor basado en (Ortíz et al., 2014; Vincent et al., 2014).



En 2017 la Organización Mundial para la Salud OMS, adopto la resolución sobre la prevención, diagnóstico y manejo de la sepsis. Resaltando la necesidad de seguir desarrollando actividades en torno a esta condición clínica, promoviendo el uso de medidas para su prevención como el lavado de manos, agua potable, vacunación



entre otros, continuar los esfuerzos para el uso racional de antibióticos y el control de resistencia antimicrobiana, educar a los pacientes y entrenar al personal entorno al manejo hospitalario y en salud pública. Dentro de sus lineamiento resalta la promoción a investigaciones principalmente innovadoras en torno a la prevención, diagnóstico y tratamiento de la sepsis(Reinhart et al., 2017).

La sepsis se caracteriza por tener una fisiopatología compleja y fenotipos heterogéneos. En la actualidad no existe un estándar de oro para el diagnóstico o seguimiento de la sepsis, ninguna herramienta para seleccionar, evaluar y de-escalonar el tratamiento, y no hay una forma fiable de definir el perfil de riesgo para predecir desenlaces. Los biomarcadores pueden ser la clave para el avance de la medicina personalizada en los pacientes con sepsis y poder escoger de manera individual los mejores esquemas de manejo. Los biomarcadores son moléculas, genes u otras características clínicas que identifican un proceso fisiológico o patológico. En el ejercicio clínico los biomarcadores se convierten en herramientas fundamentales para la toma de decisiones y la interpretación del proceso fisiopatológico como sucede en sepsis con el lactato para evaluar hipoperfusión tisular, disfunción celular y estrés metabólico y con base en ello ajustar la terapia o intensificarla(Singer, 2013; van Engelen, Wiersinga, Scicluna, & van der Poll, 2018).

El biomarcador ideal debe ser fácil de hacer, tener alta sensibilidad y especificidad, debe ser procesado por sistema automatizados, tiempo de respuesta corto y de bajo costo (Singer, 2013; van Engelen et al., 2018). Sin embargo actualmente los biomarcadores para uso diagnostico en sepsis son poco útiles y la confirmación microbiológica puede tardar de horas a días según la tecnología de la cual se disponga en cada institución, lo que convencionalmente se refleja en un manejo empírico que se ha ya demostrado puede ser inapropiado, en un rango que va desde 30-50%, en aquellos en los que se logra realizar un aislamiento microbiológico, pero cerca del 50% de los paciente con sepsis no tienen un aislamiento que defina el agente causal de la sepsis, esto sumado a que se ha demostrado que la mortalidad por el manejo antibiótico inapropiado puede aumentar hasta un 8% por cada hora que transcurre(Rhee et al., 2016).

La fase de hiperinflamación en sepsis es seguida de una fase de inmunosupresión profunda, que se ha asociado con un fenómeno de reprogramación celular o tolerancia a endotoxina, las primeras descripciones se hicieron en modelos animales que eran sometidos a dosis bajas de endotoxina y que no mostraron una abolición de la fiebre como medida indirecta de inflamación después de varias dosis repetidas(Beeson, 1946). Posteriormente se confirmó el fenómeno, que previamente se describió, que sucede en neutrófilos y monocitos de paciente sépticos en fases tardías, que impide una respuesta inmune optima al igual que en pacientes sobrevivientes que quedan con la inmunidad afectada por varias

semanas(Biswas & Lopez-Collazo, 2009).

La reprogramación celular (RC) implica un efecto supresor inducido por la exposición a más de una dosis de moléculas microbianas. Estas moléculas que no son exclusivamente endotoxinas, en dosis única son potentes inductores de inflamación. Sin embargo como lo describió Beeson a dosis repetidas desencadenan fenómenos de tolerancia(Beeson, 1946). Estos fenómenos llevan a perfilar fenotipos de reprogramación celular en los paciente con sepsis que se caracterizan por: 1. la incapacidad de las células para responder a estímulos relacionados (amnesia inmune), 2. Tolerancia cruzada a otras moléculas características bacterianas y 3. Duración prolongada de las células reprogramadas(Biswas & Lopez-Collazo, 2009).

En esta fase de RC la capacidad de respuesta inmune es limitada y las infecciones asociadas a sepsis pueden ser más severas, sin embargo, no tenemos aún las herramientas clínicas para identificarlo. En esa línea de investigación Pena y colaboradores vienen investigando mediante transcripto mica los patrones y señales de RC identificados en monocitos de sangre periférica (*PBMC Siglas en inglés peripheral blood mononuclear cells*) de paciente expuestos con sospecha diagnóstica de sepsis, datos que han sido posteriormente replicados y han demostrado la utilidad de esta novedosa herramienta diagnóstica para predecir sepsis severa y choque séptico(Pena et al., 2014; Pena, Pistollic, Raj, Fjell, & Hancock, 2011; Zhang et al., 2010).

Es por esto que el *Center for Microbial and Immunity Research* en Vancouver Canadá en donde se han realizado los estudios por Pena, Hancock y colaboradores, buscan desarrollar una fase adicional de validación con una cohorte más grande, en un estudio internacional multicéntrico para el cual incluyeron el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva- Huila. Los resultados de este estudio tienen implicaciones fundamentales para el diagnóstico oportuno, tratamiento y pronóstico de los pacientes con sepsis(Pena et al., 2014; Pena et al., 2011).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sepsis es un síndrome clínico que resultado de una respuesta aguda del huésped a una amenaza. Esa respuesta es clínicamente heterogéneo y no susceptible de criterios diagnósticos simples; por el contrario, está influenciado por una serie de retos que exigen entender sus fases y procesos moleculares involucrados(Marshall, 2018).

Se han desarrollado esfuerzos milenarios para la comprensión contemporánea que tenemos del papel de la infección microbiana en la sepsis. Sin embargo estas definiciones ignoran el hecho de que el proceso biológico subyacente no es exclusivo de infección, sino que refleja una respuesta conservada al peligro en una variedad de formas o por lo contrario la incapacidad del mismo de responder a la amenaza de forma efectiva por fenómenos de reprogramación celular y bacteriana que estamos descubriendo(Marshall, 2018).

El proceso de definición requiere que se apliquen limitaciones arbitrarias impuestas por el hombre. Las definiciones médicas describen poblaciones de pacientes cuya trayectoria clínica es moldeado por un proceso común y quién podría, por lo tanto, beneficiarse de las intervenciones. La validación de una definición médica, sin embargo, requiere más que consenso: requiere que la definición informe de manera confiable uno o más tratamientos enfoques que se pueden demostrar que alteran los resultados clínicos, que convierte un síndrome a una enfermedad. La construcción evolutiva de la sepsis refleja este proceso, un proceso que permanece inconcluso, que ha a fecha excluye muchos procesos celulares y microbiológicos que estamos en proceso de dilucidar(Marshall, 2018).

Aunque la sepsis ha sido frecuentemente reducida a un proceso de hiperinflamación como respuesta a una noxa que puede ser infeccioso, la información actual indica que estos mecanismos son mucho más complejos e involucran procesos tanto inflamatorios como antiinflamatorios, de tal modo después de una fase corta de fenómenos pro-inflamatorio desenfrenados, un subgrupo importante de pacientes con sepsis inicia una fase de profunda inmunosupresión adquirida, lo cual está asociado con dificultades en la eficiencia de la erradicación de los agentes microbianos así se disponga de una terapia antibiótica efectiva, esto también sugiere una posible asociación con la reactivación de virus latentes (*cytomegalovirus* o *herpes simplex virus*) o infecciones nosocomiales como hongos que en huéspedes inmunocompetentes no son frecuentes, además de aumentar los desenlaces de mortalidad (Hotchkiss, Monneret, & Payen, 2013a, 2013b; Hotchkiss et al., 1999; Venet, Rimmelé, & Monneret, 2018).

Datos recientes han demostrado que la mayoría de los aspectos relacionados con las respuestas inmunes en los pacientes sépticos están modulados. Los neutrófilos pierden sus propiedades anti-infecciosas y cambian hacia un perfil inmaduro y funciones inmunosupresoras. Los monocitos y las células dendríticas pierden su capacidad de producir citosinas inflamatorias y presentar adecuadamente los antígenos a los linfocitos, debido a la pérdida de la expresión del complejo de histocompatibilidad clase II (por ejemplo, HLA-DR) Los pocos linfocitos efectores que sobreviven o un proceso apoptótico intenso después de la sepsis, presentan un fenotipo agotado (pérdida de las principales funciones efectoras: proliferación, producción de citosinas, y aumento de la expresión del receptor coinhibidor) mientras que las células T reguladoras y las células B las subpoblaciones se están expandiendo (Hotchkiss et al., 2013a, 2013b; Venet et al., 2018).

En Colombia las cifras de sepsis muestran una incidencia del 18% en las unidades de cuidado intensivo de 4 ciudades principales, de estos 51% fueron adquiridas en comunidad, 44% en la UCI y 5% en la hospitalización general, con una severidad al ingreso dada por disfunción de órgano del 88%, lo que refleja el impacto de morbilidad de esta, sumado a ellos la población afectada se encuentra entre los 18-44 años siendo esta etapa la más productiva lo que impacta de forma indirecta en la carga de enfermedad que representa esta condición(Arsanios et al., 2017; Ortíz et al., 2014) (Ver grafica 2).

En el Huila, las cifras disponibles registradas por la Secretaría de Salud Departamental en su boletín epidemiológico, se reportan los casos de mortalidad materna con 11 casos de defunciones por sepsis de origen no obstétrico y 9 de origen obstétricos, no hay reportes por causas de otra naturaleza, lo que pone de manifiesto la falta de incursión e investigación en materia de sepsis a nivel local, con especial atención en sus desencadenantes de distinto índole y sus implicaciones fisiopatológicas. Permitiendo dilucidar de algún modo la gravedad del asunto y determinar con base en los hallazgos, el impacto de la enfermedad en nuestro departamento y sus municipios.

El Hospital Universitario “Hernando Moncaleano Perdomo” de Neiva, es una institución de tercer nivel de complejidad que atiende a la población del Huila, sur del Tolima, Caquetá, parte del Amazonas, Putumayo y Sur del Cauca. Constituye una empresa social del estado (E.S.E) lo que le da una categoría especial de entidad pública. Es una institución que ofrece servicios de salud de mediana y alta complejidad. Cuenta con 30 camas de cuidado intensivo para adultos entre pacientes quirúrgicos, médicos, obstétricos y cardiovasculares, además de una sala de transición de paciente críticos en el servicio de urgencias, lo que permite desarrollar cualquier tipo de investigación en población críticamente enferma.

Reconociendo pues la inminente problemática que representa una entidad de tanto impacto como la sepsis y la urgencia que emana a partir de ello en torno a su eficaz y eficiente abordaje. Se plantea entonces el problema:

¿Cuál es el perfil de expresión de genes relacionados con la reprogramación celular de los pacientes que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en un hospital de referencia en Colombia?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de genes relacionados con reprogramación celular de los pacientes que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en el hospital Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva- Huila, entre el año 2017-2019.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir las características sociodemográficas de los pacientes.

Clasificar según rutas fisiopatológicas los principales genes expresados, relacionados con la reprogramación celular.

Determinar las principales variables clínicas relacionadas con los endotipos génicos identificados.

Identificar los pacientes que cumplan criterios para sepsis según la definición Sepsis-3 con diagnóstico inicial de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica del hospital Hernando Moncaleano Perdomo.

#### 4. ANTECEDENTES

El reconocimiento de las infecciones como una patología transmisible producto de la invasión de microorganismos en el tejido sano requirió de múltiples avances científicos en el siglo 19. La interacción entre los microbios y los sistemas multicelulares han dado forma al sistema inmune del huésped y estas interacciones han quedado tanto en el genoma microbiano como de los huéspedes. La consecuencia de este proceso de alta complejidad es la prevalencia en el vacío del conocimiento de esta interacción y el impacto actual en mortalidad de los procesos infecciosos graves que puede alcanzar el 40% según la severidad (Majano, 1991).

Los egipcios fueron los primeros en articular un constructor de sepsis. En el papiro de Ebers (1500 A.C), ellos creían que la enfermedad era producto de una fuerza diseñada como whdw pronunciada como “ukhedu” originada en el intestino y que en ciertas circunstancias podía pasar al cuerpo y producir enfermedades, cuyas manifestaciones incluían la purulencia y la fiebre (Majano, 1991).

La palabra sepsis es de origen griego, aparece inicialmente en las epopeyas de Homero y hace referencia a la carne en descomposición. A Hipócrates (460-470 A.C) generalmente se le atribuye la primera definición de sepsis, el postulo que los seres vivos mueren y se descomponen a través de 1 de 2 procesos. La sepsis fue el proceso de muerte y descomposición asociado con la enfermedad, putrefacción y mal olor; la sepsis, por otro lado fue la descomposición que resulto del bienestar, ejemplificado como el proceso de digestión de los alimentos o la fermentación de la uvas en la generación de vino (Geroulanos & Douka, 2006).

Aulus Cornelius Celsus (25 A.C - 50 D.C) propuso que las manifestaciones cardinales de la inflamación eran el rubor, calor, dolor y tumor a lo cual Galeno de Pergamon adiciono un quinto hallazgo *functio laesa* que hace referencia a la pérdida de la función. Estas características clínicas descritas hace tanto tiempo aún siguen formando parte de las descripciones clínicas de los procesos infecciosos locales y de estas también se inflamación sistémica dada por fiebre, vasodilatación, alteración del estado mental, fuga capilar y disfunción orgánica. Infección y germen como teoría de la enfermedad (Geroulanos & Douka, 2006).

Aunque la vida microscópica fue descrita por van Leeuwenhoek en 1676 después de la invención del microscopio, no fue hasta el siglo XIX, que, por descubrimientos de científicos como Pasteur, Semmelweis y Koch que el concepto de generación espontánea se hiciera a un lado para dar paso a microorganismos como vectores de las enfermedades infecciosas. Robert Koch con los postulados que llevan su

epónimo estableció los criterios para demostrar la transmisibilidad e infectividad (Control & Prevention, 1999).

Esta señal revolucionaria transformo la humanidad dando apertura a un sin número de nuevas estrategias de control infeccioso como el lavado de manos, cloración del agua, pasteurización, inmunización y un espectro de medidas de salud pública lo que se vio reflejado en una disminución de más de 10 veces la mortalidad por enfermedades infecciosas (Control & Prevention, 1999). Aunque el desarrollo de antibiótico disminuyo de forma significativa la morbimortalidad por enfermedades infecciosas la letalidad y prevalencia no disminuyo por lo contrario genero una alteración en la microbiología desplazando especies aisladas en medios exógenos a medios endógenos (Rogers, 1959).

#### 4.1 SEPSIS Y RESPUESTA DEL HUÉSPED

Pfeiffer en el siglo 19 demostró que en las enfermedades infecciosas no se requería solo de la viabilidad y replicación del microorganismo si no que existía algún mecanismo intrínseco toxico que era responsable del síndrome. En 1946 Paul Beeson encontró que, al inyectar diariamente la vacuna contra el tifo en conejos, prontamente se detenía la fiebre. (Rietschel & Cavaillon, 2002).

Estudios posteriores por Freudenberg y Galanos en 1988 confirmaron que el sistema inmune de los humanos aprende a tolerar la exposición a una molécula bacteriana encontrada la membrana bacteriana que fue llamada lipopolisacarido LPS y que es ampliamente prevalente en el medio ambiente, fenómeno llamado tolerancia a endotoxina (Arnold, 2018; Beeson, 1946; Freudenberg & Galanos, 1988).

El desarrollo posterior de estudios entorno a este LPS permitió desarrollar nuevos blancos terapéuticos de antibióticos, sin embargo, la toxina no era suficiente para explicar la evolución clínica de la sepsis. Estudios por Coley finalizando el siglo 19 y varios a mediados del siglo 20 sugerían que el huésped tenía una respuesta adicional a los microorganismos (Wiemann & Starnes, 1994).

Coley demostró que un extracto bacteriano de estreptococos inoculado en un tejido podría inducir muerte del tejido tumoral, Carswell y colaboradores demostraron que el factor que generaba este fenómeno era una proteína derivada del huésped el cual denominaron factor de necrosis tumoral (FNT) (Carswell et al., 1975). En modelos experimentales desarrollados en 1950 mostro que en un factor derivado de los



macrófagos generaba fiebre en un modelo experimental animal, proteína que denominaron interleucina 1 (Atkins & Wood, 1955).

Una mutación genética aleatoria en una cepa de ratón endogámica: la C3h HeN: había resultado en una cepa separada, la cepa C3h HeJ, que era resistente a endotoxina. Michalek y colaboradores irradiaron ratones de ambas cepas para eliminar su médula ósea nativa, luego trasplantaron estos ratones irradiados con médula ósea de la cepa opuesta. Cuando sometieron estos ratones a endotoxina solo la cepa C3h HeN fue letal a la endotoxina a diferencia de los ratones C3h HeJ que mostraron una inmunidad celular innata por una mutación en un receptor de superficie celular al cual denominaron Toll Like Receptor 4 (TLR) (Michalek, Moore, McGhee, Rosenstreich, & Mergenhagen, 1980).

Sobre 1970 Schumer planteo un ensayo clínico en el cual el uso de metilprednisolona en fase crítica de las infecciones modulaba la respuesta inflamatoria mostrando una reducción de la mortalidad de 39% a 11%; Sin embargo tiempo después Roger Bone y colaboradores quisieron reproducir estos datos en paciente con sepsis y choque séptico, lo que genero la necesidad de estandarizar criterios diagnósticos para poder reclutar más paciente lo que denominaron síndrome séptico, en ausencia de datos previos robustos llegaron a consenso que se debía tener una sospecha clínica infecciosa sumada a una respuesta inflamatoria sistémica, sin embargo este ensayo clínico fallo en demostrar la utilidad de los esteroides pero abrió un camino para estandarizar criterios diagnósticos que fueron usados en múltiples ensayos clínicos posteriormente (Marshall, 2014; Schumer, 1976).

Estos fenómenos de modulación inmune confirmados in-vitro, pero sin efectividad en los ensayos clínicos, siempre se habían comportado como una rueda suelta en el entendimiento de la fisiopatología de la ruta molecular de la sepsis y que el paradigma dominante consideraba como un fenómeno hiperinflamatorio. Tan solo fue para 1999 que un joven investigador identifico un proceso que generó controversia pero que actualmente es el paradigma dominante en sepsis, al realizar necropsias de ratas muertas por sepsis, noto que un amplio número de linfocitos morían por apoptosis, lo cual confirmo también en paciente humanos que fallecían por sepsis, lo que incluyo el hecho de un fenómeno de inmunosupresión en sepsis asociado con mayor mortalidad (Arnold, 2018; Hotchkiss et al., 2013a, 2013b; Hotchkiss et al., 1999).

