



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**

**EXPRESIÓN GÉNICA DE LA INMUNIDAD INNATA EN DOS MODELOS DE
INFECCIÓN EN HUMANOS: SEPSIS ABDOMINAL Y NEUMONÍA**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**P R E S E N T A :
CARLOS ANTONIO RODRÍGUEZ OSORIO**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO.
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**

**COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS.
DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA.
DRA. FLORENCIA VARGAS VORACKOVA †
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
La sepsis y sus complicaciones originan una morbi-mortalidad elevada	10
Importancia de las infecciones por bacilos Gram-negativos y del receptor tipo Toll 4	13
Las comorbilidades incrementan el riesgo de complicaciones y muerte entre los pacientes con sepsis.....	15
La interacción entre los patógenos y el hospedero desencadena modificaciones en la expresión génica de la respuesta inmune	17
Factores asociados con cambios en la expresión génica en sepsis	19
Controversias en las teorías de la respuesta inmune en sepsis	21
JUSTIFICACIÓN	26
Preguntas de investigación	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Población de estudio.....	30
Estudios de microbiología	32
Obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas.....	32
Aislamiento y cultivo de células mononucleares periféricas.....	33
Análisis de la expresión génica	35
a) Extracción y cuantificación de ácido ribonucleico total.....	35
b) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario	36
c) Selección del gen de referencia y cuantificación de la expresión génica por qPCR	37
Determinación de la concentración de citocinas en la secreción espontánea de CMN de sangre periférica	43
Cálculo de muestra y análisis estadístico	44

Consideraciones éticas y legales	46
RESULTADOS	47
Características clínicas y comorbilidades de los individuos estudiados	47
Características microbiológicas y tratamiento antimicrobiano de los individuos estudiados	49
Indicadores de disfunción orgánica y factores de riesgo para su desarrollo	50
Análisis de la correlación entre la expresión génica de marcadores inflamatorios y la comorbilidad	52
Análisis de la correlación entre la secreción espontánea de citocinas por las CMN periféricas y la comorbilidad	54
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	70
APÉNDICES	80
Apéndice 1. Definiciones operacionales	80
Apéndice 2. Escala de Evaluación Secuencial de Falla Orgánica (SOFA)	82
Apéndice 3. Índice de comorbilidad de Charlson	83
Apéndice 4.1. Consentimiento informado (paciente)	84
Apéndice 4.2 Consentimiento informado (responsable legal)	86
 ANEXO 1: PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO Y PRESENTACIÓN DE PÓSTER DERIVADOS DE ESTA TESIS	 88
 ANEXO 2: PROYECTOS EN DESARROLLO RELACIONADOS CON EL CAMPO DISCIPLINARIO DEL SUSTENTANTE	 91
 ANEXO 3: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON EL CAMPO DISCIPLINARIO DEL SUSTENTANTE	 95

ABREVIATURAS

ABC: área bajo la curva
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
ARN: ácido ribonucleico
BGN: bacilos Gram-negativos
CHOP: proteína homóloga C/EBP
CMN: células mononucleares
Cq: ciclo de cuantificación (quantification cycle)
DM: diabetes mellitus
dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato (deoxynucleotide triphosphates)
DTT: Ditiotreitól (Dithiothreitol)
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EUA: Estados Unidos de América
HMGB1: proteína de alta movilidad de la caja 1 (high mobility group box 1)
IC95%: intervalo de confianza al 95%
ICC: índice de comorbilidad de Charlson
IL: interleucina
LPS: lipopolisacáridos
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos (cytokine monocyte chemotactic protein-1)
NAC: neumonía adquirida en la comunidad
NAV: neumonía asociada a ventilación mecánica
NIH: neumonía intrahospitalaria
NLR: receptor tipo nucleótido unido a un dominio de oligomerización [nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor]

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)
PBS: solución salina amortiguada con fosfatos (Phosphate-buffered saline)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PD1: proteína de muerte celular 1 (programmed cell death protein 1)
PRR: receptores de reconocimiento de patógenos (pathogen pattern recognition receptors)
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR)
RIC: rango intercuartil
RLR: receptores tipo RIG-I (RIG-I-like receptors)
RM: razón de momios
rpm: revoluciones por minuto
RPMI: solución de Roswell Park Memorial Institute
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNP: polimorfismo de nucleótido único
SOFA: evaluación secuencial de falla orgánica (Sequential Organ Failure Assessment score)
SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
TLR: receptor tipo toll (toll like receptor)
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
UCI: unidad de cuidados intensivos
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Definiciones para el diagnóstico de sepsis	10
Cuadro 2. Mecanismos de inmunosupresión de algunas comorbilidades en pacientes con sepsis	17
Cuadro 3. Genes estudiados para ser usados como referente	38
Cuadro 4. Estadística descriptiva de 5 genes candidatos para ser usados como referente.....	39
Cuadro 5. Genes de la respuesta inmune innata estudiados	41
Cuadro 6. Estimación de las curvas de eficiencia para los genes estudiados	42
Cuadro 7. Características clínicas de los pacientes estudiados.....	48
Cuadro 8. Enfermedades de acuerdo al índice de comorbilidad de Charlson en los pacientes estudiados.....	48
Cuadro 9. Indicadores de disfunción orgánica en los pacientes estudiados	50
Cuadro 10. Análisis univariable: factores de riesgo potencialmente asociados con el desarrollo de disfunción orgánica (SOFA)	51
Cuadro 11. Análisis multivariable: factores de riesgo potencialmente asociados con el desarrollo de disfunción orgánica (SOFA)	51
Cuadro 12. Análisis univariable y multivariable de la asociación entre la disfunción orgánica (SOFA) con la expresión génica y la secreción espontánea de citocinas de las CMN.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de algunos de los diferentes receptores de reconocimiento de patógenos.	19
Figura 2. Teoría de la sepsis: hiperinflamación.	23
Figura 3. Teoría de la sepsis: inflamación sostenida.	24
Figura 4. Teoría de la sepsis: inmunosupresión.	24
Figura 5. Teoría de la sepsis: las comorbilidades afectan la respuesta inmune ...	25
Figura 6. Desviación estándar del Cq de los genes candidatos evaluados para ser usados como referente.	39
Figura 7. Correlación entre el índice de comorbilidad de Charlson y la magnitud de la disfunción orgánica.	52
Figura 8. Correlaciones entre el ICC y expresión génica de citocinas en el día 3 del proceso infeccioso.	53
Figura 9. Correlaciones entre el ICC y expresión génica de citocinas en el día 7 del proceso infeccioso.	53
Figura 10. Correlaciones entre el ICC y el área bajo la curva de la expresión génica de citocinas en la primera semana del proceso infeccioso.	54
Figura 11. Correlaciones entre el ICC y la expresión génica de TLR4 en la primera semana del proceso infeccioso.	55
Figura 12. Correlaciones entre el ICC y la pendiente de la secreción espontánea de citocinas en los días 0 a 3 del proceso infeccioso.	56
Figura 13. Correlaciones entre el ICC y la pendiente de la secreción espontánea de citocinas en los días 3 a 7 del proceso infeccioso.	56
Figura 14. Correlaciones entre el ICC y el área bajo la curva de la secreción espontánea de citocinas en la primera semana del proceso infeccioso.	57
Figura 15. Pendiente de la secreción espontánea de citocinas de los días 0 a 3 en pacientes sin comorbilidades (ICC = 0), con comorbilidades pero sin diabetes mellitus (ICC ≥ 1 Sin DM) y en pacientes con diabetes mellitus (ICC ≥ 1 Con DM).	58
Figura 16. Correlación entre la expresión génica de citocinas y la secreción espontánea de citocinas de las células mononucleares periféricas.	66

RESUMEN

Sepsis es la respuesta inflamatoria sistémica a una infección grave y ocasiona importante morbilidad, resultando en cientos de miles de muertes cada año. Muchos de estos enfermos requieren atención en las unidades de cuidados intensivos, y la sepsis abdominal y la neumonía son los diagnósticos infecciosos más frecuentes. A pesar de intensa investigación básica y clínica en las últimas décadas, los ensayos clínicos controlados han mostrado resultados desalentadores y actualmente no existen terapias específicas para esta condición. La edad y las comorbilidades crean una complejidad adicional, y son factores de riesgo independientes asociados con el pronóstico de los pacientes con sepsis. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos de estos factores no son entendidos completamente. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar, en una cohorte incipiente de pacientes con sepsis causada por bacilos Gram-negativos, la correlación de las comorbilidades con la función de las células mononucleares a través del análisis de la expresión génica de algunos marcadores de la respuesta inmune innata y la secreción espontánea de citocinas provenientes de éstas mismas células. Se incluyeron 26 pacientes con neumonía y/o sepsis abdominal. En 19 (65.3%) individuos se identificaron una o más enfermedades crónicas clasificadas de acuerdo al índice de comorbilidad de Charlson (ICC), diabetes mellitus fue la más prevalente (42.3%). Veinte (76.9%) enfermos desarrollaron algún grado de disfunción orgánica de acuerdo con la escala de evaluación secuencial de falla orgánica (SOFA). En el análisis

multivariable, las comorbilidades fueron el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo de insuficiencias orgánicas (RM= 2.99, IC95%=1.25-7.17, p=0.014). La expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β y TLR4, no tuvo alguna asociación significativa con la comorbilidad evaluada a través del ICC. Sin embargo, la correlación de la secreción espontánea de TNF- α (r= -0.44, p=0.03), IL-6 (r= -0.51, p=0.01), e IL-10 (r= -0.40, p=0.06) evaluadas en los primeros 3 días del proceso infeccioso, mostraron una relación inversa con el ICC. Lo anterior sugiere que las enfermedades crónicas podrían afectar la respuesta inmune innata durante los primeros días de la infección incrementando el riesgo para desarrollar más insuficiencias orgánicas durante un evento infeccioso.

ABSTRACT

Sepsis is the systemic inflammatory response to a serious infection and causes significant morbidity, resulting in hundreds of thousands of deaths each year. Many of these patients require treatment in intensive care units, and intra-abdominal sepsis and pneumonia are the most common infections. Despite extensive basic and clinical research in recent decades, controlled clinical trials have shown disappointing results, and currently there is no specific therapy for this condition. The age and comorbidities are independent risk factors associated with the poorest prognosis of the patients with sepsis, and create an additional complexity. However, the pathophysiology of these factors is not fully understood. Therefore, the objective of this study was to evaluate, in a cohort of patients with sepsis caused by Gram-negative bacilli, the association of comorbidities with the function of peripheral mononuclear cells through the analysis of gene expression of some markers of the innate immune response and the spontaneous secretion of cytokines from these same cells. We included 26 patients with abdominal sepsis or pneumonia. Nineteen (65.3%) individuals had one or more chronic diseases classified according to the Charlson comorbidity index (CCI), diabetes mellitus was the most prevalent (42.3%) disease. Twenty (76.9%) patients developed some degree of organ dysfunction as assessed by the Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA). In the multivariate analysis, comorbidities were the most important independent risk factor for the development of organic failure (OR = 2.99, IC95%=1.25 - 7.17, p = 0.014). Gene expression of TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β

and TLR4, did not have any significant association with co-morbidity evaluated through the CCI. However, the correlation of the spontaneous secretion of TNF- α ($r = - 0.44$, $p = 0.03$), IL-6 ($r=-0.51$, $p=0.01$), and IL-10 ($r = - 0.40$, $p = 0.06$) evaluated in the first 3 days of the infectious process, showed an inverse relationship with the ICC. These findings suggest that chronic diseases affect the innate immune response during the first days of the infection increasing the risk of organic failures during and infectious event.

INTRODUCCIÓN

La sepsis y sus complicaciones originan una morbi-mortalidad elevada

La infección y sus complicaciones son causas frecuentes de morbilidad y la mortalidad asociada a ellas sigue siendo inaceptablemente elevada. Las infecciones se han clasificado de acuerdo a su gravedad usando una serie de definiciones de consenso las cuales se publicaron en 1992 (cuadro 1) ^{1, 2}. Esta terminología ha permitido estandarizar la nomenclatura para referirse a la infección y sus complicaciones, así, estudios posteriores han documentado su implicación pronóstica al confirmar que a mayor gravedad de la enfermedad, mayor mortalidad

3-5

Cuadro 1. Definiciones para el diagnóstico de sepsis *

Denominación	Definición
Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)	Al menos dos de los siguientes criterios, temperatura >38 o <36°C, frecuencia cardíaca >90 latidos por minuto, frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o PaCO ₂ <32 mmHg y cuenta leucocitaria >12,000 o <4, 000/mm ³ o >10% de formas inmaduras.
Sepsis	Es la presencia síndrome de respuesta inflamatoria sistémica más algún foco infeccioso identificado o sospechado.
Sepsis grave	Es la presencia de sepsis, más disfunción de al menos un sistema orgánico.**
Choque séptico	Es la presencia de sepsis más hipotensión arterial refractaria a la reanimación hídrica que requiere del uso de fármacos vasopresores.
* Modificado de la referencia ² .	
**La disfunción de los sistemas orgánicos se define de acuerdo a la escala de Evaluación Secuencial de Falla Orgánica (ver escala SOFA en apéndice 2).	

La sepsis es la decimoprimer causa de muerte en los Estados Unidos de América (EUA) ⁶ y la decimoséptima causa de muerte de adultos en México ⁷; sin incluir entidades infecciosas como las neumonías. Dos estudios epidemiológicos realizados en los EUA estimaron que ocurrieron entre 51 y 95 casos de sepsis grave por 100,000 hab ⁸ con una incidencia de ~750,000 casos anuales ⁹. Además, se identificó que la incidencia de sepsis se incrementó de 73.6 casos/100,000 pacientes en 1979 a 175.9 casos/100,000 en 1989. Este fenómeno se atribuyó al incremento de la prevalencia de los pacientes con VIH/SIDA, a un mayor uso de los dispositivos intravasculares y una mejor capacidad para identificar y diagnosticar sepsis ⁹.

La mortalidad es variable entre los estudios, sin embargo está directamente relacionada con el estadio de la enfermedad y se reporta entre el 11 y el 36% para los pacientes con sepsis, entre el 20 y el 46% para los pacientes con sepsis grave y entre el 46 y el 86% en los pacientes con choque séptico ^{3-5, 9, 10}. Por otro lado, se ha podido identificar en diversos países, que los sitios de infección causantes de los síndromes clínicos de mayor gravedad son el pulmón (41%), el abdomen (32%), los huesos y articulaciones (13%), y el tracto urinario (11%) ¹⁰.

Las personas que desarrollan infecciones graves manifestadas por sepsis grave y/o choque séptico usualmente requieren tratamiento en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) por lo que algunos datos epidemiológicos de las infecciones en esas unidades pueden reflejar el impacto de las mismas. En México existen dos reportes sobre la prevalencia de las infecciones en diversas UCI. En el estudio transversal realizado por Ponce de León Rosales y colaboradores ¹¹, se pudo observar que el 58.2% de los pacientes internados en la UCI presentaron

alguna infección y de éstas 20% fueron adquiridas en la comunidad, 40% adquiridas en la UCI y el resto adquiridas en hospitalización. El segundo estudio ¹² identificó que 11,183 casos requirieron atención en diversas UCI de México en un año, y estos casos representaron el 27.3% de todos los ingresos. Las infecciones más frecuentes en ambos estudios fueron las neumonías (33-38%), infecciones intraabdominales (6-47%), de tejidos blandos (8-13%) y del tracto urinario (5-16%). Adicionalmente, se identificó que la mortalidad global fue del 30.4% ¹², y del 31.1%, 17.8%, 45.7% y 55.6% para SRIS, sepsis, sepsis grave y choque séptico, respectivamente ¹¹.

Los costos asociados a la atención de estos pacientes son muy elevados. De acuerdo con evaluaciones realizadas en los EUA, éstos fueron de \$16.7 billones de dólares estadounidenses en 1995 y, aunque el costo promedio por paciente fue de 22,100 dólares, los enfermos que desarrollaron cuatro o más fallas orgánicas emplearon en promedio \$32,800 dólares cada uno ¹³. Adicionalmente, a partir del análisis de los costos hospitalarios en diversos hospitales de los EUA (desde 2001 a 2007), se determinó que la septicemia fue la condición en la que se observó el mayor incremento de los costos directos (174%), y la enfermedad en la que se observaron los costos directos más altos (\$12.3 billones de dólares estadounidenses) ¹⁴. En México se estimó que los costos de la atención de estos

pacientes en la UCI ascendieron a 9,769 millones de pesos mexicanos en un año ¹².

Aunque se ha observado disminución del riesgo de muerte de los pacientes con sepsis en algunos estudios, la tasa de fatalidad para sepsis grave y choque séptico continúan siendo elevadas ¹⁵. En múltiples estudios clínicos se han

evaluado decenas de tratamientos para sepsis, sin embargo, a pesar de esos esfuerzos, no ha sido posible identificar alguna terapia específica para este grupo de pacientes ¹⁶. Algunos investigadores han considerado que la aparente reducción de las tasas de mortalidad está posiblemente vinculada con la detección oportuna de los pacientes con sepsis y con el uso oportuno de los antimicrobianos ^{16, 17}; además, existe concordancia entre los expertos en la necesidad de entender la inmunopatogénesis de la sepsis para generar nuevas hipótesis que puedan culminar en el desarrollo de terapias potencialmente útiles para estos enfermos ¹⁶⁻¹⁹.

Importancia de las infecciones por bacilos Gram-negativos y del receptor tipo Toll

4

Las infecciones causadas por bacilos Gram-negativos (BGN) son problemas graves en todo el mundo. En un estudio se observó que en aquellos pacientes en los que se identificó algún agente etiológico, los BGN ocasionaron el 40% de los casos de sepsis y, de éstos, 67% fueron atribuidos a enterobacterias, el 25% a *Pseudomonas spp* ²⁰, y el resto a otros gérmenes. En otro estudio ¹⁰, el 44% de las bacteriemias fueron causadas por BGN, y de éstas, *E. coli* fue el agente causal en el 85% de los casos. Por otro lado, se pudo identificar que en este grupo de pacientes, la bacteriemia ocurrió en 45% de estos casos ²⁰ y que la probabilidad de desarrollar choque séptico fue sustancialmente mayor (50-60%) que en los pacientes con funguemia o con infecciones por gérmenes Gram-positivos (5-10%)

²¹.

El origen de las infecciones por bacterias Gram-negativas, es un aspecto de gran importancia, y se encuentra ligado con la colonización de la mucosa del tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, particularmente en los pacientes que reciben tratamiento antimicrobiano de amplio espectro. La sobrepoblación con bacterias resistentes incrementa la posibilidad de translocación de las mismas o de sus productos ²², siendo los lipopolisacáridos (LPS), los componentes más importantes ²³. En las neumonías, los BGN tienen un papel importante y causan hasta el 60% de las neumonías de adquisición intrahospitalaria, de las asociadas a ventilación mecánica ²⁴⁻²⁶ y hasta el 22% de las neumonías adquiridas en la comunidad ^{27, 28}. En cualquiera de estos escenarios, podrían estar asociadas a una evolución clínica desfavorable y a una mayor mortalidad en comparación con las neumonías causadas por otro tipo de gérmenes ^{24, 25, 27, 28}. En la fisiopatología de la sepsis abdominal, los gérmenes involucrados en las fase temprana son principalmente BGN (especialmente *E. coli*) y estos pueden explicar la mortalidad en esta etapa de la enfermedad. En la fase tardía (días a semanas), la presencia de BGN, anaerobios obligados (*B. fragilis*) y posiblemente otros microorganismos (e.g. Enterococci) son los responsables de la formación de abscesos ²⁹. Por lo anterior, es esperable que los BGN sean los agentes predominantes en la primera semana de la sepsis abdominal.

Los BGN poseen en su membrana celular una o dos capas de peptidoglucanos lo cual les confiere su coloración específica en la tinción de Gram. Su membrana celular está cubierta por una capa de proteínas y enzimas que se denomina periplasma y sobre ella se encuentra una membrana externa la cual contiene diversas proteínas y LPS. Estos últimos, representan la estructura antigénica más

importante y constituyen una endotoxina que es capaz de reproducir los síndromes de sepsis grave y choque séptico ³⁰. La endotoxina es la parte biológicamente activa de los LPS que es reconocida por el hospedero a través del complejo de proteínas asociadas con el receptor tipo Toll 4 (TLR4) ³¹. Dos polimorfismos (299G/399I) de nucleótido único (SNP), han sido vinculados con una mayor predisposición para desarrollar infecciones por BGN ^{32, 33} y con mayor riesgo para desarrollar sepsis grave o choque séptico comparados con los pacientes con los alelos D299 y T399 ³⁴⁻³⁶. Sin embargo, esta asociación no ha sido reproducida en diferentes poblaciones ³⁷, por lo que otros factores como la edad, las comorbilidades o el estado nutricional podrían tener mayor relevancia para el desarrollo de complicaciones en los pacientes con sepsis.

Las comorbilidades incrementan el riesgo de complicaciones y muerte entre los pacientes con sepsis

Diversos factores modifican el pronóstico de los pacientes con sepsis, sin embargo, en varios estudios las comorbilidades y la edad han sido consistentemente factores de riesgo independientes para el desarrollo de complicaciones tales como falla orgánica, reinternamiento hospitalario y muerte ³⁸⁻⁴⁴. Por ejemplo, se ha identificado que la supresión del sistema inmune, el cáncer, la infección por VIH/SIDA, la falla hepática y la dependencia de alcohol son algunos de los factores de riesgo vinculados con un mayor riesgo de muerte ^{8, 9, 45-47}. Adicionalmente, se ha identificado en modelos animales que estos enfermos tienen además múltiples mecanismos de inmunosupresión desencadenados por la

enfermedad *per se* o por los tratamientos que reciben. En humanos, diversos estudios observacionales han revelado la presencia de comorbilidades crónicas en 54-65% de los pacientes con sepsis ^{8, 9, 39}. Asimismo, en un registro internacional que incluyó 12,000 individuos mostró que los pacientes con sepsis grave tenían una elevada frecuencia de enfermedades crónicas, principalmente diabetes (23%), enfermedad pulmonar crónica (17%), cáncer activo (16%), insuficiencia cardiaca congestiva (14%), insuficiencia renal (11%) y enfermedad hepática crónica (7%) ⁴⁸. Por otro lado, se ha observado que algunas de estas comorbilidades no están representadas por igual en los diferentes grupos raciales. Por ejemplo, en un estudio realizado en los EUA, se identificó que en los pacientes afroamericanos con sepsis, las enfermedades crónicas más prevalentes fueron diabetes, infección por VIH e insuficiencia renal crónica; por el contrario, en sujetos caucásicos, las enfermedades con mayor prevalencia fueron cáncer y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ³⁹.

Los mecanismos y efectos de cada comorbilidad no son entendidos completamente, sin embargo varios estudios han identificado algunas alteraciones en el sistema inmune, tanto en modelos animales de infección como en estudios observacionales en humanos con diabetes, EPOC y otras enfermedades (cuadro 2). Por ejemplo, se ha identificado que los pacientes con diabetes tienen diversos defectos inmunes como la reducción de la fagocitosis y la inmunidad celular ⁴⁹. Estudios preclínicos demostraron que un grupo de ratones diabéticos que murieron de sepsis no produjeron una respuesta sistémica de citocinas similar a la de los ratones sin diabetes ⁵⁰. En otras enfermedades como la cirrosis, se ha podido identificar que los pacientes con cirrosis alcohólica tienen deterioro de

diversos mecanismos de la inmunidad como alteraciones de la fagocitosis de los neutrófilos, así como de la eliminación de patógenos intracelulares una vez que han sido fagocitados ⁵¹.

El estudio de las enfermedades crónicas es imprescindible dado que en el grupo de pacientes mayores de 65 años las enfermedades crónicas tienen una alta prevalencia y este grupo de enfermos tienen incremento significativo del riesgo de fallecer por sepsis ⁵². Lo anterior sugiere que la interacción de ambos factores podría afectar la respuesta inmunológica y el pronóstico de estos enfermos. Sin embargo, el número de publicaciones con algún análisis de la respuesta inmune con respecto a las comorbilidades y la categorización de subgrupos clínicos en la evaluación de estrategias terapéuticas, ha sido bajo.

Cuadro 2. Mecanismos de inmunosupresión de algunas comorbilidades en pacientes con sepsis	
Comorbilidad	Mecanismos
Diabetes	Reducción de la fagocitosis y de la inmunidad celular.
Cáncer	Neutropenia inducida por quimioterapia.
Cirrosis	Deficiencia del complemento, deterioro de la función de los neutrófilos e inmunosupresión mediada por prostaglandinas ⁵³ .
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Deterioro importante de la fagocitosis en macrófagos pulmonares.
Enfermedad renal crónica terminal	Deterioro de las funciones del sistema inmune innato y adaptativo.
Modificado de Iskander, et al. ⁵⁴	

La interacción entre los patógenos y el hospedero desencadena modificaciones en la expresión génica de la respuesta inmune

En la fase inicial de la respuesta inmune en contra de diversos agentes microbianos, el sistema inmunológico reconoce la presencia de patógenos y

desencadena una serie de mecanismos encaminados a eliminarlos. Esta interacción es compleja e involucra diferentes líneas celulares, moléculas y vías de señalización intracelular. Brevemente, las células de la respuesta inmune como los monocitos/macrófagos y las células dendríticas, entre otras, poseen diversos receptores que permiten el reconocimiento de diferentes tipos de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Los PAMP, son características distintivas que presentan algunas moléculas de los patógenos las cuales permiten su identificación como agentes extraños por otros organismos (e.g. el lípido A de los lipopolisacáridos o la flagelina) ⁵⁵. Diferentes clases de proteínas localizadas en la membrana celular o en los endosomas de las células del sistema inmune reconocen diferentes tipos de PAMP y se les denomina en forma genérica Receptores de Reconocimiento de Patógenos (pathogen pattern recognition receptor, PRR). Estos receptores tienen estructuras moleculares distintas y se pueden categorizar en varias familias (figura 1): a) los receptores tipo Toll (TLR); b) los receptores de la familia de proteínas que contienen un Nucleótido unido a un Dominio de Oligomerización (NLR); y c) los receptores intracelulares que contienen un dominio de helicasa de ácido ribonucleico (ARN) y dominios para el reclutamiento de caspasas (RLR) ⁵⁶. Estos grupos de PRR permiten detectar patógenos extracelulares o intracelulares, así como moléculas endógenas, desencadenando la respuesta inmune innata y adaptativa ⁵⁵. Cada uno de estos sistemas permite identificar a patógenos específicos, y en algunos casos, los gérmenes pueden ser detectados por más de un sistema ⁵⁷. Se ha demostrado en modelos animales y en humanos que la interacción PAMP – PRR desencadena una serie de cambios en la expresión

génica (activación o represión) de diversos genes incluyendo los relacionados con la inmunidad innata y adquirida, el metabolismo y la apoptosis ^{58, 59}. Estos cambios finalmente conllevan a la iniciación y regulación de los múltiples mecanismos involucrados en la respuesta a patógenos.

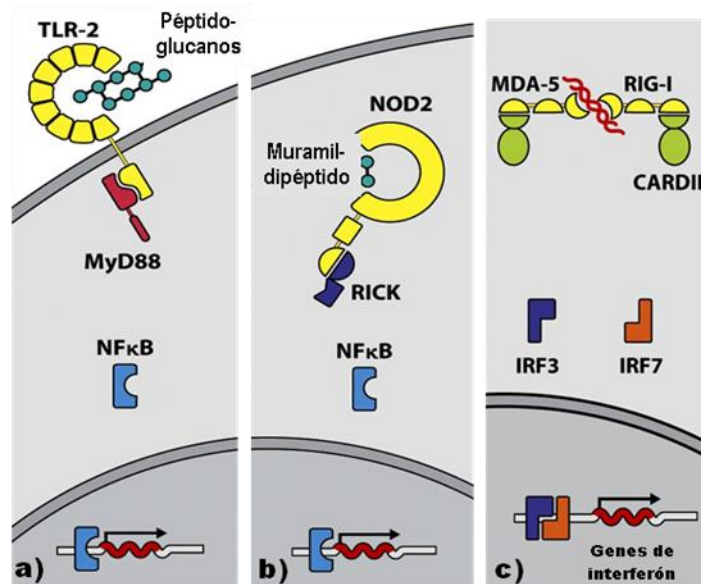


Figura 1. Representación esquemática de algunos de los diferentes receptores de reconocimiento de patógenos.

a) TLR2 como ejemplo de los TLR. El TLR2 reconoce a PAMP péptidoglucanos; **b)** Los receptores NLR (denominados también NOD) realizan el reconocimiento de Muramildipéptido; **c)** El receptor RIG-I reconoce ARN de doble cadena. **Abreviaturas:** CARDIF: Dominio de activación y reclutamiento de caspasas inductor de interferón-B; NF-κB: Factor nuclear kappa-B; IRF3 y 7: factores reguladores de interferón 3 y 7; MDA-5: proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma; MyD88: Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide; RICK: dominio de reclutamiento de caspasas que contiene una cinasa de serina/treonina Rip2; RIG-I: gen inducible por ácido retinoico-I. Modificado de la referencia ⁵⁵.