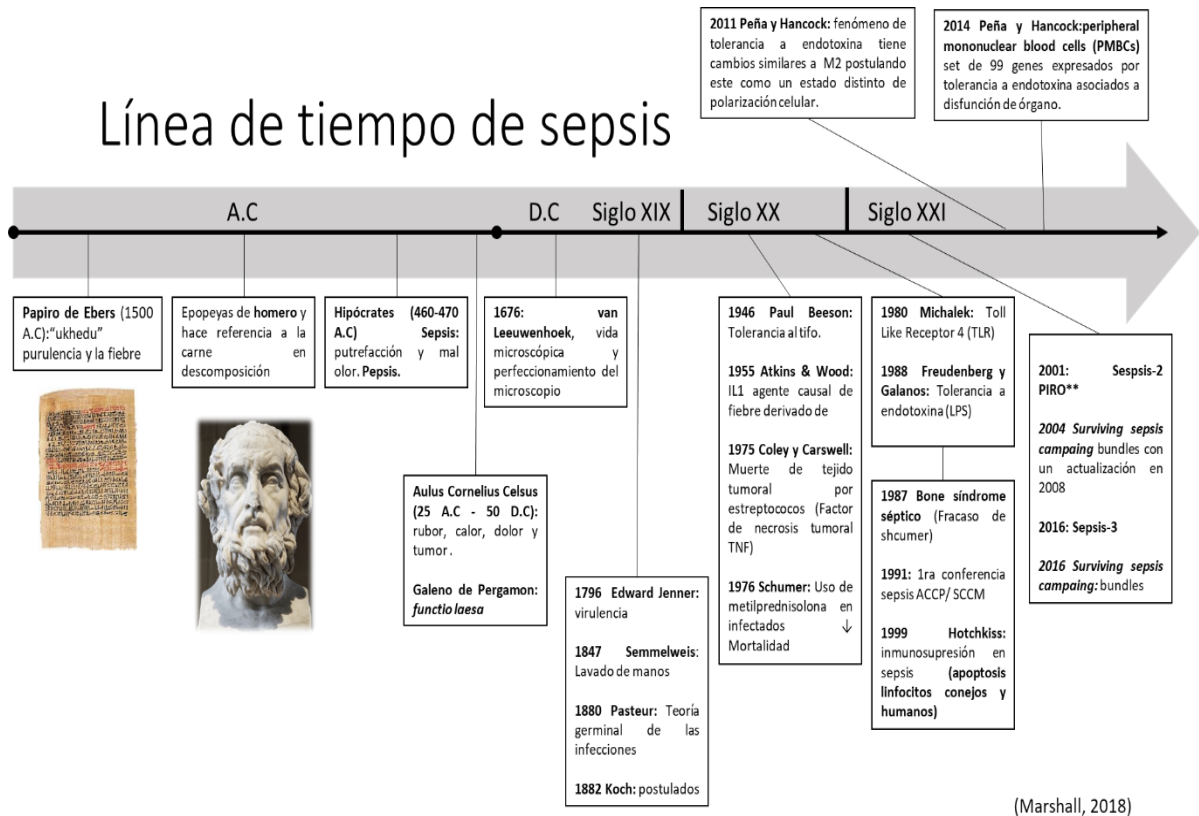
La necesidad de tipificar la expresión génica de los pacientes con sepsis en múltiples estudios llevo a Peña y colaboradores a analizar la expresión génica de monocitos y linfocitos de células periféricas conocidas como peripheral

mononuclear blood cells (PMBCs) e identificar un set de 99 genes expresados por tolerancia a endotoxina, en 583 pacientes de 11 estudios de pacientes sépticos. Posteriormente realizaron un estudio en 72 paciente sépticos en Canadá, identificando los mismos genes de expresión y además asociando la identificación de los mismos a disfunción orgánica(Pena et al., 2014; Pena et al., 2011).

Consecutivamente se han identificado más de 130 moléculas endógenas que se expresan como mecanismos de modulación a la exposición a endotoxina, lo que representa en la actualidad múltiples blancos terapéuticos y de patrones de expresiones génica y proteica frente a la infección (Marshall, 2018).

En el escenario clínico las controversias son aún mayores ya que los médicos tratantes han fundamentado en sus experiencias clínicas locales el diagnostico de sepsis y el manejo, buscando mitigar eso a través de la historia se han promovido diferentes consensos que a pesar del avance en el entendimiento de la fisiopatología de la sepsis sigue teniendo estrategias diagnósticas, terapéuticas y diagnosticas muy limitadas (Arsanios et al., 2017; Lyle, Pena, Boyd, & Hancock, 2014; Marshall, 2018).

Figura 1. Línea de tiempo de la sepsis hasta la época moderna.



Fuente: Diseñado por el autor. Basado en texto (Marshall, 2018)

## 4.2 CONFERENCIA SOBRE SEPSIS 1991

Sobre el año 1991 la AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE realizan la primera conferencia sobre sepsis realizada en Chicago que buscaba un consenso en la definición, debido a la inconformidad con los usos de forma arbitraria previamente, la conferencia definió inicialmente la infección como la invasión de microorganismos o tejidos en su mayoría estériles y la sepsis como la respuesta sistémica a esta invasión sin embargo la evolución de la misma podía ser hacia la mejoría o hacia el deterioro clínico, para direccionar esta condición se acuñó el término sepsis severa que incluía sepsis asociado a disfunción de órgano y finalmente el término choque séptico hacía referencia a aquellos paciente con hipotensión e hipoxemia tisular, abandonando el concepto ambiguo de septicemia (Bone et al., 1987). Otra

consecuencia de esta conferencia fue el reconocimiento de la respuesta inflamatoria sistémica a otros procesos no infecciosos como trauma, quemaduras o pancreatitis, este nuevo concepto se estandarizó como síndrome de respuesta inflamatoria SRIS definido como un cuadro clínico de inflamación sistémica independiente de su causa, luego entonces la sepsis se definió como la respuesta inflamatoria del huésped a un agente infeccioso dejando claro que cada evento puede desarrollarse de forma independiente, es importante aclarar que los criterios que ahora conocemos de SRIS no fueron definidos en esa conferencia si no después producto de la necesidad de poder estandarizar criterios para el desarrollo de ensayos clínicos, estos fueron promulgados sin datos robustos previos, no fue sorprendente que posteriormente esto mostrara un valor predictivo alto de mortalidad ya que incluye 4 de las 12 variables de un puntaje ya validado el APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II.

Esta conferencia también propuso el término síndrome de disfunción orgánica múltiple (sus siglas en inglés MODS) para hacer referencia al avance de la sepsis que compromete 2 sistemas vitales que puede o no ser reversibles. Posteriormente se han desarrollado otras 2 conferencias una en 2001 y la última en 2016 denominada sepsis-3 en las cuales se ha replanteado la definición de sepsis que se desarrollaran en otra sección del texto (Bone et al., 1987).

Como parte fundamental de los avances de la segunda conferencia de 2001 en la cual no se cambiaron las definiciones pero si un sistema de estratificación nuevo para sepsis el modelo PIRO de sus siglas en inglés que significan (Predisposición, Insulto, respuesta y disfunción de órgano) este modelo toma del sistema de estratificación TNM usado en oncología permitió un abordaje multidisciplinario de la sepsis guiando un manejo multimodal, este modelo permitió avanzar en conceptos no abordados de la sepsis como la respuesta celular con reprogramación génica y cambio en la expresión proteica frente a la infección y los mecanismos involucrados en la expansión de la respuesta inmune, aunque el PIRO no es un modelo pronóstico, ni su objetivo era impactar en la supervivencia, ayuda más bien a predecir la potencial respuesta a nuevas intervenciones (Marshall, 2018).

Tabla 1. Modelo predisposición, insulto, respuesta, disfunción de órgano.

DOMINIO	PRESENTE	FUTURO
Predisposición	Comorbilidades que reducen sobrevida. Creencias culturales o religiosas, edad, género.	Polimorfismos genéticos en componentes de respuesta inflamatoria (p. ej., TIR, TNF, IL-1, CD14); comprensión mejorada de interacciones específicas entre patógenos y enfermedades del huésped.
Noxa infecciosa	Cultivo y sensibilidad de patógenos infecciosos; detección de enfermedades susceptibles de control de fuente.	Ensayo de productos microbianos (LPS, manano, ADN bacteriano); perfiles de transcripción génica
Respuesta	SRIS, PCR, Choque	Marcadores inespecíficos de activación inflamatoria (p. ej., PCT o IL-6) o alteración de la capacidad de respuesta del huésped (p. ej. HLA-DR); detección específica del objetivo de terapia (p. ej., proteína C, TNF, PAF).
Disfunción de órgano	Disfunción de órganos documentada o puntaje compuesto (SOFA)	Medidas dinámicas de respuesta celular a la noxa: apoptosis, hipoxia celular, Estrés celular.

\*\*Abreviaturas: PCR: proteína C reactiva; HLA human leukocyte antigen-DR; IL interleucina; PAF, platelet-activating factor; PCT, procalcitonin

Fuente: Adaptado de: Marshall, John C. "Sepsis definitions: a work in progress." *Critical care clinics* 34.1 (2018): 1-14.

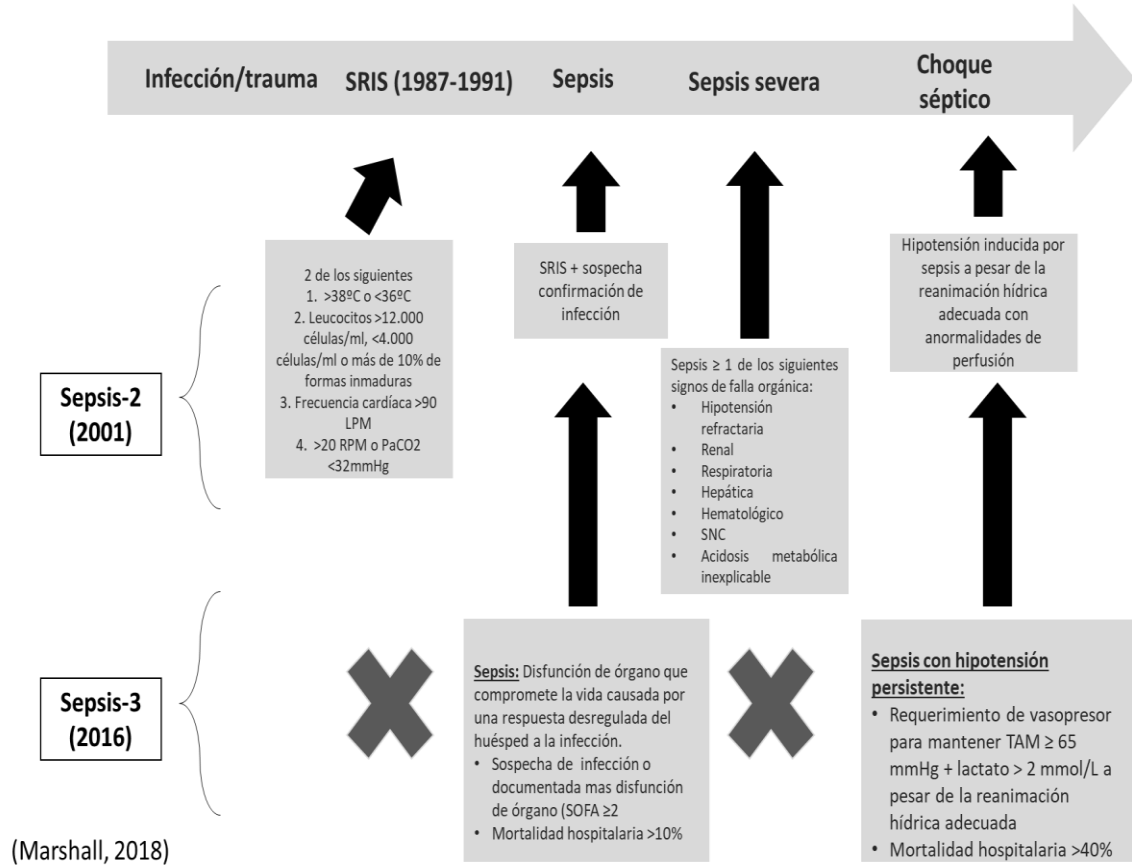
## 5. MARCO TEORICO

### 5.1 MARCO CONCEPTUAL SEPSIS

La primera definición en 1991 con una actualización en 2001 que simplemente adicione una lista de signos y síntomas producto de experiencia clínica. La definición inicial de sepsis era: SRIS mas sospecha de foco infeccioso, sepsis severa: sepsis más daño de órgano, choque séptico: sepsis más hipotensión que no mejora con adecuada reanimación hídrica. Posteriormente mediante un consenso de 19 expertos de la SCCM y la ESICM usando el método Delphi se desarrolló sepsis-3, donde sepsis se define como la disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a una infección. SOFA > 2 (como medida aproximada de disfunción orgánica) más sospecha o documentación de infección (Ver tabla 2).

5.1.1 Choque séptico definición. Subgrupo de paciente con sepsis en los que el compromiso circulatorio, metabólico y celular aumentan sustancialmente la mortalidad. La definición operativa de choque es todo paciente que requiere soporte vas opresor para mantener TAM >65 + lactato > 2 mmol / L (18 mg / dL) a pesar de la reanimación hídrica adecuada. Estos cambios en la definición producto del consenso por el método Delphi mostro que la prevalencia de choque séptico en la base de datos de surviving sepsis de los pacientes que cumplían estos criterios era del 45,2%(8520) con mortalidad del 42,3% versus 21,2% (3985) con mortalidad del 30,1% para los de sepsis-2 sin incluir el lactato. Sin embargo, el valor del lactato se ha discutido en otros estudios en donde usaron criterios sepsis-3 pero un valor de lactato mayor de 6 fue el valor asociado con mayor mortalidad en este grupo.

Figura 2. Evolución de las definiciones de sepsis según las conferencias sepsis de 1991 a sepsis-3.



Fuente: Diseñado por el autor, basado de texto (Marshall, 2018)

Tabla 2. Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (SOFA) Score

SISTEMA	PUNTAJE				
	0	1	2	3	4
Respiración					
<i>Pao2/Fio2, mmHg</i>	≥400	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 con soporte respiratorio	<100 con soporte respiratorio
Coagulación					
<i>Plaquetas</i>	≥150	<150	<100	<50	<20
Hígado					
Bilirrubina total mg/dL	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12
Cardiovascular	TAM ≥70	TAM <70	Dopamina <5 o dobutamina (cualquier dosis)	Dopamina 5.1–15 o epinefrina ≤ 0.1 o norepinefrina ≤ 0.1	Dopamina >15 o epinefrina >0.1 o norepinefrina >0.1
Sistema nervioso central					
<i>Puntaje de glasgow</i>	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9	>5.0
Gasto urinario mL/d				<500	<200

Fio2 = fracción inspirada de oxígeno; TAM= tensión arterial media; Pao2 = presión parcial de oxígeno. \*Catecolaminas dosis en ug/kg/min por al menos 1 hora.

## 5.2 SRIS vs SOFA vs qSOFA

Un estudio retrospectivo en Nueva Zelanda ANZICS en 109,663 paciente con sepsis severa y disfunción orgánica múltiple mostro que solo 87,9% cumplían 2 o más criterios e SRIS y 12,1% no, es decir usando SRIS como criterio diagnostico se pierde 1 de cada 8 pacientes con sepsis severa, sin embargo, la mortalidad aumenta 13% de manera lineal con cada criterio adicional después de cumplir mínimo 2. Es decir, usar solo SRIS para el diagnóstico de sepsis severa no tiene buena sensibilidad ni especificidad en la UCI. Un análisis subsecuente con los criterios sepsis-3, comparo SRIS, SOFA, LODS y qSOFA (2 o más criterios tiene la capacidad de identificar pacientes con mal pronóstico). En pacientes no UCI con sospecha de infección se encontró que qSOFA tiene un valor predictivo de



mortalidad intrahospitalaria mejor (AUCROC 0.81) mayor que SOFA (AUCROC 0.79) y SRIS (AUCROC 0.76) en contraste en la UCI el valor predictivo de mortalidad fue menor para qSOFA (AUCROC 0.66) y SRIS (AUCROC 0.64) comparado con SOFA (AUCROC 0.74).

En el estudio ANZICS se encontró que la mortalidad intrahospitalaria en paciente con sospecha de sepsis ingresados a la UCI, según el score usado fue de 90,1% para SOFA, 86,7% SRIS y 54,4% para qSOFA, SOFA (AUROC 0.753), SRIS (AUROC 0.589) y el de qSOFA score (AUROC 0.607). En otros estudios en los que se ha evaluado la sensibilidad y especificidad de qSOFA en pacientes no UCI se encontró un rendimiento que inclusive no lo recomienda, en 30,677 pacientes en la sala de emergencias y observación en Chicago se evaluó su utilidad para mortalidad y traslado a UCI, SRIS tuvo un SE y ES 91%-13% y qSOFA 59-70%. En contraste en Europa una cohorte incluyó 879 con sospecha de sepsis con una mortalidad global baja del 8% mostrando que qSOFA es mejor que SRIS y SOFA en predecir mortalidad intrahospitalaria (AUROC 0.8 qSOFA vs. 0.77 SOFA 0.65 SRIS), con sensibilidades muy bajas para qSOFA y SOFA frente a SRIS (qSOFA 70%, SOFA 73% vs. SIRS 93%), y especificidad muy baja para SRIS (qSOFA 79%, SOFA 70%, SIRS 27%). Por tanto, actualmente el uso de uno u otro score de tamizaje dependen de lo que más requiera en ese momento sensibilidad o especificidad.

No todas las sociedades usan SEPSIS-3 por ejemplo IDSA, ACCP, *Latin American Sepsis Institute*, AC emergency. *Surviving sepsis campaign* se lanzó inicialmente en 2004 con una actualización en 2008 y 2012 (los cambios giran en torno al uso de esteroides, proteína C activada, y dosis de LEV) la adherencia a nivel internacional es baja, en un estudio en 62 países con 1794 pacientes solo 19 % se adhirió al *bundle* a las 3 horas y 36% a las 6 horas, sin embargo, su adherencia mostró una reducción del 40% en la 1 hora y del 36% en la segunda hora de mortalidad.

En 2016 se publicó un nuevo *bundle* que hace énfasis en el inicio temprano de antibiótico < 1 hora, retirando la resucitación guiada por metas, medidas por CVC, normalización del lactato y ScVO<sub>2</sub> en 6 horas, e incluyendo la evaluación continua de la reanimación hídrica y perfusión tisular, con ultrasonido, respuesta al volumen con elevación pasiva de las piernas o reto hídrico, reconociendo además la necesidad de personalizar el manejo según el perfil de comorbilidad y respuesta de los pacientes, ejemplo un paciente con patologías que no se benefician de la reanimación hídrica exhaustiva no se debe dar a 30ml, seguramente se beneficiaría más de inotropia o vasopresores.

En un estudio de 28,150 pacientes con sepsis severa y choque séptico, la mortalidad hospitalaria fue de 19,7% y el principal factor de riesgo asociado a esta

fue el inicio tardío del antibiótico. La recomendación de vasopresor inicial es norepinefrina, seguida de vasopresina y adrenalina como alternativas, los esteroides deben ser considerados en el paciente con choque refractario a la reanimación óptima.

Tabla 3. Predicción de mortalidad intrahospitalaria entre pacientes con posible infección extra-hospitalaria

Prueba	Curva AUROC	Sensibilidad para mortalidad	Especificidad por mortalidad
SIRS $\geq 2$	0.76	64%	65%
SOFA $\geq 2$	0.79	68%	67%
qSOFA $\geq 2$	0.81	55%	84%

AUROC= area under the receiver operating curve; SRIS = Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SOFA = Sequential Organ Failure Assessment score; qSOFA = quick Sequential Organ Failure Assessment score.

### 5.3 META DE TENSIÓN ARTERIAL MEDIA (TAM)

Se realizó un ensayo clínico en el que se comparó la reanimación guiada por metas a las 6 horas versus la estrategia usual mostrando una reducción de la mortalidad intrahospitalaria de 46,5 a 30,5 %, sin embargo 3 ensayos multicéntricos realizados en diferentes países no mostraron beneficio de esta estrategia (*Protocolized Care for Early Septic Shock ProCESS* estados unidos, *Australasian Resuscitation in Sepsis Evaluation ARISE* Australia, and *Protocolized Management in Sepsis ProMISE* reino unido). Un posterior meta análisis de los 3 que incluyó 3723 mostró una mortalidad a 90 días similar entre las dos estrategias 24,9% vs 25,4%, un análisis de subgrupo de los pacientes más complicados no mostró diferencias en mortalidad no se asoció con mejoría en la supervivencia y sí con aumento de días en UCI, costos y requerimiento de soporte cardiovascular. Hemotransfusión: cambio la meta de 10 a 7 en la población general, se dejó solo la necesidad de llevar a 10 en los pacientes con IAM, hipoxemia severa o hemorragia aguda) estos cambios son producto de los resultados del estudio *Transfusion Requirements in Septic Shock (TRISS)* que comparó la meta de 7 a 9 sin encontrar diferencias significativas en los pacientes con choque séptico en UCI con respecto a desenlaces como eventos isquémicos o requerimiento de soporte vital. El metaanálisis de los 3 ensayos antes mencionados mostró que inclusive hasta un valor de 10 no hay mejoría.

#### 5.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

Como se describió previamente la correlación infecciosa de la sepsis es un principio en el cual se ha avanzado notoriamente, sin embargo el entendimiento de la respuesta tanto del huésped como del agente infeccioso y sus interacciones sigue evolucionado con el advenimiento de las ómicas y el genoma humano(Lyle et al., 2014).

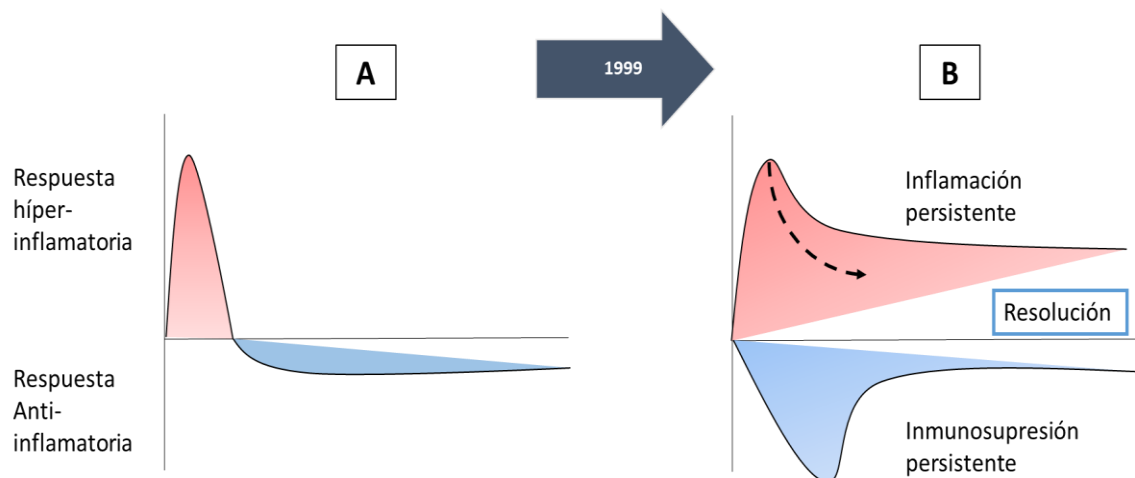
Se tiene común acuerdo en que el proceso inflamatorio agresivo se desencadena como parte de la respuesta innata al reconocimiento de moléculas de señalización bacteriana PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (por receptores de conocimiento de patrones PRRs (De sus siglas en ingles *pattern-recognition receptors*) como lo receptores tipo Toll (TLRs) los cuales son cruciales en los estados tempranos de sepsis. En condiciones de sepsis severas, el proceso inflamatorio se prolonga y se hace más intenso, dando como resultado un aumento un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) acompañado de una respuesta fisiológica adicional e insuficiencia llevando a disfunción de órgano posteriormente con un ciclo inflamatorio y coagulopático que lleva a la muerte(Lyle et al., 2014).

Hace algunos años se consideraba que el daño de órgano era producto de una respuesta inicial hiperinflamatoria seguida por un fenómeno de inmunosupresión profundo en el que predominaban las vías de señalización inmunosupresora y una regulación al alta con estabilización de los mediadores antiinflamatorios. Sin embargo, este paradigma ha sido puesto en duda basado en los análisis transcriptómicos de pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica no infecciosa (trauma y quemadura) frente a un modelo humano de endotoxemia. Estos análisis mostraron una respuesta temprana común al daño severo en el cual una respuesta inmune innata ocurre de forma simultánea con la respuesta inmune antiinflamatoria, así como la supresión de los genes implicados en la inmunidad adaptativa. Estudios postmortem han mostrado que el proceso dominante al momento de la muerte fue la inmunosupresión. Análisis de tejidos de pulmón y bazo identificaron una marcada apoptosis linfocítica, regulación a la alta de receptores celulares inhibitorios (PD-1), regulación a la baja de marcadores de activación celular (HLA-DR) y disminución de la producción de citoquina pro y antiinflamatorias (TNF-alfa, interferon-gamma e IL-10); Aunque el tiempo exacto de aparición de estos eventos con respecto a la sepsis aún no está claro, se ha postulado que el balance entre estos eventos proinflamatorios y de inmunosupresión puede ser el principal factor pronóstico de los desenlaces duros en sepsis. Un proceso postulado como parte de la explicación de estos fenómenos de los cuales se viene dilucidando cuales son los marcadores de expresión génica predominante es conocido como tolerancia a endotoxina o reprogramación celular, del cual se hablara a más

adelante(Lyle et al., 2014).

La incapacidad para reestablecer la homeostasis entre el proceso dinámico inflamatorio e inmunosupresión es el centro del paradigma actual del entendimiento de la sepsis y su entendimiento y la personalización de la respuesta del huésped permitirá mejorar la utilidad de las terapias(Hotchkiss et al., 2013a; van der Poll, van de Veerdonk, Scicluna, & Netea, 2017).

Figura 3. Cambio del paradigma del entendimiento fisiopatológico de la sepsis. Diseñado por el autor, adaptado de (Lyle et al., 2014)



Como se describió previamente la interacción entre los PAMPs y los PRRs desencadena un proceso de respuesta a la noxa que conocemos de forma muy limitada y que desde el punto de vista clínico en su mayoría se ha estudiado en el momento de admisión a la UCI lo que los ubica en una fase avanzada de la sepsis, sin datos importantes de reconocimiento clínico previo a la sepsis severa. Las alarminas: damage-associated molecular patterns (DAMPs) que son parte inicial de la activación de PAMPs se aumentan provocando un círculo vicioso que involucra la activación inmune y la disfunción orgánica, este fenómeno estudiado en los pacientes críticamente enfermos que sobreviven a la sepsis es conocido como síndrome de inflamación, inmunosupresión y catabolismo persistente (PICS)(van der Poll et al., 2017).

## 5.6 INFLAMACIÓN EXCESIVA EN SEPSIS (Figura 4)

5.6.1 Iniciación de la inflamación. La activación del sistema inmune es mediada por la interacción entre PAMPs y DAMPs con los PRR la cual puede ser muy diversa y desencadenada por agentes microbianos y no infecciosos. La translocación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dentro del núcleo y la subsecuente activación de genes diana, incluyendo aquellos que codifican citoquinas son cruciales para la inducción de la inflamación. La citoquina pro-inflamatoria involucradas en la patogénesis incluyen el TNF, interleucina 1B, IL-12, e IL-18, en modelos animales bloqueando estos sistemas se confiere protección para infecciones bacterianas fulminantes. Estos hallazgos en modelos animales y sus implicaciones clínicas han sido producto de debate, sin embargo la mortalidad temprana en sepsis, se ha correlacionado con colapso cardiovascular y disfunción orgánica múltiple, lo que se ha planteado es producto de esta fase inflamatoria que involucra varios procesos, activación del complemento, sistemas de coagulación y endotelio, cuyas funciones están estrechamente interconectados y con regulación cruzada (van der Poll et al., 2017).

5.6.2 Activación del complemento. Resulta de la liberación de pequeños fragmentos conocidos como anafilatoxinas, particularmente C3a y C5a, los cuales tienen un potente efecto pro-inflamatorio, que incluye el reclutamiento y activación de leucocitos, células endoteliales y plaquetas. Aunque la activación del complemento es un proceso esencial de la inmunidad protectora, una activación incontrolada lleva a daño tisular y falla orgánica. En modelos experimentales animales con babuinos y ratas, de sepsis abdominal polimicrobiana e inducida por *escherichia coli*, el bloqueo de la señalización de C5a mejora los desenlaces. Compstatin un inhibidor sintético de la covalentasa de C3 en modelos con sepsis por e. coli en babuinos no solo modula la activación del complemento, también atenuó otros fenómenos inflamatorios como la activación de la coagulación y la disfunción orgánica múltiple. Los receptores para C3a y C5a pueden tener roles diferente en la sepsis, tal como lo mostro un estudio en el que al suministraron un antagonista del receptor C5a con sepsis polimicrobiana con mejoría en la sobrevida, sin embargo la administración de un antagonista del receptor C3a disminuye la sobrevida (van der Poll et al., 2017).

5.6.3 Coagulación y activación de células endoteliales. La interacción huésped-patógeno induce la activación de la coagulación como mecanismo de defensa inmune, el termino inmutrombosis, hace referencia a la co-dependencia de la coagulación y la inmunidad innata. La sepsis se asocia con una fuerte activación del sistema de coagulación, la cuales clínicamente se asocian con trombosis microvascular y hemorragia y en fases avanzadas consumo de factores de coagulación y plaquetas. El factor tisular es el principal activador de la coagulación en sepsis, su inhibición en modelos experimentales en humanos y primates ha mostrado una atenuación fuerte de la activación de la cascada de la coagulación

después de infusiones de endotoxina o bacterias. En adición la inhibición del factor tisular previene la disfunción orgánica y la mortalidad en modelos de letalidad en babuinos. La correlación entre la atenuación de la cascada y la modulación inmune aun no es claro, pero se han asociado factores como Vlla Y Xa, trombina y fibrina con activación de señales inflamatorias celulares por la vía de receptores activadores de proteasas *protease-activated receptors (PARs)*, el entendimiento de estas rutas se ha demostrado en estudios in-vivo que al disminuir la potencia de la proteína C activada en modelos subletales se evoluciona a estadios letales de la enfermedad con coagulación intravascular diseminada. A parte de su efecto anticoagulante la proteína C activada, puede ejercer efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos, vasculoprotectores sobre el endotelio a través de la ruta de PAR1. Sin embargo los ensayos clínicos con esta y otras moléculas como inhibidor del factor tisular recombinante y antitrombina han fracasado (van der Poll et al., 2017).

5.6.4 Trampas extracelulares de neutrófilos. (NETs) La inflamación endotelial y la coagulación están aumentadas por la liberación de las NETs las cuales consisten en neutrófilos, ADN y proteasas de histonas y serina. La liberación de estas trampas no siempre implica la muerte de los neutrófilos, y también se ha documentado un proceso acelerado de liberación denominado NETosis. Las plaquetas aumentan la formación de NETs y se ha sugerido que este proceso ocurre desencadenado por un estímulo inmune que puede también activar las plaquetas. Las NETs pueden atrapar patógenos y ayudar a su eliminación. Sin embargo, estas pueden contribuir a un daño tisular colateral y trombosis. Se ha demostrado que los pacientes con sepsis tienen aumentada la formación de NETs y este perfil se ha asociado con disfunción de órgano. En consistencia los modelos experimentales en los cuales se desensamblan las NETs han reducido los fenómenos tromboticos (van der Poll et al., 2017).

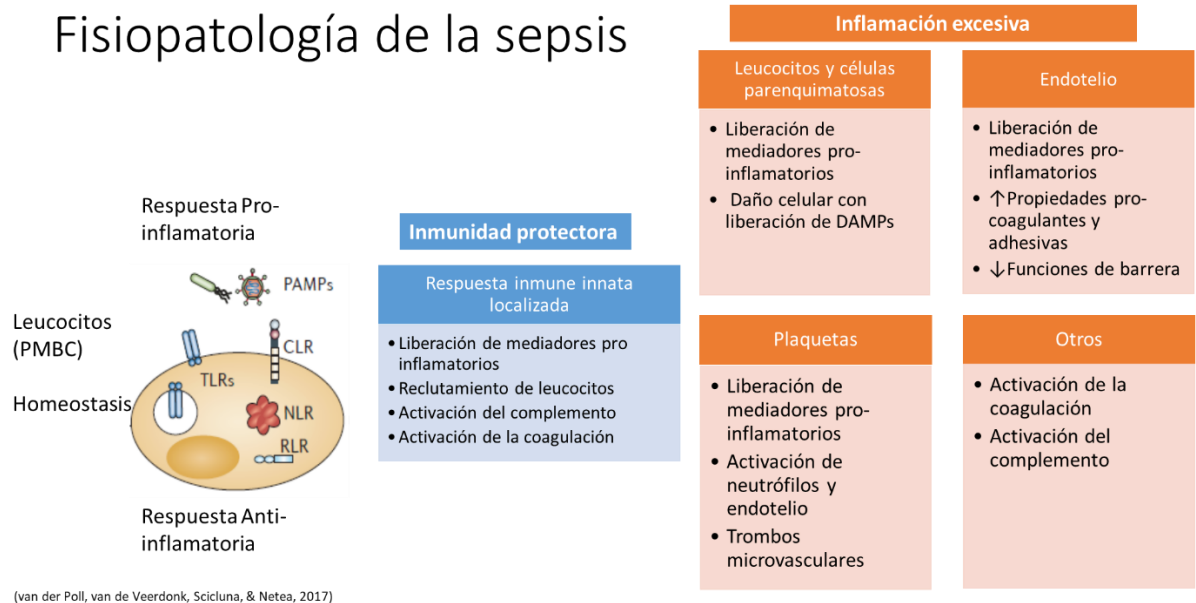
5.6.5 Disfunción endotelial. La disrupción de la integridad endotelial es un fenómeno clave en la patogénesis de la sepsis. En condiciones de equilibrio la función de barrera se mantiene por el cito esqueleto celular, el glicocalix, las moléculas de adhesión y otras proteínas de soporte. La unión célula a célula es mantenida por uniones adherentes como cadherina endotelial vascular VE y uniones estrechas (zona ocludens). En respuesta a la infección localizada, los leucocitos y plaquetas se adhieren a la superficie endotelial y migran a sitios donde las bacterias se están multiplicando. En sepsis la magnificación de este proceso contribuye a una incompetencia de la barrera. Trombina y metaloproteinasa de matrix 1 MMP1 están implicadas y sus efectos están mediados por la activación de PAR1. La esfingosina-1-fostato (S1P) es una de los mediadores más estudiados implicado en la fuga vascular, este activa el receptor S1PR1 manteniendo la integridad endotelial mediante reorganización del citoesqueleto celular y expresión de uniones de adherencia por medio de GTPasas pequeñas. Otra molécula implicada es la angiopoyetina 1 que activa el receptor de angiopoyetina TIE2. La angiopoyetina 2

es un antagonista de la angiopoyetina 1 que puede irrumpir la barrera endotelial y su medición en plasma es predictor de disfunción orgánica en sepsis, una relación elevada de angiopoyetina 2/ angiopoyetina 1 puede ser usado como marcador de disfunción endotelial en sepsis(van der Poll et al., 2017).

5.6.6 El papel de las plaquetas. Estas median la prevención de hemorragias y el mantenimiento de la integridad vascular, las cuales se adhieren y agregan en sitios de lesión vascular con activación de los sistemas de coagulación. Conteos bajos de plaquetas son asociados de forma independiente con mortalidad en sepsis. En modelos murinos se ha demostrado un efecto protector de las plaquetas frente a las infecciones bacterianas a nivel hepático por interacción con las células de Kupffer y el sistema del complemento. En concordancia, la trombocitopenia en ratones ha demostrado un empeoramiento de los mecanismos de defensa durante la sepsis por neumonía. La activación excesiva de las plaquetas durante la sepsis aumenta la inflamación y el reclutamiento celular, facilitando los fenómenos tromboticos vasooclusivos en los capilares y un efecto toxico celular directo por micropartículas plaquetarias. Aunque varios agentes antiplaquetarios han sido usados en modelos animales mejorando los desenlaces, en ensayos clínicos en humanos no han sido usados(van der Poll et al., 2017).

5.6.7 El rol de las células B. Estas contribuyen a la producción de citoquinas y aclaramiento bacteriano a través de la señalización del interferón tipo 1, mostrando mejoría en modelos animales. Un subgrupo de células B, llamado células B activadores de respuesta innata, son fundamentales en la erradicación bacteriana asi como en una atenuación de la liberación de citoquinas proinflamatorias, produciendo IL-3, la cual en el contexto de la sepsis aumenta la inflamación y la producción de células mieloides mononucleares, estos hallazgos en modelos animales, se han confirmado en pacientes con sepsis en los cuales niveles elevados de IL-3 se correlacionan con mortalidad(van der Poll et al., 2017).

Figura 4. Fisiopatología de la sepsis, fenómenos involucrados en homeostasis en inmunidad protectora sin avance a sepsis (Azul), fenómenos involucrados en inflamación excesiva en paciente que evolucionan a sepsis (Naranja). Adaptado por el autor de: (van der Poll et al., 2017)



### 5.7 INMUNOSUPRESIÓN (Figura 5)

La sepsis es asociada con inmunosupresión que se caracteriza por un agotamiento de linfocitos y reprogramación de células presentadoras de antígenos (Hotchkiss et al., 2013a, 2013b; Hotchkiss et al., 1999; van der Poll et al., 2017).

**5.7.1 Agotamiento de linfocitos y apoptosis.** La sepsis se ha asociado con una fuerte depleción de linfocitos T CD4+ y CD8+, células B y células dendríticas como resultado de apoptosis. Estudios en modelos animales han mostrado que la inhibición de la apoptosis de los linfocitos por varios mecanismos genéticos y farmacológicos mejora los resultados en sepsis, lo cual sugiere una fuerte relación con la letalidad. Pacientes sépticos tienen suprimidos los CD4+ helper 1, 2 y 17. En estudios postmortem, se han cultivado linfocitos T de bazo, mostrando una producción menor de INF gamma y TNF frente a linfocitos T de paciente muertos por causas no infecciosas, además estos linfocitos T tienen mayor expresión de muerte celular programada 1 PD1, sumado a una mayor expresión de PD1 ligando



PDL1 en los macrófagos y células endoteliales lo cual compromete la función de los linfocitos T en los tejidos locales. En ratas a las cuales se les inhibe la interacción PD1-PDL1 mostraron mejor supervivencia después de la inducción de sepsis, lo cual lo hace un potencial blanco terapéutico en futuras investigaciones. La expresión de PDL1 en monocitos es un predictor independiente de mortalidad a los 28 días en pacientes con choque séptico, además de ser un potencial biomarcador de pronóstico de tratamiento. Los linfocitos T reguladores aumentan en proporción en las sepsis sumando también al proceso de inmunosupresión sobre los linfocitos T efectores, estos también pueden inhibir la función de los monocitos y neutrófilos, el bloqueo de los linfocitos T reguladores en experimentos mejor la función y la capacidad de matar bacterias en sepsis (Hotchkiss et al., 2013a, 2013b; Hotchkiss et al., 1999; van der Poll et al., 2017).

5.7.2 Reprogramación de células presentadoras de antígeno. Una reducción en la expresión de HLA-DR en los monocitos de sangre periférica y una capacidad disminuida de los monocitos y macrófagos para liberar citoquinas proinflamatorias ante los estímulos (Inmunoparálisis o tolerancia a endotoxina). Las células dendríticas también muestran una expresión reducida de HLA-DR y liberación aumentada de IL-10 durante la sepsis. Las células dendríticas convencionales y las plasmocíticas muestran una apoptosis aumentada en sepsis, la prevención de apoptosis de estas células ha demostrado mejorar la supervivencia en experimentos en sepsis (Arnold, 2018; Pena et al., 2014; Pena et al., 2011; van der Poll et al., 2017).

La regulación epigenética ha sido identificada como un importante mecanismo de regulación de la función de las células mieloides en sepsis. La regulación transcripcional toma lugar por la organización de los locus génicos sobre la cromatina dentro de la transcripción activa o en estados silentes. Un tipo diferente de regulación epigenética involucra una regulación postranscripcional por microARNs los cuales resultan en una regulación a la baja de expresión de proteína a través de la degradación de mRNA específicos (van der Poll et al., 2017).

Los pacientes con sepsis han mostrado cambios pronunciados en los transcriptomas de leucocitos en sangre, y la expresión del 70-80% de ARN transcrito medido en estas células está considerablemente alterado comparado con sujetos sanos. Al organizar de forma canónica estas rutas de señalización se han agrupado en genes de expresión, de los cuales se han encontrado aumentados los relacionados con moléculas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y de disfunción mitocondrial, de forma paralela una disminución de la expresión de genes con función en la iniciación de traducción, señalización de mTOR (mechanistic target of rapamycin), inmunidad adaptativa (principalmente células T) y presentación de antígeno. Aunque el perfil de expresión génica puede verse involucrado también en noxas no infecciosas, estudios han permitido identificar

endotipos génicos en sepsis con perfiles de expresión génica en los cuales hay predominio de señalización de ciertas rutas fisiopatológicas (van der Poll et al., 2017).