Factores asociados con cambios en la expresión génica en sepsis

Desde que se identificó la plasticidad de las células dendríticas ante la estimulación con diversos patógenos ⁶⁰, diversos estudios en modelos de infección

en animales corroboraron que la expresión génica es diferente entre los individuos con infección y aquellos sin ella ^{61, 62}. Estas modificaciones en la expresión génica también han sido reconocidas en el modelo humano experimental de endotoxemia ^{58, 59} y en humanos (niños y adultos) con infecciones ^{63, 64}. El tejido biológico en el cual se realizaron estos análisis fue el concentrado leucocitario de células mononucleares (CMN) de sangre periférica, por lo que se considera que, por la facilidad para su obtención y por la evidencia acumulada, es el mejor tejido para el análisis de expresión génica en los individuos con infecciones ^{65, 66}. Sin embargo, diferentes factores concurrentes durante las infecciones han mostrado tener la capacidad de modificar la expresión génica de algunos marcadores de la respuesta inmune innata y adquirida. Por ejemplo, algunos estudios indican que existen diferencias en la expresión génica de acuerdo a los estadios clínicos de infección (sepsis, sepsis grave o choque séptico) ^{67, 68} y proponen que estos cambios logran discriminar subtipos de choque séptico en población pediátrica los cuales están asociados con distinta evolución clínica ^{67, 69, 70}. En estos estudios, se ha observado que las modificaciones observadas en la expresión de ARN durante la infección, constituyen una serie de cambios dinámicos complejos los cuales tienen una trayectoria paralela con la respuesta clínica ^{66, 71}, por lo que se considera que el fenómeno de transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye un indicador de la respuesta inflamatoria en las enfermedades infecciosas ⁶¹. Por otro lado, aunque los análisis de expresión génica realizados en sangre total y células mononucleares de ratones y humanos a través de microarreglos, sugieren que podría existir algún patrón de expresión génica común independientemente del microorganismo causante de la infección ^{65, 66, 68, 71-73}, la

expresión génica del sistema inmune innato ha mostrado ser distinta en estudios de líneas celulares y en algunos modelos animales de infección después de la estimulación con diferentes microorganismos ⁷⁴⁻⁷⁶. Lo anterior sugiere que la expresión génica podría ser modificada por el tipo de germen causante del proceso infeccioso. Otros factores, como los demográficos son particularmente importantes en el análisis de la expresión génica en humanos con infecciones graves. De ellos, la edad, sexo y grupo étnico son de suma importancia. Un estudio clínico determinó la magnitud del impacto de estas variables en un grupo de enfermos con neumonía ⁶⁶. Se identificó que la variable que condicionó mayor cambio en la expresión génica de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica fue el grupo étnico, siendo el impacto de la edad y el sexo significativamente menor. El grupo étnico por sí solo determinó el cambio en ~2700 genes analizados, por lo que los resultados obtenidos en poblaciones específicas no serían aplicables en otros grupos y podrían explicar las diferencias en el comportamiento de la enfermedad en diferentes grupos raciales ^{77, 78}.

Controversias en las teorías de la respuesta inmune en sepsis

El paradigma actual de la respuesta inmune en sepsis es controversial. Tradicionalmente, se ha considerado que la respuesta inmune del hospedero ante una infección está caracterizada por una respuesta hiperinflamatoria que evoluciona después de varios días a un estado de inmunosupresión ⁷⁹ (teoría hiperinflamatoria, figura 2). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que las respuestas pro- y antiinflamatorias ocurren desde fases iniciales del proceso

infeccioso en forma simultánea^{80, 81}, y algunos autores han considerado que el efecto neto inicial de esos procesos en competencia se manifiesta por una fase hiperinflamatoria temprana dominante caracterizada por fiebre, choque y aumento del metabolismo. Por otro lado, otros investigadores han descrito un paradigma distinto basándose en los resultados del análisis de la expresión génica de leucocitos obtenidos de sangre periférica de personas con trauma y quemaduras. Esta teoría está basada en los hallazgos que muestran que los genes que regulan la respuesta inmune innata se encuentran sobreexpresados en forma rápida y sostenida al mismo tiempo que ocurre una disminución de la expresión de los genes que regulan la respuesta inmune adaptativa en comparación con un grupo control sin infección⁸². Por lo anterior, estos autores proponen que la respuesta inmune del hospedero en trauma y sepsis, está caracterizada por un proceso inflamatorio intenso y muy prolongado del sistema inmune innato el cual resulta en disfunción orgánica y muerte⁸² (teoría de la inflamación sostenida, figura 3). Otros autores, han observado que los pacientes que mueren por sepsis tienen aumento de la expresión de algunos de los marcadores de inmunosupresión. Las células mononucleares, obtenidas del bazo o pulmones de pacientes recientemente fallecidos (30-180 min) por sepsis, han mostrado disminución de la producción de citocinas inflamatorias, sobreexpresión de receptores inhibidores como la proteína de muerte celular 1 (PD1), incremento de la proporción de células T reguladoras y de las poblaciones de células supresoras derivadas de la línea mieloide, así como una menor expresión de CD28 y menor expresión de las vías de activación mediadas por HLA-DR⁸³. Estos resultados llevaron a este grupo de autores a proponer que la sepsis induce numerosos mecanismos sobrepuestos de

inmunosupresión en el sistema inmune innato y adaptativo (teoría de la inmunosupresión en sepsis, figura 4). Aunque existen diferentes explicaciones potenciales para los diferentes hallazgos que han originado estas teorías contradictorias, es destacable que no consideran la presencia de otros factores que pueden modificar la respuesta inmune como las comorbilidades preexistentes, el estado nutricional, la carga de microorganismos o los factores de virulencia. La importancia de las comorbilidades en la sepsis ha sido resaltada por Hotchkiss y colaboradores ⁸⁴, quienes propusieron que las enfermedades crónicas podrían modificar importantemente la magnitud de la respuesta inmune del hospedero a las infecciones llegando a modificar el pronóstico de los enfermos (figura 5). Por lo anterior, el presente estudio fue diseñado para explorar el impacto potencial de las comorbilidades sobre algunos marcadores la respuesta inmune innata.

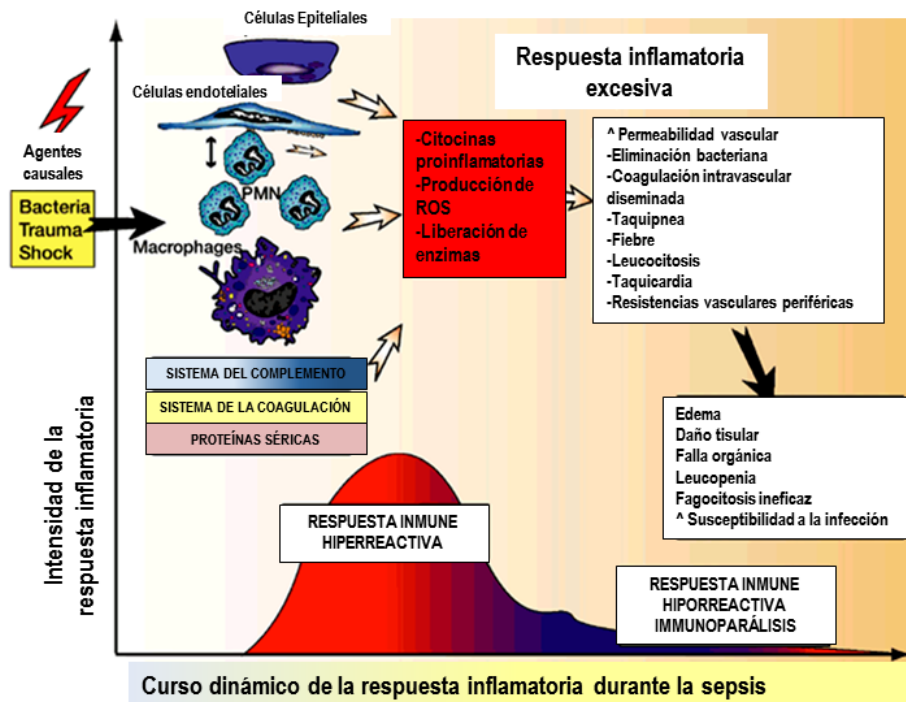


Figura 2. Teoría de la sepsis: hiperinflamación.

Modificado de la referencia ⁷⁹

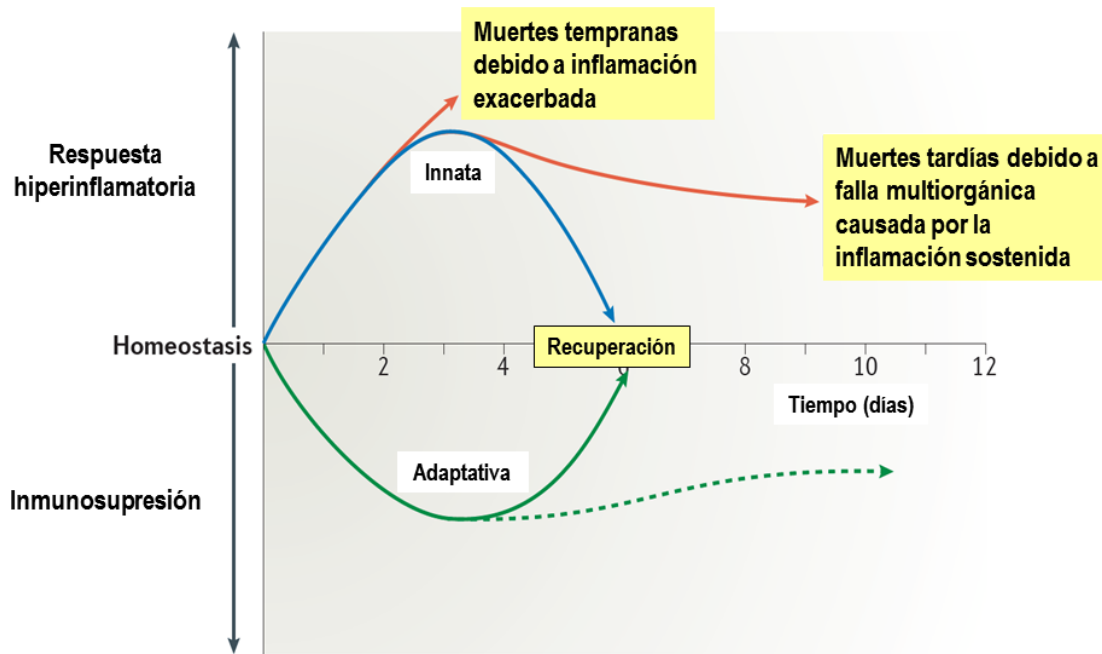


Figura 3. Teoría de la sepsis: inflamación sostenida.
Modificado de la referencia ¹⁸

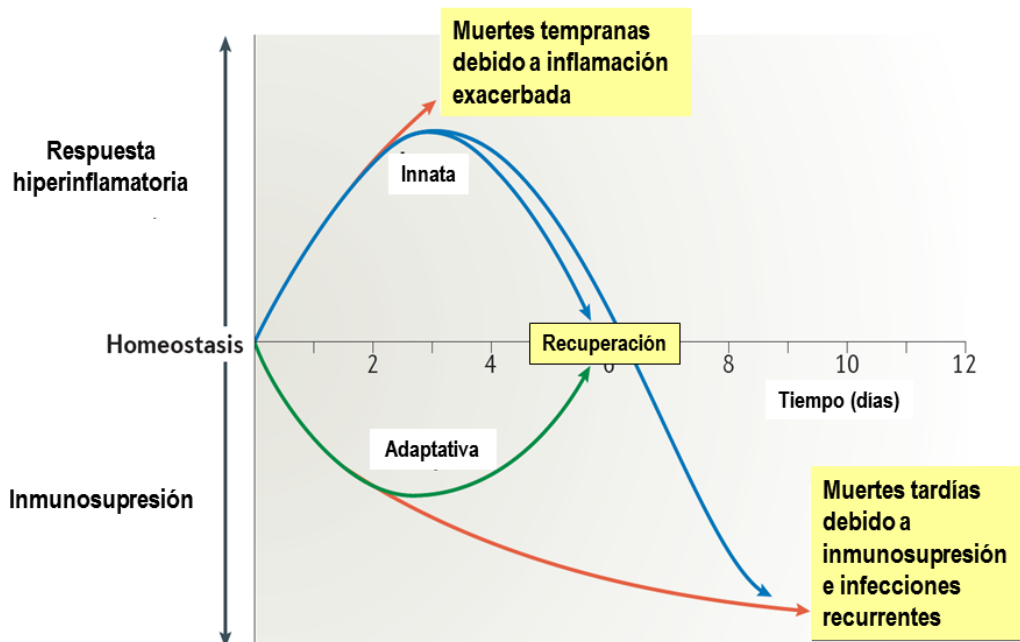


Figura 4. Teoría de la sepsis: inmunosupresión
Modificado de la referencia ¹⁸

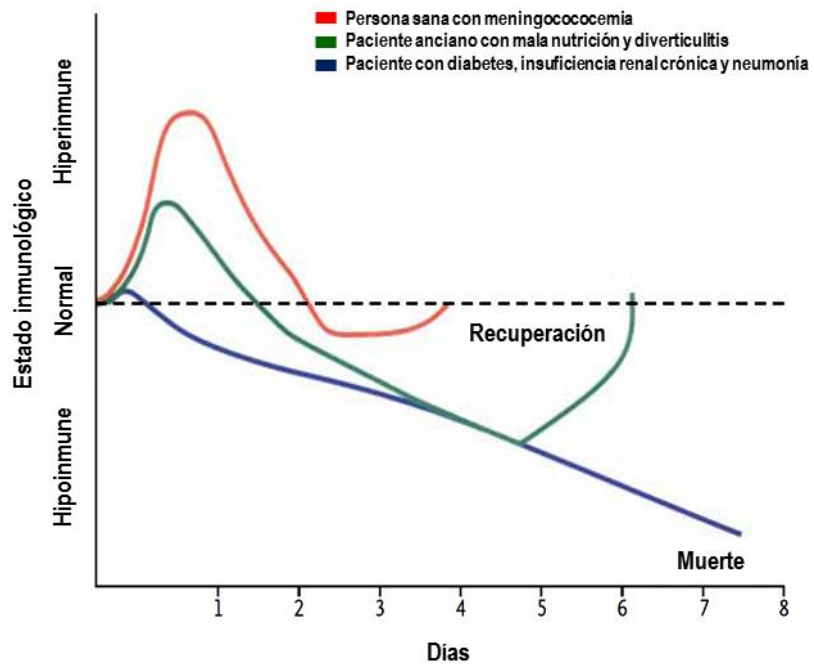


Figura 5. Teoría de la sepsis: las comorbilidades afectan la respuesta inmune
Modificado de la referencia ⁸⁴

JUSTIFICACIÓN

La incidencia de sepsis, así como los costos derivados de la atención médica, se han incrementado notablemente durante las últimas tres décadas. Si bien en algunos estudios se ha observado disminución del riesgo de muerte de los pacientes con sepsis en los últimos años, las tasas de mortalidad de sepsis grave y choque séptico se mantienen inaceptablemente elevadas llegando a ser de 50% en algunos centros hospitalarios. Los ensayos clínicos controlados que han evaluado la utilidad diagnóstica de diversos tratamientos inmunológicos han tenido resultados desalentadores y, actualmente no existen medicamentos aprobados para el tratamiento específico de sepsis. Aunque son múltiples los factores que podrían explicar la falta de eficacia de los tratamientos evaluados en este grupo de pacientes, la heterogeneidad clínica e inmunológica es un aspecto crucial que no ha sido evaluado extensamente en humanos con sepsis. Las comorbilidades crónicas representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo de disfunción orgánica, reingresos hospitalarios y muerte de los pacientes con sepsis. Sin embargo, la inmunopatogénesis de la sepsis en este grupo de enfermos es poco conocida. Por lo anterior, este estudio exploró la función de las CMN de sangre periférica a través del análisis de la expresión génica de algunos marcadores de la inmunidad innata, así como el análisis de la secreción espontánea de citocinas en células mononucleares periféricas de enfermos con sepsis abdominal y/o neumonía y diferentes enfermedades crónicas. El examen de la función de las células mononucleares podría segregar grupos de enfermos

con manifestaciones clínicas similares o quizá podría determinar algún patrón específico de cada enfermedad^{85, 86}. Lo anterior podría facilitar el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis o sentar las bases para una mejor clasificación de pacientes en la evaluación de terapias inmunológicas.

Preguntas de investigación

Primaria: ¿Es distinta la expresión génica de algunos marcadores de la inmunidad innata en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía, de acuerdo con el número de enfermedades crónicas preexistentes, durante la primera semana del proceso infeccioso?

Secundaria: ¿Es distinta la secreción de citocinas de las células mononucleares periféricas durante la primera semana del proceso infeccioso de acuerdo con el número de enfermedades crónicas preexistentes en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía?

HIPÓTESIS

Primaria: La expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 y TLR4 en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía es menor de acuerdo a la cantidad de enfermedades crónicas durante la primera semana del proceso infeccioso.

Secundaria: La secreción espontánea de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17) de las células mononucleares periféricas durante la primera semana del proceso infeccioso es menor de acuerdo a la cantidad de enfermedades crónicas en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía.

OBJETIVOS

Primario: Determinar la correlación de la expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 y TLR4 en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía con el número de enfermedades crónicas, durante la primera semana del proceso infeccioso.

Secundario: Determinar la correlación de la secreción espontánea de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17) de las células mononucleares periféricas durante la primera semana del proceso infeccioso, con la cantidad de enfermedades crónicas en humanos con sepsis abdominal y/o neumonía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Todos los pacientes mayores de 18 años internados en las unidades de hospitalización, urgencias y terapia intensiva del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) entre enero de 2010 y enero de 2011 fueron examinados para determinar su elegibilidad para participar en el estudio. Con el objeto de identificar a los pacientes en la etapa más temprana posible del proceso infeccioso, se realizó una búsqueda activa de pacientes con SRIS ² (n=205) y, aquellos con sospecha o diagnóstico de neumonía o sepsis abdominal (n=84) fueron elegibles para este estudio. La clasificación del diagnóstico infeccioso fue basada en la revisión independiente de los expedientes clínicos por 2 investigadores (C.A.R.-O. and J.S.-O.). Los desacuerdos fueron resueltos por consenso. Los casos fueron cuidadosamente clasificados como sepsis abdominal y/o neumonía basándose en las definiciones establecidas en consensos internacionales (apéndice 1) ^{26, 87, 88}. Finalmente, fueron incluidos únicamente los pacientes con éstos diagnósticos en los que se documentó infección por BGN. Fueron excluidos aquellos pacientes con diagnóstico previo o en la hospitalización de infección por VIH, lupus eritematoso generalizado y otras enfermedades autoinmunes, enfermedad hematológica maligna o neoplasia sólida, pancreatitis aguda (primeros 15 días de evolución), lesión por quemaduras (segundo grado en más del 20% de superficie corporal) o trauma. Asimismo, fueron excluidos aquellos enfermos que recibieron quimioterapia en los 6 meses

previos al estudio o que recibían algún inmunosupresor antes o durante este internamiento. También fueron eliminados aquellos pacientes en los que no se corroboró el diagnóstico de neumonía o sepsis abdominal, no se identificó algún BGN, el episodio de sepsis se encontraba en resolución, no se obtuvieron las muestras para el análisis de los marcadores inflamatorios, insuficiente información en el expediente clínico para determinar las comorbilidades del enfermo, o el paciente no era mexicano mestizo. La magnitud de la disfunción orgánica durante la hospitalización fue cuantificada de acuerdo al puntaje de la escala secuencial de falla orgánica (SOFA) ⁸⁹ (apéndice 2). Para este estudio, sepsis grave fue establecida cuando se identificó un valor = 1 en cualquier sistema orgánico y choque séptico cuando se documentó la administración de algún vasopresor (norepinefrina, epinefrina o vasopresina) por más de una hora ². Las evaluaciones de disfunción orgánica fueron realizadas al ingreso del paciente al estudio (día 0), en el día 3 y subsecuentemente cada 7 días a partir del día 0 hasta su egreso o fallecimiento. Las definiciones se detallan en el apéndice 1. Las características clínicas y demográficas, así como el registro de sus enfermedades previas, fueron obtenidas directamente de los expedientes clínicos y las comorbilidades fueron clasificadas (apéndice 3) de acuerdo al índice de comorbilidad de Charlson (ICC)⁹⁰. Adicionalmente, se registraron los días de estancia intrahospitalaria y mortalidad intrahospitalaria. El abordaje diagnóstico y terapéutico del episodio de sepsis fue proporcionado por el médico especialista encargado del paciente sin la intervención de los investigadores y fueron registrados la administración de terapia temprana dirigida por metas, uso de antibióticos y control de foco infeccioso. La

búsqueda activa y seguimiento clínico de los pacientes del estudio fueron llevados a cabo por el sustentante.

Estudios de microbiología

A todos los enfermos se les realizaron cultivos de acuerdo a las políticas institucionales y todos los especímenes fueron procesados por el personal del laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ. Los especímenes intraabdominales y respiratorios de todos los pacientes elegibles fueron procesados bajo las siguientes especificaciones. Las muestras intraabdominales fueron incubadas en viales BACTEC® plus + Aerobic/F y BACTEC® plus + Anaerobic/F por 7 días. Los viales positivos en la tinción de Gram fueron subcultivados en Agar gelosa sangre de carnero (aeróbicos), agar alcohol fenil-etílico (cocos Gram-positivos) o agar Sabouraud con CFP (hongos) por 48 h. Los especímenes de secreciones respiratorias fueron cultivadas en agar MacConkey sangre de carnero y agar chocolate siguiendo los procedimientos convencionales⁹¹. Solo fueron incluidos los cultivos que fueron considerados positivos por el médico infectólogo tratante. Finalmente, los cultivos bacterianos fueron categorizados como Gram-negativos, Gram-positivos, hongos o polimicrobianos.

Obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas

Los pacientes elegibles fueron invitados a participar en el estudio y, después de adquirir el consentimiento informado del paciente o su responsable legal, se obtuvieron las muestras de sangre venosa total (9 ml) entre 8:00 - 10:00 h. Estas

muestras fueron extraídas en un lapso de 24 h después de la firma del consentimiento informado, y su procesamiento fue realizado basado exclusivamente en la disponibilidad de las muestras independientemente del estado clínico del enfermo. Las muestras de sangre venosa periférica fueron extraídas por punción o a través de un catéter venoso central en el caso de estar disponible. La sangre se colectó en dos tubos, una en un tubo Vacutainer BD® con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2% (4 ml) para extracción de las CMN y otra en un tubo Vacutainer BD® SST® con óxido de silicio como activador de la coagulación (5 ml) para obtención del suero. El aislamiento de las CMN y la extracción del suero se realizaron inmediatamente después de la obtención de las muestras. Los pacientes egresados de la hospitalización durante la realización del estudio, fueron invitados a regresar al hospital para la toma de la(s) muestra(s) faltantes, o bien, éstas se obtuvieron en su domicilio entre 8:00 y 12:00 h. Estas técnicas fueron llevadas a cabo en el Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ.

Aislamiento y cultivo de células mononucleares periféricas.

La secreción espontánea de citocinas por CMN se obtuvo recuperando y cultivando CMN de sangre periférica. Las CMN se obtuvieron por gradiente de densidad usando el producto comercial Lymphoprep®, (Fresenius Kabi Norge S, Halden, Norway. Cat. núm.: 1114544). Brevemente, en condiciones de esterilidad y en la campana de flujo laminar en tubos de poliestireno de 15 ml se le agregaron 4 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA 2% y 7 ml de solución salina

amortiguada con fosfatos (Phosphate-buffered saline, PBS) pH 7.3, los cuales se mezclaron por inversión. En la parte inferior de cada tubo se adicionaron cuidadosamente 2 ml de Lymphoprep® para posteriormente ser centrifugados a 2,000 revoluciones por minuto (rpm) a 18°C durante 20 min. Subsecuentemente, la capa superior de plasma fue aspirada y descartada, y el concentrado leucocitario con CMN fue recuperado y transferido a un tubo nuevo de 15 ml. El tubo fue centrifugado nuevamente a 1,500 rpm durante 8 minutos descartando el sobrenadante. El botón de CMN fue resuspendido suavemente en 1 ml de solución de RPMI. Se corroboró la viabilidad y número total de CMN a través de microscopía óptica en la cámara de Neubauer usando azul tripano. En todos los casos se observaron >96% de células mononucleares viables. Subsecuentemente, las CMN fueron separadas en 2 alícuotas, un millón fueron usadas para el cultivo de CMN y el resto (aproximadamente 4 millones de CMN) fueron colocadas en 250 µl de solución protectora de ARN (RNAprotect Cell Reagent, Qiagen, Texas, EUA. Cat. Núm.: 76526) e inmediatamente almacenadas a -70°C. El cultivo de CMN se realizó colocando un millón de CMN en 1 ml de medio RPMI suplementado con albúmina 2%, L-glutamina 2 mM y estreptomycin 1%. Las células fueron cultivadas en tubos Falcon de 5 ml (Becton-Dickinson, LabWare, Inc. New Jersey, EUA) a 37°C con 5% CO₂ durante 24 h. Los cultivos fueron centrifugados a 1500 rpm por 5 min y el sobrenadante fue almacenado inmediatamente en crioviales a -70°C hasta la medición de citocinas. Estos procesos fueron realizados en el Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ.

Análisis de la expresión génica

a) Extracción y cuantificación de ácido ribonucleico total

La extracción de ARN total de las CMN se realizó por el método de tiocianato de guanidina y cloroformo ⁹². Se utilizó el reactivo TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA. Cat. núm.: 15596-018) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras con CMN preservadas en solución protectora de ARN fueron descongeladas en hielo y centrifugadas 1 min a 12,000 rpm para descartar la solución protectora de ARN. Se agregó 1 ml de TRIzol® homogeneizando las CMN con la punta de la pipeta hasta observar una mezcla homogénea la cual se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregaron 200 µL de cloroformo agitando en vórtex durante 15 segundos y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm, a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa de cada tubo se transfirió a un tubo nuevo agregando subsecuentemente 500 µL de isopropanol. Se realizó mezcla por inversión e incubación por 10 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue desechado y se realizó un lavado agregando 1 ml de etanol al 75% y centrifugando nuevamente a 12,000 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las muestras se dejaron secar hasta la evaporación del etanol. Subsecuentemente, las muestras fueron resuspendidas en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (UltraPure™ DEPC-treated Water, Ambion). Las muestras fueron calentadas a 55-65°C por 10 min y transferidas a hielo. Posteriormente, la concentración y pureza de todas las muestras fue

determinada por espectrofotometría (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE). La concentración de ARN se determinó a 260 nm y únicamente las muestras con una relación de absorbancia 260/280 nm entre 1.8-2.2 fueron analizadas. Dos μL de ARN fueron sometidos a electroforesis en un gel desnaturalizante de formaldehído-agarosa al 1.5% para comprobar su integridad; únicamente las muestras que mostraron ARN íntegro fueron procesadas. El resto de la muestra fue almacenada inmediatamente a -70°C hasta la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Estos procesos fueron llevados a cabo en el Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ.

b) Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario

A partir del ARN total extraído, se sintetizó ADNc. Se utilizó la transcriptasa reversa Moloney del virus de leucemia murina y los reactivos contenidos en el producto comercial M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Alameda, CA. Cat. Núm.: 28025013) en el termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Corp. Norwalk, CT, USA). El volumen total de reacción fue de 22 μL mezclando:

-Buffer RT 5x: 4 μL (Cat. Núm.: 28025013)

-Mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM: 4 μL (Qiagen, cat. núm.: 201900)

-Oligo dT 0.1 mM: 2 μL (Invitrogen, Alameda, CA. Cat. Núm.: 18418012)

-Ditiotreitol (DTT) 0.1 M: 2 μL (Invitrogen, Alameda, CA. Cat. Núm.: 28025013)

-Transcriptasa reversa 200 U/ μL : 0.5 μL (Invitrogen, Alameda, CA. Cat. Núm.: 28025013)

-Inhibidor de ARNsas (40 U/ μ L): 1 μ l (Invitrogen, Alameda, CA. cat. núm.: 15518012)

-ARN total: 5 μ g de ARN

-Agua grado biología molecular c.b.p. 22 μ l

La reacción se incubó a 42°C por 60 min, se inactivó a 94°C por 5 min y finalmente se mantuvo a 4°C. Posteriormente, el ADNc se almacenó a -20°C hasta su utilización para la realización de las reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Este proceso fue llevado a cabo en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ.

c) Selección del gen de referencia y cuantificación de la expresión génica por qPCR

El proceso de selección del gen de referencia para normalizar la expresión de los genes en estudio incluyó la búsqueda en la literatura biomédica sobre los genes utilizados como genes de referencia en CMN y la evaluación de su desempeño en un grupo de muestras provenientes de pacientes de este estudio. Se identificaron 5 potenciales genes útiles (cuadro 3) los cuales fueron evaluados inicialmente en las CMN de 6 pacientes con sepsis abdominal o neumonía. Se determinó su variabilidad a través de la cuantificación de diversos índices de dispersión (figura 6 y cuadro 4) y el método BestKeeper⁹³. Este análisis mostró que el gen con menor dispersión fue el gen de la proteína ribosomal L32 transcrito variante 1 (RPL32) por lo que este gen fue utilizado como gen de referencia en todas las mediciones de qPCR subsecuentes.