Figura 5. Fisiopatología de la sepsis, fenómenos involucrados en homeostasis en los mecanismos locales de reparación sin avance a sepsis (Azul), fenómenos involucrados en inmunosupresión en paciente que evolucionan a sepsis (verde). Adaptado por el autor de: (van der Poll et al., 2017)

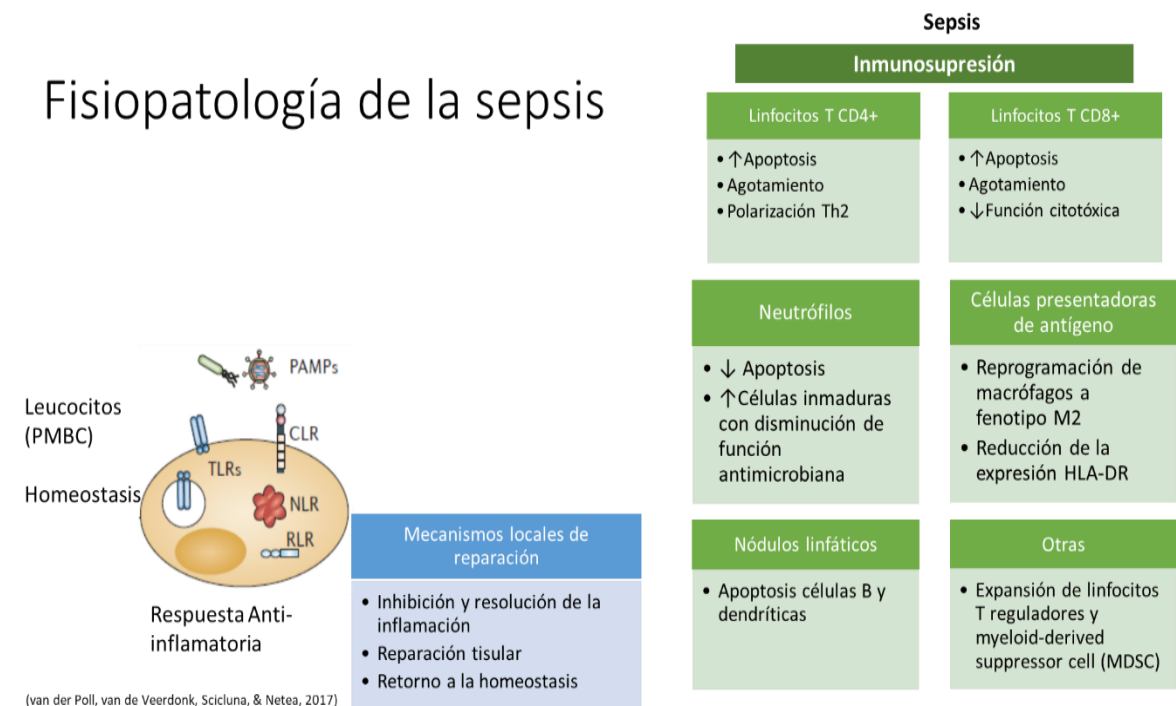
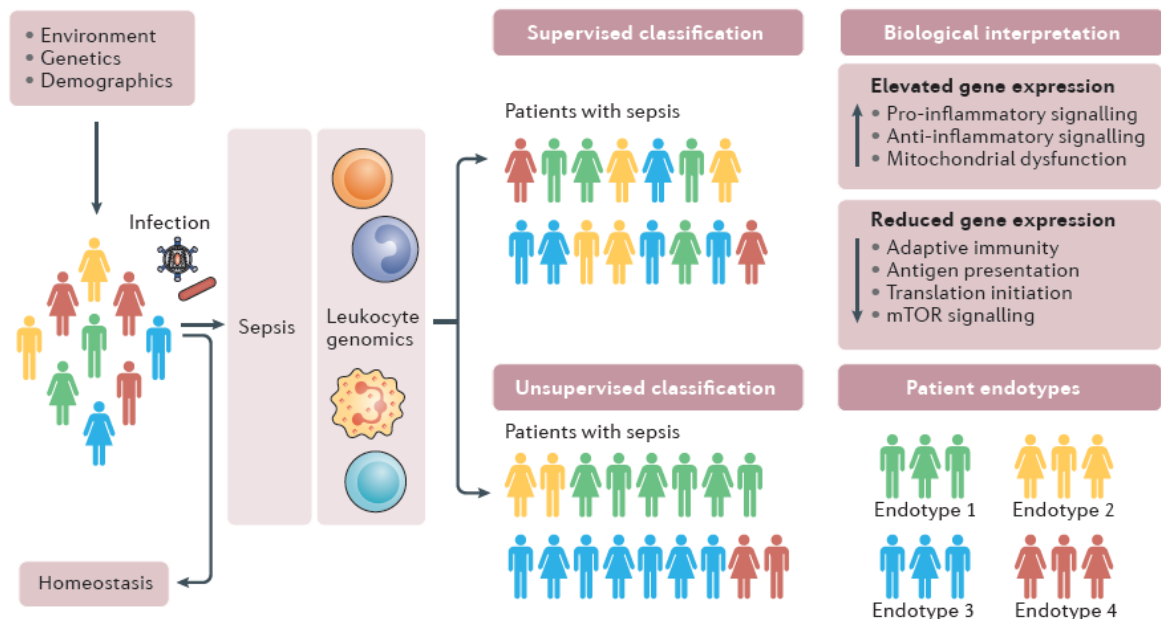


Figura 6. Respuesta genómica de los leucocitos en sepsis. Una respuesta inapropiada a la noxa influenciada por diferentes factores genéticos, medio ambientales y demográficos permite que los pacientes evolucionen a sepsis. Estratificar los pacientes según el perfil clínico y el perfil de expresión génica de predominio, ya sea hacia el alta o baja, permite clasificar por análisis de clúster endotipos según la respuesta inmune del huésped, lo que puede tener un valor pronóstico y terapéutico.



Fuente: Tomado y adaptado de: van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P., & Netea, M. G. (2017). The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*, 17(7), 407.

## 5.8 BIOMARCADORES EN SEPSIS

Un biomarcador ideal requiere de ciertas características, ser de bajo costo, procesamiento rápido, resultados rápidos, disponibilidad global con bajos costos de producción. Actualmente los biomarcadores se pueden clasificar en dos grandes grupos: 1. Diagnósticos y 2. Pronósticos. En sepsis tienen utilidad como herramientas para discriminar entre posibles casusas no infecciosas e infecciosas, o en la diferenciación del agente etiológico y su diagnóstico puntual. Un biomarcador diagnóstico puede permitir evaluar el beneficio de iniciar un antibiótico y direccionar su descalonamiento. Aunque la prueba de oro para definir la etiológica

microbiológica en sepsis son los hemocultivos estos se encuentran positivos en 30 a 40% de los casos, y en 1 tercio de los pacientes con sepsis los cultivos son estériles. Los biomarcadores pronósticos permiten identificar de forma oportuna perfiles de riesgo en pacientes sépticos, permitiendo estratificar en subgrupos según las características fisiopatológicas y así poder ayudar a predecir mejores resultados en el manejo. Los biomarcadores usados para guiar una terapia conocidos como teranósticos son ahora definidos como las principales herramientas en el manejo futuro de muchas enfermedades (Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

Los biomarcadores son usados en diferentes áreas de la medicina como cardiología (Troponina I, M, US), Neumología (dímero D) y en una amplia variedad en oncología. En contraste en sepsis el uso de biomarcadores viene tomando relevancia recientemente. En una revisión sistemática de literatura en la década pasada se encontró el uso de 178 biomarcadores en sepsis, pero recientemente en PubMed se han convertido en una tendencia de búsqueda, en la última década alrededor de 5000 artículos sobre este tema han sido publicados y antes de 2007 no eran más de 3000 los publicados. Aunque son muchos en sepsis la última actualización de *Surviving Sepsis Campaign* solo evaluó como nuevo biomarcador la utilidad de la procalcitonina PCT, sin embargo, lejos de ser un biomarcador ideal está mostrando una gran utilidad para guiar el manejo antibiótico en los pacientes críticamente enfermos, sin cumplir varios de los postulados de un biomarcador ideal, ya que no está disponible en todas las instituciones y su operatividad y costo no lo han permitido. Nuevas tecnologías como las ómicas y el proyecto del genoma humano son prometedoras en la investigación y nuevos usos en sepsis (Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

## 5.9 BIOMARCADORES PROTEICOS

Estudios recientes han mostrado que existe una sobreestimación del diagnóstico de sepsis en la UCI, en estudio reciente de paciente que ingresaron a UCI con diagnóstico de sepsis mostro que hasta un 13% no tenía ningún riesgo de infección y un 30% adicional apenas tenía una probabilidad muy baja, usando de forma correcta los criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos para hacer el diagnóstico. Llamativamente estos pacientes a los cuales se les inicia manejo como sepsis sin serlo tienen mayor mortalidad (Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

A pesar de los múltiples estudios de biomarcadores, es la procalcitonina el único implementado actualmente en la guía. Los niveles de procalcitonina se aumentan en respuesta a un estímulo proinflamatorio, con un periodo corto de elevación para su elevación e identificación, detectable a las 4 horas con un pico a las 6 horas,

además de una vida media prudente de 25 a 30 horas. Un meta-análisis reciente mostro una sensibilidad de 0.77 (IC 95% 0.72-0.82) y especificidad 0.79 (IC 95% 0.74-0.84) para distinguir entre SRIS infecciosa y no infecciosa. Los niveles de PCT entre 0.1 y 0.5 ng/mL, sugiriendo la presencia de infección bacteriana y el requerimiento de manejo antibiótico, pero aún existe controversia frente al punto de corte. Aunque los niveles de PCT se han asociado con severidad y su descenso con mejoría en la sobrevida(Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

En un estudio con 858 pacientes con sepsis, la incapacidad de disminuir los niveles PCT por debajo del 80% de la línea de base al 4 y al día 28 mostró ser un predictor independiente de mortalidad. Esta ha mostrado mejor rendimiento en el diferencial entre patología infecciosa y no infecciosa en el paciente críticamente enfermo, entre PCR, (Lipopolisacarido ligado a proteína) LBP e IL6(Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

Otras moléculas estudiadas en sepsis con proteína C reactiva (PCR), soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) y soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) de sus siglas en inglés, con un rendimiento diagnóstico y pronóstico muy pobre. Por lo cual la única con utilidad demostrada principalmente en paciente con infecciones bacterianas respiratoria ha sido la PCT, sin embargo no puede ser usada para descartar sepsis ya que esta práctica ha demostrado un aumento en la mortalidad(Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

## 5.10 NUEVO MARCADORES DERIVADOS DE LAS ÓMICAS

El campo ómico de la biología de sistemas busca caracterizar y cuantificar moléculas que se traducen en la estructura, función y dinámica de un organismo. Las ómicas incluyen genómica, epigenética, transcriptómica, proteómica, y metabolómica. Estas metodologías se han convertido en herramientas más factibles y menos costosas y ha aumentado el desarrollo de investigaciones en torno a las interacciones huésped - patógenos, respuesta del huésped y biomarcadores en sepsis(Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

Los biomarcadores tradicionales como mencionamos previamente convencionalmente miden la concentración de moléculas proteicas circulantes, en ese sentido la transcriptómica es la más estudiada. El uso de moléculas de ARN como biomarcadores tiene la ventaja de que se pueden incorporar en las pruebas de cabecera basadas en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con interpretación a corto plazo o inmediatas, lo que las hace muy atractivas para el ejercicio clínico diario. Estas pruebas pueden medir un conjunto de biomarcadores

de ARN al mismo tiempo, lo que ha demostrado ofertar un mejor rendimiento diagnóstico con respecto a sensibilidad y la especificidad (Seymour et al., 2019; Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

### 5.11 BIOMARCADORES DE ARN

La respuesta genómica a sepsis ha mostrado alteraciones en la transcriptómica de los leucocitos periféricos con diferencias significativas con los de pacientes sanos. Varias investigaciones han mostrado la capacidad que tienen estas pruebas de diferenciar enfermedad aguda infecciosa y no infecciosa y también entre diferentes agentes infecciosos. Una de estas pruebas rápidas aprobadas recientemente por FDA es SeptiCyte LAB que permite en los pacientes críticamente enfermos evaluar causas infecciosas y no infecciosas en su primer día de admisión a la UCI (McHugh et al., 2015). Esta prueba de clasificación de expresión génica de 4 genes combina CEACAM4, LAMP1, PLA2G7, y PLAC8 y produce un resumen que permite obtener un AUCROC de 0.89 (IC 95%, 0.85–0.93). Otra prueba llamada Sepsis MetaScore evalúa 11 genes biomarcadores en sepsis con AUCROC 0.87 (rango 0.70–0.98) (Maslove et al., 2019). Otro estudio que usó los perfiles de expresión de todo el genoma del ARN mensajero logró establecer un panel de marcadores compuesto por 3 transcripciones reguladas a la baja (Toll-like receptor 5, protectin, y clusterin) y 4 reguladas al alza (fibrinogen-like 2, IL-7 receptor, complejo de histocompatibilidad mayor tipo II, carboxypeptidasa, y vitellogenin-like) que explica de mejor forma el proceso de las alteraciones inmunes, lo que permitió crear un puntaje de expresión génica que fue mayor en pacientes con infección probable o posible que los no infectados. Algunos grupos han focalizado el esfuerzo para usar estas pruebas en condiciones infecciosas específicas con neumonía adquirida en comunidad (NAC), compararon los perfiles de todo el genoma de ARN de los pacientes admitidos en UCI, se identificaron 78 genes de señalización, de los cuales la expresión génica FAIM3:PLAC8 superó a la PCT sérica para discriminar entre paciente con NAC versus no NAC, esta estrategia también se ha evaluado en el contexto de todas las causas de sepsis, en adultos, pediátricos y neonatos, con AUCROC muy favorable como se dio en el estudio PRESERVE y el genome-wide association study, o GWAS (Rautanen et al., 2015; Singer, 2013; van Engelen et al., 2018; Wong et al., 2012).

Los biomarcadores transcriptómicos no solo tienen utilidad diagnóstica y de inicio de manejo terapéutico, también se han probado en el escenario pronóstico (Singer, 2013; van Engelen et al., 2018).

## 5.12 REPROGRAMACIÓN CELULAR O TOLERANCIA A ENDOTOXINA

La inflamación implica un mecanismo primitivo de defensa frente a un agente externo que genere daño celular, estos procesos se han venido estudiando desde hace varios años, tal como se describió en párrafos anteriores, sin embargo, este fenómeno inflamatorio es deletéreo si se perpetua y requiere de unos estrechos mecanismos de regulación celular y humoral. La exposición inicial a una parte de un agente microbiano (Lipopolisacárido LPS) desencadena después de una exposición continua o repetida un fenómeno de reprogramación celular que se resume en un mecanismo celular ancestral de defensa para evitar el daño tisular continuo que puede llegar a generar un estado hiperinflamatorio excesivo. Se ha identificado que los macrófagos y los monocitos juegan un papel protagónico en este mecanismo, ya que se han aislado estas células de pacientes sépticos con hiperactividad y baja expresión de HLA-DR y de citoquinas pro inflamatorias. En ese mismo sentido en pacientes que sobrevivían a sepsis se encontró un déficit de activación de los monocitos hasta por 2 semanas, lo que además confirmó un fenotipo estable de reprogramación (Pena et al., 2011).

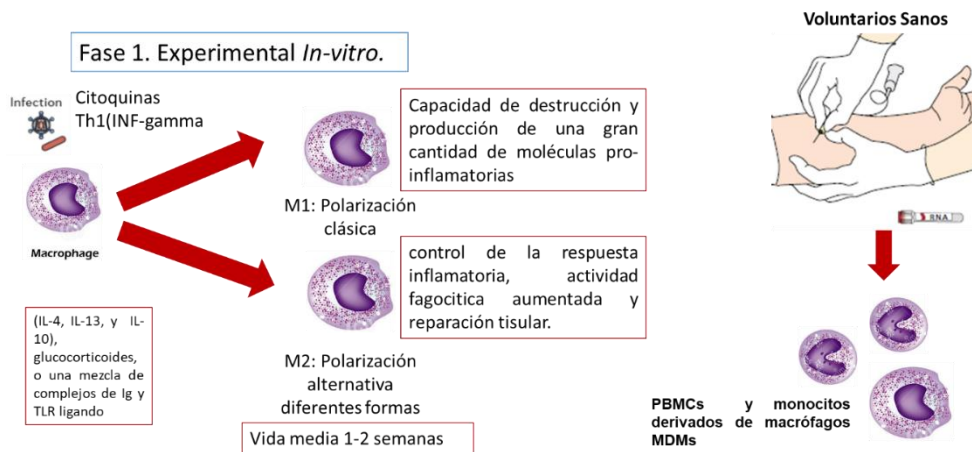
La polarización clásica (M1) y alternativa (M2) se usa en general para hacer referencia a la respuesta de los macrófagos ante estímulos en un microambiente. M1 es llevada a cabo en respuesta a productos microbianos o citoquinas Th1, como INF- $\gamma$ , lo que genera un aumento en la capacidad de destrucción y producción de una gran cantidad de moléculas pro inflamatorias. Por el contrario M2 se produce por una gran variedad de estímulos como son citoquinas Th2 (IL-4, IL-13, y IL-10), glucocorticoides, o una mezcla de complejos de Ig y TLR ligando, produciendo diferentes formas de polarización de M2, las funciones de estos linajes de macrófagos están involucrados en el control de la respuesta inflamatoria, actividad fagocítica aumentada y reparación tisular (Pena et al., 2011).

Pena y colaboradores en 2011, confirmaron que este fenómeno de polarización M2 tiene semejanzas en expresión génica a la reprogramación celular y la identificación de estos y su sometimiento a modelos bioinformáticos permite agrupar según el predominio de expresión la ruta fisiopatológica implicada, y de esa forma marcar pronóstico y futuros escenarios clínicos de beneficios terapéuticos por terapias de inmunomodulación o inmunostimulación. Inicialmente en el experimento in-vitro tomaron células mononucleares de pacientes voluntarios sanos, las PBMCs y monocitos derivados de macrófagos MDMs fueron aislados y cultivados, posteriormente se extrajo LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-H103), después de cultivadas fueron incluidas en 3 grupos, 1 que no recibió ningún estímulo, 2 que recibió un estímulo a las 24 horas con LPS y un 3 que recibió doble estímulo de LPS al inicio del cultivo (hora 0) y a las 24 horas de cultivados (24 h), los lisados celulares y los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados a las 4 horas del segundo

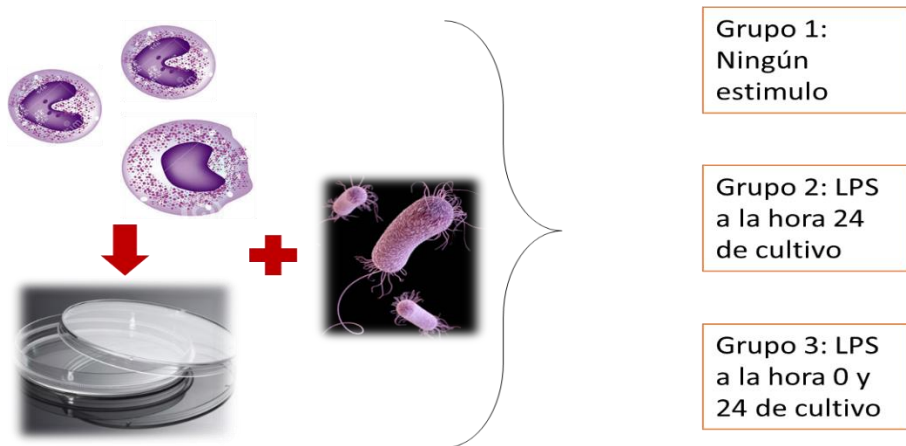
estimulo. Los diferentes genes de expresión génica fueron identificados inicialmente por análisis de microarray y validados por PCR en tiempo real (qRT-PCR). En estos experimentos se confirmó que el fenómeno de tolerancia a endotoxina tiene cambios similares a M2 postulando este como un estado distinto de polarización celular. Demostrando una serie de fenómenos como regulación a la baja de un amplio rango de citoquinas pro inflamatorias, por ejemplo TNF- alfa (Pena et al., 2011) (Figura 7).

Figura 7. Modelos experimentales que han confirmado la reprogramación celular y el método usado para la identificación génica en nuestro estudio.

A.



B.



Fuente: Diseñado por el autor, basado en materiales y métodos de: Pena, O. M., Pistollic, J., Raj, D., Fjell, C. D., & Hancock, R. E. (2011). Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *The Journal of Immunology*, 186(12), 7243-7254.



Posteriormente el mismo grupo llevo a cabo un estudio de fase clínica en el que tomaron los datos de expresión génica de (PMBCs) de 11 estudios para un total de 583 pacientes con sepsis, identificando un set de 99 genes expresados en modelos de reprogramación celular, después en una cohorte independiente de paciente con sospecha de sepsis tomaron 72 casos, confirmando la relación de los hallazgos in-vitro con sepsis y además identificando riesgo de disfunción orgánica múltiple(Arnold, 2018; Pena et al., 2014) (Figura 7).