Cuadro 3. Genes estudiados para ser usados como referente								
Símbolo del gen	Nombre del gen	Número de catálogo (Applied Biosystems)	Número de secuencia de acceso	Cromosoma	Localización del ensayo (pb)	Exón de unión con la sonda	Longitud amplicón	SNP identificados por el fabricante y evaluación de su impacto potencial sobre la expresión génica
RPL32	Proteína ribosomal L32, transcrito variante 1	Hs00851655_g1	NM_000994.3	3	498	4	146	No reportados por el fabricante
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Hs02758991_g1	NM_001256799.1	12	728	6-7	93	rs11549343 y rs77154254. Frecuencia en Mestizos no determinada. Podrían afectar el desempeño del ensayo.
ACTB	B-actina	Hs01060665_g1	NM_0011101.3	7	208	2-3	63	No reportados por el fabricante
LRP10	Receptor de la lipoproteína de baja densidad relacionado con la proteína 10	Hs00204094_m1	NM_014045.3	14	1981	3-4	78	No reportados por el fabricante
18S	ARN ribosomal 18S eucarionte	4319413E	X03205.1	-	-	ND	187	No reportados por el fabricante

Abreviaturas: ARN: ácido ribonucleico; ND: no determinado; SNP: polimorfismo de nucleótido único (Single-Nucleotide Polymorphism)

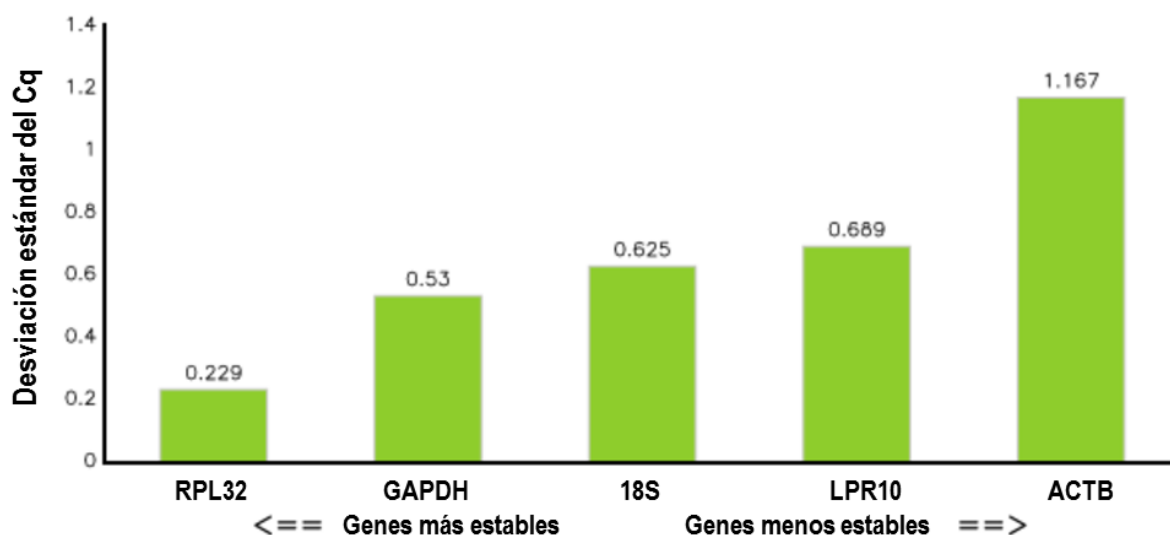


Figura 6. Desviación estándar del Cq de los genes candidatos evaluados para ser usados como referente.

Cuadro 4. Estadística descriptiva de 5 genes candidatos para ser usados como referente.					
	RPL32	GAPDH	18S	LRP10	ACTB
Promedio geométrico [CP]	16.94	18.44	16.69	23.50	35.07
Promedio aritmético [CP]	16.94	18.45	16.71	23.51	35.10
min [CP]	16.62	17.62	15.79	22.08	33.80
max [CP]	17.57	19.92	18.44	24.91	37.30
Desv. Estándar [+/- CP]	0.23	0.53	0.63	0.69	1.17
CV [% CP]	1.35	2.87	3.74	2.93	3.33
min [x - min]	-1.25	-1.76	-1.86	-2.67	-2.42
max [x - max]	1.55	2.79	3.37	2.66	4.68
Desv. Estándar [+/- x- DE]	1.17	1.44	1.54	1.61	2.25

Cuantificación de la expresión génica: Se cuantificó la expresión génica de TNF- α , interleucina (IL)-6, IL-10, IL-1 β y TLR4 con las sondas de hidrólisis de doble marcaje (cuadro 5, TaqMan, Applied Biosystems) usando el equipo ABI PRISM 7000 (Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Primeramente, se realizó el rango dinámico cuantificando la

expresión de cada gen con diferentes concentraciones de ADNc (0.035 ng, 0.35 ng, 3.5 ng, 35 ng y 350 ng) y se determinaron los coeficientes de correlación entre los valores del logaritmo común (base = 10) del ciclo de cuantificación (quantification cycle, Cq) y la correspondiente concentración de ADNc. Se observaron las siguientes correlaciones: RPL32 $r^2 = -0.9997$ (IC95% = -0.9995, -1.0000), TNF- α $r^2 = -0.9891$ (IC95% = -0.9758, -1.0000), IL-6 $r^2 = -0.9956$ (IC95% = -0.9915, -0.9997), IL-10 $r^2 = -0.9945$ (IC95% = -0.9888, -1.0000), IL-1 β $r^2 = -0.9995$ (IC95% = -0.9988, -1.0000) y TLR4 $r^2 = -0.9734$ (IC95% = -0.9438, -1.0000). Adicionalmente, se determinó la eficiencia de la expresión de todos los genes analizados incluyendo el gen de referencia (cuadro 6). La amplificación de los genes en estudio se llevó a cabo con la técnica de qPCR utilizando el ADNc, las sondas correspondientes sin dilución, y la mezcla universal (Applied Biosystems, Foster City, CA. Cat. Núm.: 4304437) que contiene ADN polimerasa, uracil-glucosilasa, cloruro de magnesio (1.5-4 mM) y dNTPs. Todas las reacciones se realizaron manualmente por triplicado en un volumen de reacción de 10 μ l. Las muestras fueron procesadas en placas de reacción de 96 pozos (Applied Biosystems. Cat. Núm.: N8010560), recubriéndolas con cubiertas ópticas adherentes transparentes (Applied Biosystems. Cat. Num.:4311971). La cantidad de ARN en cada reacción fue de 35 ng para todos los genes estudiados.

Cuadro 5. Genes de la respuesta inmune innata estudiados

Símbolo del gen	Nombre del gen	Número de catálogo (Applied Biosystems)	Numero de secuencia de acceso	Cromosoma	Localización del ensayo (pb)	Exón de unión con la sonda	Longitud amplicón	SNP identificados por el fabricante y evaluación de su impacto potencial sobre la expresión génica
TNF	Factor de necrosis tumoral	Hs00174128_m1	NM_000594.3	6	457	3-4	80	rs4645843 frecuencia en Mestizos 0.020 (HAPMAP-MEX). Podrían afectar el desempeño del ensayo. rs1800620. rs1800620: ausente en una población de 23 individuos autodenominados "hispanos" (HISP1).
IL6	Interleucina 6	Hs00985639_m1	NM_000600.3	7	321	2-3	66	No reportados por el fabricante
IL10	Interleucina 10	Hs00961622_m1	NM_000572.2	1	510	4-5	74	No reportados por el fabricante
IL1B	Interleucina 1 beta	Hs01555410_m1	NM_000576.2	2	190	3-4	91	No reportados por el fabricante
TLR4	Receptor tipo toll 4	Hs00152939_m1	NM_003266.3	9	679	3-4	89	rs56302444: frecuencia en Mestizos no determinada. Podrían afectar el desempeño del ensayo.

Abreviatura. SNP: polimorfismo de nucleótido único (Single-Nucleotide Polymorphism)

Cuadro 6. Estimación de las curvas* de eficiencia para los genes estudiados			
Gen	Intercepto	Pendiente	Eficiencia ±EE
RPL32	26.47579	-3.277667	2.01 ±3.34e-26
TNF	33.92124	-3.282221	2.01 ±6.03e-12
IL6	37.19474	-2.819333	2.26 ±4.42e-06
IL10	37.9913	-2.705	2.34 ±1.06e-05
IL1B	32.26673	-3.378333	1.97 ±1.53e-18
TLR4	35.94429	-2.912667	2.20 ±7.12e-04
*Las curvas fueron realizadas con 0.035 ng, 0.35 ng, 3.5 ng, 35 ng y 350 ng de ADNc. ±EE: error estándar.			

Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: paso 1: 50°C por 2 min (1 ciclo), paso 2: 95°C por 10 min (1 ciclo), paso 3: 95°C por 15 s (45 ciclos), seguidos de 60°C por 1 min. Como control negativo se prepararon reacciones sin ADNc y fue requisito observar ausencia de amplificación en los controles negativos para considerar útiles los resultados de los ensayos. Las curvas de amplificación se obtuvieron a través del programa computacional Sequence Detection Software versión 1.2.3, Applied Biosystems y se examinó y seleccionó manualmente la fase exponencial para establecer el valor de Cq. Aquellas muestras que mostraron Cq > 40 fueron eliminadas de los análisis. Los valores atípicos (outliers) fueron verificados y en caso de no identificar error en el proceso de medición, fueron incluidos en el estudio. El análisis de los valores de Cq de expresión génica se realizó usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ⁹⁴. Brevemente, los valores de Cq de cada individuo fueron divididos entre el valor de Cq de la expresión del

gen RPL32 (delta 1), subsecuentemente se determinó la expresión génica de los días 3 y 7 ajustando al valor del día 0 (delta 2), y finalmente el valor resultante fue el exponente de la ecuación considerando una eficiencia de 2.0. Los valores fueron reportados como cambio en unidades arbitrarias de expresión con respecto al día 0. Estos procesos fueron realizados en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ.

Determinación de la concentración de citocinas en la secreción espontánea de CMN de sangre periférica

Se determinaron las concentraciones de TNF- α , IL-6, IL-10, e IL-17 en los sobrenadantes de las CMN periféricas cultivadas por 24 h. Se realizó la cuantificación de citocinas mediante el equipo de Human cytokine (LINCOplex, Luminex Corporation, Austin, TX) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y con los reactivos HCYTOMAG-60K-0.5 (HCYTOMAG-60K-0.5, Merck Millipore, Billerica, MA). En resumen, se adicionaron 25 μ L de solución amortiguadora de ensayo a un placa de 96 pozos con fondo de filtro previamente bloqueada con amortiguador de ensayo, posteriormente se adicionaron 25 μ L del sobrenadante de los cultivos y 25 μ L de la mezcla de las perlas para cada citocina. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación. Se realizaron dos lavados con 200 μ L por pozo con solución amortiguadora de lavado, la solución de lavado se removió con vacío y el remanente de la solución se eliminó mediante un papel absorbente. Se adicionaron 25 μ L de anticuerpo de detección y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se adicionaron 25 μ L de

estreptavidina-ficoeritrina y las mezclas se incubaron en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron dos lavados con solución amortiguadora de lavado y se adicionaron 100 μ L de Sheath Fluid (Millipore). La placa se leyó en el equipo de Lincoplex 200, con el programa Luminex 100 IS 2.3, los datos fueron interpolados a partir de las curvas de calibración usando los referentes proveídos por el fabricante. Este proceso fue realizado por el personal del Departamento de Inmunología y Reumatología, INCMNSZ. Los límites de detección en el sistema para todas las citocinas cuantificadas fueron 3.2 pg/ml y 10,000 pg/ml. Aunque estos rangos permitieron que el sistema cuantificara el 100% de las muestras de IL-10 y de IL-17, no se detectaron 16.6% de las determinaciones de TNF- α ni el 62.8% de las determinaciones de IL-6. Por lo anterior, la cuantificación de IL-6 fue dicotomizada en valores mayores y menores a 10,000 pg/ml.

Cálculo de muestra y análisis estadístico

Este estudio de cohorte fue diseñado como un estudio piloto con el objeto de evaluar la correlación entre el ICC (escala ordinal) y la expresión de los genes en estudio (escala numérica continua). Se estimó una muestra de 29 individuos para una correlación $\rho = 0.5$, asumiendo $\alpha = 0.05$, poder = 0.80 y dos colas, usando el programa computacional `sampsi_rho`⁹⁵ para el software Stata (StataCorp, College Station, TX). La descripción de las características de los pacientes estudiados se realizó con estadística descriptiva usando frecuencias relativas, medianas y rangos intercuartiles (RIC). Las comparaciones entre dos

grupos se realizaron a través de la prueba U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas, y a través de la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas. Las comparaciones entre 3 grupos se realizaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis. La evaluación de los factores de riesgo para el desarrollo de disfunción orgánica (variable desenlace) cuantificada a través de la escala SOFA se realizó a través de un análisis de regresión logística ordinal usando el comando "ologit" y se corroboró el supuesto de momios proporcionales con el comando "omodel" ⁹⁶. El modelo multivariable se construyó usando como variable dependiente el puntaje en la escala SOFA incluyendo como variable independiente el ICC además de potenciales confusores como la edad, medicación previa (estatinas, fibratos o aspirina), sexo, y tratamiento antibiótico no activo en contra del germen identificado. Por otro lado, los valores de expresión génica fueron transformados a logaritmo natural (base = e) para obtener una distribución gaussiana y la evaluación de la correlación de la expresión génica con el ICC (objetivo primario) se realizó a través del coeficiente de correlación de Spearman.

La secreción espontánea de citocinas por las CMN periféricas se examinó usando un análisis estadístico de mediciones seriadas para variables cuantitativas en la que cada individuo en estudio es su propio control ⁹⁷. La concentración de citocinas fue transformada a logaritmo natural (base = e) para obtener una distribución gaussiana. La cuantificación de cada citocina fue clasificada en tres índices de resumen: (1) la pendiente de los días 0 a 3, (2) la pendiente de los días 3 a 7, y (3) el área bajo la curva de los días 0 a 7. Por otro lado, el sistema no detectó el 62.8% de las determinaciones de IL-6 por lo que esta variable fue

dicotomizada en valores mayores y menores de 10,000 pg/ml. De esta manera, se calculó un índice de resumen que categorizó la respuesta de los días 3 y 7 como decremento o incremento con respecto al valor previo considerando al mismo individuo como control. Los índices de resumen fueron usados para determinar su asociación con la comorbilidad. Las correlaciones entre el ICC y los índices de resumen de la secreción de citocinas (objetivo secundario) se determinaron usando el coeficiente de correlación de Spearman para todas las citocinas excepto IL-6 cuya asociación con el ICC se evaluó a través de la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis fueron realizados a dos colas y $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software STATA v. 12.0 (StataCorp, College Station, TX).

Consideraciones éticas y legales

Este estudio fue realizado de acuerdo al Código de ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki) para la realización de experimentos en humanos y fue aprobado por los comités de ética e investigación del INCMNSZ (Aprobación Núm.: 174). Todos los pacientes o sus responsables legales dieron su consentimiento informado por escrito (apéndices 4.1 y 4.2) antes de la obtención de sus datos y de las muestras de sangre. De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud en su Título Segundo, Capítulo uno, Artículo 17, este estudio se clasifica como de riesgo mínimo.

RESULTADOS

Características clínicas y comorbilidades de los individuos estudiados

Ochenta y cuatro pacientes reunieron los criterios de elegibilidad, sin embargo, 58 de esos pacientes fueron excluidos por una o más de las siguientes razones: no haberse corroborado el diagnóstico de neumonía o sepsis abdominal de acuerdo a los criterios definidos para este estudio (26), no haberse identificado algún BGN en los cultivos (13), haber estado recibiendo tratamiento con algún inmunosupresor, o haber sido diagnosticado durante la hospitalización con infección por VIH/SIDA, alguna neoplasia sólida, enfermedad hematológica maligna o alguna enfermedad autoinmune (9), sepsis en resolución (6), expediente clínico incompleto (5), o no pertenecer al grupo de mexicanos mestizos (3). Las características de los 26 pacientes confirmados e incluidos en el estudio se presentan en el cuadro 7. Siete (27%) pacientes no tenían antecedentes de alguna enfermedad crónica según la clasificación del ICC. Sin embargo, en 19 (65.3%) individuos se identificó una o más enfermedades crónicas clasificadas de acuerdo al ICC. Notablemente, la enfermedad más frecuente (cuadro 8) fue algún tipo de diabetes mellitus (DM). Por otro lado, se identificó que los días transcurridos entre el inicio de alguno de los datos de respuesta inflamatoria sistémica y la toma de la primera muestra para el estudio (mediana =2, RIC =1-3) no se asociaron con el ICC (rho Spearman = -0.1676, p = 0.413) ni con la gravedad de la disfunción orgánica medida a través de la escala SOFA (rho Spearman = -0.1635, p = 0.425).

Cuadro 7. Características clínicas de los pacientes estudiados.	
Edad, md (p25-p75)	50.5 (36-64)
Sexo masculino, n (%)	12 (46.1)
Índice de Masa Corporal, md (p25-p75)	25.2 (21.2-28.44)
Índice de comorbilidad de Charlson, md (p25-p75)	1 (0-3)
Tiempo desde el inicio de SRIS hasta toma de muestras, md (p25-p75)	2 (1-3)
Medicación previa: estatinas, fibratos o aspirina	5 (19.3)
Sitio Infeccioso:	
Sepsis Abdominal, n (%)	17 (65.3)
Neumonía, n (%)	6 (23.0)
Ambas, n (%)	3 (11.5)
Bacteriemia, n (%)	7 (26.9)
Estancia intrahospitalaria, md (p25-p75)	29 (20-52)
Fallecidos, n (%)	1 (3.8)
Abreviaturas: md: mediana, p25: percentil 25, p75: percentil 75.	

Cuadro 8. Enfermedades de acuerdo al índice de comorbilidad de Charlson en los pacientes estudiados	
Enfermedad	n (%)
Diabetes mellitus	11 (42.3)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	5 (19.2)
Insuficiencia renal crónica	5 (19.2)
Enfermedad ácido péptica	3 (11.5)
Antecedente de infarto agudo al miocardio	2 (7.6)
Enfermedad vascular periférica	2 (7.6)
Demencia	1 (3.8)
Cirrosis estadio Child A	1 (3.8)
Cirrosis estadio Child B-C	3 (11.5)
Insuficiencia cardíaca congestiva	0
Enfermedad vascular cerebral	0
Hemiplejía	0
Sin enfermedades crónicas	7 (26.9)

Características microbiológicas y tratamiento antimicrobiano de los individuos estudiados

En todos los pacientes se corroboró la presencia de sepsis abdominal y/o neumonía, además de cultivos positivos con algún BGN en este evento infeccioso. Sin embargo, 8 (30.7%) pacientes habían padecido alguna infección en los 30 días previos a su inclusión las cuales incluyeron: infección de vías urinarias (1), alguna infección del tracto respiratorio superior o inferior (2) y antecedente de sepsis abdominal (5). No se identificó alguna asociación entre el antecedente de infección previa y el ICC ($p=0.515$). Los BGN identificados fueron enterobacterias en 23 (88.4%) individuos y bacilos no fermentadores en 13 (50.0%). Otros microorganismos identificados fueron cocos Gram-positivos en 9 (34.6%) pacientes y hongos en 1 (3.8%) enfermo. La infección por dos o más microorganismos se identificó en 16 (61.5%) pacientes. Todos los pacientes recibieron tratamiento antibacteriano empírico para el proceso infeccioso sospechado o documentado, sin embargo, los resultados de sensibilidad bacteriana revelaron que los antimicrobianos administrados fueron activos en contra de los microorganismos identificados en 18 pacientes (69.2%). Adicionalmente, el control del foco infeccioso (drenaje o intervención quirúrgica) fue alcanzado en todos de los casos que lo requirieron. Finalmente, 7 (26.9%) pacientes desarrollaron bacteriemia.

Indicadores de disfunción orgánica y factores de riesgo para su desarrollo

Veinte (76.9%) enfermos desarrollaron algún grado de disfunción orgánica definida con una puntuación igual o mayor a 1 en algún sistema evaluado por la escala SOFA. Las fallas orgánicas afectaron a diversos órganos, sin embargo, la falla respiratoria y hemodinámica fueron las más frecuentes (cuadro 9). El monitoreo y tratamiento de las estrategias de "reanimación temprana dirigidas por metas" para tratamiento de sepsis grave o choque séptico fueron completados en 23 (92.0%) casos.

Cuadro 9. Indicadores de disfunción orgánica en los pacientes estudiados	
Sepsis grave o choque séptico durante la hospitalización, n (%)	16 (61.5)
SOFA más alto durante el internamiento, md (p25-p75)	3.5 (1-6)
Número de pacientes con lactato >4 mmol/L, n (%)	16 (61.5)
Número de fallas orgánicas desarrolladas en el internamiento, md (p25-p75)	1 (0-2)
Fallas orgánicas	
Respiratoria, n (%)	6 (23.0)
Hemodinámica, n (%)	5 (19.2)
Hepática, n (%)	5 (19.2)
Renal, n (%)	4 (15.3)
Coagulación, n (%)	2 (7.6)
Sistema Nervioso Central, n (%)	0 (0%)
Abreviaturas: md: mediana, p25: percentil 25, p75: percentil 75.	

En el análisis univariable, la comorbilidad medida a través del ICC y la administración de algún fármaco como estatinas, aspirina o bezafibrato fueron los factores de riesgo significativamente asociados con el desarrollo de disfunción orgánica (cuadro 10). Adicionalmente, aunque la edad y el tratamiento antibiótico no activo *in vitro* mostraron asociaciones que no fueron estadísticamente significativas con la magnitud de disfunción orgánica, la puntuación de la escala SOFA fue mayor en los pacientes mayores de 50 años (mediana = 4, RIC = 3-6)

comparados con los de menor edad (mediana = 1, RIC = 1-4), $p=0.068$, y en aquellos que recibieron tratamiento antimicrobiano no activo en contra del germen identificado (mediana = 4.5, RIC = 0.5-6) en comparación con aquellos en los que el agente antimicrobiano fue activo *in vitro* (mediana = 3, RIC = 1-4), $p=0.377$. Finalmente, el análisis multivariable identificó que la comorbilidad evaluada a través del ICC fue el factor que continuó mostrando alguna asociación estadísticamente significativa después del ajuste a otras variables clínicamente relevantes (cuadro 11 y figura 7).

Cuadro 10. Análisis univariable: factores de riesgo potencialmente asociados con el desarrollo de disfunción orgánica (SOFA)*

Factor	RM	IC95%	p
Medicación previa: estatinas, fibratos o aspirina	15.08	2.00-113.7	0.008
Edad >50 años	3.85	0.90-16.42	0.068
Índice de comorbilidad de Charlson	3.24	1.72- 6.09	<0.001
Infección previa (30 días previos)	2.10	0.33-13.23	0.426
Bacteriemia por cualquier germen	2.51	0.50-12.38	0.258
Tratamiento antibiótico no activo <i>in vitro</i>	2.02	0.42-9.67	0.377
Sexo masculino	1.62	0.41-6.38	0.488
Índice de masa corporal	1.11	0.97-1.27	0.105

*Análisis de regresión logística ordinal usando como desenlace el puntaje de la escala SOFA más alto alcanzado en la hospitalización.
Abreviaturas: IC: intervalo de confianza, RM: razón de momios, SOFA: escala de evaluación secuencial de falla orgánica.

Cuadro 11. Análisis multivariable: factores de riesgo potencialmente asociados con el desarrollo de disfunción orgánica (SOFA)

Factor	RM	IC95%	p
Índice de comorbilidad de Charlson	2.99	1.25-7.17	0.014
Sexo masculino	1.25	0.18-8.66	0.817
Tratamiento antibiótico no activo <i>in vitro</i>	1.04	0.18-5.94	0.962
Edad	0.97	0.91-1.04	0.486
Medicación previa: estatinas, fibratos o aspirina	0.72	0.01-47.58	0.880

*Análisis de regresión logística ordinal usando como desenlace el puntaje de la escala SOFA más alto alcanzado en la hospitalización.
Nota: El análisis incluyó a las variables enlistadas. Adicionalmente, en el modelo se incluyó el producto del índice de comorbilidad de Charlson y la medicación previa para evaluación de confusión entre estas variables.
Abreviaturas: IC: intervalo de confianza, RM: razón de momios, SOFA: escala de evaluación secuencial de falla orgánica.

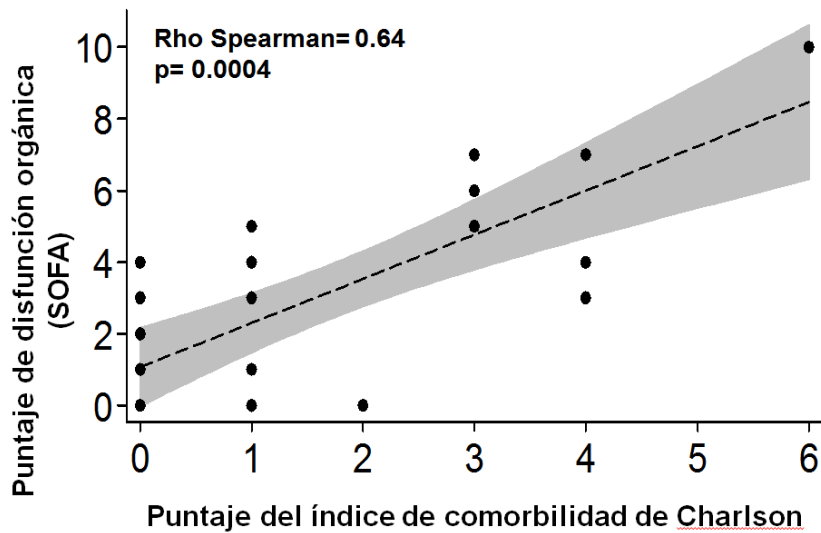


Figura 7. Correlación entre el índice de comorbilidad de Charlson y la magnitud de la disfunción orgánica.

Análisis de la correlación entre la expresión génica de marcadores inflamatorios y la comorbilidad

No se identificó alguna correlación significativa entre el ICC y la expresión génica de las citocinas estudiadas en los días 3 o 7 después de la inclusión de los pacientes al estudio (figura 8 y figura 9). Adicionalmente, el análisis de la expresión génica del área bajo la curva que refleja la transcripción de las citocinas estudiadas en la primera semana del proceso infeccioso, no mostró correlaciones significativas con el ICC (figura 10). En forma complementaria, el estudio de la expresión génica de TLR4 a lo largo de la primera semana del evento infeccioso, no mostró asociaciones significativas con el ICC (figura 11).

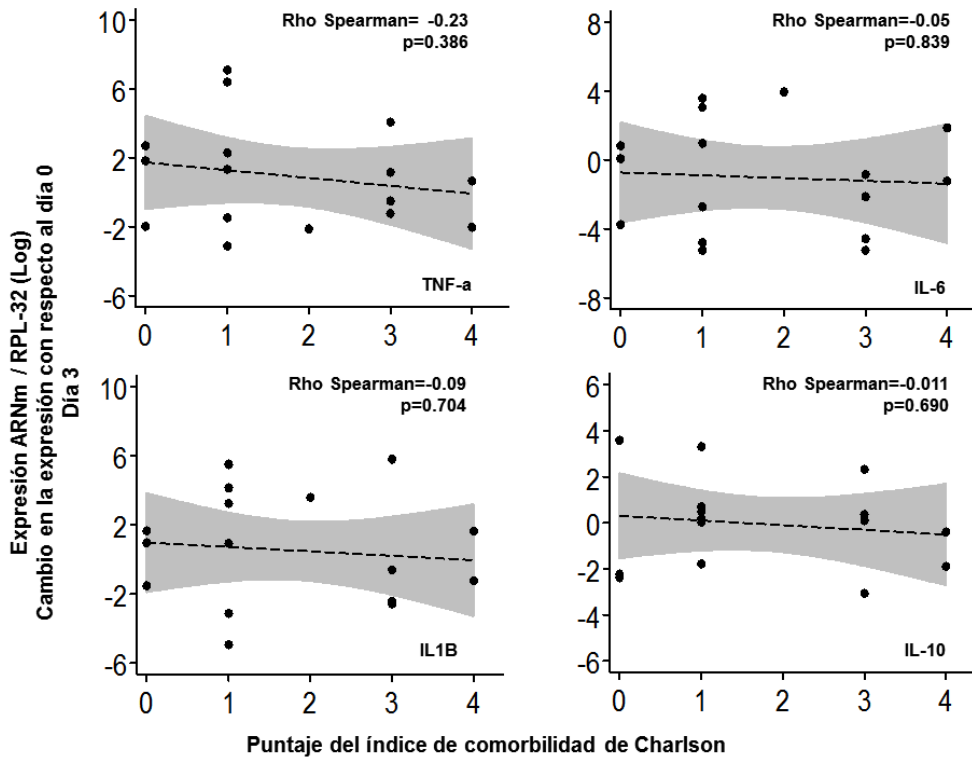


Figura 8. Correlaciones entre el ICC y expresión génica de citocinas en el día 3 del proceso infeccioso.

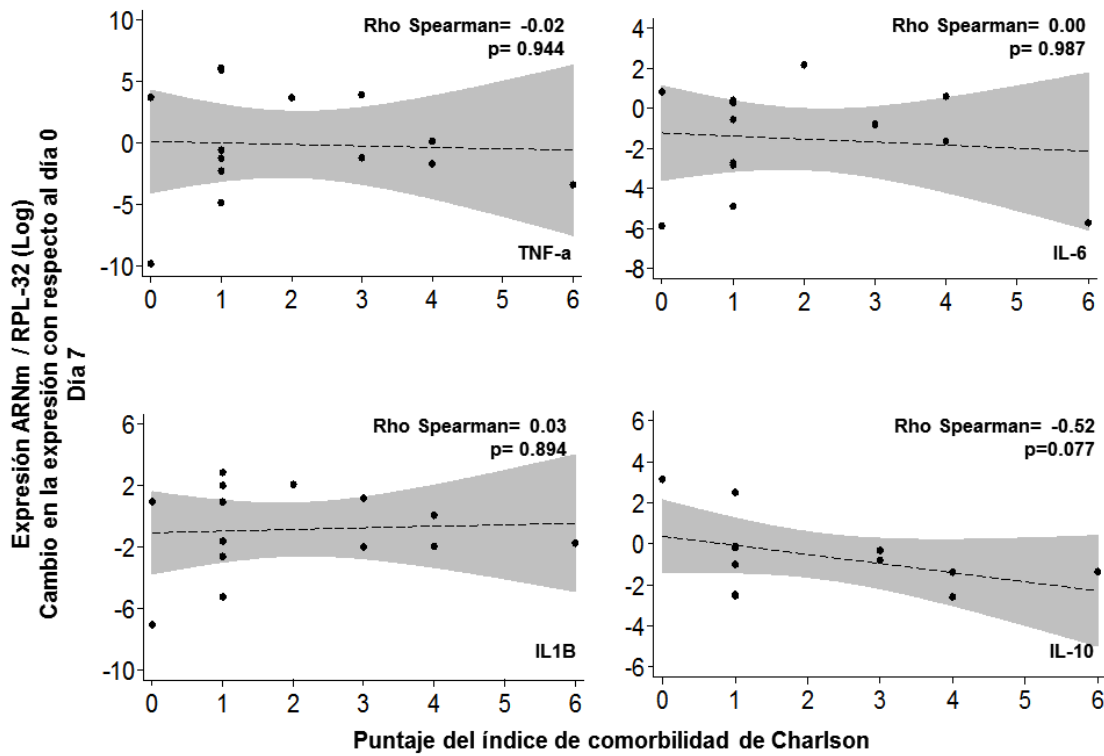


Figura 9. Correlaciones entre el ICC y expresión génica de citocinas en el día 7 del proceso infeccioso.

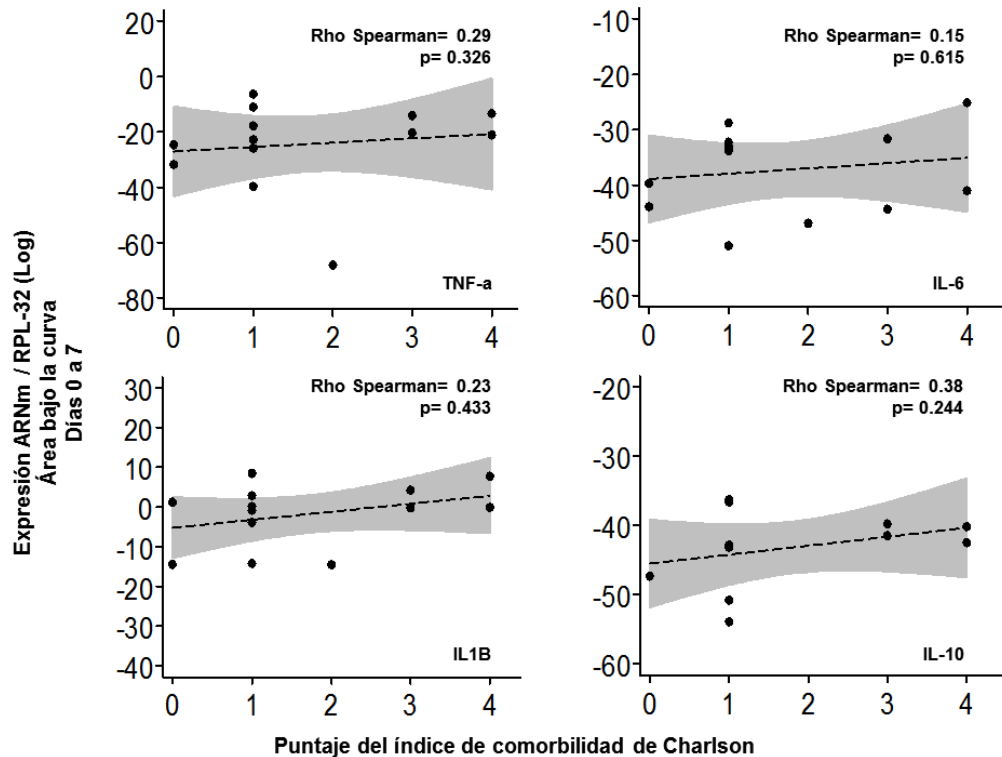


Figura 10. Correlaciones entre el ICC y el área bajo la curva de la expresión génica de citocinas en la primera semana del proceso infeccioso.

Análisis de la correlación entre la secreción espontánea de citocinas por las CMN periféricas y la comorbilidad

El análisis de las asociaciones de la secreción espontánea de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17 en día 0 con el ICC, no mostró asociaciones significativas. Por el contrario, la secreción de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-17 en los días 0 a 3 mostró una correlación inversa con el ICC. Particularmente, resultaron estadísticamente significativos los descensos de la secreción de TNF- α e IL-6 en los días 0 a 3 en los pacientes con un mayor puntaje en la escala de comorbilidades (figura 12). Por el contrario, no se identificó alguna correlación significativa entre la secreción de citocinas en los días 3 a 7 con el ICC (figura 13). De forma similar, el análisis del área bajo la curva de la secreción de citocinas, no mostró alguna correlación significativa con el ICC

(figura 14). Por la frecuencia de DM en los pacientes estudiados, se analizó en forma exploratoria la secreción de TNF- α e IL-10 de los días 0 a 3 de acuerdo a: a) la ausencia de comorbilidades, b) la presencia de comorbilidades sin DM y, c) la presencia de DM. Se identificó un descenso no estadísticamente significativo en la secreción de éstas citocinas en los pacientes con sepsis y con diabetes mellitus en comparación con aquellos sin DM o sin comorbilidades (figura 15).

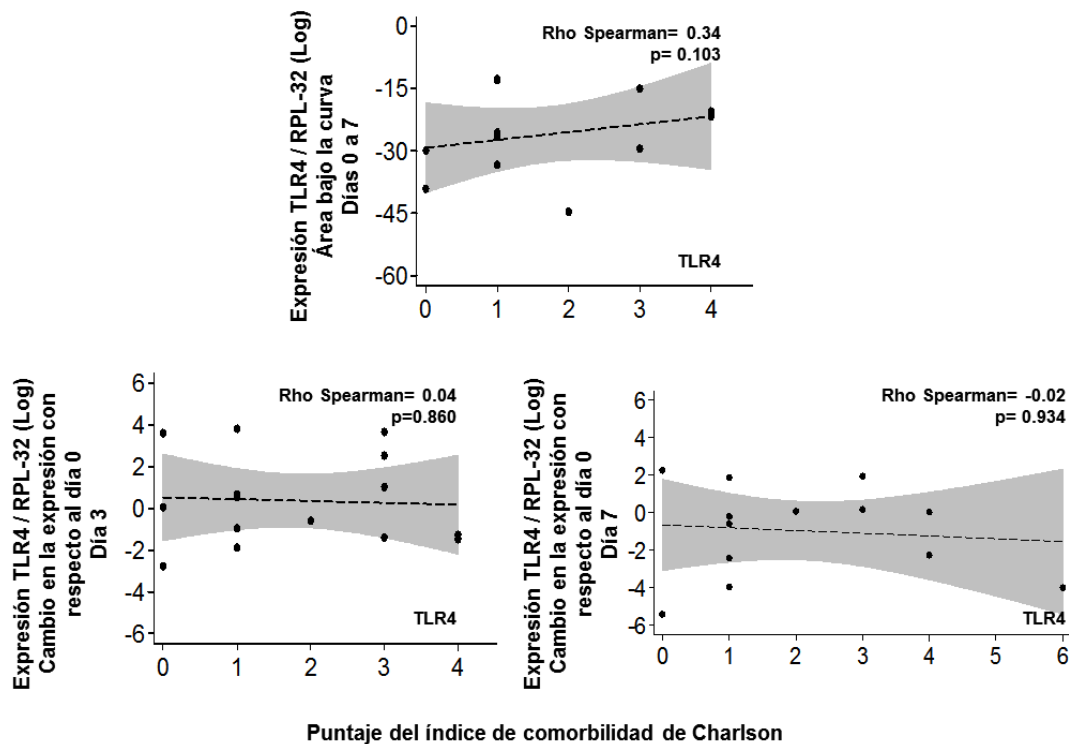


Figura 11. Correlaciones entre el ICC y la expresión génica de TLR4 en la primera semana del proceso infeccioso.

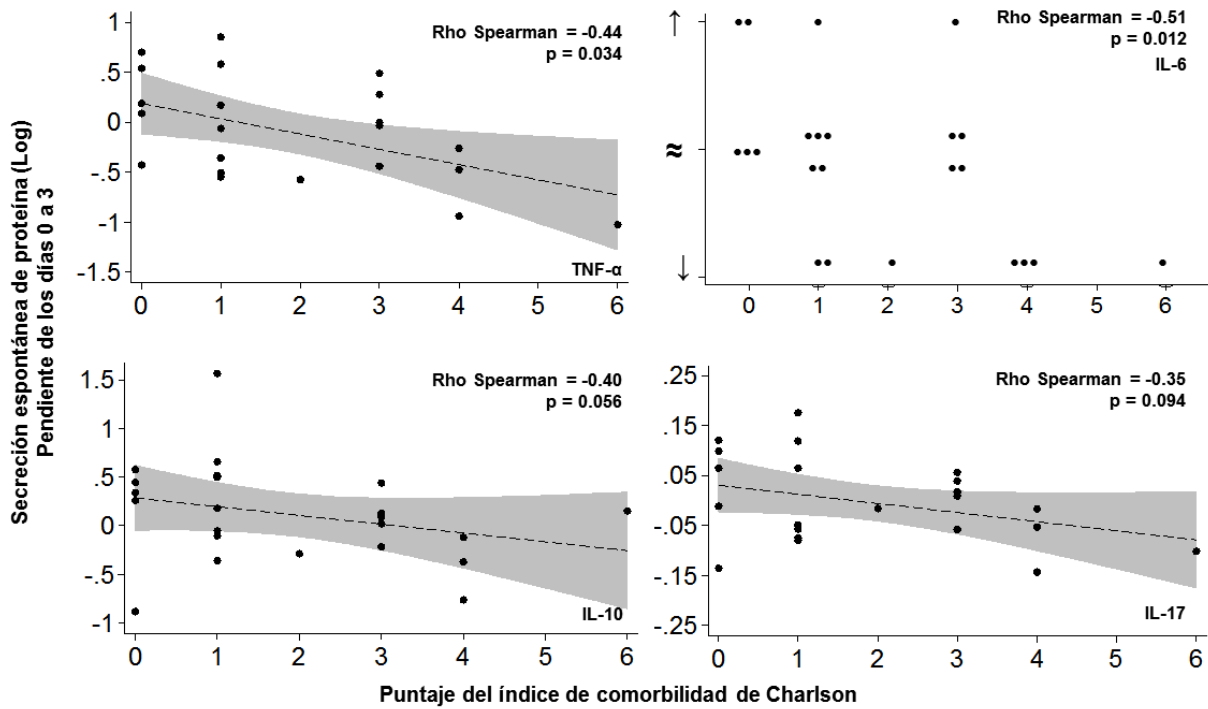


Figura 12. Correlaciones entre el ICC y la pendiente de la secreción espontánea de citocinas en los días 0 a 3 del proceso infeccioso.

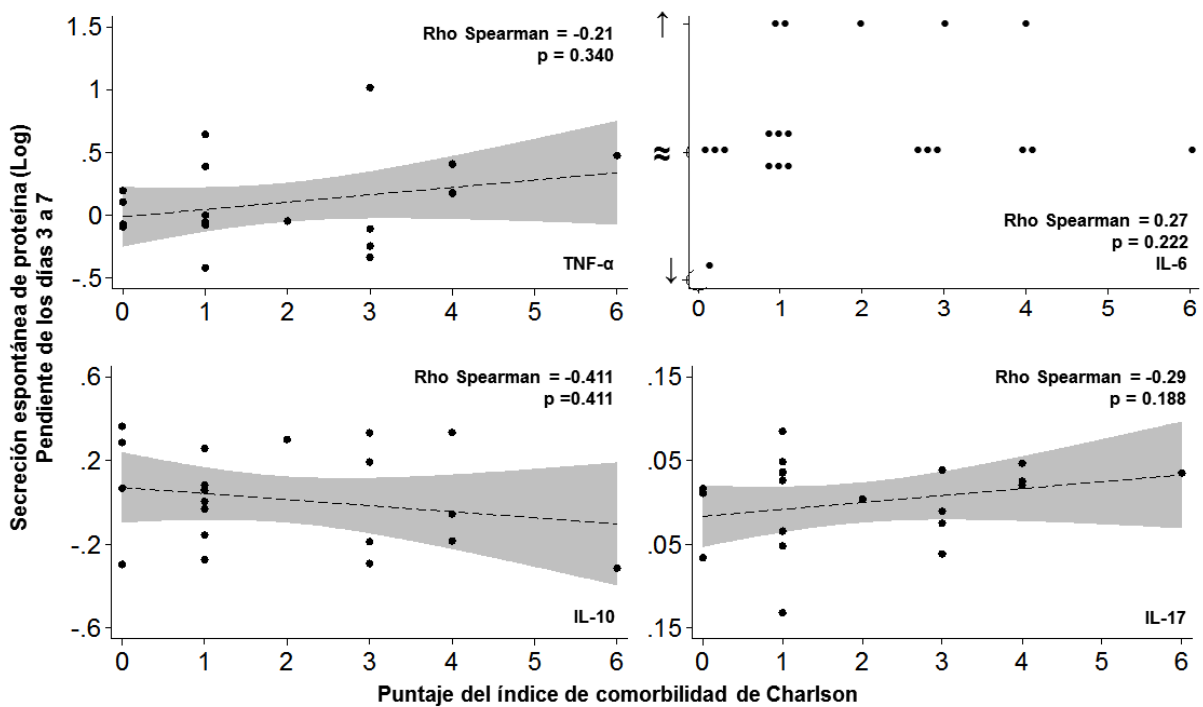


Figura 13. Correlaciones entre el ICC y la pendiente de la secreción espontánea de citocinas en los días 3 a 7 del proceso infeccioso.

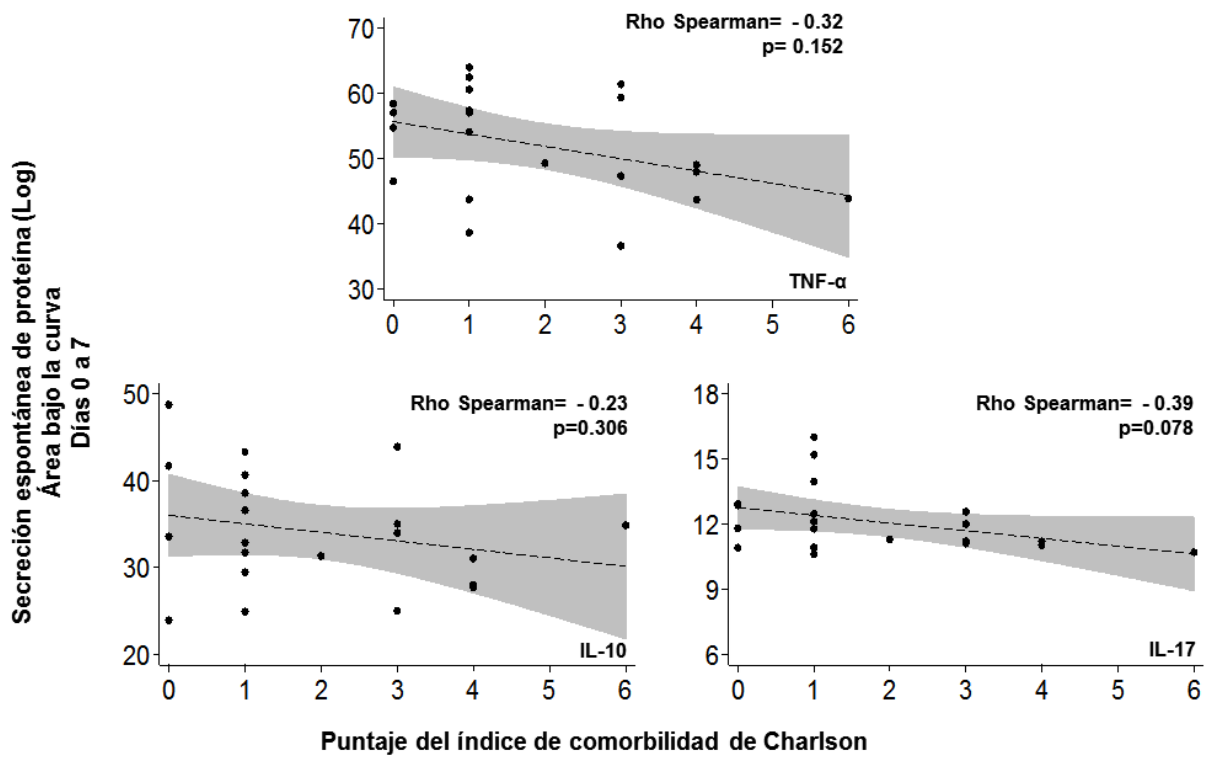


Figura 14. Correlaciones entre el ICC y el área bajo la curva de la secreción espontánea de citocinas en la primera semana del proceso infeccioso.

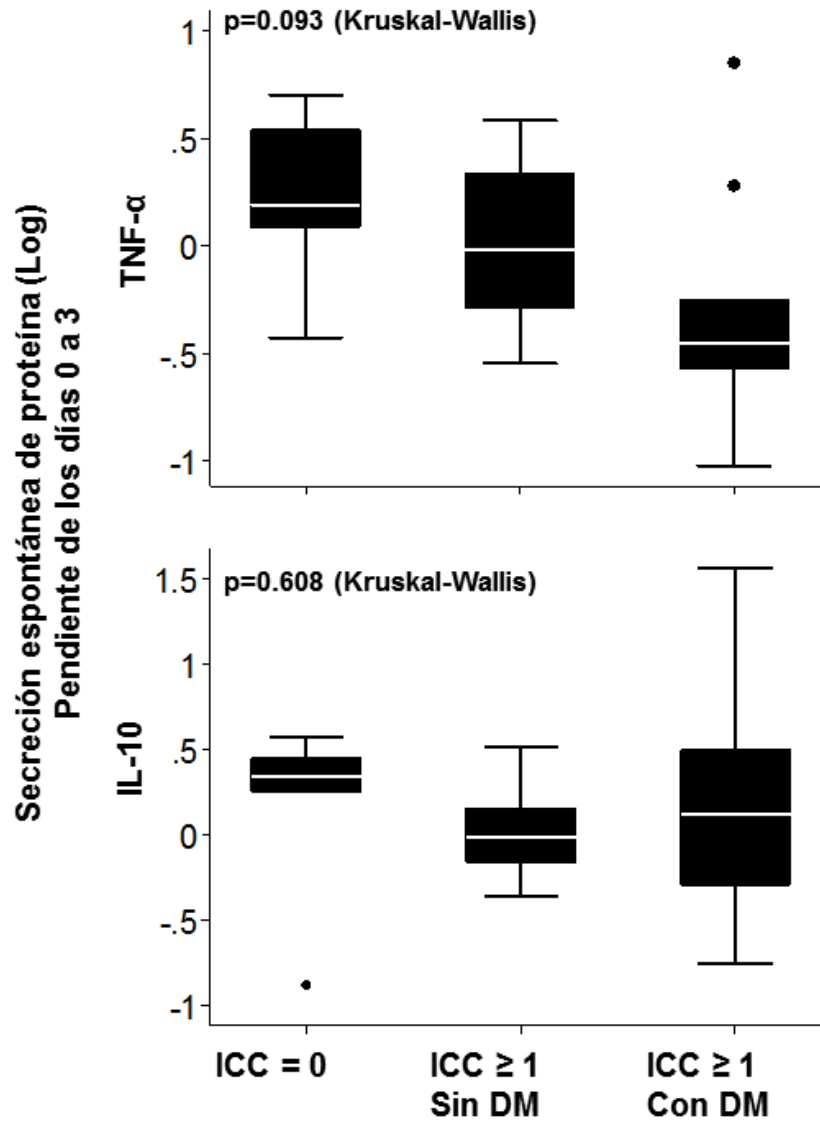


Figura 15. Pendiente de la secreción espontánea de citocinas de los días 0 a 3 en pacientes sin comorbilidades (ICC = 0), con comorbilidades pero sin diabetes mellitus (ICC ≥ 1 Sin DM) y en pacientes con diabetes mellitus (ICC ≥ 1 Con DM).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio piloto corroboró la asociación entre la carga de enfermedades crónicas y la gravedad por sepsis que se ha observado en diversos estudios observacionales y ensayos clínicos ^{38-40, 42, 44}. Fue diseñado con el objetivo de analizar secuencialmente la magnitud de la activación de las CMN periféricas a través del estudio de 1) la expresión génica de citocinas vinculadas con la respuesta inflamatoria a las infecciones, y 2) la secreción espontánea de citocinas en la primera semana desde la detección de sepsis abdominal y/o neumonía causadas por BGN. Los principales resultados mostraron que la expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1 β , no tuvieron asociaciones significativas con la comorbilidad evaluada a través del ICC. Sin embargo, el análisis de la tendencia de la secreción espontánea de citocinas por las CMN periféricas en los primeros 3 días de evolución, mostró que la secreción de citocinas, particularmente de TNF- α e IL-6, tiene una correlación inversa con el ICC, sugiriendo que las enfermedades crónicas, entre las que se encuentra la DM, podrían afectar la respuesta inmune innata durante los primeros días de la infección incrementando el riesgo de una mayor gravedad en un evento infeccioso.

Los resultados este estudio son novedosos dado que en la literatura se han descrito alteraciones del sistema inmune en los pacientes con sepsis y en aquellos con síndrome metabólico que indican que existe un estado proinflamatorio en ambos trastornos ^{79, 98}. Sin embargo, algunos estudios en modelos animales y en humanos indican que algunas enfermedades crónicas modifican la respuesta

inflamatoria durante eventos infecciosos o traumáticos. En un estudio en ratas diabéticas tipo 1 se observó que después de la administración intratraqueal de LPS, se encontraron menores concentraciones de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el lavado bronquioalveolar que en animales sin diabetes ⁹⁹. Por el contrario, otro estudio realizado en ratas con diabetes tipo 2 tipo Goto-Kakizaki, los niveles circulantes de IL-6 e IL-10 fueron más elevados a las 20 h después de haber inducido sepsis abdominal en comparación con las ratas no diabéticas ¹⁰⁰. Aunque es difícil identificar la causa de la ausencia de concordancia de estos estudios, la disparidad en el momento de la evaluación, y las diferencias en el tipo de diabetes de esos modelos, son algunas explicaciones para las discrepancias en sus resultados. Por lo anterior, el análisis de la respuesta inflamatoria en humanos es trascendental. Un estudio realizado en pacientes con diabetes que desarrollaron infecciones del tracto genital urinario, identificó concentraciones menores de IL-6 en orina y en la secreción inducida por sus células mononucleares periféricas cuando fueron comparadas con las concentraciones de enfermos sin diabetes ¹⁰¹. Más aun, otro estudio en donde se exploró retrospectivamente la secreción de citocinas en pacientes obesos que habían sufrido algún trauma contuso grave, mostró que los enfermos con índice de masa corporal mayor a 30 kg/m² presentaron concentraciones de citocinas significativamente menores en comparación con los sujetos con un índice de masa corporal normal después del evento traumático ¹⁰². Estos resultados, en conjunto con los encontrados en nuestro estudio, son concordantes con la hipótesis que indica que la inmunopatogénesis de sepsis está importantemente afectada por la comorbilidad ⁸⁴ sugiriendo que existe una respuesta inmune innata paradójica en los individuos

con múltiples enfermedades lo cual puede predisponerlos al desarrollo de complicaciones.

La secreción disminuida de citocinas, particularmente TNF- α e IL-6, en los pacientes con sepsis y un mayor número de enfermedades crónicas, podría condicionar una menor capacidad del hospedero para eliminar el agente infeccioso. Por ejemplo, dada la importancia de TNF- α en la activación de diversas células inmunes y en la liberación de otros mediadores inflamatorios, la menor secreción de TNF- α en pacientes con más enfermedades crónicas podría afectar la diferenciación y activación de macrófagos, o quizá limitaría la activación de especies reactivas de oxígeno que son cruciales en la respuesta a patógenos. Por otro lado, la expresión de moléculas de adhesión intercelular-1 y moléculas de adhesión a células vasculares-1 podría ser menor en respuesta a menores concentraciones de TNF- α , lo que conseguiría afectar la trans migración de leucocitos así como la señalización de la interacción de los leucocitos con el endotelio. Asimismo, la disminución en la secreción de IL-6 en los pacientes con más comorbilidades, podría alterar múltiples mecanismos de respuesta como la liberación de reactantes de fase aguda hepáticos dentro de los que se encuentran algunos elementos del complemento, alterando la opsonización y lisis de microorganismos ¹⁰³.

La respuesta inmune innata a patógenos incluye múltiples procesos que incluyen reclutamiento celular en el sitio afectado, fagocitosis, eliminación intracelular de patógenos, activación del complemento, NETosis, liberación de citocinas y quimiocinas (e.g. MCP-1) para la propagación de la respuesta inflamatoria, activación de células asesinas naturales y de otros linfocitos con capacidad de

respuesta innata [células b-1, células $\gamma\delta$ o células asesinas naturales invariantes (iNKT cells)], entre otras respuestas. Por lo que, otros estudios encaminados a examinar algunos de estos mecanismos después de algún estímulo (e.g. LPS) *ex vivo*, podrían proporcionar más información sobre los mecanismos efectores afectados en los pacientes con múltiples enfermedades crónicas que sufren algún evento infeccioso grave.

Otros factores importantes podrían modificar la respuesta inflamatoria en este grupo de pacientes. Particularmente, se intentó analizar la expresión génica y la secreción de citocinas de acuerdo a los gérmenes identificados, sin embargo, se identificó que la segregación del grupo de estudio condujo a una reducción notable de los sujetos en cada subgrupo lo que imposibilitó la evaluación de este aspecto. Aunque todos los pacientes tuvieron cultivos positivos, únicamente 11 (42%) pacientes tenían infecciones por enterobacterias y solo en 3 (12%) se identificaron infecciones por BGN no fermentadores; el resto de individuos tuvieron infecciones combinadas, esto es, infecciones por enterobacterias y BGN no fermentadores (n=3); con enterobacterias y gérmenes Gram-positivos (n=2); con enterobacterias, BGN no fermentadores y gérmenes Gram-positivos (n=6); y con enterobacterias, BGN no fermentadores, gérmenes Gram-positivos y hongos (n=1). Por lo anterior, el análisis de estos factores requerirá estudios adicionales con un número sustancialmente mayor de individuos.

Asimismo, diversos estudios sugieren que la respuesta inflamatoria puede ser modificada directamente por algunos antimicrobianos. En particular, algunos estudios indican que ciprofloxacino, ceftazidima, piperacilina o los macrólidos reducen la secreción de citocinas después de la estimulación con algún BGN *in*

vitro^{104, 105}. Además, se ha observado que la administración de ciprofloxacino a dosis supraterapéuticas, induce la liberación de IL-1 e IL-2¹⁰⁶. Por lo anterior, en este estudio se intentó evaluar el potencial efecto de los antimicrobianos sobre la producción de citocinas, sin embargo, se identificó que 80.8% de los enfermos recibieron combinaciones de dos o más antimicrobianos de diferentes grupos farmacológicos, haciendo imposible segregar el efecto de algún antimicrobiano en particular sobre la expresión génica o la secreción de citocinas de las CMN. Por lo anterior, considerando que los esquemas antimicrobianos empíricos para el tratamiento de neumonía y sepsis abdominal incluyen distintas combinaciones de 2 o hasta 3 antibióticos, la evaluación de los efectos de los antimicrobianos *in vivo* podría ser mejor examinada en centros hospitalarios con esquemas de tratamientos menos heterogéneos o en modelos animales de infección.

Otro hallazgo relevante en este estudio fue de la ausencia de correlación entre la expresión génica de células mononucleares periféricas y la secreción espontánea de citocinas en células mononucleares periféricas provenientes de la misma muestra (figura 16). La falta de correlación entre la expresión génica y la secreción proteica ha sido observada en estudios previos¹⁰⁷ y ha sido enfatizada dado que existen teorías discordantes sobre la inmunopatogénesis de la sepsis basadas en el análisis de la expresión génica o en la cuantificación proteica de diversos marcadores¹⁸. Estos antecedentes, en conjunto con las observaciones de este estudio, sugieren que las comorbilidades podrían estar afectando el proceso de traducción hacia la síntesis proteica y no la transcripción del ADN. Por lo anterior, estudios adicionales requerirán el análisis de diversos procesos para determinar los mecanismos moleculares involucrados en la menor secreción proteica en

enfermos con diabetes o múltiples comorbilidades. Aunque se conoce que cierto grado de inflamación ocurre en pacientes con enfermedades crónicas como diabetes y obesidad ⁹⁸, poco se conoce con respecto a las alteraciones potenciales que la inflamación crónica puede generar en la respuesta a citocinas después de un evento infeccioso o traumático agudo. Aunque múltiples procesos pueden estar afectados, uno de los mecanismos candidato es el estrés del retículo endoplásmico. Por ejemplo, la edad y algunas enfermedades como la diabetes y la obesidad, conllevan disminución de la actividad del proteosoma originando acumulación de proteínas desplegadas y desencadenando estrés del retículo endoplásmico ¹⁰⁸. En este proceso, uno de los mediadores con cambio de su expresión durante las condiciones de estrés metabólico es la proteína homóloga C/EBP (C/EBP homologous protein, CHOP) cuyo resultado es la menor secreción de TNF- α e IL-1 β ¹⁰⁹. Por lo anterior, es factible que los cambios en la expresión de CHOP estén asociados con menor secreción de citocinas por lo que resultará importante evaluar esta proteína u otros marcadores de la vía de señalización del estrés del retículo endoplásmico en futuros estudios en pacientes con sepsis.