Como hipótesis a la explicación de estos procesos, se sugiere que existe un enfrentamiento por mantener el equilibrio entre dos tipos de leucocitos, los monocitos, células pro inflamatorias que pueden diferenciarse en macrófagos y células dendríticas, y los neutrófilos, los glóbulos blancos más abundantes. Mientras los monocitos pueden sobrevivir durante 1 a 2 semanas, los neutrófilos tienen una vida corta, con un promedio de vida de solo 5,4 días, la vida prolongada de los monocitos permite la reprogramación celular, pero la vida media corta de los neutrófilos hace que se produzcan nuevos que carecen de esta tolerancia. Los neutrófilos persisten en su labor de buscar agentes infecciosos, sin el apoyo de los monocitos, sin embargo los mecanismos de control inmune son insuficientes lo que se ve reflejado en una mayor disfunción orgánica(Cavaillon & Adib-Conquy, 2006; Pena et al., 2014).

## 6. HIPOTESIS

Existe una relación entre el perfil de expresión de genes relacionados con la reprogramación celular y los pacientes que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis en un hospital de referencia en Colombia.

## 7. DISEÑO METODOLOGICO

### 7.1 TIPO DE ESTUDIO

Cohorte prospectiva, controlada, ciega, parte de un estudio multicéntrico llevado a cabo por la universidad de British Columbia en Vancouver con participación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo.

### 7.2 LUGARES

#### *Canadá:*

Vancouver Coastal Health (VCHRI/VCHA) Vancouver General Hospital

UBC Vancouver (excludes UBC Hospital)

Vancouver Coastal Health (VCHRI/VCHA) UBC Hospital

Providence Health Care St. Paul's Hospital

#### *Australia:*

University of Sydney

#### *Colombia:*

Hospital "Hernando Moncaleano Perdomo", institución de tercer nivel que atiende a la población del Huila, al sur del Tolima, el Caquetá, parte del Amazonas, el Putumayo y el Sur del Cauca. Ofrece servicios de salud de mediana y alta complejidad, garantizando óptima calidad científica a sus usuarios, calidez humana y procesos de mejoramiento continuo.

### 7.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Pacientes del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, pertenecientes los régimen contributivos, subsidiados y especiales, que asisten a la institución por consulta espontánea al servicio de urgencias o remitidos de otro

centro asistencial, en búsqueda de servicios especializados, unidades y programas especiales, apoyo diagnóstico y complementación terapéutica.

La muestra fue calculada según los datos publicados previamente por Pena y cols, que muestran que, para una cohorte local independiente, un tamaño de muestra de 35 pacientes adultos con sepsis y 70 pacientes adultos controles en total fue suficiente para lograr una sensibilidad de al menos 0,9 con un intervalo de confianza del 95%. Con este tamaño de muestra, se logra alta significancia estadística ( $p < 0.001$ ) con un AUC de solo 63%. Por lo cual se estimó un total de 1000 pacientes de varios grupos de edad, incluidos los sujetos de control, para obtener un rendimiento diagnóstico excelente y lograr mayor precisión, especificidad y sensibilidad, (Pena et al., 2014).

Esta estrategia de reclutamiento de pacientes proporcionará como beneficios adicionales: (1) la capacidad de relacionar las señales y la expresión génica de la RC con la demografía del paciente y los síntomas clínicos mediante el análisis multivariado, proporcionando así datos esenciales que contribuyen al diagnóstico basado en esta prueba, (2) reducción de los números de genes característicos basados en un análisis de genes desregulados con menos frecuencia, y (3) la capacidad de determinar la sensibilidad y especificidad.

Los participantes están siendo reclutados en los departamentos de emergencia de múltiples centros que sirven como cohortes separadas para un importante estudio de validación observacional prospectivo y ciego. En el estudio se encuentran incluidos 5 países (Canadá, Vietnam, Australia, EUA y Colombia) Cada ubicación del estudio proporcionará al menos 100 muestras, las cuales serán las muestras mínimas aportadas por Colombia.

#### 7.4 SUJETOS DE ESTUDIO

COHORTE		EDAD	NÚMERO DE PARTICIPANTES DE LA COHORTE MULTICÉNTRICA
1	Adultos	14 - 65 años	300-500
2	Ancianos*	>65 años	500-700

\* Como este grupo puede tener más comorbilidades y está en mayor riesgo de desarrollar sepsis, se espera observar una mayor variabilidad, por lo tanto, se

aumentó el número de participantes necesarios en este grupo, pero brindando rangos de acuerdo con la tasa de éxito del reclutamiento.

	COHORTE	EDAD	NÚMERO DE PARTICIPANTES
3	Pacientes sanos	>19 año	100

La intensidad del reclutamiento variará según la institución. Para el caso de Colombia en común acuerdo con Canadá se definió un 10% mínimo del total de muestras enviadas lo que dio un valor mínimo de 100 muestras.

Los pacientes fueron reclutados bajo los siguientes criterios:

#### 7.5 CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes que ingresen al servicio de urgencias del Hospital Universitario Hernando Moncaleano con sospecha de sepsis y al menos 2 criterios de SRIS.

Pacientes mayores de 14 años.

#### 7.6 CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes en etapa terminal (muerte anticipada en 12 horas).

Aquellos en los cuales no se lograba obtener el consentimiento informado.

Pacientes en quienes era inviable obtener muestras de sangre.

Que la muestra no se haya podido obtener en las primeras 24 horas desde el primer contacto médico al ingreso hospitalario.

## 7.7 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACION

Revisión de historias clínicas

Entrevista y aplicación de instrumento diseñado

Recolección, traslado y procesamiento de las muestras

## 7.8 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

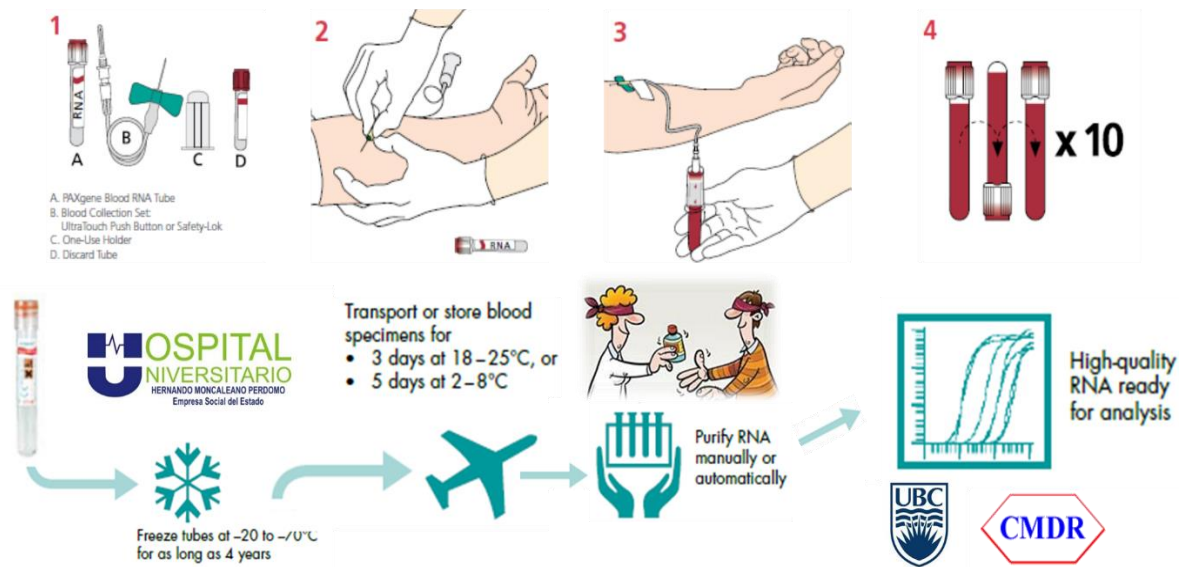
Se realizó durante la recolección habitual de las muestras sanguíneas al ingreso al servicio de urgencias en pacientes que cumplían los criterios de inclusión, a los cuales se les tomo una muestra adicional (3ml) de sangre y se transfirió inmediatamente mediante un sistema vacoutainer de recolección segura a tubos que contienen una cantidad apropiada de reactivo PAXgene los cuales fueron almacenados según las especificaciones del fabricante en congeladores que garantizaban temperaturas – 20° garantizando una conservación prolongada de las muestras hasta que fueron enviadas a la University of British Columbia (UBC). Este proceso de recolección y entrega de tubos fue responsabilidad del equipo de investigación, el transporte se contrató por medio de la empresa Interlogistica SA quien mediante la empresa FedEx garantizaba la cadena de frio requerida para la conservación de las muestras hasta su llegada a Vancouver. El laboratorio Hancock suministro los tubos PAXgene y se encargó de los costos de envío de las muestras a Vancouver.

El envío de las muestras fue cegado para los investigadores en Canadá, a todas las muestras se les asigno una codificación que solo conocen los investigadores colombianos, anexo a las muestras se envió una base de datos separada, que vinculo a cada código las variables solicitadas por el equipo líder en Canadá.

7.8.1 Procesamiento de las muestras. (Información suministrada por Center for Microbial and Immunity Research de la University of British Columbia) (Pena et al., 2014; Pena et al., 2011; Zhang et al., 2010)

Figura 8. Cadena de sucesos en la recolección de la muestra, el bloque superior la estrategia de toma de muestras y en el bloque inferior las estrategias de conservación y transporte de las muestras a Canadá.

## Técnica de recolección de la muestra



### 7.9 ARN-seq

A su llegada a Vancouver, se realizó un proceso de calidad que evaluaba las características del arribo de las muestras incluyendo la reservación de la cadena de frío la calidad de las muestras y el congelamiento, los hallazgos de algunas muestras defectuosas fueron informados al líder del grupo en Canadá y Colombia. El procesamiento de las muestras es ciego, todas las muestras en los tubos PAXgene serán codificadas mediante códigos de barras y procesadas ARN-Seq, seguido se prepararon para secuenciación y análisis transcriptómico de alto rendimiento de cADNs (RNA-Seq). Las librerías de cADN se prepararon a partir del ARN total usando el kit de muestras totales de ARN TruSeq con enriquecimiento de polyA (Illumina). La RNA-Seq se realizó con el instrumento Illumina Hi-Seq, utilizando una única lectura de secuencias de 100 bp-long (+ adaptador / índice de secuenciación).

Se utilizó un protocolo de análisis estándar con control de calidad fastqc v0.11.5 y multiqc v 0.8. dev0; la alineación al genoma humano (Ensembl GRCh38.86) se hizo con STAR v2.5, usando la tabla de lecturas de conteo htseq-count v0.6.1p1, y el

análisis de expresión diferencial con DESeq2 v1.14.1. El cADN y el ARN no utilizados se almacenarán a -80 ° C para su posterior análisis por PCR.

## 7.10 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

El diseño de la base de datos se realizó mediante grupos de trabajo en Canadá y reuniones virtuales con los equipos internacionales participantes que aportaron sus experiencias y se realizaron recomendaciones frente a la recolección de la información, ver la tabla de variables en el suplemento (A continuación, el resumen de las variables).

Tabla 4. Metadatos de los pacientes recolectados.

CRITERIOS SRIS	DATOS CLÍNICOS RELACIONADOS CON LA INFECCIÓN #	DATOS DE DAÑO DE ÓRGANO#	PRINCIPALES DATOS DE LA HISTORIA CLÍNICA
Temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$	Conteo total y diferencial de leucocitos	Corazón: PAM/necesidad de vasopresores	Malignidad u otras enfermedades irreversibles, o con condiciones en las cuales la mortalidad es del 50% en los siguientes 6 meses.
Frecuencia cardiaca $> 90/\text{min}$	Cultivos microbiológicos	Hígado: Bilirubina	Cáncer o metástasis activas
Frecuencia respiratoria $> 20/\text{min}$	Rayos X y Procalcitonina	Coagulación: Plaquetas	Quimioterapia o radioterapia 8 semanas antes de ingreso al estudio
Alteración del estado mental	Cirugía reciente o procedimientos invasivos	Riñones: Creatinina	Cualquier trasplante
	Historia de fiebre	Pulmones: $\text{PAO}_2/\text{FIO}_2$ $\text{SAO}_2/\text{FIO}_2$	Historia de enfermedades inmunosupresoras



	Piel y tejidos blandos	SNC: Glasgow coma score	Otras comorbilidades
	Síntomas urinarios	Niveles de lactato	Re-admisión al Hospital 1 año después de un diagnóstico de sepsis
	Síntomas respiratorios		
	Re-infección en los siguientes 28 días		

Fuente: Datos obtenidos del estudio de Burrell y colaboradores en Australia (Burrell, McLaws, Fullick, Sullivan, & Sindhusake, 2016).

## 7.11 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN

Sesgo de medición. No se pudo controlar el error aleatorio en nuestro estudio ya que la muestra seleccionada por conveniencia fue el mismo universo, sin embargo, en el análisis y presentación de resultados se realizó de manera sistemática buscando mitigar el sesgo de la información presentada, se espera que este sesgo se mitigue con el análisis total de la cohorte.

Sesgo de información. Para controlar las variables de confusión se diseñó un instrumento previamente mencionado y se realizó un entrenamiento con los profesionales especializados locales e internacionales con cinco historias clínicas, identificando los errores con respecto a la introducción de los datos, clasificación de las variables, sistema numérico a usar y puntos de cohorte de interpretación de los paraclínicos, realizando así los cambios pertinentes propuestos por ellos esto enfocado a mejorar la calidad de la información recolectada, sin embargo algunas variables no eran susceptibles de modificación ya que eran diligenciadas directamente por el personal del triage, lo que puede llegar a generar un sesgo de información (Ej.: peso, talla).

## 7.12 PLAN DE ANÁLISIS

Los datos fueron digitados a una base de datos creada en Excel 2013® para Windows 10® con las variables definidas.

Los criterios de SIRS y datos restantes se recogieron en el instrumento establecido. Se tabularon y se compararon con el resultado del análisis de RNA-Seq. El análisis del set de genes ROAST (Wu et al, 2010 implementado por Pena et al 2014) se usará para probar la representación de este conjunto de genes en los pacientes con SRIS, como predictores del diagnóstico de sepsis severa o choque séptico, este procesamiento de datos fue realizado por el *Center for Microbial and Immunity Research de la University of British Columbia* y fueron enviados al investigador principal. El grupo informo que mediante la estrategia de agrupación (Clustering) *K-medoids* se identificaron y seleccionaron los genes más variables (1130) y agruparon 4 patrones (Endotipos o Cluster) de expresión génica alimentados de vías de la base de datos Reactome.

Posteriormente los datos se procesaron empleando el paquete estadístico STATA licenciado para la Universidad Surcolombiana. Según los datos enviados del análisis transcriptómico por Canadá según cada endotipo de RC, la UBC utiliza el software R para el análisis de los datos. Se usaron como desenlaces primarios y secundarios las siguientes variables:

- Primarios clínicos: Diagnóstico médico de sepsis según criterios del consenso SEPSIS 3 y su relación con la positividad de la prueba y SRIS.
- Secundarios clínicos: Datos de infección confirmada, positividad del rastreo microbiológico o datos clínicos que confirmen el foco.
- Primarios de pronóstico: Días libres de daños de órgano
- Secundarios pronósticos: Sobrevida a los 28 días, días de estancia en UCI, días de estancia en hospitalización

Posteriormente se realizó un apareamiento de las muestras procesadas con los códigos y la información clínica asignada en la base de datos en Colombia.

Las variables numéricas fueron resumidas como medias con sus desviaciones estándar ( $\pm$ DE). Las variables categóricas fueron resumidas como proporciones (%), con sus correspondientes intervalos de confianza (IC 95%). Las variables cuantitativas de las aplicaron pruebas de normalidad Shapiro Wilks para evaluar si se utilizaban medias o mediana.

Las comparaciones entre los endotipos (Cluster) definidos según los análisis enviados por Canadá y las variables cuantitativas por medio de la prueba ANOVA para evaluar si tenían asociación estadística, aquellas variables que no cumplían los supuestos, se les aplicó la prueba Kruskal Wallis. Posteriormente se hizo un análisis de RR con respecto a las variables de asociación frente al desarrollo de sepsis según criterios Sepsis-3 y cada uno de los endotipos, las variables que no lo requirieron fueron categorizadas por grupos.

### 7.13 ASPECTOS ÉTICOS

Se trata de una investigación con riesgo mínimo de acuerdo a los criterios establecidos por la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, y se acoge a los principios bioéticos de autonomía, confidencialidad, beneficencia y no maleficencia. Se realizó un consentimiento informado institucional para el acceso a las historias clínicas y un consentimiento informado para cada paciente en el cual se explicaban los objetivos de la obtención de los datos clínicos y muestra sanguínea, en el marco de la toma de paraclínicos de rutina. Se garantizó la seguridad del paciente en el proceso de toma de muestras, a partir del cumplimiento del protocolo institucional para la toma de muestras.

El costo beneficio del mismo radica en que este estudio permitirá hacer un diagnóstico temprano de una patología frecuente en el medio y con mal pronóstico si no es manejada tempranamente, disminuyendo de esta manera los costos de estancias hospitalarias prolongadas en UCI y el manejo de complicaciones. Los pacientes se beneficiarán del diagnóstico temprano, para así brindarles un tratamiento oportuno y la disminución de las complicaciones. Y nosotros como investigadores nos beneficiaremos de los resultados obtenidos en el estudio como parte de nuestra formación profesional.

El impacto de la investigación se verá reflejado en la retroalimentación que se realizará de los hallazgos del estudio a la institución con el fin de que se pueda evaluar el llevar a cabo la modificación y mejoramiento de las guías institucionales del Hospital Universitario.

Y de esta manera brindar a los futuros pacientes un enfoque de mayor precisión frente a esta patología. Adicionalmente, el alcance del estudio subyace en que como parte de un estudio multicéntrico los resultados obtenidos serán publicados como hallazgos regionales, nacionales e internacionales.

El protocolo de investigación fue sometido a evaluación por el comité de bioética del hospital y aprobado el 19 de abril de 2018 bajo acta número 004-003. También recibió aprobación por parte del comité de ética de la UBC con número H17-01208-A001.

## 7.14 ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Tabla 5. Cronograma de actividades.

8	Organización y tabulación de datos																
9	Recepción de análisis transcriptómico							<b>AÑO 2017-2019</b>									
10	Análisis e interpretación de datos																
11	Redacción de borrador del informe	ENE-MAR	ABR-JUN	JUL-SEP	OCT-DIC	ENE-MAR	ABR-JUN	JUL-SEP	OCT-DIC	ENE-MAR	ABR-JUN	JUL-SEP					
12	Revisión y aprobación de borrador de informe																
13	Presentación Metodología y resultados.																
14	Difusión y socialización de resultados																
4	Presentación a Comité de Bioética																
5	Aprobación																
	<b>EJECUCIÓN/TRABAJO DE CAMPO</b>																
6	Tomas de muestras de sangre																
7	Envío de muestras																

En rojo las fases críticas del desarrollo del proyecto.

Tabla 6. Costos del proyecto a la fecha.

INSUMOS Y MATERIALES*	JUSTIFICACIÓN	FINANCIAMIENTO	CANTIDAD	VALOR UNID	VALOR (\$)	VALOR (USD)*
PAXgene blood RNA tube	Recolección de muestras	UBC‡	200**	150 USD	98.100.000	30.000
Procesamiento de muestra	Técnica molecular especial de transcriptómico	UBC	123	400 USD	160.884.000	49.200
Impresiones y fotocopias	Consentimientos informados, algoritmos informativos al servicio de urgencias	Investigadores	100	\$400	40000	
Envío de muestras	Transporte Neiva-Vancouver	UBC	2	1600 USD	10.464.000	3200
Almacenamiento de muestras en Colombia	Cadena de frío según especificaciones del fabricante	Donación por cada institución USCO-HUHMP	-	0	0	0
Auxiliar de enfermería	Personal calificado para toma de muestras	Investigadores	123	10000	1.230.000	
Kit BD Vacutainer Safety-Lok	Toma segura de muestras	Investigadores	200	1000	200.000	
<b>Total</b>					<b>270.918.000</b>	<b>82.849</b>

Fuente : \*Datos suministrados por Centre for Microbial Diseases and Immunity Research. University of British Columbia e Interlogística SA. USD: Dolores americanos, \$: Pesos Colombianos. ‡ UBC: Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia Tasa de cambio a enero 2020: 1 USD: 3270

\*\*Cantidad de tubos enviados a Colombia, al finalizar la recolección los tubos no usados se debían desechar.