Este estudio no es capaz de disecar los efectos de la comorbilidad y la edad dado que la frecuencia de comorbilidades fue mayor en los pacientes de mayor edad. Si bien diferentes funciones del sistema inmune innato están alteradas en los pacientes mayores de 65 años ¹¹⁰, algunos estudios han mostrado que otros indicadores de la función de la respuesta inmune innata como la actividad de neutrófilos, la de las células asesinas naturales ¹¹⁰, así como la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas ^{111, 112}, se mantienen relativamente conservadas entre los pacientes con sepsis de mayor edad cuando son

comparados con sus contrapartes más jóvenes. Estos antecedentes sugieren que las alteraciones de la secreción de citocinas observada en este estudio podrían estar vinculadas con las enfermedades crónicas. Por otro lado, dado que diversos estudios en humanos han mostrado que los pacientes mayores de 65 años son también aquellos que tienen mayor número de condiciones médicas previas^{8, 39, 113}, la distinción y caracterización del efecto independiente de estas dos entidades es extremadamente difícil en humanos y podría ser mejor evaluada en modelos animales. En forma similar, en este estudio no es posible discernir los efectos de cada enfermedad y sus tratamientos sobre la expresión génica o la secreción de citocinas, por lo que estas preguntas podrán ser preferiblemente estudiadas en modelos animales de infección.

El pronóstico de los enfermos con sepsis depende de diversos factores. Los factores terapéuticos que podrían explicar que un solo enfermo falleció a pesar que 61.5% desarrollaron algún grado de disfunción orgánica son: la alta frecuencia del cumplimiento de las medidas de reanimación (92%), uso de antimicrobianos empíricos apropiados (69.2%) y resolución del foco infeccioso en los casos en donde estaba indicado (100%). Sin embargo, dada la importancia de las citocinas en sepsis, en un subanálisis se evaluó la potencial asociación del desarrollo de disfunción orgánica con la expresión génica y la secreción espontánea de IL-6 e IL-10. Se seleccionaron estas citocinas como representantes de la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria, y por los antecedentes sobre su asociación con pronóstico desfavorable en pacientes con sepsis en otros estudios. No se observó alguna asociación significativa entre estas citocinas y el pronóstico (cuadro 12). Ésta ausencia de asociación puede ser resultado del periodo en el que se realizó

la toma de muestras (únicamente en la primera semana del proceso infeccioso), por lo que estudios adicionales que analicen la secreción de mediadores inflamatorios con potenciales implicaciones pronósticas (e.g. HMGB1, MCP-1) ¹¹⁴ durante periodos más amplios de la sepsis, serán de gran interés para comprender el impacto de la respuesta inflamatoria en el pronóstico.

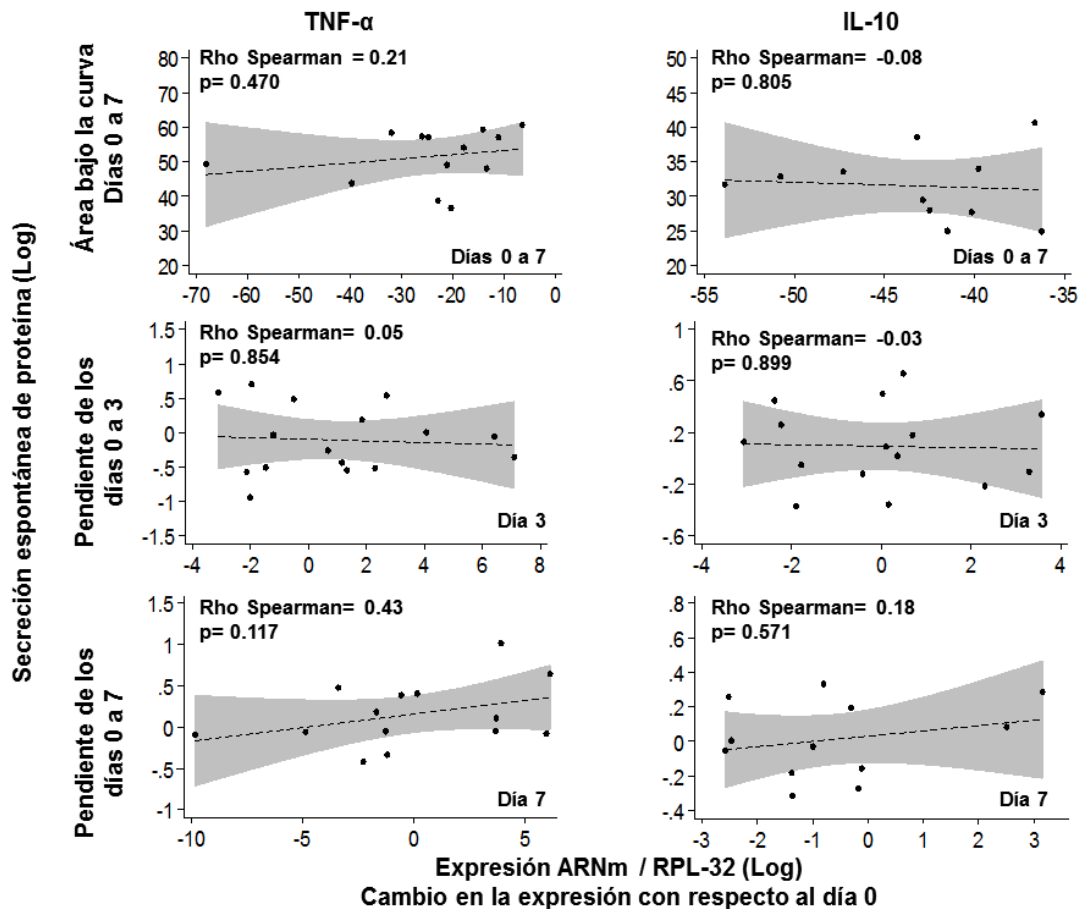


Figura 16. Correlación entre la expresión génica de citocinas y la secreción espontánea de citocinas de las células mononucleares periféricas.

El análisis estadístico de los marcadores inflamatorios en este estudio fue planeado considerando que la sepsis es un proceso extremadamente dinámico y que existe considerable heterogeneidad en la respuesta humana a la infección.

Consecuentemente, el análisis estadístico incluyó estrategias de análisis que utilizan al individuo en estudio como su propio control ⁹⁷. Lo anterior, permitió caracterizar algunos marcadores de la respuesta inmune innata considerando la individualidad de cada sujeto de estudio. Adicionalmente, este estudio fue diseñado para cumplir con los requerimientos y la terminología recomendada por las guías MIQE para la comunicación de estudios que utilizan PCR cuantitativa en tiempo real (The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) ¹¹⁵.

Cuadro 12. Análisis univariable y multivariable de la asociación entre la disfunción orgánica (SOFA) con la expresión génica y la secreción espontánea de citocinas de las CMN

Factor	Análisis univariable*		Análisis multivariable (ajustado por comorbilidades)**	
	RM (IC95%)	p	RM (IC95%)	p
Expresión génica IL-6, día 3	0.86 (0.63-1.16)	0.334	0.84 (0.61-1.17)	0.329
Expresión génica IL-6, día 7	0.92 (0.60-1.42)	0.726	0.90 (0.57-1.40)	0.644
Expresión génica IL-10, día 3	1.16 (0.71-1.88)	0.533	1.60 (0.92-2.80)	0.096
Expresión génica IL-10, día 7	0.86 (0.51-1.45)	0.577	1.37 (0.70-2.66)	0.346
Secreción espontánea de IL-6, días 0-3	0.68 (0.24-1.94)	0.482	1.81 (0.53-6.12)	0.335
Secreción espontánea de IL-6, días 3-7	2.96 (0.61-14.36)	0.178	2.32 (0.35-15.26)	0.380
Secreción espontánea de IL-10, días 0-3	0.54 (0.15-1.95)	0.349	1.06 (0.23-4.85)	0.936
Secreción espontánea de IL-10, días 3-7	0.72 (0.02-21.67)	0.855	3.14 (0.08-122.54)	0.540

Análisis de regresión logística ordinal usando como desenlace el puntaje de la escala SOFA más alto alcanzado en la hospitalización.

*El análisis univariable evaluó la asociación entre el puntaje de la escala SOFA y el factor en estudio.

**El análisis multivariable evaluó la asociación entre el puntaje de la escala SOFA y el factor en estudio incluyendo en el modelo el puntaje del índice de comorbilidad de Charlson.

Abreviaturas: CMN: células mononucleares, RM: razón de momios, SOFA: escala de evaluación secuencial de falla orgánica.

Este estudio tiene diversas limitaciones. Primeramente, el número de sujetos eliminados en la fase selección fue alto; sin embargo, aunque este factor limita la representatividad a otro tipo de infecciones, permite la evaluación de un grupo de

sujetos con criterios de inclusión claramente definidos *a priori*. Por lo anterior, será necesario evaluar en estudios subsecuentes la secreción de citocinas y la expresión génica de CMN de sangre periférica en enfermos con infecciones por otro tipo de infecciones y gérmenes. Otra limitación está relacionada con la dificultad de comparar con un grupo control pareado por edad, sexo y sin comorbilidades ni medicamentos (como aspirina o hipolipemiantes); sin embargo, es extremadamente difícil incluir a un grupo con estas características e infecciones, por lo que este estudio pragmático se diseñó para estudiar meticulosamente a pacientes con características clínicas comunes. Finalmente, este estudio no evaluó la concentración de sérica de citocinas dado que fue considerado que las concentraciones de mediadores en suero contienen la producción de citocinas por otros componentes celulares, además de las CMN, haciendo imposible identificar la activación de las CMN *in vivo*. Sin embargo, considerando que la cuantificación de citocinas séricas en humanos y animales con sepsis ha sido crucial para conocer diversos aspectos de la respuesta inflamatoria de este trastorno, se planea su cuantificación en este grupo de enfermos. Se espera que estos resultados permitan entender mejor la respuesta inflamatoria y el estudio de la compartimentalización de la respuesta inflamatoria en humanos con sepsis abdominal y neumonía.

En conclusión, este estudio mostró que la comorbilidad es un factor independientemente asociado con el desarrollo de sepsis grave en pacientes con sepsis abdominal y neumonía. La comorbilidad no se encontró asociada con cambios en la expresión génica de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β y TLR4 durante la primera semana del proceso infeccioso. Por otro lado, mostró que la comorbilidad

se asoció con una menor secreción de citocinas, particularmente de TNF- α e IL-6, sugiriendo que las enfermedades crónicas pueden afectar la secreción de moléculas inflamatorias modificando la respuesta inmune durante los procesos infecciosos causados por BGN. Aunque los resultados de este estudio provienen de una cohorte, nuestros hallazgos se encuentran limitados por el número de sujetos analizados lo que impide que podamos obtener conclusiones definitivas. Sin embargo, la observación de una menor secreción de citocinas en los pacientes con enfermedades crónicas sugiere que la respuesta inflamatoria en este grupo de enfermos es distinta por lo que estudios subsecuentes en humanos y en modelos animales deberán evaluar la respuesta inmune en sujetos con enfermedades crónicas como diabetes. El estudio cuidadoso de estos enfermos podría ofrecer la oportunidad de mejorar su categorización para establecer tratamientos inmunológicos más apropiados.

REFERENCIAS

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; **20**: 864-74.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; **31**: 1250-6.
3. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; **273**: 117-23.
4. Salvo I, de CW, Musicco M, et al. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995; **21 Suppl 2**: S244-S249.
5. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995; **274**: 968-74.
6. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, et al. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief* 2011: 1-8.
7. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 14. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. México.
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/consulta.asp?c=11800#>.
8. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1546-54.
9. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; **29**: 1303-10.
10. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; **26 Suppl 1**: S64-S74.
11. Ponce de Leon-Rosales SP, Molinar-Ramos F, Dominguez-Cherit G, et al. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. *Crit Care Med* 2000; **28**: 1316-21.

12. Carrillo-Esper R, Carrillo-Cordova JR, Carrillo-Cordova LD. [Epidemiological study of sepsis in Mexican intensive care units]. *Cir Cir* 2009; **77**: 301-8.
13. Wood KA, Angus DC. Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis. *Pharmacoeconomics* 2004; **22**: 895-906.
14. Wier LM, Henke R, Friedman B. Agency for Healthcare Research and Quality. Diagnostic groups with rapidly increasing costs by payer, 2001-2007 : HCUP statistical brief 91, June 2010. In: 2010.
15. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014; **311**: 1308-16.
16. Suffredini AF, Munford RS. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA* 2011; **306**: 194-9.
17. Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 471-82.
18. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 862-74.
19. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA* 2011; **306**: 2614-5.
20. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; **278**: 234-40.
21. Martin MA. Epidemiology and clinical impact of gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1991; **5**: 739-52.
22. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; **17**: 47-52.
23. Luchi M, Morrison DC. Comparable endotoxic properties of lipopolysaccharides are manifest in diverse clinical isolates of gram-negative bacteria. *Infect Immun* 2000; **68**: 1899-904.
24. Kollef MH, Morrow LE, Niederman MS, et al. Clinical characteristics and treatment patterns among patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2006; **129**: 1210-8.
25. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 867-903.

26. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**: 388-416.
27. Kawai S, Ochi M, Nakagawa T, et al. Antimicrobial therapy in community-acquired pneumonia among emergency patients in a university hospital in Japan. *J Infect Chemother* 2004; **10**: 352-8.
28. Paganin F, Lilienthal F, Bourdin A, et al. Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *Eur Respir J* 2004; **24**: 779-85.
29. Levison ME, Bush LM. Peritonitis and Intraperitoneal Abscess. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*. USA: Elsevier INC, 2005; 927-51.
30. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology* 1993; **187**: 403-16.
31. Jin MS, Lee JO. Structures of TLR-ligand complexes. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 414-9.
32. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; **186**: 1522-5.
33. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; **162**: 1028-32.
34. Child NJ, Yang IA, Pullet MC, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 652-3.
35. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, et al. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 2004; **41**: 808-13.
36. Shalhub S, Junker CE, Imahara SD, et al. Variation in the TLR4 gene influences the risk of organ failure and shock posttrauma: a cohort study. *J Trauma* 2009; **66**: 115-22.
37. Zhu L, Li X, Miao C. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene* 2012; **501**: 213-8.

38. Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J, et al. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 1990; **18**: 474-9.
39. Esper AM, Moss M, Lewis CA, et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit Care Med* 2006; **34**: 2576-82.
40. Murray SB, Bates DW, Ngo L, et al. Charlson Index is associated with one-year mortality in emergency department patients with suspected infection. *Acad Emerg Med* 2006; **13**: 530-6.
41. Capelastegui A, Espana Yandiola PP, Quintana JM, et al. Predictors of short-term rehospitalization following discharge of patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Chest* 2009; **136**: 1079-85.
42. Yang Y, Yang KS, Hsann YM, et al. The effect of comorbidity and age on hospital mortality and length of stay in patients with sepsis. *J Crit Care* 2010; **25**: 398-405.
43. Pavon A, Biquet C, Kara F, et al. Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit Care Med* 2013; **41**: 2600-9.
44. Baldwin MR, Narain WR, Wunsch H, et al. A prognostic model for 6-month mortality in elderly survivors of critical illness. *Chest* 2013; **143**: 910-9.
45. Danai PA, Moss M, Mannino DM, et al. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006; **129**: 1432-40.
46. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991; **100**: 1619-36.
47. O'Brien JM, Jr., Lu B, Ali NA, et al. Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2007; **35**: 345-50.
48. Martin G, Brunkhorst FM, Janes JM, et al. The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes. *Crit Care* 2009; **13**: R103.
49. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; **16 Suppl 1**: S27-S36.

50. Osuchowski MF, Craciun FL, Schuller E, et al. Untreated type 1 diabetes increases sepsis-induced mortality without inducing a prelethal cytokine response. *Shock* 2010; **34**: 369-76.
51. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; **6**: 252-62.
52. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006; **34**: 15-21.
53. O'Brien AJ, Fullerton JN, Massey KA, et al. Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nat Med* 2014; **20**: 518-23.
54. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev* 2013; **93**: 1247-88.
55. Murphy KP. The Induced Responses of Innate Immunity. In: Murphy KP, ed. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2012; 39-125.
56. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; **21**: 317-37.
57. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 179-90.
58. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005; **437**: 1032-7.
59. Talwar S, Munson PJ, Barb J, et al. Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiol Genomics* 2006; **25**: 203-15.
60. Huang Q, Liu D, Majewski P, et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 2001; **294**: 870-5.
61. Chung TP, Laramie JM, Meyer DJ, et al. Molecular diagnostics in sepsis: from bedside to bench. *J Am Coll Surg* 2006; **203**: 585-98.
62. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, et al. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 1503-8.

63. Hopf HW. Molecular diagnostics of injury and repair responses in critical illness: what is the future of "monitoring" in the intensive care unit? *Crit Care Med* 2003; **31**: S518-S523.
64. Johnson SB, Lissauer M, Bochicchio GV, et al. Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg* 2007; **245**: 611-21.
65. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, et al. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med* 2009; **37**: 882-8.
66. McDunn JE, Husain KD, Polpitiya AD, et al. Plasticity of the systemic inflammatory response to acute infection during critical illness: development of the riboleukogram. *PLoS One* 2008; **3**: e1564.
67. O'Dwyer MJ, Mankan AK, Stordeur P, et al. The occurrence of severe sepsis and septic shock are related to distinct patterns of cytokine gene expression. *Shock* 2006; **26**: 544-50.
68. Wong HR, Cvijanovich N, Allen GL, et al. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. *Crit Care Med* 2009; **37**: 1558-66.
69. Wong HR, Cvijanovich N, Lin R, et al. Identification of pediatric septic shock subclasses based on genome-wide expression profiling. *BMC Med* 2009; **7**: 34.
70. Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, et al. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med* 2008; **34**: 1371-6.
71. Cobb JP, Moore EE, Hayden DL, et al. Validation of the Riboleukogram to Detect Ventilator-Associated Pneumonia After Severe Injury. *Ann Surg* 2009; **250**: 531-9.
72. Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 281-94.
73. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, et al. Gene-expression profiling of gram-positive and gram-negative sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med* 2008; **36**: 1125-8.
74. Yu SL, Chen HW, Yang PC, et al. Differential gene expression in gram-negative and gram-positive sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **169**: 1135-43.

75. McConnell KW, McDunn JE, Clark AT, et al. Streptococcus pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa pneumonia induce distinct host responses. *Crit Care Med* 2010; **38**: 223-41.
76. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2003; **71**: 5803-13.
77. Rosenstiel P, Derer S, Till A, et al. Systematic expression profiling of innate immune genes defines a complex pattern of immunosenescence in peripheral and intestinal leukocytes. *Genes Immun* 2008; **9**: 103-14.
78. Spielman RS, Bastone LA, Burdick JT, et al. Common genetic variants account for differences in gene expression among ethnic groups. *Nat Genet* 2007; **39**: 226-31.
79. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; **9**: 517-24.
80. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 316-21.
81. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, et al. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; **6**: 19-48.
82. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011; **208**: 2581-90.
83. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; **306**: 2594-605.
84. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; **348**: 138-50.
85. Polpitiya AD, McDunn JE, Burykin A, et al. Using systems biology to simplify complex disease: immune cartography. *Crit Care Med* 2009; **37**: S16-S21.
86. Feezor RJ, Cheng A, Paddock HN, et al. Functional genomics and gene expression profiling in sepsis: beyond class prediction. *Clin Infect Dis* 2005; **41 Suppl 7**: S427-S435.
87. Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 133-64.

88. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; **44 Suppl 2**: S27-S72.
89. Vincent JL, de Mendonca A., Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998; **26**: 1793-800.
90. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987; **40**: 373-83.
91. Thomson RBJ. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In: Murray PR, Baron E.J., Jorgensen J.H., et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washinton, D.C.: American Society of Microbiology, 2007; 291-333.
92. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; **1**: 581-5.
93. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; **26**: 509-15.
94. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1101-8.
95. Mander AP. SAMPSI_RHO: Stata module to compute sample size for a Pearson correlation. <http://EconPapers.repec.org/RePEc:boc:bocode:s456774> (1 April 2009, date last accessed).
96. Williams R. Generalized ordered logit/partial proportional odds models for ordinal dependent variables. *Stata Journal* 2006; **6**: 58-82.
97. Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, et al. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 1990; **300**: 230-5.
98. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 2005; **56**: 45-62.

99. de Oliveira-Martins J., Meyer-Pflug AR, Alba-Loureiro TC, et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. *Shock* 2006; **25**: 260-6.
100. Jacob A, Steinberg ML, Yang J, et al. Sepsis-induced inflammation is exacerbated in an animal model of type 2 diabetes. *Int J Clin Exp Med* 2008; **1**: 22-31.
101. Geerlings SE, Brouwer EC, Van Kessel KC, et al. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2000; **30**: 995-1001.
102. Winfield RD, Delano MJ, Cuenca AG, et al. Obese patients show a depressed cytokine profile following severe blunt injury. *Shock* 2012; **37**: 253-6.
103. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm* 2013; **2013**: 165974.
104. Galley HF, Dhillon JK, Paterson RL, et al. Effect of ciprofloxacin on the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB, activator protein-1 and nuclear factor-interleukin-6, and interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expression in a human endothelial cell line. *Clin Sci (Lond)* 2000; **99**: 405-10.
105. Vickers IE, Smikle MF. The immunomodulatory effect of antibiotics on the secretion of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in response to *Stenotrophomonas maltophilia* stimulation. *West Indian Med J* 2006; **55**: 138-41.
106. Petit JC, Daguet GL, Richard G, et al. Influence of ciprofloxacin and piperacillin on interleukin-1 production by murine macrophages. *J Antimicrob Chemother* 1987; **20**: 615-7.
107. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1720-30.
108. Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, et al. Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)* 2012; **20**: 748-55.
109. Endo M, Mori M, Akira S, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol* 2006; **176**: 6245-53.
110. Opal SM, Girard TD, Ely EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2005; **41 Suppl 7**: S504-S512.

111. Grubeck-Loebenstien B, Berger P, Saurwein-Teissl M, et al. No immunity for the elderly. *Nat Med* 1998; **4**: 870.
112. Marik PE, Zaloga GP. The effect of aging on circulating levels of proinflammatory cytokines during septic shock. Norasept II Study Investigators. *J Am Geriatr Soc* 2001; **49**: 5-9.
113. Tinetti ME, Studenski SA. Comparative effectiveness research and patients with multiple chronic conditions. *N Engl J Med* 2011; **364**: 2478-81.
114. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; **285**: 248-51.
115. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; **55**: 611-22.
116. Perez-Padilla JR. Altitude, the ratio of PaO₂ to fraction of inspired oxygen, and shunt: impact on the assessment of acute lung injury. *Arch Bronconeumol* 2004; **40**: 459-62.

APÉNDICES

Apéndice 1. Definiciones operacionales

- Mexicano mestizo: sujetos nacidos en México cuyos abuelos y padres nacieron en México.

- Criterios del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica ²:

Fiebre (>38°C) o hipotermia (<36°C)

Taquicardia (>100 latidos por minuto en ausencia de betabloqueadores)

Taquipnea (>20 respiraciones por minuto) o la necesidad de ventilación mecánica

Leucocitosis (cuenta de leucocitos totales >12,000/ µl), leucopenia (leucocitos totales <4,000/ µl) o > 10% de bandas.

- Sepsis abdominal: El diagnóstico se estableció basándose en las guías de la Sociedad de Infecciones Quirúrgicas y de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de los EUA ⁸⁷. Para este estudio, el diagnóstico de sepsis abdominal se estableció cuando existió dolor abdominal y síntomas de alteraciones de la función gastrointestinal (pérdida del apetito o, náusea, vómito, distensión abdominal y/o oclusión intestinal), con o sin signos de inflamación local (dolor o hiperestésias), en adición a la evidencia de un proceso infeccioso en el cual existe solución de continuidad del tracto digestivo hacia el espacio peritoneal, asociado con la formación de algún absceso o peritonitis demostrada por cirugía o en una tomografía computarizada. Los pacientes con sepsis abdominal comunitaria o asociada a los cuidados de la salud fueron incluidos en este estudio.

- *Neumonía*: El diagnóstico de neumonía en este estudio se basó en las guías de la sociedad de enfermedades infecciosas de los EUA/Sociedad Americana de Tórax (Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society) sobre el manejo de neumonía adquirida en la comunidad en adultos ⁸⁸, así como en las guías de la American Thoracic Society y la Infectious Diseases Society of America para el manejo de los adultos con neumonía de adquisición hospitalaria, asociada al ventilador, y aquella asociada a los cuidados de la salud ²⁶. Los hallazgos clínicos para el diagnóstico fueron la presencia de SRIS (cuadro 1), tos con esputo, consolidación pulmonar y/o la presencia de nuevo(s) infiltrado(s) alveolares, o progresión de los mismos en los estudios de imagen del tórax. Éste estudio incluyó pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, neumonía de adquisición intrahospitalaria o asociada a los cuidados de la salud.

Apéndice 2. Escala de Evaluación Secuencial de Falla Orgánica (SOFA)

Escala de Evaluación Secuencial de Falla Orgánica (SOFA) ⁸⁹					
Aparato o sistema afectado	0	1	2	3	4
Respiratorio PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg) ^{&}	> 307	≤ 307	≤ 230	≤ 154 con soporte respiratorio	≤ 77 con soporte respiratorio
Coagulación Plaquetas (núm./ml)	>150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Hígado Bilirrubinas (mg/dL)	<1.2 <20	1.2-1.9	2-5.9	6-11.9	>12
Cardiovascular* Tensión arterial Media (mmHg)	Sin hipotensión	TAM <70 mmHg	Dopamina ≤ 5 Dobutamina (Cualquier dosis) (µg/kg/min)	Dopamina > 5 Adrena ≤ 0.1 Noradrena ≤ 0.1 (µg/kg/min)	Dopamina >15 Adrena > 0.1 Noradrena > 0.1 (µg/kg/min)
Sistema Nervioso Central Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina (mg/dL) Gasto urinario	1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 o <500ml/d	>5.0 o <200 ml/d
<p>Abreviaturas: Adrena: adrenalina, Noradrena: Noradrenalina, PaO₂: Presión arterial de oxígeno, FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno, TAM: tensión arterial media.</p> <p>*Los agentes adrenérgicos son administrados por al menos 1 h.</p> <p>^{&}El índice PaO₂/FiO₂ está ajustado a la altura msnm de la Ciudad de México ¹¹⁶.</p> <p>Se establece falla orgánica cuando se identifica una puntuación ≥2 en alguno de los aparatos o sistemas evaluados.</p>					

Apéndice 3. Índice de comorbilidad de Charlson

Índice de comorbilidad de Charlson ⁹⁰	
Condición evaluada	Puntuación
Infarto al miocardio	1
Insuficiencia cardíaca congestiva	1
Enfermedad vascular periférica	1
Enfermedad cerebrovascular	1
Demencia	1
Enfermedad pulmonar crónica	1
Enfermedad de tejido conectivo	1
Enfermedad ulcerosa péptica	1
Enfermedad hepática leve: Child-Pugh A	1
Diabetes	1
Hemiplejía	2
Enfermedad renal moderada o grave	2
Cualquier tumor	2
Leucemia	2
Linfoma	2
Enfermedad hepática moderada o grave Child-Pugh B-C	3
Tumor sólido metastásico	6
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	6
SUMA	

Apéndice 4.1. Consentimiento informado (paciente).

[Hoja membretada del INCMNSZ]

**HOJA DE INFORME PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA EL PACIENTE**

Nombre: _____ Expediente/Folio: _____
Apellido paterno Apellido Materno Nombre(s)

Alguna de las infecciones que usted padece (neumonía o sepsis abdominal) tiene diferentes etapas y en algunos casos puede causar cuadros severos denominados sepsis grave y choque séptico. Estos cuadros pueden llegar a producir la muerte de las personas que las padecen y aunque se han diseñado estrategias para tratar de disminuir la mortalidad, ésta continúa siendo elevada. Actualmente se considera que la magnitud de la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección podría influir de manera importante en la evolución de los pacientes y ésta podría estar determinada por la información contenida en los genes.

El objetivo de este estudio, al que ha sido invitado a participar, es determinar la magnitud de la actividad de diversos genes en sus glóbulos blancos. Para lograr este objetivo, únicamente se requerirá que usted nos autorice que le tomemos una muestra de sangre de 10 mL y que recabemos algunos datos de su expediente clínico.

Las muestras de sangre se obtendrán del catéter que tiene instalado y, en caso que no lo tenga, se le realizará una punción en el brazo, la cual podría generar las siguientes molestias leves: moretones, sangrado y/o dolor. No existen otras complicaciones relacionadas al estudio, dado que no se le administrarán medicamentos ni se le realizarán maniobras diagnósticas o terapéuticas adicionales a las que sus médicos indiquen.

Las muestras de sangre que se le tomarán no causarán costos adicionales para usted. Los resultados de esta investigación ayudarán a conocer mejor la respuesta inflamatoria en los pacientes con infecciones graves y, aunque los resultados no tendrán aplicación clínica inmediata, en el futuro podrían ser útiles para el desarrollo de estrategias de tratamiento más apropiadas.

La información contenida en este estudio tiene fines científicos y es completamente confidencial. No se mencionará su nombre ni su registro en los informes o publicaciones resultantes. Usted tiene la libertad de no participar o abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto afecte la calidad de su atención médica en el Instituto.

Por la participación en este estudio usted no recibe alguna compensación.

ESTE DOCUMENTO HA SIDO PREPARADO DE ACUERDO A LA DECLARACIÓN DE HELSINKY, A LOS LINEAMIENTOS DE LA SECRETARÍA DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN EN HUMANOS Y AL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS DE ESTE INSTITUTO. PARA CUALQUIER DUDA COMUNICARSE CON LOS DOCTORES CARLOS A. RODRÍGUEZ OSORIO O JOSÉ SIFUENTES OSORNIO AL TELEFONO 5487-0900 EXTENSIONES 5012, 5020 ó 2174.

LEÍDO LO ANTERIOR MANIFIESTO QUE HE:

1. RECIBIDO INFORMACIÓN SUFICIENTE
2. ENTENDIDO LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA

3. HABLADO CON LOS INVESTIGADORES INVOLUCRADOS
4. ACLARADO MIS DUDAS SOBRE EL ESTUDIO
5. COMPRENDIDO QUE MI PARTICIPACIÓN ES VOLUNTARIA
6. COMPRENDIDO QUE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DURANTE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO SERA MANEJADA EN FORMA CONFIDENCIAL
7. COMPRENDIDO QUE PUEDO RETIRARME DEL ESTUDIO CUANDO QUIERA, SIN TENER QUE DAR EXPLICACIONES Y SIN QUE ESTO REPERCUTA EN MI ATENCIÓN MEDICA FUTURA
8. ACORDADO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y CUMPLIR CON SUS REQUERIMIENTOS

NOMBRE COMPLETO DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO 1

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO 2

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

MÉXICO, D.F., A _____ DE _____ DE 20__.

Apéndice 4.2 Consentimiento informado (responsable legal).

[Hoja membretada del INCMNSZ]

**HOJDE INFORME PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA EL RESPONSABLE LEGAL**

Nombre: _____ Expediente/Folio: _____
Apellido paterno Apellido Materno Nombre(s)

Alguna de las infecciones que su paciente padece (neumonía o sepsis abdominal) tiene diferentes etapas y en algunos casos puede causar cuadros severos denominados sepsis grave y choque séptico. Estos cuadros pueden llegar a producir la muerte de las personas que las padecen y aunque se han diseñado estrategias para tratar de disminuir la mortalidad, ésta continúa siendo elevada. Actualmente se considera que la magnitud de la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección podría influir de manera importante en la evolución de los pacientes y ésta podría estar determinada por la información contenida en los genes.

El objetivo de este estudio, al que su paciente ha sido invitado a participar, es determinar la magnitud de la actividad de diversos genes en sus glóbulos blancos. Para lograr este objetivo, únicamente se requerirá que usted nos autorice que le tomemos al paciente una muestra de sangre de 10 mL y que recabemos algunos datos del expediente clínico.

Las muestras de sangre se obtendrán del catéter que el paciente tiene instalado y, en caso que no lo tenga, se le realizará una punción en el brazo, la cual podría generar las siguientes molestias leves: moretones, sangrado y/o dolor. No existen otras complicaciones relacionadas al estudio dado que no se administrarán medicamentos ni se realizarán maniobras diagnósticas o terapéuticas adicionales a las que sus médicos indiquen.

Las muestras de sangre que se tomarán no causarán ningún costo adicional ni para usted ni para su paciente. Los resultados de esta investigación ayudarán a conocer mejor la respuesta inflamatoria en los pacientes con infecciones graves y, aunque los resultados no tendrán aplicación clínica inmediata, en el futuro podrían ser útiles para el desarrollo de estrategias de tratamiento más apropiadas.

La información contenida en este estudio tiene fines científicos y es completamente confidencial por lo que no se mencionará el nombre del paciente ni su registro en los informes o publicaciones resultantes. Usted tiene la libertad que su paciente no participe o abandone el estudio en cualquier momento sin que esto afecte la calidad de su atención médica en el Instituto.

Por la participación en este estudio ni usted ni su paciente reciben alguna compensación.

ESTE DOCUMENTO HA SIDO PREPARADO DE ACUERDO A LA DECLARACIÓN DE HELSINKY, A LOS LINEAMIENTOS DE LA SECRETARÍA DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACIÓN EN HUMANOS Y AL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS DE ESTE INSTITUTO.
PARA CUALQUIER DUDA COMUNICARSE CON LOS DOCTORES CARLOS A. RODRÍGUEZ OSORIO O JOSÉ SIFUENTES OSORNIO AL TELEFONO 5487-0900 EXTENSIONES 5012, 5020 0 2174.

LEIDO LO ANTERIOR MANIFIESTO QUE HE:

1. RECIBIDO INFORMACIÓN SUFICIENTE

2. ENTENDIDO LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA
3. HABLADO CON LOS INVESTIGADORES INVOLUCRADOS
4. ACLARADO MIS DUDAS SOBRE EL ESTUDIO
5. COMPRENDIDO QUE LA PARTICIPACIÓN DE MI PACIENTE ES VOLUNTARIA
6. COMPRENDIDO QUE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DURANTE LA PARTICIPACIÓN DE MI PACIENTE EN EL ESTUDIO SERA MANEJADA EN FORMA CONFIDENCIAL
7. COMPRENDIDO QUE PUEDO RETIRAR A MI PACIENTE DEL ESTUDIO CUANDO QUIERA, SIN TENER QUE DAR EXPLICACIONES Y SIN QUE ESTO REPERCUTA EN LA CALIDAD DE SU ATENCIÓN MEDICA FUTURA
8. ACORDADO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y CUMPLIR CON SUS REQUERIMIENTOS

NOMBRE COMPLETO DEL RESPONSABLE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO 1

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO 2

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

MÉXICO, D.F., A _____ DE _____ DE 20__.

ANEXO 1: PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO Y PRESENTACIÓN DE PÓSTER DERIVADOS DE ESTA TESIS

Rodriguez-Osorio CA*, Lima G, Herrera-Caceres JO, Villegas-Torres BE, Zuñiga J, Ponce-de-Leon S, Llorente L, Sifuentes-Osornio J*. Genetic variations in toll-like receptor 4 in Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia. *Immunol Lett.* 2013;153:41-46.

La sepsis es una causa importante de muerte alrededor del mundo. Entre 73-83% de todos los casos de sepsis que requieren atención en las terapias intensivas son causados por infecciones intraabdominales o neumonía. La activación de la inmunidad es un aspecto crucial de las manifestaciones de sepsis y el receptor tipo Toll 4 (TLR4) tiene un papel muy importante en este proceso. Los alelos 299G y 399I del TLR4 han sido asociados con un incremento del riesgo de infecciones por bacilos Gram-negativos y choque séptico en algunas poblaciones. Por lo anterior, este estudio de casos y controles evaluó la prevalencia de los polimorfismos D299G/T399I en pacientes mexicanos mestizos con infecciones intraabdominales y/o neumonía y en un grupo de controles sanos. La genotipificación reveló que 1 de 44 pacientes (2.3%; IC95%: 0.05–12.0%) y 4 de 126 controles (3.2%; IC95%: 0.9–7.9%) fueron heterocigotos para ambos polimorfismos (RM: 0.71, IC95%: 0.01–7.44, $p = NS$), confirmando su cosegregación en esta población. Adicionalmente, los pacientes con sepsis grave e infección por bacilos Gram-negativos no fueron portadores de los alelos de riesgo. En conclusión, este reporte muestra que la frecuencia de los polimorfismos

D299G y T399I en mexicanos mestizos es menor que la anticipada en comparación con otros grupos étnicos, enfatizando la heterogeneidad de la frecuencia de estas variantes entre diferentes poblaciones. Consecuentemente, éste estudio no detectó o asociaciones entre los polimorfismos D299G/T399I y sepsis en esta población.

PÓSTER: Keystone Symposia on Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity. Dublin, Ireland, June 2010. Abstract # 498.



COMORBIDITY SEEMS TO DETERMINE THE INITIAL INFLAMMATORY RESPONSE (IIR) AND THE SEVERITY OF SEPSIS CAUSED BY GRAM-NEGATIVE BACILLI (GNB)

Rodriguez-Orsorio CA*, Llorente L, Vargas-Vorackova F, Ponce-de-Leon A, Ponce-de-Leon S, Lima G, Dominguez-Cherit G, Tusie-Luna TM, Sifuentes-Osorio J.

National University of Mexico & National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubiran, Mexico

BACKGROUND

Severe infection manifested as severe sepsis (SS) and septic shock (SSh) is frequently caused by pneumonia (PN) and abdominal sepsis (AS). SS/SSh syndromes are attributed to uncontrolled and unbalanced inflammatory response (IR) ¹, however the pattern of response is controversial ^{2,3}. This pilot study describes the cytokine response from patients with PN and AS caused by GNB and the presence of some factors associated with SS and SSh.

OBJECTIVE

To describe Inflammatory Response (TNF- α and IL-10) in the first week of evolution of infection in subjects with PN or/and AS caused by GNB.

RESULTS

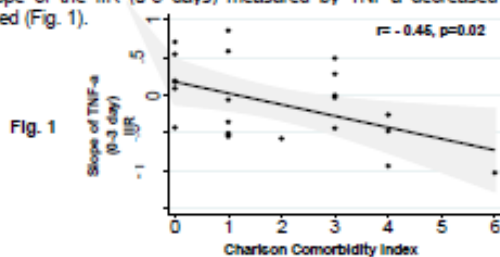
CLINICAL CHARACTERISTICS: 28 subjects were analyzed (Table 1), 11 (58%) developed SS/SSh during the first 5 days of evolution.

Patients were allocated according the Charlson Comorbidity Index (CCI) score. Any escalation in the CCI value showed a significant increase in the risk for SS/SSh (OR 2.3; CI95%:1.1-4.9, p=0.02). The more frequent diseases were type 2 diabetes mellitus 11 (42%) and chronic renal failure 5 (19%).

Table 1. Clinical Characteristics	Absence SS/SSh (n=11)	Presence SS/SSh (n=15)	P
Age: median (p25-p75)	41 (35-64)	56 (36-70)	0.21
Male: n (%)	5 (45.0%)	8 (53.0%)	0.69
CCI Score: median (p25-p75)	1 (0-1)	3 (0-4)	0.03
Body Mass Index: median (p25-p75)	21.4 (16-47)	26.4 (23.4-32.5)	0.04
Abdominal Sepsis: n (%)	8 (72.7%)	8 (53.3%)	0.95
Pneumonia: n (%)	2 (18.1%)	4 (26.7%)	
Both: n (%)	1 (9.1%)	3 (20.0%)	
Bacteremia: n (%)	2 (18.1%)	4 (26.7%)	0.61
Empiric antibiotic not active against GNB: n (%)	3 (27.2%)	7 (46.6%)	0.31
Length of stay, days: median (p25-p75)	25 (16-47)	49 (22-69)	0.18
Time since the beginning of SIRS and Inclusion, days: median (p25-p75)	2 (1-3)	2 (2-3)	0.62
Mortality: n (%)	0	2 (13.3%)	0.20

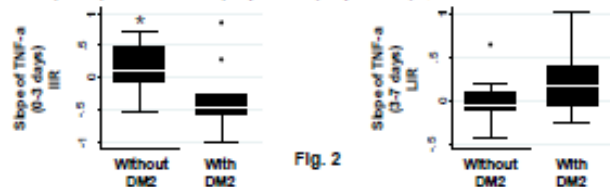
INFLAMMATORY RESPONSE: No correlation between the beginning of clinical systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and levels of TNF- α or IL-10 was observed.

The slope of the IIR (0-3 days) measured by TNF- α decreased as the CCI increased (Fig. 1).



The IIR of patients (n=8) without comorbidities (CCI=0) showed increased TNF- α (slope=0.19); in contrast patients (n=18) with some disease (CCI \geq 1) showed decrease (slope: -0.35) of TNF- α , p=0.05. This phenomenon was not observed in late IR (3-7 days).

These findings were also seen when levels of TNF- α from patients (n=11) with type 2 diabetes mellitus (DM2) (slope: -0.45) were compared with those from patients (n=15) without DM2 (slope: 0.08), * p<0.05 (Fig. 2).



INFLAMMATORY RESPONSE & ORGAN DYSFUNCTION: In 11 (42%) patients the organ dysfunction (SOFA score) showed a parallel pattern with the TNF- α production (Fig. 3a) and in other 9 (35%) patients SOFA and TNF- α were discordant (Fig. 3b). The level of cytokine production was not associated with SS/SSh or death.

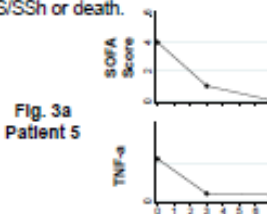


Fig. 3a Patient 5

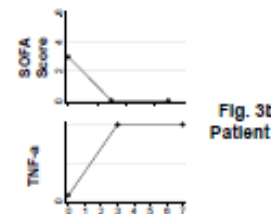


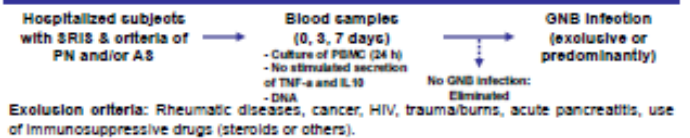
Fig. 3b Patient 2

POLYMORPHISMS OF TLR4: The wild type allele (Asp/Asp) of TLR4 299 was observed in all patients and the prevalence was similar to that observed in Mexican controls (n=126) Asp/Asp:122, Asp/Gly:4, Gly/Gly:0 (p>0.05). The polymorphism Thr399Ile cosegregated with Asp299Gly variant.

CONCLUSIONS

- 1) The main risk factor for development SS/SSh was comorbidity measured by CCI.
- 2) Increased comorbidity was associated with a decrease in the slope of cytokine production through the IIR.
- 3) The cytokine concentration showed a discrepancy with organ dysfunction in one third of the patients.
- 4) The prevalence of polymorphisms of TLR4 was similar in patients and controls.

METHODS



Statistics: Analysis of serial measurements obtaining a slope for the 0-3 days (IIR) and a slope for 0-7 days (LIR) for every patient. Non parametric test were used. p<0.05 was considered statistically significant.

References: 1) Hotchkiss RS, et al., NEJM 2003;348:138. 2) Netea MG, et al. NEJM 2003;348:1600. 3) Kellum JA, et al., Arch Intern Med 2007;167:1655
Founds: Intramural Research Funds **E-mail:** rosocahoo@yahoo.com.mx

ANEXO 2: PROYECTOS EN DESARROLLO RELACIONADOS CON EL CAMPO DISCIPLINARIO DEL SUSTENTANTE

1) USO DE ANTIBIÓTICOS Y PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INTRODUCCIÓN DE ERTAPENEM AL SUMINISTRO DEL HOSPITAL.

- Descripción del proyecto: Este estudio se diseñó con el objetivo de evaluar las asociaciones entre el uso de ertapenem y la resistencia antimicrobiana en un grupo de bacilos Gram-negativos ajustando para el uso de otros antimicrobianos, incluyendo carbapenémicos tipo 2, y otros factores hospitalarios relevantes. Después del ajuste por importantes confusores, se observó que la introducción de ertapenem en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán no estuvo asociada con cambios en la resistencia en un grupo de bacilos Gram-negativos a pesar de haber observado cambios importantes en los patrones de resistencia a diferentes antimicrobianos en el análisis no ajustado.
- Avances: Artículo en revisión (Journal of Antimicrobial Chemotherapy): Rodriguez-Osorio CA, Sanchez-Martinez CO, Araujo-Melendez J, Criollo E, Macias-Hernandez AE, Ponce-de-Leon A, Ponce-de-Leon S, Sifuentes-Osornio J*. Impact of Ertapenem on Antimicrobial Resistance in a Sentinel Group of Gram-negative Bacilli: A 6-year Antimicrobial Resistance Surveillance Study.

2) EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE UN GRUPO DE GENES CODIFICANTES PARA TLR4, TNF- α , IL-1 β , IL1RA, IL-6 Y MIF SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS EN PACIENTES CON NEUMONÍA Y SEPSIS ABDOMINAL PRODUCIDAS POR BACILOS GRAMNEGATIVOS. Aprobación del comité de investigación Núm.: 1773.

- Descripción del proyecto: En la primera fase de este estudio, se evaluó la prevalencia de polimorfismos D299G/T399I de TLR4 en mexicanos mestizos. Se realizó un estudio de casos y controles que incluyó a pacientes mexicanos

con sepsis abdominal y/o neumonía y en individuos sanos. Este reporte mostró que la frecuencia de los polimorfismos estudiados en mexicanos mestizos es baja comparada con otros grupos étnicos, enfatizando la distribución variable de estos polimorfismos entre diferentes poblaciones. Consecuentemente, este estudio no detectó asociaciones entre los polimorfismos de TLR4 y sepsis en esta población.

- Población: Rodríguez-Osorio CA*, Lima G, Herrera-Caceres JO, Villegas-Torres BE, Zuñiga J, Ponce-de-Leon S, Llorente L, Sifuentes-Osornio J*. Genetic variations in toll-like receptor 4 in Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia. *Immunol Lett.* 2013;153:41-46.
- Actualmente se están reclutando nuevos pacientes y se evaluará la prevalencia de polimorfismos de otros genes.

3) ADHERENCIA A LAS GUÍAS DE TRATAMIENTO DE LA CAMPAÑA SOBREVIVIENDO A LA SEPSIS (SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN) Y SU IMPACTO SOBRE LA MORTALIDAD DE LOS PACIENTES CON SEPSIS GRAVE O CHOQUE SÉPTICO. Aprobación del comité de investigación Núm.: 58

- Descripción del proyecto: Diversas estrategias de tratamiento han sido poco efectivas entre los pacientes con sepsis, por lo que un grupo de expertos propusieron una serie de acciones diagnósticas y terapéuticas específicas en los pacientes con sepsis grave y choque séptico. Esta propuesta denominada “campana sobreviviendo a la sepsis” (CSS) del inglés, Surviving Sepsis Campaign, indica que se deben de cumplir una serie de acciones en las primeras 24 h del manejo de estos pacientes. El objetivo de este estudio es determinar la adherencia a estas recomendaciones y el impacto sobre la mortalidad en pacientes con sepsis grave y choque séptico internados en el Departamento de Urgencias del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Avances: En el análisis interino se identificó que en la institución el porcentaje de apego a las metas dentro de las primeras seis horas es mayor al 80% y el no recibir una adecuada hidratación (<20 ml/kg) se encuentra vinculado con

una mayor mortalidad. El apego a las metas de mantenimiento (6-24 h) fue variable y no mostró alguna asociación con mortalidad. Tesis para graduación de la especialidad de medicina interna del Dr. José J. Rodríguez Andoney. Actualmente se están reclutando nuevos pacientes.

4) IMPACTO DEL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO EMPÍRICO SOBRE EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON BACTERIEMIA INTERNADOS EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.

- Descripción del proyecto: La relación entre el tratamiento antimicrobiano empírico apropiado y los desenlaces clínicos en pacientes con bacteriemia no ha sido evaluada en nuestra Institución. Se identificaron 46 pacientes internados en la terapia intensiva del INCMNSZ con algún hemocultivo positivo en un lapso de un año. Trece (28.2%) pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano que no fue efectivo *in vitro* en contra del germen identificado. La mortalidad fue mayor en aquellos pacientes que recibieron tratamiento no efectivo *in vitro* en comparación con aquellos en los que el tratamiento fue activo *in vitro* (46.1% vs 15.1%). $p = 0.06$.
- Avances: Tesis para graduación de la especialidad de medicina del enfermo en estado crítico del Dr. Luis Manuel Padilla Martínez.

5) ESTUDIO INTERNACIONAL DE PREVALENCIA PUNTUAL (UN SOLO DÍA) PARA SEPSIS GRAVE Y / O SHOCK SÉPTICO. Aprobación del comité de investigación Núm.: 1094.

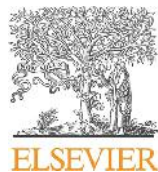
- Descripción del proyecto: este proyecto de prevalencia es una colaboración internacional que tiene los siguientes objetivos: 1. Estimar la carga mundial que la sepsis representa mediante la determinación de la prevalencia de la sepsis, sepsis grave y shock séptico en todo el mundo en las unidades de cuidados intensivos y en los servicios de urgencias. 2. Evaluar diferencias en las prácticas en el cuidado de los pacientes con sepsis mediante la medición de cumplimiento de las directrices sepsis propuestas por la Campaña

Sobreviviendo a la Sepsis, tanto en la comunidad y hospitales académicos a nivel internacional. 3. Evaluar el impacto de la sepsis, sepsis grave y shock séptico en el pronóstico. 4. Estimar el tamaño de muestra para detectar diferencias significativas en ensayos clínicos internacionales en el futuro.

- Avances: el 7 de noviembre 2013 se incluyeron 16 pacientes internados en el departamento de urgencias y en la unidad de terapia intensiva Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El análisis se encuentra en realización por parte del centro coordinador.

ANEXO 3: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON EL CAMPO DISCIPLINARIO DEL SUSTENTANTE

- Rodriguez-Osorio CA*, Lima G, Herrera-Caceres JO, Villegas-Torres BE, Zuñiga J, Ponce-de-Leon S, Llorente L, Sifuentes-Osornio J*. Genetic variations in toll-like receptor 4 in Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia. *Immunol Lett.* 2013;153:41-46.
Factor de Impacto de la revista: 2.337
Numero de citas (Web of Science y Scopus): 0
- Rodriguez-Osorio CA, Dominguez-Cherit G*. Medical decision making: paternalism versus patient-centered (autonomous) care. *Curr Opin Crit Care.* 2008;14:708-13.
Factor de Impacto de la revista: 2.967
Numero de citas (Web of Science y Scopus): 15
- Lozada-Leon D, Rodriguez CA, Cardona-Salgado G, Avila-Funes JA*. [Unexpected admission to the intensive care unit following ambulatory surgical procedures]. *Rev Invest Clin.* 2008;60:188-96.
Factor de Impacto de la revista: 0.310
Numero de citas (Web of Science y Scopus): 1
- Dorantes-Acosta E*, Arreguin-Gonzalez F, Rodriguez-Osorio CA, Sadowinski S, Pelayo R, Medina-Sanson A. Acute myelogenous leukemia switch lineage upon relapse to acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Cases J.* 2009;2:154.
Factor de Impacto de la revista: 0.00
Numero de citas (Web of Science y Scopus): 17



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immllet

Genetic variations in toll-like receptor 4 in Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia



Carlos A. Rodriguez-Osorio^{a,*}, Guadalupe Lima^b, Jaime O. Herrera-Caceres^c,
Beatriz E. Villegas-Torres^d, Joaquin Zuñiga^e, Sergio Ponce-de-Leon^f, Luis Llorente^b,
Jose Sifuentes-Osornio^{g,*}

^a Department of Critical Care Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

^b Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

^c Department of Surgery, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

^d Laboratory of Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genomica, Mexico City, Mexico

^e Laboratory of Immunobiology and Genetics, Department of Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

^f Clinical Epidemiology Unit, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

^g Department of Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2013

Received in revised form 7 June 2013

Accepted 8 July 2013

Available online 18 July 2013

Keywords:

Mexico

Mestizo

Polymorphism

Sepsis

SNP

TLR4

ABSTRACT

Sepsis is a leading cause of death around the world, and 73–83% of all sepsis cases requiring attention in intensive care units are linked to intra-abdominal infection (IAI) or pneumonia. The activation of innate immunity is central to the manifestation of sepsis, and toll-like receptor (TLR) 4 plays an important role in this activation process. The 299G and 399I alleles of TLR4 have been linked with an increased risk of Gram-negative bacteria (GNB) infections and septic shock in some populations. This case-control study evaluated the prevalence of D299G/T399I polymorphisms in Mexican patients with IAI and/or pneumonia and in healthy controls. Genotyping revealed that 1 in 44 patients (2.3%; CI95%: 0.05–12.0%) and 4 in 126 controls (3.2%; CI95%: 0.9–7.9%) were heterozygous for both the D299G and T399I polymorphisms (OR: 0.71, CI95%: 0.01–7.44, $p = \text{NS}$), confirming the co-segregation of these alleles in this population. Furthermore, the patients with a GNB infection and severe sepsis were not carriers of the risk alleles. In summary, this report shows that the frequency of the D299G and T399I polymorphisms in Mexican-Mestizos is lower than anticipated in comparison with other ethnic groups, emphasizing the variable distribution of TLR4 polymorphisms among different populations. Consequently, this study was not able to detect associations between TLR4 polymorphisms and sepsis in this population.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sepsis remains a leading cause of death around the world. Raw data in international registries show hospital mortality rates due to sepsis that range from 33% to over 50% [1–3]. In the United States, approximately 750,000 cases of sepsis occur annually [4], and their incidence has increased over the past 3 decades [5]. Among cases of

severe sepsis, 51.1% receive attention in intensive care units [4], and 73–83% of all cases of sepsis are linked to intra-abdominal infection (IAI) or pneumonia [1,3].

The activation of innate immunity is believed to be central to the development of sepsis [6]. Toll-like receptors (TLR) are essential components of the immune response to pathogens because they detect conserved molecular motifs known as pathogen-associated molecular patterns (PAMP). Specifically, TLR4 is the receptor for the PAMPs and several ligands [7,8], including the lipopolysaccharide (LPS) found in the outer membrane of Gram-negative bacteria (GNB) [9]; therefore, this receptor is considered to be a key element in the regulation of the host immune system. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the TLR4 gene have been linked with the deregulation of the inflammatory response in humans [10] and have been studied in various populations. The D299G SNP (dbSNP: rs4986790) results from the substitution of an A with a G at nucleotide 896, which replaces the conserved aspartic acid residue at amino acid 299 with a glycine. The T399I SNP (dbSNP: rs4986791)

Abbreviations: dbSNP, single nucleotide polymorphism database; GNB, Gram-negative bacteria; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; IAI, intra-abdominal infection; INCMNSZ, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran; LPS, lipopolysaccharide; PAMP, pathogen-associated molecular patterns; SNP, single nucleotide polymorphism; STR, short tandem repeats; TLR, toll-like receptor.

* Corresponding authors at: Vasco de Quiroga 15, Seccion XVI, Tlalpan, C.P. 14,000, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5513 3782; fax: +52 55 5655 1794.

E-mail addresses: ca.rodriguezoriosorio@gmail.com (C.A. Rodriguez-Osorio), sifuentesosornio@gmail.com (J. Sifuentes-Osornio).

0165-2478/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imllet.2013.07.002>

results from the substitution of a C with a T at nucleotide 1196, causing the non-conserved threonine at amino acid 399 to be replaced with an isoleucine. These non-synonymous polymorphisms are located in the extracellular domain of the TLR4 receptor and cosegregate in most individuals [10].

The prevalence of the risk alleles 299G and 399I varies depending on the ethnic group studied and ranges from 0% in Asians [11] to 18% in Caucasians [12]. It has been suggested that these alleles increase the risk of Gram-negative infections and septic shock [13] because the frequency of Gram-negative infections is up to 79% in patients with these alleles [14]. However, these estimations have been controversial because they have not been replicated in other studies [15].

To ascertain the prevalence of these polymorphisms and the potential risk for the development of IAI and pneumonia in the Mexican population, we undertook a case-control study of patients with IAI and/or pneumonia and healthy controls.

2. Materials and methods

2.1. Patients

All of the Mexican-Mestizo patients admitted to the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran (INCMNSZ) were examined for eligibility. A Mexican-Mestizo is defined as a person who was born in Mexico and whose ancestors for two previous generations were also born in Mexico. The patients were screened daily, and those who met ≥ 2 of the criteria for systemic inflammatory response syndrome ($n=205$) [16] and had a suspected or proven diagnosis of IAI and/or pneumonia ($n=84$) between January 2008 and January 2009 were eligible for this analysis. Samples of whole blood were obtained within 24 h of the patients' identification, and the DNA isolation was performed based exclusively on the availability of the samples irrespective of the patients' clinical status. The classification of the patients' phenotype was blind to the patients' TLR4 genotype and was based on the independent review of clinical charts and a follow-up evaluation of the patients by two investigators (C.A.R.-O. and J.S.-O.); disagreements were resolved by discussion between the investigators. The cases were carefully classified as IAI and/or pneumonia based on the consensus definitions [17–19]. Organ dysfunction was quantified according to the Sequential Organ Failure Score [20], and severe sepsis was diagnosed when a value ≥ 2 was identified for any organ system. These evaluations were carried out at the patients' time of inclusion in this study and weekly during the patients' hospitalization. Septic shock was diagnosed according to the consensus definitions [16]. All the definitions are detailed in the supplementary data. The baseline demographics of the patients and their previous disease histories were obtained from their clinical charts, and any comorbidities were categorized according to the Charlson comorbidity Index [21]. The treatment for the patients' current sepsis episode was provided by the attending physician, and the administration of early goal-directed therapy, antibiotics and source control were recorded.