## 8. ENTIDADES PARTICIPANTES Y TIPO DE PARTICIPACIÓN

Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, University of British Columbia:

- Idea original de investigación.
- Suministro de tubos de recolección de muestras tipo PAXGENE.
- Análisis transcriptómico de mRNA de las muestras.
- Análisis bioinformático de expresión génica y endotipos.
- Sponsors:
  - Canadian Institutes of Health Research (CIHR) - "Alternatives to antibiotics: new strategies for treating multi-drug resistant infections"
  - Canadian Institutes of Health Research (CIHR) - "The network biology of stem cell derived macrophages; Deciphering the role of cellular reprogramming in sepsis"

Los autores:

- Compra de insumos para correcta toma de muestras (Kit de toma segura de muestras) BD Vacutainer Safety-Lok.
- Honorarios de personal entrenado para recolección de muestras.
- Gastos de papelería de consentimientos informados, formatos informativos y de recolección de datos.

Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva:

- Aprobación N 004-003 del comité de ética para el desarrollo de la investigación.
- Uso provisional de congeladores del laboratorio clínico para conservación de muestras mientras eran recolectadas y enviadas a Canadá.

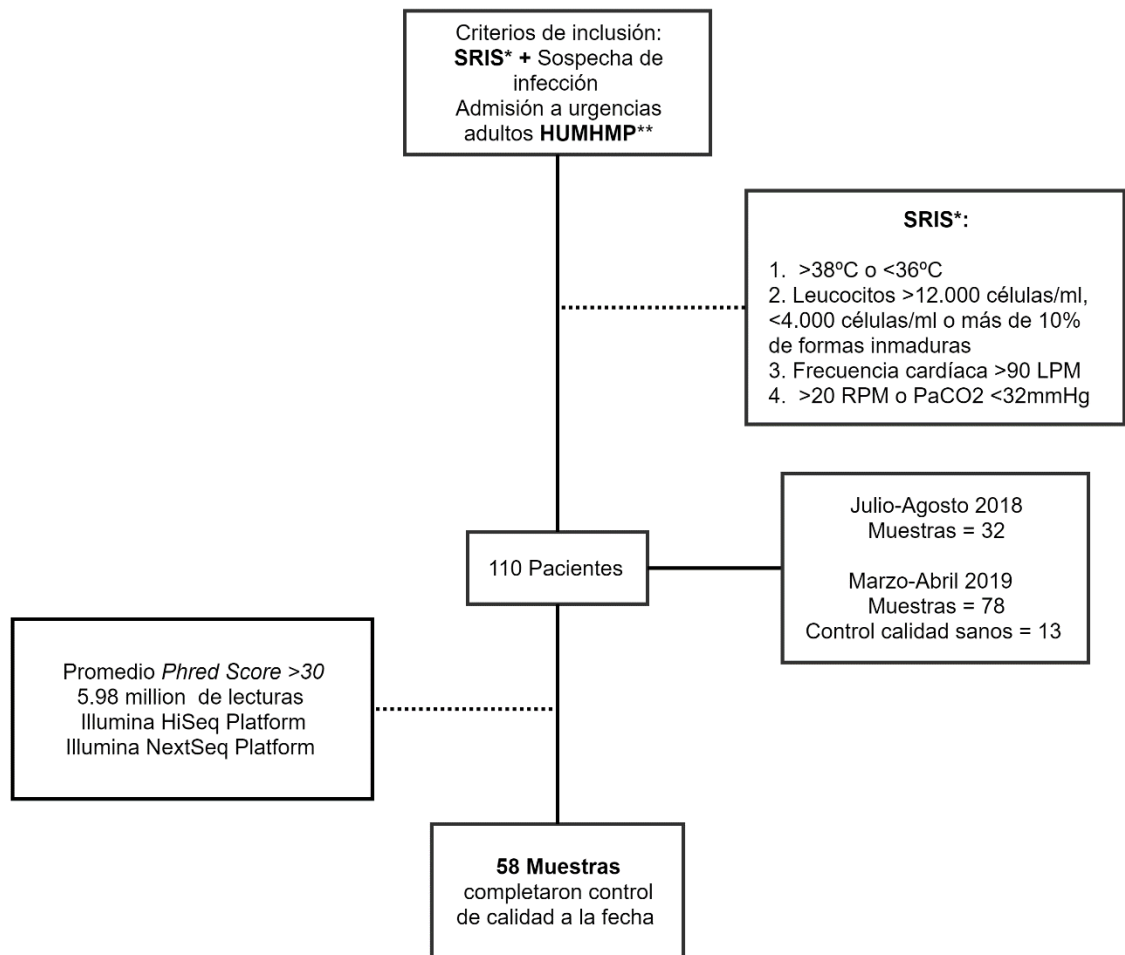
Universidad Surcolombiana (Facultad de Salud- Programa de Medicina). Neiva-  
Huila:

- Aprobación del proyecto de investigación como tesis de grado para estudiantes de pregrado y postgrado.
- Uso provisional de congeladores del laboratorio de genética para conservación de muestras mientras eran recolectadas y enviadas a Canadá.



## 9. RESULTADOS

Figura 9. Flujograma recolección de información y muestras.



\*Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

\*\*Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo

En el periodo de estudio se recolectaron un total de 123 muestras de las cuales 110 fueron de casos y 13 fueron de pacientes sanos (Ver gráfica 2). Con respecto a las variables sociodemográficas, 68% eran hombres (36/58), el 33% (19/58) eran mayores de 65 años (ancianos) (Ver Figura 1,2).

La prueba de calidad usada por el UBC para evaluar las muestras usando puntaje promedio de *Phred*. Los puntajes promedio de *Phred* están por encima de 30, por lo tanto, son apropiados para análisis posteriores. Lo que permite dar garantía de la interpretación y amplificación de los pares de bases para de las cuales a la fecha sean procesado 58 que cumplen los estándares para análisis transcriptómico (Ver Figura 3). El tamaño medio de la biblioteca de pares de bases es de 5.98 millones de lecturas, como lo indica la línea punteada en figura 4. Los resultados antes descritos fueron realizados, desarrollados por *Arjun Baghela PhD (c)* Department of Microbiology and Immunology, asignados por la University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Se describe el efecto de lote presente en la secuenciación identificado en el análisis del componente principal (En consecuencia, se realizó una corrección por lotes para reducir la variación en los genes afectados por el lote según lo determinado por un modelo lineal.) (Ver figura 5).

En la figura 6 se muestra la estrategia usada para clasificar los datos transcriptómicos obtenidos por endotipos según las rutas moleculares inferidas. Mediante la estrategia de agrupación (Clustering) *K-medoids* se identificaron y seleccionaron los genes más variables (1130) y agruparon 4 patrones de expresión génica alimentadas de vías de la base de datos *Reactome* (Ver figura 7).

En la figura 8. Se muestran Vías de expresión génica agrupadas por *cluster* para la cohorte de sepsis Colombia, los genes expresados por cada ruta obtenida según la base de datos *Reactome*. Se agruparon según vía dominante en: A. Señalización de interferón B. Señalización Interleucina C. Cascada Complemento/Membrana Extracelular D. Ciclo celular. El clúster 2 fue el de más casos con 19 pacientes.

## 9.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO POR ENDOTIPOS.

El clúster 4 presento los pacientes más jóvenes (Edad promedio: 32,5), en todos las mayoría fueron hombres como en el análisis demográfico general, en el análisis de las variables clínicas en las primeras 24 horas, en todos los grupos el promedio de temperatura no alcanzo valores de fiebre con la desviación estándar más amplia

en el clúster 4, más del 50% de todos los pacientes no tenían antibiótico previo al ingreso a urgencias, en el clúster 4 estaban la mayoría de paciente que ya tenían antibiótico. El clúster 1 fue el que tuvo el mayor número de pacientes con solo 2 criterios de SRIS y el 2 fue el único que tuvo pacientes con todos los criterios. Tan solo el 30%(18/58) de los pacientes en la sala de urgencias que tenían 2 o más puntos qSOFA, en el clúster 1 y 4 se encuentran la mayoría de los casos. Con respecto al conteo de leucocitos llama la atención que el clúster 2 tiene los valores de leucocitos más altos y el 4 los más bajos, el que presenta el conteo de neutrófilos más alto es el clúster 1. En relación a las variables hemodinámicas la TAM inicial se mantuvo > 65 en todos y el único grupo que requirió vas opresores fue el clúster 2, con relación a la disfunción de órgano el endotipo 1 presento los puntajes SOFA más altos (Ver tabla 6).

En las variables clínicas entre las 24-72 horas con respecto al conteo y diferencial de leucocitos no hubo cambios importantes igual que con las variables hemodinámicas (Ver tabla 6). El grupo que presento más casos con puntaje SOFA > 2 en las primeras 72 horas y posteriormente (>72 horas) fue el clúster 1. El endotipo con más casos de disfunción de órgano fue el 1 y el clúster 3 fue el grupo con más casos de mortalidad (6/58), seguido del 2 (3/58). En relación a los criterios de sepsis-3 el 41,3% (24/58) los cumplían siendo la mayoría en general del clúster 1 13% (8/58) y también el endotipo con más casos dentro del grupo con 61,5% (8/13) seguido del clúster 2 36,8% (7/19) (Ver tabla 8).

En relación al índice de masas corporal IMC todos los pacientes estuvieron en rango de normopeso o sobrepeso. El clúster con pacientes más comorbidos fue el grupo 4, los pacientes con diagnóstico de VIH estuvieron en el grupo 1 y 2 (ver tabla 8).

La mayoría de aislamientos microbiológicos confirmados se dio en el clúster 2 con una gran variedad de agentes bacterianos, virales (dengue), parasitarios (*e. histolytica*) y fúngicos (*candida tropicalis*), en el clúster 1 el germen más frecuente fue *klebsiella pneumoniae* y el mayor número de casos confirmados serológicamente de dengue fue en el cluster 4 con 4 casos. Con respecto al perfil de resistencia en el cluster 2 se encontró la mayor expresión de penicilinasas de alta expresión el grupo con mas carbapenemasas fue el 1(Ver tabla 9).

La distribución porcentual según el diagnóstico de egreso fue mayor para dengue con 15,5% (9/58) en todos los pacientes, en el clúster 4 represento la mayor cantidad de casos con el 66 % (6/9), seguido por neumonía 13,7% (8/58) este último represento la mayor cantidad de casos 26,3% (5/19) en el clúster 2, otros diagnósticos de enfermedades de predominio en países en vía de desarrollo como

leptospirosis quedaron en los clúster 1 y 2, y tuberculosis estuvieron solo en el clúster 2 (ver tabla 10).

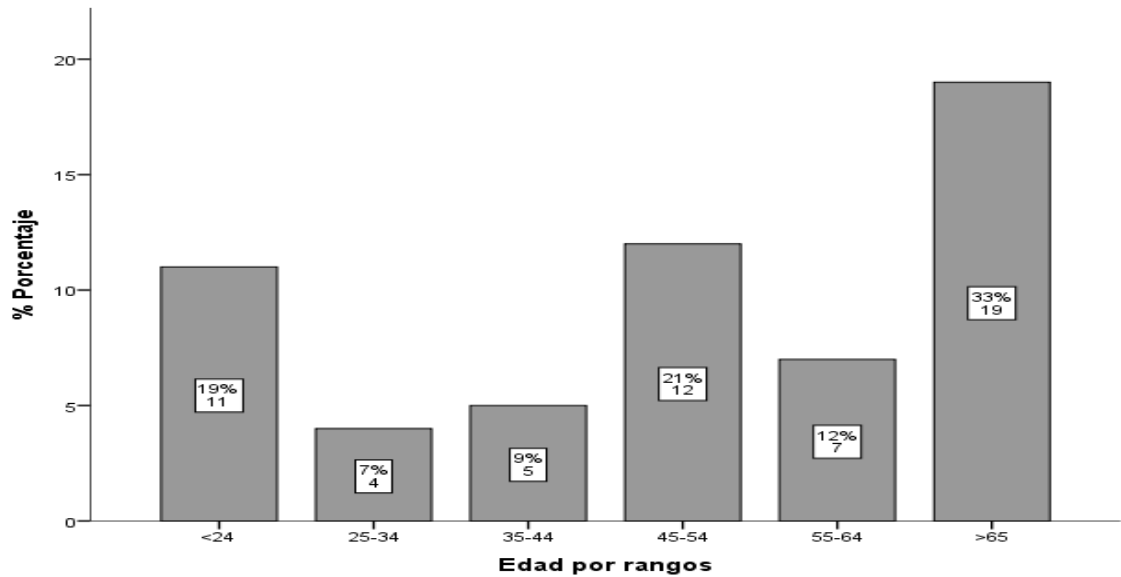
Cuando se realizó el análisis de asociación entre el desenlace primario según el cumplimiento de los criterios para Sepsis-3 solo se encontró asociación estadísticamente significativa con las siguientes variables: empeoramiento del SOFA después de 72 horas RR= 4,89 (IC 2,36-10,11,  $p= 0,000$ ), Daño de órgano RR= 3,6 (IC 2,2-5,7  $p=0,000$ ) y Hemocultivos positivos RR= 0,44 (IC 0,24-0,749  $p= 0,01$ ) (Ver tabla 11).

Al aplicar el análisis multivariado las variables clínicas que presentaron asociación estadística con cada clúster en la prueba Kruskal-Wallis fueron edad, qSOFA en la sala de urgencias, días de hospitalización y SOFA en las 72 horas de admisión (Ver tabla 11, figura 9, grafica 3 y 4).

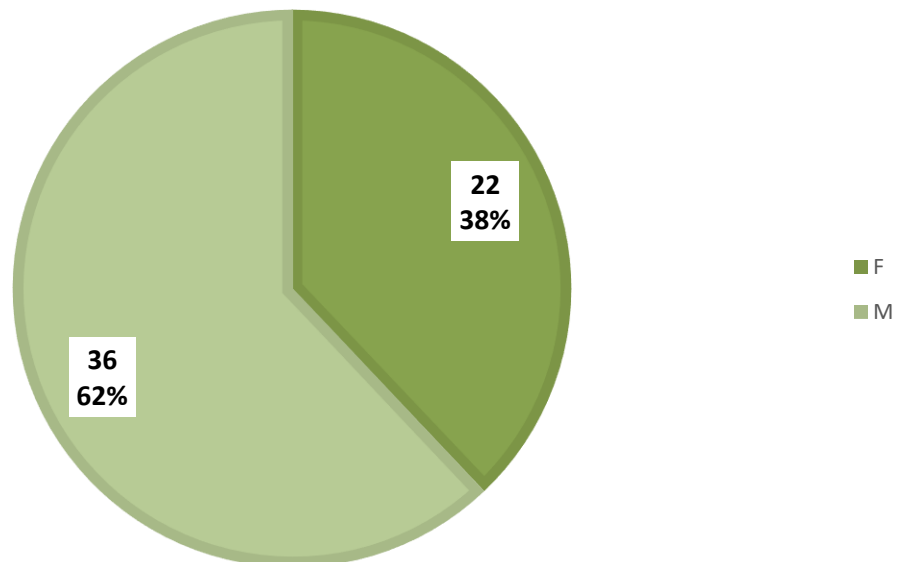
El clúster 1 presento el puntaje SOFA más alto con un promedio de 2.73, más estancia hospitalaria y menor expresión de vías moleculares relacionadas con el ciclo celular. El cluster 2 presento un puntaje de SOFA de moderado a alto con un promedio de 1.60, más ancianos, y mayor expresión de rutas de expresión de interferón. El clúster 3 presento el puntaje SOFA más bajo. Finalmente, el clúster 4 presento un puntaje SOFA de 1.5 alto a moderado, menor estancia hospitalaria y alta expresión de rutas relacionadas con el ciclo celular (Ver gráfica 5).

## 9.2 VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS

Grafica 3. Distribución porcentual por grupo etarios de los pacientes estudiados.

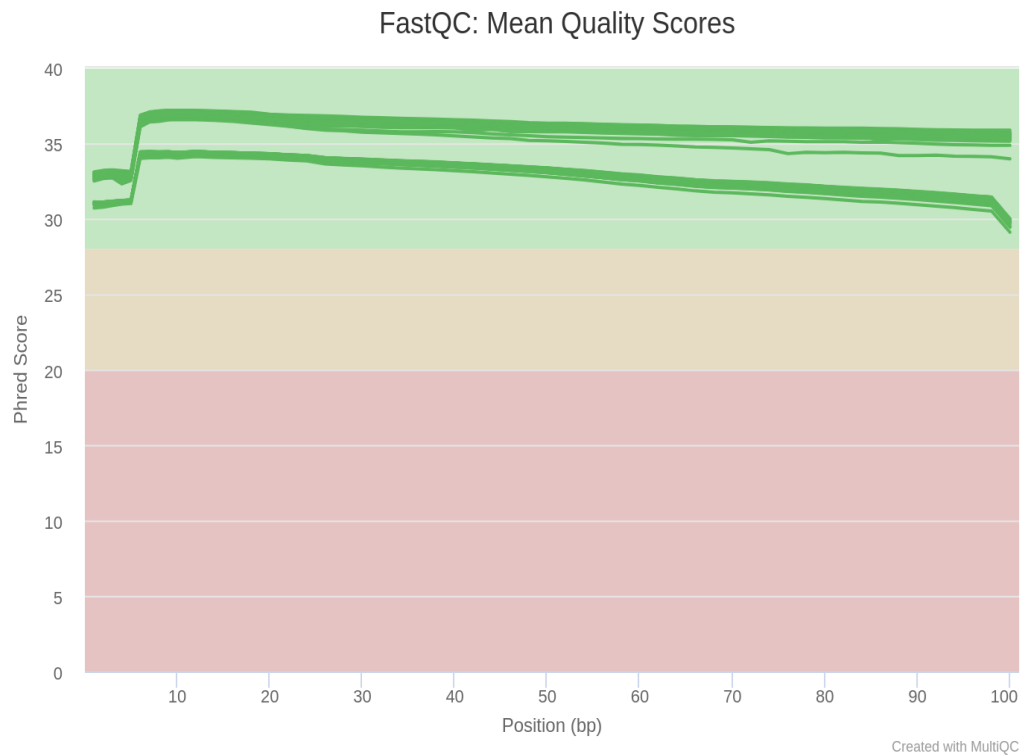


Grafica 4. Distribución porcentual según el sexo.



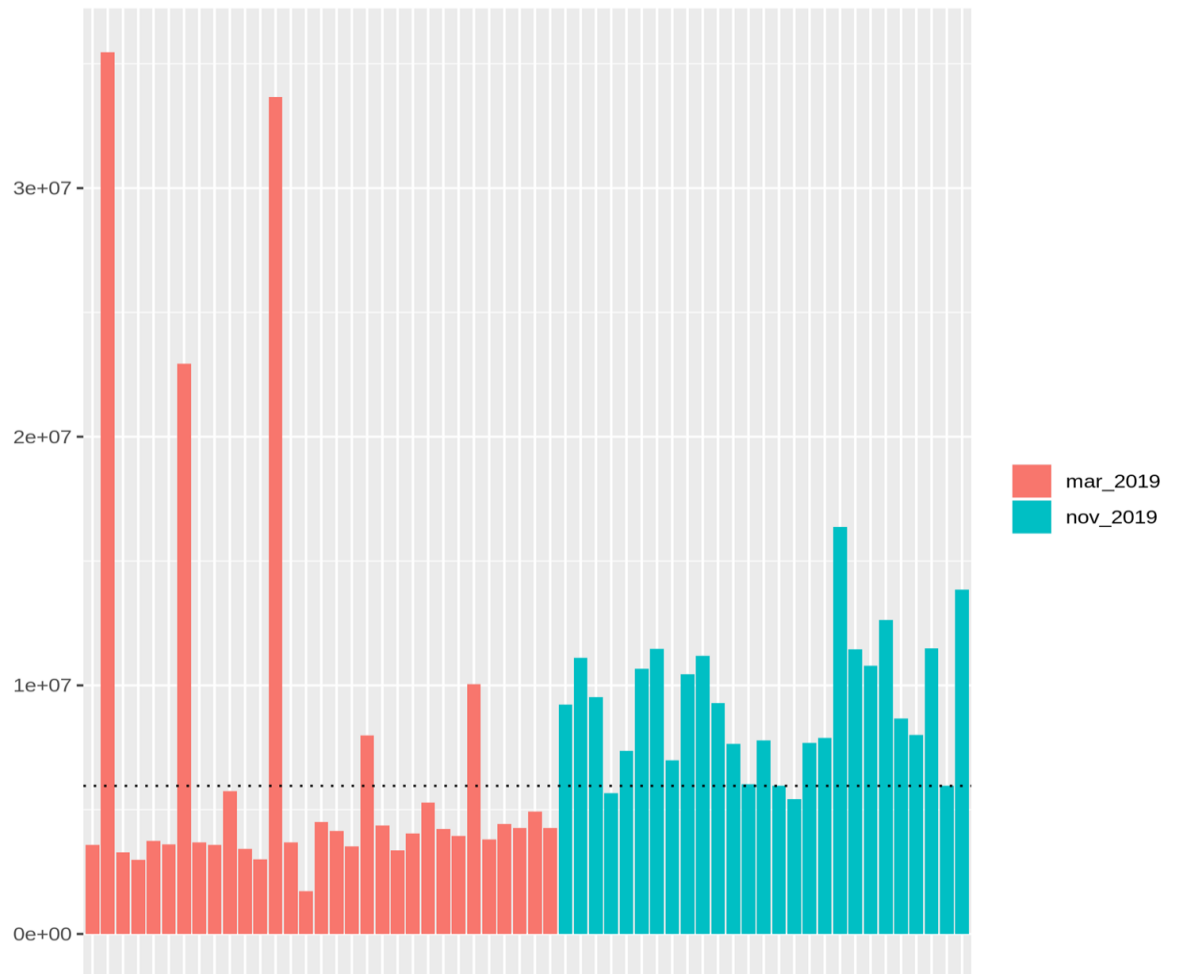
### 9.3 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DESCRIPTIVO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SEPSIS COHORTE COLOMBIA

Grafica 5. Puntaje promedio de *Phred* sobre una longitud de lecturas de 100 pb para cada muestra. Línea verde superior muestras Julio-agosto 2018 procesadas en equipo Illumina HiSeq Platform. Línea verde inferior muestras Marzo-abril 2019 procesadas en equipo Illumina NextSeq Platform.