Eligible patients were subjected to routine cultures in accordance with institutional policies. The intra-abdominal specimens were processed in BACTEC® plus Aerobic/F and Anaerobic/F vials and incubated for 7 days. The positive samples were placed on MacConkey sheep blood agar (aerobic) or phenylethyl alcohol agar (anaerobic). The samples from respiratory secretions were cultured on MacConkey sheep blood agar and Chocolate agar following conventional procedures [22]. Only the cultures that were judged to be positive by the attending physician were included. The positive bacterial cultures were categorized as Gram-negative, Gram-positive, fungal or polymicrobial. A subgroup of patients with infections

caused by GNB was further characterized to explore the prevalence of 299G and 399I alleles because of their theoretically higher risk of being carriers for these variants.

2.2. Controls

A suitable sample of 126 unrelated healthy Mexican-Mestizo individuals was selected. None of these individuals had a history of IAI, pneumonia or any other inflammatory disease.

2.3. Sample size and ethics

An unmatched case-control study design was used. A minimal number of 38 cases and 114 unmatched controls (rate 1:3) was required to detect an odds ratio of ~ 3.0 with a power of 80% and a 5% type I error rate (one side). The prevalence of polymorphisms of TLR4 in Mexican-Mestizos was not known at the time of the study design. However, a frequency of 9% in controls was identified in a study that included Hispanic population [23]; accordingly, that prevalence was assumed for sample size determination (Quanto Software 1.2.4 [24]). This study was carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans and was approved by the Institutional Review Board. All of the patients and controls gave written informed consent for the data and specimen collection. All of the samples were anonymized.

2.4. TLR4 genotyping

The DNA was isolated from 5 mL of the whole blood using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions and was stored (-20°C) until the allelic variants were determined. The genotyping of the D299G and T399I alleles was accomplished by a polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism procedure with a few modifications to the techniques that have been described previously [25]. The total volume of the PCR was 25 μL and contained 100 ng/ μL of the genomic DNA, 1 \times PCR-Buffer (Qiagen, Hilden, Germany), 0.2 mM of each dNTP (Sigma, Taufkirchen, Germany), 0.5 U of HotStar-Taq™ DNA polymerase (Qiagen) and 2.5 pmol of each primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). The final concentration of MgCl_2 was 4 mM for D299G and 1.5 mM for T399I. The PCR was performed in an MJ Research PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) with an initial denaturation step (95°C for 15 min), 35 cycles (94°C for 30 s, 62°C (D299G) or 60°C (T399I) for 30 s and 72°C for 30 s) and a final extension step (72°C for 10 min). Negative and positive controls for the PCR reaction were included in the assay. The restriction enzyme digestion assay contained 1 \times restriction buffer, 10 units of the respective restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, MD, USA) and 5 μL of the PCR product. It was incubated overnight at 37°C and analyzed by electrophoresis on a 2.5% agarose gel. The primer sequences, restriction enzyme and digestion products are presented in Table 1. The genotyping was performed without the knowledge of the patients' clinical status. The TLR4 genotyping was performed at the Laboratory of Immunology and Rheumatology, INCMNSZ.

2.5. Short tandem repeats genotyping and admixture estimates

To assess the ancestry of the patients and rule out population stratification, individual and group ancestry estimates were performed for 38 patients and 30 random controls. Fifteen autosomal short tandem repeats (STR) markers (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S11358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D19S433 and D251338) were typed along with

Table 1
Sequences of primers used for PCR, restriction enzymes and length of the restriction fragments.

Polymorphism	Primers	Restriction enzyme	Length of the restriction fragments
D299G	F: 5'-AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' R: 5'-GAGAGATTGAGTTTCAATGTGGG-3'	Nco I	D299 (allele A): 188 bp 299G (allele G): 168 bp + 20 bp
T399I	F: 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA-3' R: 5'-GGAATCCAGATGTTCTAGTGTCTTAAGCC-3'	Hinf	T399 (allele C): 124 bp 399I (allele T): 98 bp + 26 bp

amelogenin using the Applied Biosystems AmpFI STR Identifier Kit (Applied Biosystems, CA). The PCR amplification was carried out in a Gene Amp 9600 thermocycler (Applied Biosystems, CA) using 1 ng of DNA according to the manufacturer's protocol. The PCR conditions were as follows: 95 °C for 11 min, followed by 28 cycles of 94 °C for 1 min, 59 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a hold at 60 °C for 60 min. The PCR products were diluted 1:15 in Hi-Di formamide and the GS500-LIZ internal size standard (Applied Biosystem, CA) and analyzed on an ABIPrism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA). Allele assignments were made using GeneMapper software, version 4.0 (Applied Biosystems, CA). The individual and group admixture estimates were calculated using the STR frequencies in a trihybrid model with Structure software, version 2.3.4. The STR data from three parental populations (Amerindians, Spaniards and Africans) were obtained from previously published databases [26–28]. The STR genotyping and admixture estimates were performed at the Laboratory of Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico.

2.6. Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) model was calculated using the genwhi program in Stata software (StataCorp). Categorical and numerical variables were tested with parametric or nonparametric statistics where appropriate. The unadjusted estimates of proportions are presented as 95% confidence intervals (CI) using the exact method. The allelic and genotype distributions of IAI/pneumonia patients and controls were compared using the Chi square or Fisher's exact tests where pertinent. The odds ratios (OR) and CI95% were calculated by applying the exact method when comparing the allelic and genotypic frequencies between patients with IAI/pneumonia and controls. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. All of the statistical analyses were performed by Stata software, v. 12.0 (StataCorp, College Station, TX).

3. Results

3.1. Clinical features

Eighty-four patients met the eligibility criteria. However, 40 of these patients were excluded for one or more of the following reasons: belonging to a non-Mexican-Mestizo or unknown ethnic group (3); having a diagnosis of IAI or pneumonia excluded (24); undergoing immunosuppressive treatment or being diagnosed with an immunosuppressive disease, such as cancer, a hematologic malignancy or rheumatic disease, during their hospitalization (7); having incomplete clinical information (5) or an unavailable blood sample (3). The characteristics of the 44 confirmed patients are presented in Table 2.

Twenty-six (59.1%) of the confirmed patients developed severe sepsis or septic shock at some point in their hospitalization. The monitoring and management of severe sepsis/septic shock were accomplished by early goal-directed therapy in 39 cases (88.6%), and source control was achieved in 100% of these cases that required it. In addition, although all of the patients received antibiotics in the first 12 h after diagnosis, this empiric treatment was not effective against the microorganisms that were further

characterized in 8 (18.2%) patients. The patients' length of stay had a median of 25.5 days (range: 1–113), and 1 (2.3%) patient died during their hospitalization. A subgroup of patients with infections caused by GNB ($n = 27$) was identified. Although most of their clinical features were not different from those with a non-Gram-negative infection, the individuals with a GNB infection had a higher Charlson Comorbidity Index Score (1 ($1_{p25} - 3_{p75}$) vs. 0 ($0_{p25} - 7_{p75}$), $p < 0.05$), a higher frequency of bacteremia (33.3% vs. 20.4, $p < 0.05$), a higher rate of ineffective empirical antimicrobial coverage for the microorganisms characterized (29.6% vs. 0%, $p < 0.005$), and a non-statistically significant longer length of stay (27.0 vs. 15.0 days, $p = 0.07$). The control group ($n = 126$) had a median age of 56 years (range: 29–77), and 79.3% were males.

3.2. TLR4 genotyping

The genotypes of 44 patients and 126 controls were successfully determined. The distribution of the genetic variants met the conditions of the HWE ($p = 0.85$). The analysis of polymorphisms among all the patients ($n = 44$) showed that 1 (2.3%; CI95%: 0.05–12.0%) individual was heterozygous for both the D299G and T399I polymorphisms (Table 3). This patient developed IAI after a bariatric surgical procedure, did not progress to severe sepsis, and GNB were not identified in cultures from the patient. All of the remaining patients, including those with documented GNB infection and/or severe sepsis, were not carriers of the risk alleles. The analysis of the controls revealed that 4 (3.2%; CI95%: 0.9–7.9%) individuals were heterozygous for both the D299G and T399I SNPs, confirming

Table 2
Characteristics of Mexican-Mestizo patients with intra-abdominal infection and/or pneumonia.

Characteristic	Frequency
Male sex, n (%)	20 (45.5)
Age, median (range)	50 (21–89)
Total Charlson Comorbidity Index, median (range)	1 (0–7)
Diabetes, n (%)	15 (34.1)
Peptic ulcer disease, n (%)	10 (22.7)
Moderate or severe renal disease, n (%)	9 (20.4)
Chronic pulmonary disease, n (%)	7 (15.9)
Myocardial infarct, n (%)	3 (6.8)
Moderate or severe liver disease, n (%)	3 (6.8)
Peripheral vascular disease, n (%)	1 (2.3)
Congestive heart failure, n (%)	1 (2.3)
Cerebrovascular disease, n (%)	1 (2.3)
Dementia, n (%)	1 (2.3)
Mild liver disease, n (%)	1 (2.3)
Main diagnosis, n (%)	
Intra-abdominal infection	28 (63.6)
Pneumonia	13 (29.5)
Both	3 (6.8)
Positive cultures, n (%)	31 (70.4)
Gram-negative bacteria	27 (61.4)
Gram-positive bacteria	12 (27.7)
Fungus	3 (6.8)
Polymicrobial	17 (38.6)
Bacteremia, n (%)	9 (20.4)
SOFA, median (range)	3 (0–13)

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment.

Table 3
Frequency of TLR4 D299G and T399I genotypes and alleles in the Mexican-Mestizo population.

	Intra-abdominal infection and/or pneumonia (n = 44)		Control group (n = 126)		OR (CI95%)
	n	% (CI95%)	n	% (CI95%)	
<i>D299G</i>					
D/D	43	97.7 (87.9–99.9)	122	96.8 (92.1–99.1)	1
D/G	1	2.3 (0.05–12.0)	4	3.2 (0.9–7.9)	0.71 (0.01–7.44)∇
G/G	0	0(0–8.0)	0	0(0–2.9)	–
Allele A	87	98.9 (93.8–99.9)	248	98.4 (95.9–99.6)	1
Allele G	1	1.1 (0.02–6.2)	4	1.6 (0.4–4.0)	0.71 (0.01–7.33)∇
<i>T399I</i>					
T/T	43	97.7 (87.9–99.9)	122	96.8 (92.1–99.1)	1
T/I	1	2.3 (0.05–12.0)	4	3.2 (0.9–7.9)	0.71 (0.01–7.44)∇
I/I	0	0(0–8.0)	0	0(0–2.9)	–
Allele C	87	98.9 (93.8–99.9)	248	98.4 (95.9–99.6)	1
Allele T	1	1.1 (0.02–6.2)	4	1.6 (0.4–4.0)	0.71 (0.01–7.33)∇

CI: confidence interval; ∇p = not statistically significant.

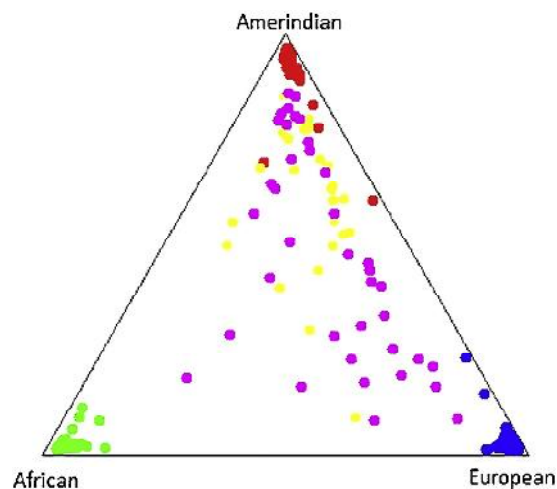


Fig. 1. Triangle plot showing ancestry estimates. The parental populations are represented in each corner of the triangle, including Amerindian (red), European (blue), African (green), controls (yellow) and patients (purple). The circles represent the individuals, who were clustered and distributed according to the ancestral proportion of each subject.

the co-segregated state of both alleles in the patients and controls (Table 3).

3.3. Admixture estimates

The admixture estimates using STR markers in patients and controls, revealed a greater Amerindian genetic contribution (47.0% vs. 67.5%, $p = \text{NS}$) and a lower percentage of European (33.5% vs. 20.8%, $p = \text{NS}$) and African (19.4% vs. 13.5%, $p = \text{NS}$) genes, respectively (Fig. 1).

4. Discussion

This study revealed a low prevalence of 299G and 399I TLR4 polymorphisms among a group of Mexican-Mestizos, which contrasts with the prevalence of these polymorphisms reported in Caucasians. Frequencies of 4–18% have been found in Spaniards [12], and frequencies of 10.7–13.1% have been found in Australians [29,30]. Furthermore, the allelic variation observed in Mexicans was also distinct from that found in an Asian population, in which both SNPs were absent in controls and patients with bacteremia

[11] or other diseases [31]. Interestingly, the prevalence of the TLR4 polymorphisms was also somewhat different from that described in a population of trio-Indians from Surinam in South America [32], suggesting that Mexican-Mestizos have their own particular genetic mixture.

The TLR4 receptor has an important biologic role in sensing LPS [9] and numerous other microbial and non-microbial ligands [7,8]; however, the contribution of the 299G and 399I polymorphisms to the susceptibility of individuals to infections and the severity of the inflammatory response in humans with sepsis remains controversial [15]. Various factors could explain the divergence among studies, e.g., small sample sizes, population stratification or heterogeneous phenotypes in the human population or microbial strains, among others; however, a significant but overlooked explanation is that there is heterogeneity in the frequency of TLR4 polymorphisms across different human populations [33].

Different prevalences of TLR SNPs may derive from a variety of factors, such as local infectious pressures, historical events or genetic drift [33]. When analyzing which of these potential factors might play a role in the actual prevalence of TLR4 polymorphisms in the Mexican population, it should be considered that the genetic makeup of Mexicans has been molded in the relatively recent past by the combination of different ethnic groups that had unequal prevalences of TLR4 polymorphisms. The most remarkable immigration phenomena in Mexico began in 1521 during the European colonization of the Americas [34]. The ethnic groups involved in this process included Spaniards and Africans who migrated to this area and mixed with the indigenous populations living in the Americas during that period. Furthermore, as shown by admixture estimates in this and other studies [35], Amerindians and Europeans represent between 80.5–88.3% of the total genetic contribution to Mexicans and other Mestizo groups in Latin America.

As showed by Ferwerda et al., South American indigenous populations lack the 299G and 399I TLR4 variants [32], suggesting that these SNPs are very rare in Native Americans. These groups, who have lived in the Americas for approximately the past 10,000 years, might have lost these SNPs during the migration of *Homo sapiens* across the northeast of Asia and the Bering Strait 25,000 years ago [33]. Conversely, the prevalence of these alleles in Spaniards is 4–18%, which might be the consequence of a bottleneck in the Iberian Peninsula plus genetic drift that occurred after the last glacial maximum approximately 20,000 years ago [12]. Consequently, the hypothesis that the prevalence of TLR4 polymorphisms in the modern Mexican-Mestizo population is the result of crossbreeding between Native Americans, Spaniards and Africans during the 16th century could be supported. Moreover, the 100%

co-segregation of the 299G and 399I TLR4 SNPs in Mexicans may suggest that the European group had a stronger genetic influence because the 299G and 399I SNPs co-segregate in virtually all of the individuals from both populations [12]. These relatively recent historical events suggest that migrations and genetic drift may explain the observed prevalence of TLR4 polymorphisms in modern Mexican-Mestizos better than pressure from infectious diseases. This hypothesis may also be supported by the fact that the TLR4 sequence has a high proportion of non-synonymous variations with probable effects on protein function, including stop mutations, suggesting there is high redundancy in the function of this receptor [36]. This redundancy makes it improbable that pressure from infectious diseases would influence the prevalence of TLR4 polymorphisms in a relatively short period of time.

Other studies conducted in Mexican populations have shown that the prevalence of the 399I TLR4 allele varies between 3.0 and 6.3% and the prevalence of the 299G allele varies between 4.0 and 5.9%. Although these studies are not completely comparable to the current study because they evaluated populations with diabetes mellitus [37] and gastroduodenal diseases [38], the prevalence of SNPs they report is in agreement with the CI95% observed in our report (3.2%; CI95%: 0.9–7.9%). Taken together, these data provide helpful information on the frequencies of these polymorphisms in Mexican-Mestizos. Furthermore, because of the low prevalence of the 299G and 399I TLR4 alleles in Mexican-Mestizos, the overall impact on the susceptibility to sepsis or severe sepsis in this population is likely to be small. However, other SNPs, such as those found in TNF-alpha [39], the major histocompatibility complex class II [40] or leptin receptor [41], among others, might be associated with the pathogenesis of sepsis and different inflammatory diseases in this ethnic group.

The sample size of this study was a limitation for testing the frequency of polymorphisms observed and their association with IAI or pneumonia. Thus, additional studies will be required to evaluate this relationship. On the other hand, when evaluating the use of this study to represent the Mexican population, it should be considered that (1) all of the patients and controls met the Mexican-Mestizo definition, (2) the frequency of the TLR4 polymorphisms was similar to that reported in other studies performed in the same population and (3) the results of the ancestry analysis showed a similar pattern to that reported for other Mexicans [42]. These factors suggest that the results of this study could represent this particular ethnic group. Conversely, the genotype frequencies observed for TLR4 may not represent the extensive group of Mestizos in Latin America because this group has broad genetic heterogeneity [35].

In summary, this report shows that the frequency of the D299G and T399I polymorphisms in Mexican-Mestizos is lower than anticipated in comparison with other ethnic groups, emphasizing the variable distribution of TLR4 polymorphisms among different populations. Consequently, this study was not able to detect associations between TLR4 polymorphisms and sepsis in this population.

Conflict of interest

None.

Author's contributions

C.A.R.-O., J.S.-O., and L.L. designed research; C.A.R.-O., G.L., J.O.H.-C., B.V.-T., and J.Z. performed research; J.S.-O., L.L. and J.Z. contributed with reagents/analytic tools; C.A.R.-O., G.L., and S.P.-de-L. analyzed data; and C.A.R.-O., J.S.-O., and L.L. wrote the paper.

Acknowledgments

This study was supported by the Intramural Research Funds. Special thanks to Aldo Marin, Barbara Valdivia, Karina Arce, Yolanda Cerna and Alma R. Chavez for their help with the search of patients and construction of database. We appreciate the valuable suggestions from Teresa Tusie-Luna MD, PhD, Alfredo Ponce-de-Leon, MD, MSc, and Guillermo Dominguez, MD during the development of the study. In memoriam Florencia Vargas-Vorackova.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.07.002>.

References

- [1] Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl. 1):S64–74.
- [2] Ponce de Leon-Rosales SP, Molinar-Ramos F, Dominguez-Cherit G, Rangel-Frausto MS, Vazquez-Ramos VG. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. *Crit Care Med* 2000;28:1316–21.
- [3] Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009;302:2323–9.
- [4] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303–10.
- [5] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546–54.
- [6] Marshall JC. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008;83:471–82.
- [7] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009;420:1–16.
- [8] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–84.
- [9] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085–8.
- [10] Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187–91.
- [11] Yoon HJ, Choi JY, Kim CO, Park YS, Kim MS, Kim YK, et al. Lack of toll-like receptor 4 and 2 polymorphisms in Korean patients with bacteremia. *J Korean Med Sci* 2006;21:979–82.
- [12] Plantinga TS, Ioana M, Alonso S, Izagirre N, Hervella M, Joosten LA, et al. The evolutionary history of TLR4 polymorphisms in Europe. *J Innate Immun* 2012;4:168–75.
- [13] Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028–32.
- [14] Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522–5.
- [15] Zhu L, Li X, Miao C. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene* 2012;501:213–8.
- [16] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–6.
- [17] Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50:133–64.
- [18] Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007;44(Suppl. 2):S27–72.
- [19] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388–416.
- [20] Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;26:1793–800.

- [21] Needham DM, Scales DC, Laupacis A, Pronovost PJ. A systematic review of the Charlson comorbidity index using Canadian administrative databases: a perspective on risk adjustment in critical care research. *J Crit Care* 2005;20:12–9.
- [22] Thomson RB. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: Am Soc Microbiol; 2007. p. 291–333.
- [23] Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 2004;41:808–13.
- [24] Gauderman W, Morrison J. QUANTO 1. 1: a computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies; 2006 <http://hydra.usc.edu/gxe>
- [25] Folwaczny M, Glas J, Török HP, Limbersky O, Folwaczny C. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2004;135:330–5.
- [26] Barrot C, Sanchez C, Ortega M, Gonzalez-Martin A, Brand-Casadevall C, Gorostiza A, et al. Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 2005;119:111–5.
- [27] Sanz P, Prieto V, Flores I, Torres Y, Lopez-Soto M, Farfan MJ. Population data of 13 STRs in southern Spain (Andalusia). *Forensic Sci Int* 2001;119:113–5.
- [28] Calzada P, Suarez I, Garcia S, Barrot C, Sanchez C, Ortega M, et al. The Fang population of equatorial Guinea characterised by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 2005;119:107–10.
- [29] Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de LE, McIntyre PB, et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 2008;86:268–70.
- [30] Everett B, Cameron B, Li H, Vollmer-Conna U, Davenport T, Hickie I, et al. Polymorphisms in toll-like receptors-2 and -4 are not associated with disease manifestations in acute Q fever. *Genes Immun* 2007;8:699–702.
- [31] Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, et al. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002;16:56–8.
- [32] Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16645–50.
- [33] Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 2012;13:535–42.
- [34] Diaz-del-Castillo B. *Historia verdadera de la conquista de la nueva España*: 1517–1521. 1st ed. Mexico: Trillas; 2012.
- [35] Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, et al. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 2008;4:e1000037.
- [36] Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, Laval G, Patin E, Pickrell JK, et al. Evolutionary dynamics of human toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet* 2009;5:e1000562.
- [37] Maldonado-Bernal C, Trejo-de la OA, Sanchez-Contreras ME, Wachter-Rodarte N, Torres J, Cruz M. Low frequency of Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in Mexican patients and their association with type 2 diabetes. *Int J Immunogenet* 2011;38:519–23.
- [38] Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007;7:70.
- [39] Rodriguez-Perez JM, Cruz-Robles D, Hernandez-Pacheco G, Perez-Hernandez N, Murguía LE, Granados J, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 2005;98:97–102.
- [40] Camarena A, Juarez A, Mejia M, Estrada A, Carrillo G, Falfan R, et al. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1528–33.
- [41] Bracho-Riquelme RL, Loera-Castaneda V, Torres-Valenzuela A, Loera-Castaneda GA, Sanchez-Ramirez JP. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with poor outcome (death) in patients with non-appendicular secondary peritonitis. *Crit Care* 2011;15:R227.
- [42] Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8611–6.

Medical decision making: paternalism versus patient-centered (autonomous) care

Carlos A. Rodriguez-Osorio and Guillermo Dominguez-Cherit

Department of Critical Care Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

Correspondence to Guillermo Dominguez-Cherit, MD, Department of Critical Care Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, C.P. 14000 Distrito Federal, Mexico
Tel: +52 55 5487 0900 x5020; fax: +52 55 5655 2510; e-mail: guidom@prodigy.net.mx

Current Opinion in Critical Care 2008, 14:708–713

Purpose of review

Medical literature has increasingly emphasized the need to observe patients' autonomy; however, not all experts agree with this principle. This discord is based on varying credence between the concepts of autonomy and beneficence. In critically ill patients, this conflict involves the patient's family and creates a particular family–physician relationship. The purpose of this review is to assess the evidence on medical decision making and the family–physician relationship.

Recent findings

The many studies published on this topic reveal that people's preferences around the medical decision-making process vary substantially. Although it is clear that a shared decision approach is popular and desirable to some, it is not universally favored; some patients prefer to leave final treatment decisions up to the doctor. This finding shows a robust moral pluralism, which requires special attention in multicultural societies. For critically ill patients, the diversity of opinion extends to the family, which creates a complex family–physician dynamic and necessitates utilization of particular interaction strategies.

Summary

Clinicians must understand the range of preferences in a society and should offer the opportunity to participate in treatment by sharing decision-making responsibility. This would involve assessing the preferences of patients and their families in order to provide care accordingly. Clinicians should then ensure proper information is provided for informed decision making and minimize factors that could have potential adverse effect.

Keywords

autonomy, family-centered care, medical decision making, paternalism, patient-centered care, relational autonomy

Curr Opin Crit Care 14:708–713
© 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1070-5295

Introduction

A review of the last decades in the history of medicine, healthcare, and biotechnology identifies both longstanding zones of ethical conflict and areas of relatively stable social norms. Beauchamp and Childress [1] make empirical claims about the universality of common morality; however, contemporary liberal democracies are multicultural, multireligious, and pluralistic societies. In this view, there is a crucial difference between making normative claims about how humans ought to act and making transhistorical, cross-cultural claims about the empirical status of particular moral practices. In this article, we review some recent publications about patient and physician perceptions around medical decision making and the role of the family in the patient's autonomy. Finally, we propose a practical approach for medical decision making in critical-care units.

Autonomy

The word autonomy comes from the Greek *autos* (self) and *nomos* (rule, governance, or law) and was first used to refer to self-government or self-rule. Although it originally applied to society, it has become a term that is used to refer to individuals and is found in moral, political, and bioethical philosophy. Beauchamp and Childress [1] describe it as the 'personal rule of the self that is free from both controlling interferences by others and from personal limitations that prevent meaningful choice, such as inadequate understanding.' In a medical context, respect for a patient's autonomy is considered a fundamental ethical principle, and this belief is the central premise of the concept of informed consent. In addition, some studies have shown that the ability and opportunity to exercise autonomy improves physical and psychological health and is generally a component of a good quality of life [2].

A patient's freedom to decide can be impinged upon by internal factors arising from the patient's condition or by external factors. Internal factors are those that affect the ability of the patient to make decisions. For example, a patient with metastatic prostate cancer must decide about noninvasive mechanical ventilation while suffering severe bone pain. In this case, the pain functions as an internal factor and must be controlled as much as possible to assist the patient in the decision-making process. External factors, which are the focus of this review, include the ability of others to exert control over a patient by force, coercion, or manipulation. Force involves the use of physical restraint or sedation to enable a treatment to be given. Coercion involves the use of explicit or implicit threats to ensure that a treatment is accepted. Manipulation involves a deliberate distortion or omission of information in an attempt to induce the patient to accept a treatment or make a certain decision [3]. To avoid coercion and manipulation, the physician must provide accurate and relevant information. This is a significant issue, as informed patients are empowered to make decisions affecting their lives as a whole that they could not have made had they been unaware of the true nature of their condition.

Autonomy requires an appropriate relationship between patient (or family) and physician. Charles *et al.* [4] provided useful suggestions for developing a framework for the analysis of treatment-related decision making and proposed three analytical approaches: the paternalistic approach, characterized by physician control; the informed approach, also called consumerism, characterized by division of labor and preservation of patient autonomy; and the shared approach, characterized by simultaneous interaction between both the patient and physician in all stages of the decision-making process. Some studies have shown that most patients, especially in the United States, want to be completely informed about their medical situation and prefer the shared decision-making approach [5^{••},6,7]. However, other studies suggest that 10–20% of all patients do not want to know the details of their condition [8], and 9–17% prefer to leave decisions to their family or their physicians [5^{••},9]. Complete knowledge regarding one's medical condition can have negative consequences. For example, one study found that providing cancer patients with more detailed information resulted in higher anxiety levels [9], which could adversely influence medical care decisions. However, poor disclosure is typically done too hurriedly, in the wrong setting, without appreciation of the patient's circumstances and without addressing the patient's real needs and fears. For this reason, physicians should start from the assumption that all patients are able to cope with the facts and reserve nondisclosure for the less usual cases for which more harm will result from telling the truth than from not telling it. Truth should be offered, but not

forced, and how and when to discuss the patient's situation should be carefully evaluated. The proper amount of information to disclose at any one time varies from patient to patient. Concerns regarding purportedly very bad outcomes of disclosure, including loss of hope, premature death, or suicide, are anecdotal and lack any real empirical foundation [10].

Despite the espoused importance of patient autonomy, there are some limitations. Beauchamp and Childress [1] have suggested four principles that may limit autonomy: the harm principle, the principle of paternalism, the principle of legal moralism, and the welfare principle. However, according to some experts, only the principle of harm would be an appropriate situation in which to consider restrictions of autonomy. According to this principle, we should restrict the freedom of those whose expressions of autonomy would result in harm to another individual. This brings to light the concept of paternalism [1,11^{••}], which will be discussed later. Physician's beliefs are another difficulty to overcome in the context of patient autonomy. One study in the setting of critical-care medicine found that 23% of 879 American physicians had withdrawn therapy without the patient's or family's consent, 12% without their knowledge, and 3% despite their objections [12]. Therefore, it seems that although autonomy is a sought-after value, it is both hard to attain and difficult to respect.

Paternalism

Clinicians are often faced with an inherent tension between their desire to respect and foster patient autonomy and their responsibility to act in a patient's best interest (which some might call paternalism). 'Paternalism' comes from the Latin *pater*, meaning to act like a father, or to treat another person like a child. Beauchamp and Childress [1] wrote: 'Paternalism, then, is the intentional overriding of one person's known preferences or actions by another person, where the person who overrides, justifies the action by the goal of benefiting or avoiding harm to the person whose preferences or actions are overridden.'