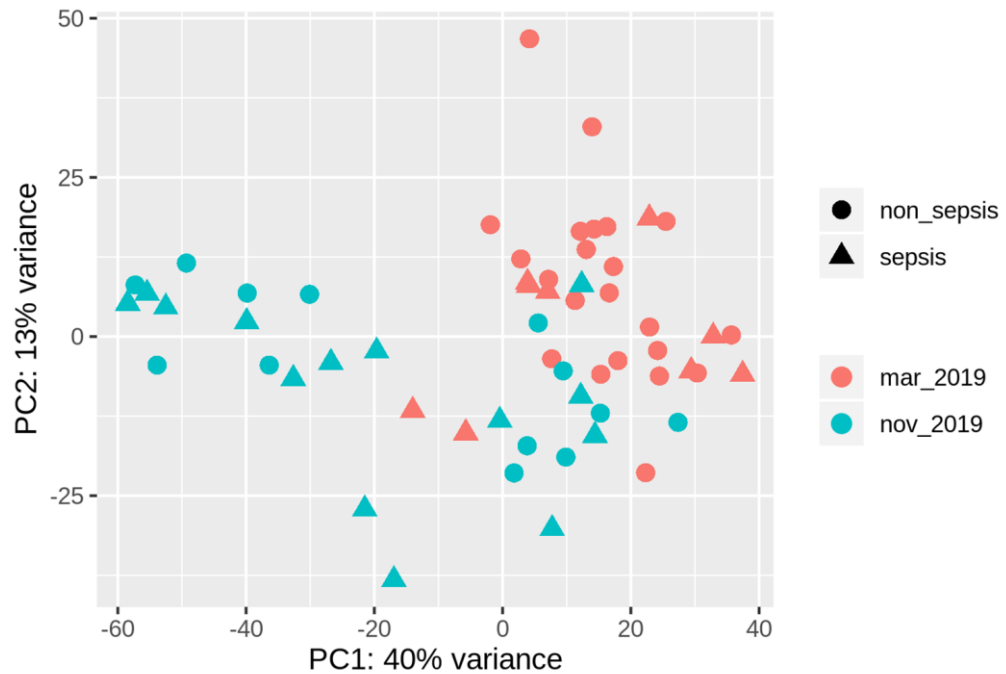
Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Grafica 6. Tamaños de los bloques de las bibliotecas para los dos lotes de secuenciación. En rojo el bloque de Julio-agosto 2018 secuenciado en marzo de 2019. En azul el bloque de marzo-abril 2019 secuenciado en noviembre de 2019.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Grafica 7. Efecto de lote presente en la secuenciación identificado en el análisis del componente principal.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.



Gráfica 8. Estrategia de análisis de datos de expresión génica, para identificar la presencia de endotipos.

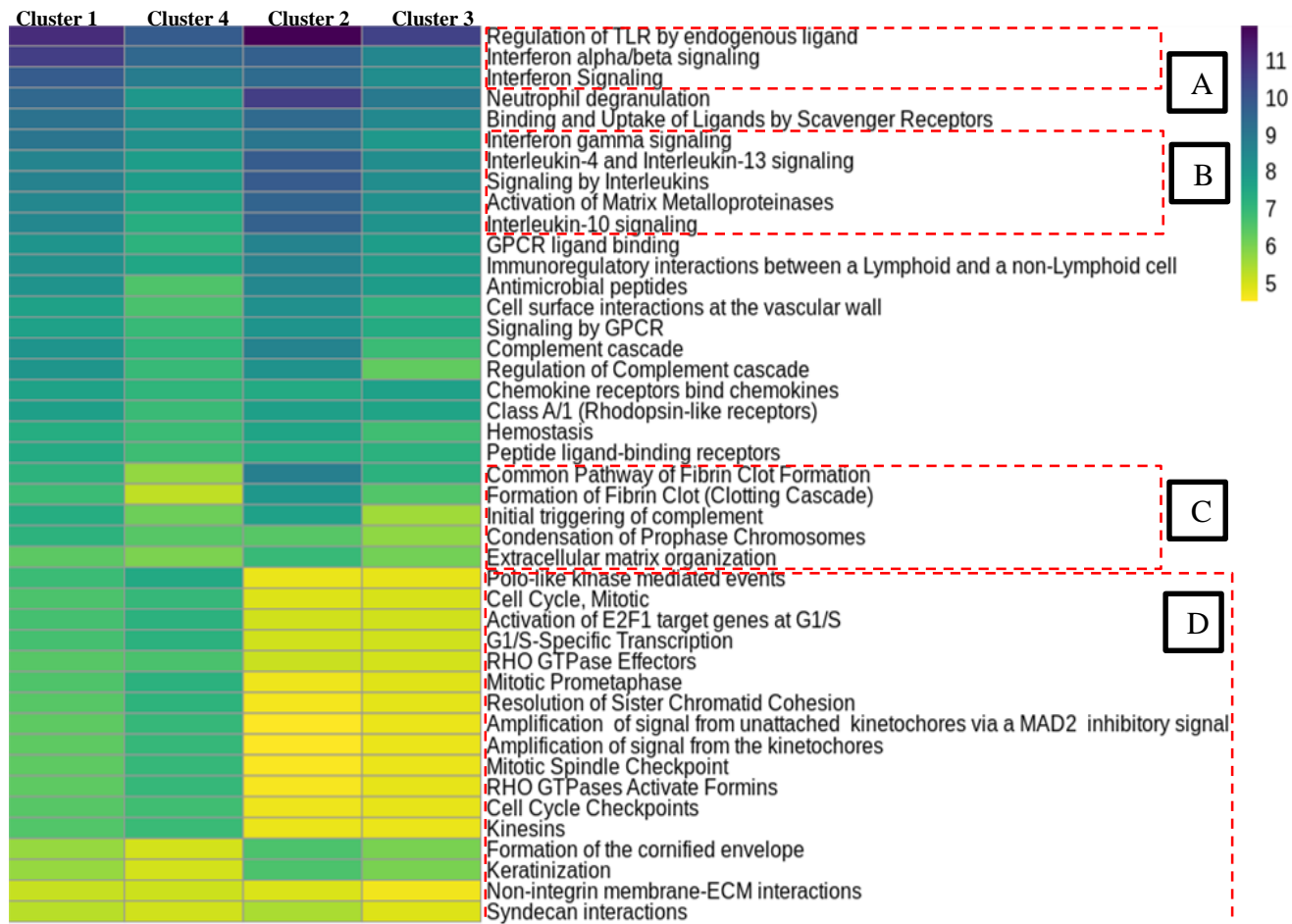


Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Tabla 7. Número de pacientes agrupados (Clúster) por patrones de expresión génica.

Clúster	1	2	3	4
Número de pacientes	13	19	17	9

Grafica 9. Vías de expresión génica agrupadas por cluster para la cohorte de sepsis Colombia. La intensidad del color hacia el azul refleja la intensidad de genes expresados por cada ruta obtenida según la base de datos Reactome. Agrupadas según vía dominante en: A. Señalización de interferón B. Señalización Interleucina C. Cascada Complemento/Membrana Extracelular D. Ciclo celular.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Tabla 8. Distribución de variables demográficas y clínicas según los cluster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia en < 24 horas después de la admisión a urgencias.

Demográficas	cluster 1 n=13	cluster 2 n= 19	cluster 3 n=17	cluster 4 n=9	p
Edad(DS)	45,9(21,2)	58,6( 20,89)	54,4 (22)	32,5(14,)	
Género Masculino (%)	10(76,9)	12(63,16)	10(58,2)	44,4(55,56)	0,477
<b>Clínicas</b>					
Temperatura(DS)	36,7(0,87)	37(1,18)	36,6(1,01)	36,7(1,1)	0,2199
No uso de antibióticos previo al ingreso (%)	11(84,62)	14(73,68)	15(88,24)	4(55,56)	0,245
Frecuencia cardiaca al ingreso (DS)	102(19)	103(19,5)	103(14,8)	93,3(13,1)	0,647
Frecuencia respiratoria al ingreso (DS)	21,4(2,02)	22,8(4,05)	22,4(371)	22,2(1,78)	
<b>SRIS (%)</b>					
1 (2 criterios)	6(46,15)	12(63,16)	11(64,71)	6(66,67)	0,387
2 (3 criterios)	7(53,85)	5(26,32)	6(35,29)	3(33,33)	
3 ( 4 Criterios)	-	2(10,53)	-	-	
<b>qSOFA (%)</b>					
0	2(15,38)	1(5,26)	4(23,53)	1(11,11)	0,027
1	5(38,46)	13(68,42)	12(70,59)	2(22,22)	
2	6(46,15)	5(26,32)	1(5,88)	6(66,67)	
<b>Conteo Total Leucocitos x 109L al ingreso (DS)</b>					
% Neutrófilos (DS)	7,444(4,62)	10,46(5,98)	9,4(4,13)	4,72(2,18)	0,003
% Eosinófilos (DS)	54,21(29,6)	40,94(38,1)	52,41(29,74)	17,23(22,07)	
% Linfocitos (DS)	0,84(1,3)	0,44(0,62)	1,07(1,06)	1,8(4,04)	
% Monocitos (DS)	15(15)	4,68(4,5)	14,8(12,9)	8,3(13,8)	
% Monocitos (DS)	3,5(5,1)	5,38(3,2)	2,36(2,29)	6,13(4,86)	
No uso de Vasopresor (%)	13(100)	18(94,74)	17(100)	9(100)	0,554
TAM	85,2(11,58)	81,6(16,52)	87,72(12,72)	85,47(11)	0,36
<b>Puntaje Glasgow (%)</b>					
13	1(7,69)	1(5,26)	1(5,88)	-	0,84
14	2(15,38)	2(10,53)	1(5,88)	-	
15	10(76,92)	16(84,21)	15(88,24)	9(100)	
<b>Puntaje SOFA &lt;24 horas</b>					
0	5(38,46)	9(47,37)	10(58,82)	3(33,33)	0,354
1	1(7,69)	1(5,26)	3(17,65)	2(22,22)	
2	-	5(26,32)	3(17,65)	3(33,33)	
3	2(15,38)	2(10,53)	1(5,88)	-	
4	3(23,08)	2(10,53)	-	1(11,11)	
5	1(7,69)	-	-	-	
6	1(7,69)	-	-	-	

Tabla 9. Distribución de clínicas según los clúster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia en 24-72 horas después de la admisión a urgencias.

Clínicas	cluster 1 n=13	cluster 2 n= 19	cluster 3 n=17	cluster 4 n=9	p
Conteo Total Leucocitos x 10 <sup>9</sup> L 24-72 h (DS)	6,7(5,0)	11,9(5,8)	11(4,9)	4,5(1,6)	0,00921
% Neutrófilos 24-72 hr (DS)	54,46(25)	38,5(38,02)	59,6(22,3)	9,7(16,2)	0,0023
% Basófilos 24-72 hr (DS)	0,9(0,4)	0,2(0,3)	0,79(0,64)	0,24(0,22)	0,000
% Eosinófilos 24-72 (DS)	1,21(0,8)	0,52(0,78)	1,12(0,9)	2,08(5,4)	0,000
% Linfocitos 24-72 hr (DS)	13,(6,6)	3,1(2,4)	20,1(13,7)	12,6(20,7)	0,000
% Monocitos 24-72 hr (DS)	8,4(5,78)	2,16(2,22)	7,3(3,3)	1,9183,6)	0,000
TAM 24-72 hrs % (DS)	87,3(6,5)	85,8(8,71)	85,6(10,3)	87,5(9,6)	0,52
<b>Puntaje de Glasgow 24-72 hr</b>					
9	-	1(5,56)	-	-	
14	-	1(5,56)	1(6,25)	-	0,00
15	12(100)	16(88,8)	15(93,75)	9(100)	
<b>Puntaje SOFA hasta las 72 hr (%)</b>					
0	3(25)	11(61,11)	14(87,5)	5(55,5)	
1	3(25)	3(16,67)	-	1(11,1)	
2	2(16,67)	3(16,67)	1(6,25)	2(22,2)	0,00
3	3(25)	1(5,56)	-	1(11,1)	
4	1(8,33)	-	1(6,25)	-	
<b>Puntaje SOFA después de 72 hr (%)</b>					
0	5(41,67)	13(76,47)	9(75)	4(44,44)	
1	1(8,33)	-	1(8,33)	3(33,33)	
2	-	2(11,76)	-	1(11,11)	0,00
3	5(41,67)	1(5,88)	-	-	
4	-	-	-	1(11,11)	
7	1(8,33)	1(5,88)	1(8,33)	-	
9	-	-	1(8,33)	-	
Evolución a DMO (%)	5(38,46)	3(15,79)	2(11,76)	1(11,11)	0,00
No Sobrevida al final de la hospitalización (%)	2(15,38)	3(15,79)	6(35,29)	1(11,11)	0,00
<b>Paciente con criterios Sepsis-3(%)</b>	8(61,54)	7(36,84)	4(23,53)	5(8)	0,95

Tabla 10. Distribución de IMC\*, comorbilidades e inmunosupresión según los clúster/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia.

Clínicas	cluster 1 n=13	cluster 2 n= 19	cluster 3 n=17	cluster 4 n=9	<i>p</i>
IMC (DS)	23,2(2,85)	23,61(4,19)	22,93(2,07)	23,72(2,53)	0,00
<b>Comorbilidades (%)</b>					
Diabetes	11(84,62)	13(68,42)	15(88,24)	9(100)	0,00
EPOC**	13(100)	15(78,95)	13(76,47)	9(100)	0,00
Cáncer	10(76,92)	19(100)	17(100)	9(100)	0,00
Cirugía reciente	13(100)	19(100)	13(76,47)	9(100)	0,00
Enfermedad renal crónica	10(76,92)	17(89,47)	15(88,24)	9(100)	0,00
Falla Cardíaca	13(100)	17(89,47)	16(94,12)	8(88,89)	0,00
Cardiopatía isquémica	12(92,31)	17(89,47)	17(100)	9(100)	0,00
<b>Inmunosupresión (%)</b>					
VIH*	2(15,38)	3(15,79)			0,00

\***IMC**: Índice de masa corporal; \*\***EPOC**: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. \***VIH**: Virus de inmunodeficiencia Humana.

Tabla 11. Distribución de tipo de cultivo, aislamiento microbiológico y perfil de resistencia según los clústeres/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia.

	clúster 1 n=13	clúster 2 n=19	clúster 3 n=17	clúster 4 n=9	<i>p</i>
<b>Tipo de cultivo</b>					
Hemocultivos (%)	9(69,23)	17(89,47)	14(82,35)	9(100)	0,00
Urocultivos (%)	13(100)	16(84,21)	16(94,12)	9(100)	0,00
Cultivo de esputo (%)	11(84,62)	16(84,21)	15(88,24)	9(100)	0,00
Otros cultivos (%)	11(84,62)	17(89,47)	16(94,12)	6(66,67)	0,00
<b>Patógeno</b>					
<i>candida tropicalis</i>	-	1(5,26)	-	-	
dengue	1(7,69)	1(5,26)	1(5,88)	4(44,44)	
<i>e. coli</i>	-	1(5,26)	1(5,88)	-	
<i>entamoeba histolytica</i>	-	1(5,26)	-	-	
<i>enterobacter cloacae</i>	-	1(5,26)	-	-	
<i>klebsiella pneumoniae</i>	3(23,08)	1(5,26)	-	-	
<i>proteus mirabilis</i>	1(7,69)	-	-	-	
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	1(5,88)	-	0,000
<i>s. aureus</i>	1(7,69)	1(5,26)	-	-	
<i>s. Epidermidis</i>	-	-	1(5,88)	-	
<i>s. haemolyticus</i>	-	-	1(5,88)	-	
<i>staphylococo hominis</i>	-	1(5,26)	-	-	
<i>streptococcus mittis</i>	-	-	1(5,88)	-	
<i>streptococcus acidominimus</i>	-	1(5,26)	-	-	
<b>Perfil de resistencia</b>					
BLEE	1(7,69)		1(5,88)		
Carbapenemasa	2(15,38)				
Meticilinoresistente	1(7,69)	2(10,53)	2(11,76)		0,000
Penicilinasa alta expresión	1(7,69)	5(26,32)			
Salvaje	1(7,69)		2(11,76)		

Tabla 12. Distribución de los diagnósticos al egreso según los clústeres/endotipos identificados en la cohorte de sepsis Colombia.

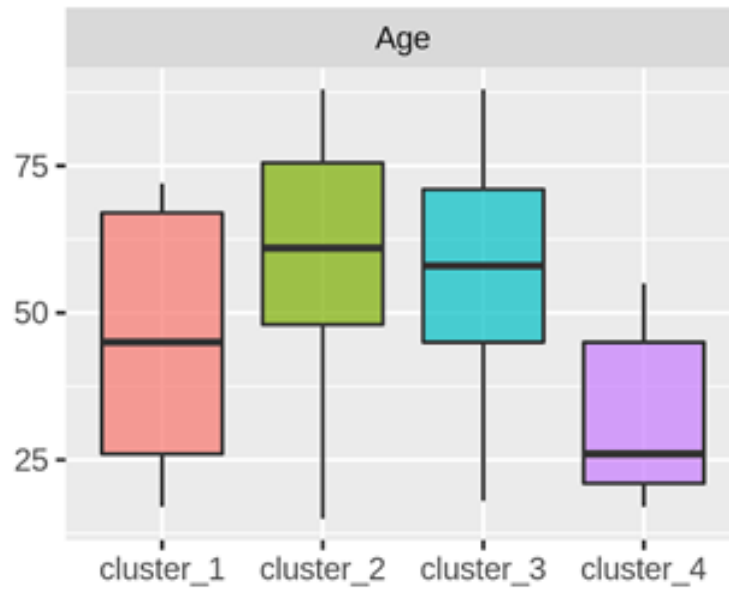
<i>Diagnostico</i>	cluster 1 n=13	cluster 2 n=19	cluster 3 n=17	cluster 4 n=9	<i>p</i>
Artritis séptica			1(5,88)		
bacteriemia			1(5,88)		
bacteriemia asociada a dispositivos	1(7,69)				
Choque séptico	1(7,69)	1(5,26)	1(5,88)	1(11,11)	
Criptococosis meníngea	1(7,69)				
Cuerpo extraño			1(5,88)		
Dengue	1(7,69)	2(10,53)	1(5,88)	6(66,67)	
Endocarditis			1(5,88)		
EPOC exacerbado			2(11,76)		
Fiebre de origen desconocido	1(7,69)	1(5,26)	1(5,88)	1(11,11)	
Gastroenteritis infecciosa	1(7,69)	2(10,53)		1(11,11)	
Hepatitis aguda	1(7,69)				
Infección de piel y tejidos blandos		2(10,53)	1(5,88)		0,00
Infección urinaria complicada	1(7,69)	1(5,26)	2(11,76)		
Leptospirosis	2(15,38)	1(5,26)			
Neoplasia	1(7,69)				
Neumonía		5(26,32)	3(17,65)		
Neumonía complicada			1(5,88)		
Otitis media supurativa	1(7,69)				
Peritonitis		1(5,26)			
Rechazo de transplante renal			1(5,88)		
Síndrome linfoproliferativo	1(7,69)				
Trombosis venosa profunda		1(5,26)			
Tuberculosis		2(10,53)			

Tabla 13. Riesgo relativo de desarrollar sepsis según criterios de Sepsis-3 en los pacientes estudiados.

VARIABLES DE RIESGO PARA SEPSIS-3			
	<b>RR</b>	<b>IC</b>	<b>p</b>
Sexo	0,98	0,52-1,85	0,95
Uso de antibioticos previos al ingreso	0,86	0,43-1,72	0,69
Alteracion del estado mental	0,58	0,10-3,29	0,49
Uso de vasopresores	0,4	0,29-0,55	0,22
Admision a hospitalizacion	0,58	0,28-1,18	0,11
Admision a UCI	0,4	0,29-0,55	0,22
Muerte	1,27	0,65-2,49	0,49
<b><u>Empeoramiento del SOFA despues de 72 horas</u></b>	<b>4,89</b>	<b>2,36-10,11</b>	<b>0,000</b>
<b><u>Daño de organo</u></b>	<b>3,6</b>	<b>2,2-5,7</b>	<b>0,000</b>
<b><u>Hemocultivos positivos</u></b>	<b>0,44</b>	<b>0,24-0,749</b>	<b>0,01</b>
Urocultivo	0,81	0,29-2,28	0,71
Cultivo de esputo	0,68	0,33-1,41	0,36
Diabetes	1,04	0,454-2,38	0,92
EPOC	1,76	0,50-6,08	0,31
Cancer	1,25	0,24-6,4	0,77
Cirugia reciente	1,7	0,3-9,5	0,49
ERC	0,68	0,33-1,41	0,36
Falla cardiaca	0,81	0,29-2,28	0,71
Cardiopatía isquemica	1,25	0,24-6,40	0,77

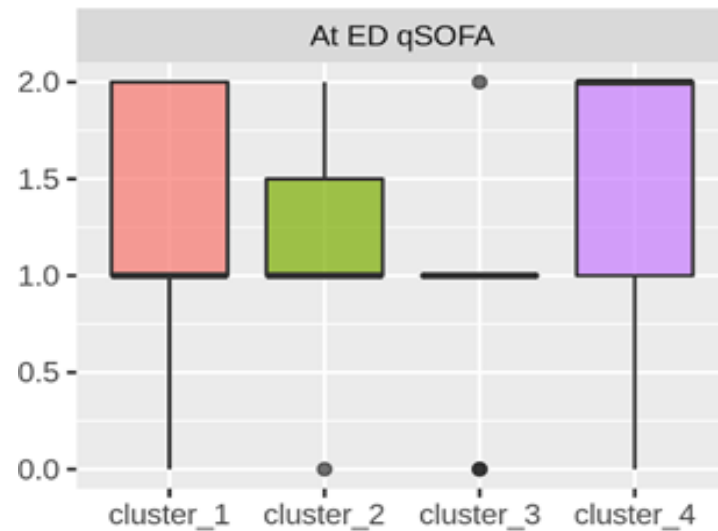


Grafica 10. Distribución en cajas y bigotes entre la edad y los clústeres.



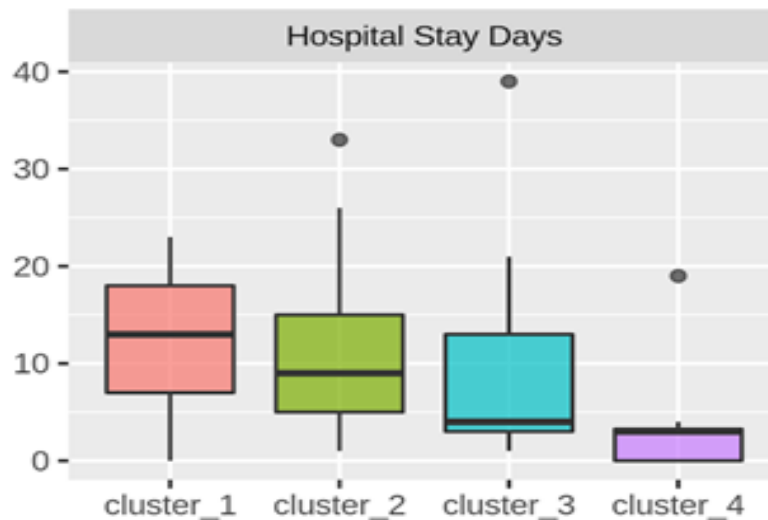
Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Grafica 11. Distribución en cajas y bigotes entre la qSOFA en la sala de urgencias y los clústeres.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Grafica 12. Distribución en cajas y bigotes entre los días de estancia hospitalaria en la sala de urgencias y los clústeres.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Grafica 13. Distribución en cajas y bigotes entre el puntaje SOFA a las 72 horas de observación en urgencias y los clústeres.



Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.

Tabla 14. Resumen de variables clínicas que presentaron asociación estadística con los cada cluster en la prueba Kruskal-Wallis para la Cohorte Sepsis Colombia.

CLUSTER	PROMEDIO DE SOFA	CARACTERÍSTICAS
1	2.73	SOFA scores Alto, Mas estancia hospitalaria, Baja expresión de vías del ciclo celular.
2	1.60	SOFA scores Intermedio, Mas ancianos, alta expresión de vías de Interferón
3	0.54	SOFA scores bajo
4	1.50	SOFA score Intermedio, estancia hospitalaria corta, alta expresión de rutas del ciclo celular

*Fuente: Análisis preliminar. Arjun Baghela PhD (c) Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia diseñado para Cohorte Sepsis Colombia.*

## 10. DISCUSION

El análisis transcriptómico preliminar de los pacientes de la cohorte de reprogramación celular para Colombia muestran patrones de señalización concordantes con los encontrados en cohortes independientes de pacientes con sepsis por parte de Pena y colaboradores, lo que ratifica la reproductibilidad de esta prueba en esta locación, los datos con respecto a la validación total de la prueba deben esperar los análisis generales de sensibilidad de la prueba (Pena et al., 2014; Pena et al., 2011).

La agrupación por endotipos según el perfil de señales identificadas también habla de la severidad de la sepsis y su avance a disfunción de órgano como se demostró los pacientes del clúster/endotipo 1 los cuales en correlación a un empeoramiento del SOFA abren la puerta para esta herramienta como un biomarcador molecular temprano de evolución a choque y disfunción orgánica. En ese mismo sentido toma relevancia como los endotipos tienen también correlación con el cumplimiento de los criterios de Sepsis-3, dato que se vio con mayor frecuencia en los pacientes del clúster 1. Otro dato importante es como a pesar de que los criterios de inclusión eran el cumplimiento SRIS, tan solo el 30% de estos tenían el qSOFA positivo, sin embargo de este 30% la mayoría de estos se encontraban en el endotipo 1 y 4 del cual el 1 fue el que se asoció con SOFA más alto en las 72 horas y más días de estancia hospitalaria (Lyle et al., 2014).

Como ya lo han demostrado múltiples autores la sepsis presenta dos fases que marcan la expresión génica que pueden ser simultáneos y que su identificación permite evaluar el proceso que predomina en los pacientes con sepsis ya sea hiperinflamación o inmunomodulación y de esta forma la amnesia celular previamente adquirida por exposición a moléculas microbianas de forma repetitiva genera una respuesta inapropiada a la noxa y una mayor posibilidad de desenlaces mortales en sepsis (Lyle et al., 2014). En el caso de nuestro estudio la señalización transcriptómica identificada permitió clasificar en 4 clusters en los cuales predominaron la señalización de interferón, señalización de interleucina, cascada del complemento y membrana celular y la señalización en relación al ciclo celular (Hotchkiss et al., 2013b).

Dentro de estos endotipos de reprogramación celular y su relación con la severidad del SRIS el clúster 1 que fue el más asociado con regulación a la baja de la expresión de genes del ciclo celular también mostro una mayor asociación con la severidad y la disfunción de órgano medida por el puntaje de SOFA, como lo han mostrado otros autores (Lyle et al., 2014; Pena et al., 2014; Zhang et al., 2010).

En ese mismo sentido se identificó en el endotipo 2 una alta expresión de señalización de expresión génica en relación a moléculas antiinflamatorias y sepsis severa con disfunción de órgano no tan altas, con puntajes SOFA modernamente altos.

Esta expresión génicas inflamatoria y anti-inflamatoria diversa vista a través de los diferentes endotipos como se mostró en la gráfica 10 ratifica que el nuevo paradigma frente al entendimiento de la fisiopatología de la sepsis cambio y estos procesos que antes eran evaluados e intervenidos con fracasos de forma independiente se dan en paralelo y más que una intervención objetiva se debe avanzar en una identificación temprana del endotipo que permita predecir el riesgo de evolución a disfunción de órgano y poder disminuir esa cifra poco modificada en el tiempo y es la mortalidad en choque séptico(Lyle et al., 2014; Tillmann & Wunsch, 2018).

La identificación temprana de los endotipos sin duda permitirá en algún momento de la historia poder identificar esos pacientes que se puedan beneficiar de terapias diana inmunomoduladoras que han fracasado desde la era de Schumer y que ahora vuelven a tomar relevancia en sus beneficios a algunos subgrupos en los análisis pos-hoc(Lyle et al., 2014; Schumer, 1976).

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentran que algunas variables clínicas no pudieron ser confirmadas por un segundo evaluador, ya que cuando se hacia el doble chequeo de la base de datos por parte de los investigadores, los pacientes ya habían egresado o muerto, esto incentivados por algunas variables clínicas como las antropométricas que a la hora de analizar se evidencia una ausencia de pacientes con obesidad, pero si con varios pacientes con enfermedad metabólica. El transporte de las muestras hasta Canadá y la no verificación de la calidad de las mismas por el grupo investigador en Colombia también, se plantean como una limitación que puede disminuir el número de muestras con criterios de calidad mínima para ser procesadas. Los resultados preliminares están sujetos de errores en la asociación estadística inicial que puede modificarse en el momento de los análisis de todos los datos del estudio multicéntrico lo cual se convierte en una limitación.

El rol de la reprogramación celular en infecciones virales aún se encuentra en estudio, los resultados preliminares de esta cohorte muestran un número alto de casos de dengue principalmente en el clúster 4 que tuvo una alta expresión de señalización de rutas del ciclo celular, al revisar en PUBMED la correlación entre estos mecanismos y el dengue solo se encuentra una posible hipótesis en relación a tensión baja de oxígeno a nivel celular lo que favorece la replicación de virus de

ADN y ARN como el dengue virus principalmente en hepatocitos, células epiteliales y monocitos, resaltando que las PMBC fueron la fuente de mARN en nuestro estudio para los análisis transcriptómicos, lo que plantea sin duda la posibilidad de usar esta prueba como biomarcador temprano de severidad en paciente con dengue en la sala de urgencias(Frakolaki et al., 2018).

En ese mismo sentido otras enfermedades infecciosas de predominio tropical y en países en vía de desarrollo como la tuberculosis pueden hacer parte de los avances que aporte esta prueba diagnóstica, ya que la reprogramación celular en los macrófagos involucrados en la formación del granuloma se viene estudiando y puede convertirse en un blanco terapéutico(Cronan et al., 2016). Por otro lado, frente a infecciones como leptospirosis en una búsqueda en PUBMED no se encuentra ningún artículo lo que plantea un reto en reprogramación celular y fiebre tropical.

El desarrollo de nuevas herramientas en la cabecera del paciente rápidas de bajo costo y con una sensibilidad y especificidad > 90 % como se espera lograr con esta prueba marcan el presente y futuro de la sepsis y terapéutica.

## 11. CONCLUSIONES

Existen diferencias claras en la expresión de vías entre los grupos identificados.

Calidad de secuencia buena, con tamaños de biblioteca promedio de aproximadamente 6 millones de lecturas.

Características de los endotipos consistentes con el análisis previo con otras cohortes.

Clúster / Endotipo 1 tiene puntuaciones SOFA más altas a las 24 horas y 72 horas, lo que indica un grupo de pacientes con sepsis más grave.

Los factores de riesgo asociados con el diagnóstico de sepsis según los criterios Sepsis-3 tienen relación directa con el empeoramiento del SOFA, el daño de órgano y la positividad de los hemocultivos.

## BIBLIOGRAFIA

- Arnold, C. (2018). News Feature: The quest to solve sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 3988-3991.
- Arsanios, D. M., Barragan, A. F., Garzón, D. A., Millán, F. C., Pinzón, J., Isaza, E. R., & Muñoz, C. A. (2017). Actualización en sepsis y choque séptico: nuevas definiciones y evaluación clínica. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*, 17(3), 158-183.
- Atkins, E., & Wood, W. B. (1955). Studies on the pathogenesis of fever: II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. *Journal of experimental medicine*, 102(5), 499-516.
- Beeson, P. B. (1946). Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 61(3), 248-250.
- Biswas, S. K., & Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology*, 30(10), 475-487.
- Bone, R. C., Fisher Jr, C. J., Clemmer, T. P., Slotman, G. J., Metz, C. A., Balk, R. A., & Group, M. S. S. S. (1987). A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 317(11), 653-658.
- Burrell, A. R., McLaws, M. L., Fullick, M., Sullivan, R. B., & Sindhusake, D. (2016). SEPSIS KILLS: early intervention saves lives. *Medical Journal of Australia*, 204(2), 73-73.
- Carswell, E., Old, L. J., Kassel, R., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3666-3670.
- Cavaillon, J.-M., & Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care*, 10(5), 233.
- Control, C. f. D., & Prevention. (1999). Control of infectious diseases. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 48(29), 621.
- Cronan, M. R., Beerman, R. W., Rosenberg, A. F., Saelens, J. W., Johnson, M. G., Oehlers, S. H., . . . Miller, S. E. (2016). Macrophage epithelial reprogramming underlies mycobacterial granuloma formation and promotes infection. *Immunity*, 45(4), 861-876.



Frakolaki, E., Kaimou, P., Moraiti, M., Kalliampakou, K., Karampetsou, K., Dotsika, E., . . . Bartenschlager, R. (2018). The Role of Tissue Oxygen Tension in Dengue Virus Replication. *Cells*, 7(12), 241.

Freudenberg, M. A., & Galanos, C. (1988). Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infection and immunity*, 56(5), 1352-1357.

Geroulanos, S., & Douka, E. T. (2006). Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive care medicine*, 32(12), 2077-2077.

Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013a). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet infectious diseases*, 13(3), 260-268.

Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013b). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 13(12), 862.

Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., . . . Karl, I. E. (1999). Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical care medicine*, 27(7), 1230-1251.

Lyle, N. H., Pena, O. M., Boyd, J. H., & Hancock, R. E. (2014). Barriers to the effective treatment of sepsis: antimicrobial agents, sepsis definitions, and host-directed therapies. *Ann NY Acad Sci*, 1323(101), e14.

Majano, G. (1991). The ancient riddle of sepsis. *J Infec Dis*, 163, 937.

Marshall, J. C. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends in molecular medicine*, 20(4), 195-203.

Marshall, J. C. (2018). Sepsis definitions: a work in progress. *Critical care clinics*, 34(1), 1-14.

Martin, G. S. (2012). Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(6), 701-706.

Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., & Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348(16), 1546-1554.

Maslove, D. M., Shapira, T., Tyryshkin, K., Veldhoen, R. A., Marshall, J. C., & Muscedere, J. (2019). Validation of diagnostic gene sets to identify critically ill patients with sepsis. *Journal of critical care*, 49, 92-98.

McHugh, L., Seldon, T. A., Brandon, R. A., Kirk, J. T., Rapisarda, A., Sutherland, A. J., . . . Thomas, M. R. (2015). A molecular host response assay to discriminate between sepsis and infection-negative systemic inflammation in critically ill patients: discovery and validation in independent cohorts. *PLoS medicine*, *12*(12).

Michalek, S. M., Moore, R. N., McGhee, J. R., Rosenstreich, D. L., & Mergenhagen, S. E. (1980). The Primary Role of Lymphoreticular Cells in the Mediation of Host Responses to Bacterial Endotoxin. *Journal of Infectious Diseases*, *141*(1), 55-63.

Ortíz, G., Dueñas, C., Rodríguez, F., Barrera, L., de La Rosa, G., Dennis, R., . . . Jaimes, F. (2014). Epidemiology of sepsis in Colombian intensive care units. *Biomedica*, *34*(1), 40-47.

Pena, O. M., Hancock, D. G., Lyle, N. H., Linder, A., Russell, J. A., Xia, J., . . . Hancock, R. E. (2014). An endotoxin tolerance signature predicts sepsis and organ dysfunction at initial clinical presentation. *EBioMedicine*, *1*(1), 64-71.

Pena, O. M., Pistolic, J., Raj, D., Fjell, C. D., & Hancock, R. E. (2011). Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *The Journal of Immunology*, *186*(12), 7243-7254.

Rautanen, A., Mills, T. C., Gordon, A. C., Hutton, P., Steffens, M., Nuamah, R., . . . Davenport, E. E. (2015). Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*, *3*(1), 53-60.

Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., & Finfer, S. (2017). Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *New England Journal of Medicine*, *377*(5), 414-417.

Rhee, C., Kadri, S. S., Danner, R. L., Suffredini, A. F., Massaro, A. F., Kitch, B. T., . . . Klompas, M. (2016). Diagnosing sepsis is subjective and highly variable: a survey of intensivists using case vignettes. *Critical Care*, *20*(1), 89.

Rhodes, A., Evans, L. E., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., Ferrer, R., . . . Nunnally, M. E. (2017). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive care medicine*, *43*(3), 304-377.

Rietschel, E. T., & Cavaillon, J.-M. (2002). Endotoxin and anti-endotoxin The contribution of the schools of Koch and Pasteur: Life, milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris). *Journal of endotoxin research*, *8*(1), 3-16.

- Rogers, D. E. (1959). The changing pattern of life-threatening microbial disease. *New England Journal of Medicine*, 261(14), 677-683.
- Russell, J. A., Rush, B., & Boyd, J. (2018). Pathophysiology of Septic Shock. *Critical care clinics*, 34(1), 43-61. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.005
- Schumer, W. (1976). Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Annals of surgery*, 184(3), 333.
- Seymour, C. W., Kennedy, J. N., Wang, S., Chang, C.-C. H., Elliott, C. F., Xu, Z., . . . Gomez, H. (2019). Derivation, validation, and potential treatment implications of novel clinical phenotypes for sepsis. *JAMA*, 321(20), 2003-2017.
- Singer, M. (2013). Biomarkers in sepsis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 19(3), 305.
- Tillmann, B., & Wunsch, H. (2018). Epidemiology and Outcomes. *Critical care clinics*, 34(1), 15-27. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.001
- van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P., & Netea, M. G. (2017). The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*, 17(7), 407.
- van Engelen, T. S. R., Wiersinga, W. J., Scicluna, B. P., & van der Poll, T. (2018). Biomarkers in Sepsis. *Critical care clinics*, 34(1), 139-152. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.010
- Venet, F., Rimmelé, T., & Monneret, G. (2018). Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Critical care clinics*, 34(1), 97-106. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.007
- Vincent, J.-L., & Grimaldi, D. (2018). Novel Interventions: Whats New and the Future. *Critical care clinics*, 34(1), 161-173. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.012
- Vincent, J.-L., Marshall, J. C., Namendys-Silva, S. A., François, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., . . . Njimi, H. (2014). Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *The lancet Respiratory medicine*, 2(5), 380-386.
- Wiemann, B., & Starnes, C. O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacology & therapeutics*, 64(3), 529-564.

Wong, H. R., Salisbury, S., Xiao, Q., Cvijanovich, N. Z., Hall, M., Allen, G. L., . . . Meyer, K. (2012). The pediatric sepsis biomarker risk model. *Critical Care*, *16*(5), R174.

Zhang, H., Zhao, C., Li, X., Zhu, Y., Gan, C. S., Wang, Y., . . . Sze, S. K. (2010). Study of monocyte membrane proteome perturbation during lipopolysaccharide-induced tolerance using iTRAQ-based quantitative proteomic approach. *Proteomics*, *10*(15), 2780-2789.