Paternalism can be divided into hard and soft, broad and narrow, pure and impure, moral and welfare, and active and passive [13]. This discussion is limited to hard, soft, active, and passive paternalism. Soft, or weak, paternalism is a philosophy that believes the physician or the state can help you make the choices you would make for yourself, if only you had the strength of will and the sharpness of mind. A weak paternalist believes that it is legitimate to interfere with the means that agents choose to achieve their ends, if those means are likely to defeat those ends. But unlike hard paternalists, who ban some things and mandate others, the softer kind aims only to

skew your decisions, without infringing greatly on your freedom of choice. Conversely, a hard, or strong, paternalist believes that people may be mistaken or confused about their ends and that it is legitimate to interfere to prevent them from achieving those ends. This kind of paternalism involves an individual who refuses to accept another's autonomous decision in actions or choices [13]. On the contrary, a paternalistic view may involve active or passive nonacquiescence to the patient's choices. In active nonacquiescence, the paternalist refuses to accept a patient's request for nonintervention or noninterference, whereas, in passive nonacquiescence, a paternalist refuses to carry out the wishes or choices of a patient or to assist the patient in his or her action. It is easier, *ceteris paribus*, to justify passive paternalism than active paternalism, because passive paternalism confirms the professional's autonomy, affirming they are not an instrument of their patients' wishes, and because passive paternalism leaves the patient with other options [14].

In most cases, the antipaternalist rejects any form of paternalism. However, some antipaternalists do not reject weak paternalism. Paternalism can be justified if it provides great benefit or prevents major problems while disrespecting autonomy only slightly. According to Beauchamp and Childress [1], we should accept paternalism as a benefit for the patient only in certain situations, when the patient is at risk of a significant, preventable harm; the paternalistic action will probably prevent the harm; the projected benefits to the patient of the paternalistic action outweigh the risks to the patient; and the least autonomy-restricting alternative that will secure the benefits and reduce the risks is adopted.

Despite the fact that patient involvement in treatment-related decision making has been widely advocated and promoted in both clinical and policy-making settings, research conducted in developed and in developing countries revealed that people's preferences regarding their role in the decision-making process vary substantially [4,5^{**},15]. Recently, a large cross-sectional survey [5^{**}] conducted among the American public using computer-assisted telephone interviewing found that 62% of respondents preferred shared decision making, 28% informed approach, and 9% paternalism. In another population-based survey of a representative sample of English-speaking adults conducted in conjunction with the General Social Survey in United States, nearly all respondents (96%) reported they preferred to be offered choices and to be asked their opinions. However, this was not for all situations; half of the respondents (52%) preferred to leave final decisions to their physicians and 44% preferred to rely on physicians for medical knowledge rather than seeking out information themselves [15]. These examples suggest that a collaborative model of decision making is popular and may be desirable,

but that it is not held universally by the public. As noted, some respondents preferred to rely on physicians for information about their condition and others preferred to leave final treatment decisions up to the doctor. This finding could vary based on the severity of the situation, that is, when the situation involves potential mortality or when the respondents' health status is deteriorating [16^{*}]. In addition, factors such as age, sex, and education have consistently been shown to impact patients' desire for information and decision making in several studies [17–19]. Culture also plays a role in this scenario. Studies have shown that African–American, Hispanic [5^{**}], and Japanese [9] respondents more frequently reported that they prefer their family or physicians make final decisions.

Physicians' opinions about medical decision making

Recently, Murray *et al.* [20^{**}] conducted a cross-sectional survey within a nationally representative sample of American physicians. They found that 75% of physicians preferred to share decision making with their patients, 14% preferred paternalism, and 11% preferred an informed approach. Older physicians (aged 50 or older) were more likely to perceive themselves as practicing paternalism. Physicians trained abroad were less likely to perceive themselves as practicing shared decision making than those trained in America, but they were more likely to report practicing either paternalism or an informed approach. Respondents from surgical specialties were less likely to report paternalism and more likely to report consumerism compared with physicians from either medical or primary care specialties.

Although paternalism could be preferred by some respondents (patients and physicians), a number of researchers suggest that individuals in long-standing relationships tend to build implicit decision-making processes frequently leading to a false sense of knowledge about another's desires and wishes. Moreover, limiting autonomy would lead to potentially negative health consequences as a result of the loss of control over one's own life, including negative physical, social and psychological outcomes, poorer health, and diminished morale and self-esteem in some patients [2].

Family-centered care

Although shared decision making and patient autonomy are desirable, the situation may be different when considering critically ill patients. These patients are often incapable of providing consent, and unless they had previously filed to the contrary, their families receive full information on their diagnosis, prognosis, and treatment, and are anticipated to make medical decisions on their behalf. For this reason, healthcare providers in ICU

have devoted considerable attention to families, creating the concept of family-centered care [21,22^{••}]. In many countries, a consensus seems to exist that the patient's natural proxy is their family. For example, family participation in end-of-life decisions is almost universal in the United States (93–100%), whereas somewhat more variable in Europe (84–47%) [23]. It must be noted, however, that this definition of family involvement may not include sharing in decision making, as 88% of families in Europe were simply told that the end-of-life policy was being enacted, whereas only 38% were asked for their opinions [24].

The family–physician relationship in the ICU is a complex interaction that requires ICU staff to provide appropriate and accurate information and the family members to function as surrogate decision makers by providing information about the patient's wishes. These components are necessary to choose the management strategy that will best fit the patient's wishes, preferences, and values. One important issue is the ability of family to know the patient's preferences and values. One study showed that surrogate decision makers for ICU patients made unwanted treatment decisions in about 20% of overall cases, with less agreement (50–88%) occurring in regard to decision making for the critically ill [25,26]. Despite this lack of the knowledge of patients' wishes, studies from the FAMIREA group in France have shown that 90% of respondents were favorable to surrogate designation if they were admitted to an ICU and 85% said they would want their surrogate to share in discussions and decisions with the intensivists. Moreover, 85% of nurses and 90% of physicians supported family involvement in care and decision making [21,27]. These results suggest that most individuals feel that proxy contribution to the decision-making process is preferable to leaving the decision entirely to the intensivists.

When families are involved in medical decision making, the family's needs and preferences should be reassessed frequently as they may change over time and cause problems in the family–physician relationship. Conflict between families and the ICU staff is not uncommon, and one study found that family members felt they received insufficient information regarding the patient's condition, the cause of death, and the methods used to relieve pain and anxiety in the patient [28]. Resolution of these conflicts can usually be achieved with sensitive negotiation; however, when these measures fail, external arbiters may have to be employed. These could include an ethics consultant (a third party not involved in the ICU care of the specific patient and not necessarily a physician) or an ethics committee [24]. Otherwise, if a clinician attempted to persuade a patient or their family to follow a particular course of action based on medical evidence and clinical judgment, and the patient or their

proxy rejected their advice, the information, the involvement of family members, and final decision should be recorded clearly in the patient's chart. Additionally, similar to patients developing anxiety with too much information, family members may also experience anxiety and depression around the diagnosis, risk of death, or treatment plan of their loved ones. If the family decision maker is too affected, there is a risk of inadequate proxy decision making [22^{••}]. For this reason, ICU healthcare workers should strive to alleviate these symptoms by establishing effective and compassionate communication. Often, identifying a key influential member of the family to be the primary discussant for the family is extremely helpful.

The role of family in patients' autonomy

Contemporary patients are faced with increasingly complex choices, some of which are expensive and/or existentially tragic. Even cases in which patients are competent and able to participate in decision making, such deliberation can be physically and emotionally exhausting. Additionally, as specialized medicine has resulted in patients being attended by more clinicians than ever before, certain medical care has become increasingly impersonal and fragmented. This is true particularly in ICU, in which healthcare team members usually only focus on their own specialty. This could cause critically ill patients to feel isolated, and is of particular concern for minority patients who may face language or cultural issues or may not be familiar with the healthcare system or western medicine [11^{••}]. In this context, it seems that family involvement and patients' relational identity are more important than ever in preserving or restoring patients' autonomous agency and that many patients may be more inclined to trust their family's judgment over paternalistic doctors' claims.

The autonomist framework ignores patients' duties toward their family members and family members' interest around care of their loved one. When professionals pressure patients to make independent decisions, they risk severing the intimate ties that hold patients and their families together, leaving patients feeling overwhelmed in fending for themselves and families being left out of the patients' journey. Clinicians should acknowledge that self-determining patients exist fundamentally in relation to others, and that their interests involve a dynamic balance among interdependent people who have overlapping considerations [11^{••},22^{••}].

Conversely, in cases in which professionals suspect that the patient may be going along with his/her family's suggestions out of familial pressure, they should privately discuss patient goals and family dynamics, examine how patients come to their decisions, and address their

concerns regarding their situation at hand. In cases in which it is clear that the patient would like to be free of familial influence, clinicians could discuss various ways to support his/her interests without creating more familial animosity. Since professionals are usually unfamiliar with their patients' relational history and family dynamics, it is more important for them to follow their patients' own assessment and expressed wishes rather than to authoritatively 'free' them from their families [11**].

On the contrary, given that physician paternalism is also seen in many countries [16*,19] and numerous patients are treated in multicultural urban societies, it can be expected that significant differences regarding the role of individuals or families as decision makers will be found between patients and healthcare providers. The incompatibility of values between patients and healthcare providers and the judgments they support may result in incompatible bioethical claims. Consequently, those engaged in these substantive moral controversies who assess what is at stake, separated by incommensurable moral–metaphysical frameworks, and attempt to resolve such controversies by sound rational argument will be characterized by begging the question, arguing in circles, or engaging in infinite regress [29]. However, healthcare organizations will seek to appropriately tailor health promotion programs in order to improve understanding of the range and distribution of preferences within populations.

Thus, it has been increasingly emphasized that merely pressuring patients to decide a treatment option could have negative psychosocial consequences, if the patient does not wish to be the final decision maker; physicians should 'sound out' patients' preferences in this regard to find means for a peaceable collaboration that does not require stakeholders to abandon their moral commitments or compromise their moral integrity; this will require conscience clauses that recognize the existence of moral disparities and accept different assumptions.

Conclusion

Throughout this review, we have emphasized that physicians should offer patients the opportunity to participate in medical decision making by sharing responsibility and active engagement. Clinicians should understand that merely pressuring patients to decide certain treatment options could have negative psychosocial consequences if the patient does not wish to be the final decision maker. Doctors cannot substitute their judgments about what is important for patients to know for the patients' own judgments.

A doctor needs to specifically ask patients and/or their families to assess individual patient preferences in order

to provide individualized care. When the patient or family agrees to receive the information and make a decision, clinicians should ensure that informational needs are met and should minimize the potential influences of internal and external factors to the best of their ability. Finally, understanding the range and distribution of preferences within populations is important to health-care organizations seeking to appropriately tailor health promotion programs.

Acknowledgements

The authors appreciate the helpful suggestions of Dr Juan A. Rull in the preparation of the manuscript.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 730–731).

- 1 Beauchamp TL, Childress JF. Principles of biomedical ethics. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- 2 Tuckett AG. On paternalism, autonomy and best interests: telling the (competent) aged-care resident what they want to know. *Int J Nurs Pract* 2006; 12:166–173.
- 3 Dykeman MJ, Dewhirst K. Voluntariness. In: Singer PA, Viens AM, editors. The Cambridge textbook of bioethics. Cambridge, USA: Cambridge University Press; 2008. pp. 31–35.
- 4 Charles CA, Whelan T, Gafni A, *et al*. Shared treatment decision making: what does it mean to physicians? *J Clin Oncol* 2003; 21:932–936.
- 5 Murray E, Pollack L, White M, Lo B. Clinical decision-making: patients' preferences and experiences. *Patient Educ Couns* 2007; 65:189–196.
- A large cross-sectional survey conducted among the American public using computer-assisted telephone interviewing. It found a diversity of responses regarding preferred approach. The main findings are that 62% of respondents preferred shared decision making, 28% preferred informed approach, and 9% preferred paternalism.
- 6 Butow PN, Maclean M, Dunn SM, *et al*. The dynamics of change: cancer patients' preferences for information, involvement and support. *Ann Oncol* 1997; 8:857–863.
- 7 Mazur DJ, Hickam DH. Patients' preferences for risk disclosure and role in decision making for invasive medical procedures. *J Gen Intern Med* 1997; 12:114–117.
- 8 Schattner A. What do patients really want to know? *QJM* 2002; 95:135–136.
- 9 Sekimoto M, Asai A, Ohnishi M, *et al*. Patients' preferences for involvement in treatment decision making in Japan. *BMC Fam Pract* 2004; 5:1.
- 10 Hebert PC, Hoffmaster B, Glass KC. Truth telling. In: Singer PA, Viens AM, editors. The Cambridge textbook of bioethics. Cambridge, USA: Cambridge University Press; 2008. pp. 36–42.
- 11 Ho A. Relational autonomy or undue pressure? Family's role in medical decision-making. *Scand J Caring Sci* 2008; 22:128–135.
- This essay argues for a re-examination of the notions of autonomy and undue pressure in the contexts of patienthood and relational identity. In particular, it examines the characteristics of families and their role in adult patients' decision making. This paper argues that family involvement and consideration of family interests can be integral in promoting patients' overall agency.
- 12 Asch DA, Hansen-Flaschen J, Lanken PN. Decisions to limit or continue life-sustaining treatment by critical care physicians in the United States: conflicts between physicians' practices and patients' wishes. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:288–292.
- 13 Dworkin, G. Paternalism. In: Zalta EN, editor. The Stanford encyclopedia of philosophy. Winter 2005 ed. <http://plato.stanford.edu/archives/win2005/entries/paternalism/>.
- 14 Siegler M. Metaphors and models of doctor–patient relationship. In: Childress JF, editor. Practical reasoning in bioethics. Indiana: Indiana University Press; 1997. pp. 44–56.

15 Levinson W, Kao A, Kuby A, Thisted RA. Not all patients want to participate in decision making. A national study of public preferences. *J Gen Intern Med* 2005; 20:531–535.

16 Watanabe Y, Takahashi M, Kai I. Japanese cancer patient participation in and satisfaction with treatment-related decision-making: a qualitative study. *BMC Public Health* 2008; 8:77.
This study revealed that Japanese cancer patients' preferences regarding their role in treatment-related decision making varied widely from complete physician control to complete patient control.

17 Adams RJ, Smith BJ, Ruffin RE. Patient preferences for autonomy in decision making in asthma management. *Thorax* 2001; 56:126–132.

18 Fraenkel L, Bogardus S, Concato J, Felson D. Preference for disclosure of information among patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 45:136–139.

19 Asghari F, Mirzazadeh A, Fotouhi A. Patients' preferences for receiving clinical information and participating in decision-making in Iran. *J Med Ethics* 2008; 34:348–352.

20 Murray E, Pollack L, White M, Lo B. Clinical decision-making: physicians' preferences and experiences. *BMC Fam Pract* 2007; 8:10.
Cross-sectional survey of a nationally representative sample of US physicians. It showed the first data from a large nationally representative sample of physicians to explore physician perceptions of their preferred and perceived role in clinical decision making. The main findings are that three quarters of physicians prefer sharing decision making with their patients, with the remaining one quarter almost equally divided between the paternalist and consumerist approaches.

21 Azoulay E, Pochard F. Communication with family members of patients dying in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9:545–550.

22 Berger JT, DeRenzo EG, Schwartz J. Surrogate decision making: reconciling ethical theory and clinical practice. *Ann Intern Med* 2008; 149:48–53.
In this article, the authors outline differences between normative standards for decision making and empirical evidence of practice and offer clinicians ways in which the two can be reconciled for the patient's benefit.

23 Cohen S, Sprung C, Sjøkvist P, *et al.* Communication of end-of-life decisions in European intensive care units. *Intensive Care Med* 2005; 31:1215–1221.

24 Levin PD, Sprung CL. Critical and intensive care ethics. In: Singer PA, Viens AM, editors. *The Cambridge textbook of bioethics*. Cambridge, USA: Cambridge University Press; 2008. pp. 462–468.

25 Coppolino M, Ackerson L. Do surrogate decision makers provide accurate consent for intensive care research? *Chest* 2001; 119:603–612.

26 Ciroidi M, Cariou A, Adrie C, *et al.* Ability of family members to predict patient's consent to critical care research. *Intensive Care Med* 2007; 33:807–813.

27 Azoulay E, Pochard F, Chevret S, *et al.* Half the family members of intensive care unit patients do not want to share in the decision-making process: a study in 78 French intensive care units. *Crit Care Med* 2004; 32:1832–1838.

28 Studdert DM, Mello MM, Burns JP, *et al.* Conflict in the care of patients with prolonged stay in the ICU: types, sources, and predictors. *Intensive Care Med* 2003; 29:1489–1497.

29 Engelhardt HT Jr. Critical care: why there is no global bioethics. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11:605–609.

Admisión no prevista a la Unidad de Cuidados Intensivos en pacientes programados para procedimientos por estancia corta

Dthurley Lozada-León,* Carlos A. Rodríguez,** José Alberto Ávila-Funes***

* Departamento de Anestesiología. ** Unidad de Terapia Intensiva. *** Departamento de Geriátria. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Unexpected admission to the intensive care unit following ambulatory surgical procedures

ABSTRACT

Introduction. Unexpected admission (UA) to the intensive care unit (ICU) among the ambulatory patient could be considered as an indicator of quality of attention on ambulatory services. However, the determinants associated with this rare complication are unknown. **Objective.** To identify the factors associated with UA to the ICU among the patients following ambulatory surgical procedures (ASP). **Material and methods.** Twenty one cases and 105 controls were selected from among 4,705 patients admitted for an ASP at a teaching hospital between January 2004 and May 2006. A case was that one with an UA to the ICU for monitoring and/or treatment after its ambulatory surgical procedure. Each case was paired with five controls according to type of procedure and date of accomplishment. Conditional logistic regression analyses were used to determine the potential factors associated with an UA to the ICU. **Results.** Cases represented 0.4% of admitted ones for an ASP. Mean age of controls were 46.9 years and 52.4% were women. There were no statistically significant differences between cases and controls in relation to several clinical, biochemical and physical status variables (comorbidity, vital signs, biochemistry, surgical procedure, anesthetic, technical anesthetic, time of surgery, surgical bleeding). Fourteen patients were less than 48 hours at the ICU and there were no deaths. **Conclusions.** Most of UA to the ICU seem to be based on decisions non-related to general health status of patients and these are usually preventive. This decision is not based on scientific evidence. Admission to the ICU must be based on a multidisciplinary evaluation.

Key words. Ambulatory surgical procedures. Intensive care. Anesthesia.

RESUMEN

Introducción. La admisión no prevista (ANP) a la unidad de cuidados intensivos (UCI) de enfermos originalmente ingresados en las unidades de estancia corta (EC) podría considerarse como un indicador de calidad en la selección de enfermos para cirugía ambulatoria y de corta estancia. Sin embargo, se desconocen las características de los pacientes que presentan esa rara complicación. **Objetivo.** Identificar los factores asociados con la ANP a la UCI entre pacientes ingresados en EC. **Material y métodos.** Estudio de 21 casos y 105 controles seleccionados de entre 4,705 pacientes admitidos en EC de un hospital universitario entre enero de 2004 a mayo de 2006. Los casos fueron aquéllos con ANP a la UCI para vigilancia y/o tratamiento después de su procedimiento. Cada caso fue pareado con cinco controles según el tipo de procedimiento y la fecha de realización. Modelos de regresión logística condicional identificaron los posibles factores asociados a la ANP a la UCI. **Resultados.** Los casos representaron 0.4% de los pacientes admitidos en la EC. Su edad media fue 46.9 años, y 52.4% fueron mujeres. No hubo alguna diferencia estadísticamente significativa entre los casos y los controles con respecto a las variables clínicas, bioquímicas y del estado físico (comorbilidad, signos vitales, exámenes de laboratorio, tipo de procedimiento, riesgo anestésico, técnica anestésica, tiempo de cirugía, sangrado quirúrgico). Catorce ANP a la UCI duraron menos de 48 horas. No hubo defunciones. **Conclusión.** La mayoría de las ANP a la UCI fueron consecuencia de complicaciones, tanto médicas como quirúrgicas, mientras que otras no estuvieron relacionadas con el estado general del enfermo sino que fueron precautorias. Esta última conducta no está adecuadamente respaldada por evidencia científica por lo que debe fundamentarse en una evaluación integral multidisciplinaria.

Palabras clave. Procedimientos quirúrgicos ambulatorios. Cuidados intensivos. Anestesia.

INTRODUCCIÓN

La anestesia en cirugía ambulatoria ha sido parte fundamental en el desarrollo y la expansión de los procedimientos realizados en las unidades de estancia corta (EC) de múltiples hospitales, al promover el cuidado y la atención de pacientes con problemas médicos específicos.^{1,2} Esta práctica ha pretendido que los enfermos sean tratados de forma segura y eficaz sin que sea necesaria su internación y que la mayoría puedan ser egresados en un máximo de 48 horas tras la realización de su procedimiento.^{1,3}

La asignación de un riesgo anestésico (como el propuesto por la *American Society of Anesthesiologists* [ASA])⁴ (Anexo) ha permitido refinar la selección de los candidatos a procedimientos ambulatorios siendo privilegiados los pacientes con riesgo anestésico ASA I o II.⁵ Sin embargo, a pesar de esta valoración, los pacientes no están exentos de sufrir algún evento no anticipado durante el procedimiento que retrase su egreso y además los hagan susceptibles de requerir una vigilancia más estrecha en los servicios de hospitalización o de cuidados intensivos.^{6,7} La admisión no prevista (ANP) a hospitalización de los pacientes que han ingresado a procedimientos por la EC es un evento raro y se desconoce la frecuencia con la que ocurren este tipo de admisiones a las unidades de cuidados intensivos (UCI). Hay escasa información en la literatura a este respecto, por lo que el propósito de este trabajo fue el identificar los factores potencialmente asociados a la ANP en la UCI entre los pacientes programados para algún procedimiento en la unidad de EC de un hospital de la ciudad de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de casos y controles realizado con la información clínica (expediente médico y hojas de registro anestésico) de pacientes que fueron ingresados al programa de cirugía de EC de un Instituto Nacional de Salud entre enero de 2004 y mayo de 2006 en la ciudad de México. Un total de 4,705 personas ingresaron en la EC en ese lapso. Para los propósitos de este estudio, los casos fueron aquellos pacientes que, tras ingresar para cirugía de EC, fueron admitidos de forma no prevista en la UCI para vigilancia y/o tratamiento especializado por el surgimiento de un evento inesperado relacionado con el procedimiento o intervención realizada. Por otro lado, los controles fueron aquellos pacientes que, tras ingresar de forma programada para cirugía de EC, fueron dados de alta hospitalaria a su domicilio

tras la adecuada recuperación postanestésica relacionada con el procedimiento realizado. Para considerar su alta del servicio de EC se consideró:

1. Paciente despierto, orientado y completamente lúcido, sin somnolencia.
2. Adecuada tolerancia de la vía oral (ausencia de náusea y vómito).
3. Adecuado control del dolor con analgésicos vía oral.
4. Deambulacion por sí mismo con las limitaciones propias de la intervención.
5. Micción normal.
6. Comprobar ausencia de cefalea (descartar cefalea postpunción).
7. Descartar la posibilidad de edema laríngeo, disfonía, estridor o dificultad respiratoria en aquéllos donde se utilizó una cánula endotraqueal.
8. Comprobar vendajes y aportar instrucciones verbales y escritas sobre la atención postoperatoria.

Para cada caso, cinco controles fueron seleccionados y pareados por el tipo de procedimiento y por la fecha en la cual fue realizado el mismo (± 10 días). Este estudio cumple con las normas éticas de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 (Principios éticos aplicables a las investigaciones médicas en sujetos humanos) y su revisión en 2004.

Variables

Además de la información sociodemográfica necesaria para la descripción de la muestra (edad y sexo), se estudiaron las siguientes variables:

- **Comorbilidad.** Fueron adicionadas distintas patologías de acuerdo a nueve aparatos o sistemas (hematológicas, reumatológicas o autoinmunes, oncológicas, infectológicas, neurológicas, endocrinológicas, cardiológicas, gastroenterológicas o pulmonares). La hipertensión arterial, diabetes mellitus e insuficiencia renal fueron consideradas de forma independiente y también fueron sumadas para crear un puntaje máximo de 12. Entre mayor fue el puntaje, mayor el número de enfermedades crónicas. Esta variable fue analizada como continua, pero también se analizaron, separadamente, cada una de las patologías como variables dicotómicas (presencia o ausencia).
- **Signos vitales.** Se consideró las mediciones al ingreso a la EC de la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), y media (PAS-PAD/3 +

PAD), además de la frecuencia cardiaca (latidos por minuto) y la frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto).

- **Exámenes de laboratorio.** Se analizaron los valores al ingreso en la EC de la hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), leucocitos (K/uL), plaquetas (K/uL), glucosa (mg/dL), nitrógeno de la urea (mg/dL), creatinina (mg/dL), sodio (mEq/L), potasio (mEq/L), cloro (mEq/L), tiempo de protrombina (seg.) y albúmina (g/dL).
- **Tipo de procedimiento programado por la EC.** Éste fue categorizado de acuerdo a su naturaleza en: 1) Quirúrgicos: Cirugía de cabeza y cuello (tiroidectomía total y subtotal); Cirugía oncológica (mastectomía radical); Cirugía urológica (resección transuretral de próstata); Cirugía gastroenterológica (colecistectomía y derivación gastroyeyunal); Cirugía oftalmológica (trabeculectomía); 2) Biopsias percutáneas, y 3) Cardiología intervencionista: (cateterismos vasculares).
- **Riesgo anestésico de la ASA.** Se refiere a la escala de valoración del estado físico del paciente que determina su riesgo anestésico.⁴ Con seis categorías posibles (I a VI), mientras menor sea la clasificación se indica menor riesgo anestésico.
- **Técnica anestésica.** Se consideró como variable nominal el tipo de anestesia aplicada durante el procedimiento que motivó el ingreso a la EC. Fueron consideradas: 1) Anestesia general; 2) Anestesia regional (epidural o espinal); y 3) Anestesia local con o sin sedación.
- **Tiempo de cirugía.** Se consideró el tiempo en minutos.
- **Sangrado quirúrgico.** Variable en la que el volumen fue reportado en mililitros.

Análisis estadístico

Para la descripción de los casos y de los controles, se calculó la media y la desviación estándar (DE) de las variables continuas y la frecuencia y el porcentaje de las variables categóricas. Con el objetivo de identificar una posible asociación entre las diferentes variables del estado general del paciente a su ingreso en la EC y la admisión no prevista en la UCI (variable dependiente), fueron construidos modelos de regresión logística condicional univariados debido al diseño pareado del estudio. Si alguna asociación fue identificada, se construyeron modelos de regresión logística condicional multivariados, los cuales incluyeron las potenciales variables explicativas. Las asociaciones son presentadas como la razón de probabilidades (*Odds ratio* [OR]),

la cual se obtuvo a partir del exponencial del coeficiente β correspondiente, además de su intervalo de confianza (IC) al 95%. El valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico Stata para Windows® (Intercooled Stata 9.0. 2005; Stata Corporation, Collage Station, TX, USA).

RESULTADOS

Durante un periodo de 29 meses, hubo 21 ANP a la UCI de un total de 4,705 ingresos a la EC en ese lapso (0.4%). La edad media de los casos fue de 46.9 (19.0 DE) años, y 11 (52.4%) fueron mujeres. La hipertensión arterial sistémica y la diabetes mellitus fueron las enfermedades más prevalentes entre los casos (38.1% vs. 33.3%, respectivamente), y en quienes la media de enfermedades crónicas fue de 2.14 ± 1.28 .

Las características generales de los casos y los controles se presentan en el cuadro 1. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos relacionadas con la edad ($p = 0.98$) o al sexo ($p = 0.24$) de los pacientes. Tampoco hubo diferencias relacionadas con su riesgo anestésico (ASA), la técnica anestésica empleada, el tiempo de cirugía o el sangrado quirúrgico. Los controles tuvieron un tiempo mayor de estancia en la EC a diferencia de los casos admitidos de forma no prevista en la UCI ($p < 0.01$).

En el cuadro 2 se muestran los signos vitales y los exámenes de laboratorio de los casos y los controles. No hubo diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las variables estudiadas.

En el cuadro 3 se presenta la comorbilidad de los pacientes que ingresaron a la EC. Una vez más, el número total de enfermedades no fue diferente entre los casos y los controles ($p = 0.25$) ni tampoco hubo diferencias relacionadas a la frecuencia de las enfermedades crónicas más prevalentes ($p = 0.46$ para hipertensión arterial y $p = 0.78$ para diabetes mellitus).

En el cuadro 4 se muestran los 21 casos con su diagnóstico de ingreso a la EC y su motivo de admisión en la UCI. Siete pacientes tuvieron una complicación inherente a la cirugía o procedimiento (seis hematomas y una hiponatremia dilucional [síndrome postRTUP]). Dos pacientes requirieron cirugía convencional en lugar de la laparoscópica originalmente programada. Tres sufrieron alguna arritmia transoperatoria. Uno más presentó descontrol hipertensivo posterior a anestesia regional y dos por sospecha de tromboembolia pulmonar en el postoperatorio inmediato. Finalmente, dos por apoyo ventilatorio para

Cuadro 1. Características generales y técnica anestésica.

Variable	Casos n = 21	Controles n = 105	OR*	IC** al 95%	<i>p</i>
Edad en años, media (DE)***	46.9 (19.0)	47.0 (17.5)	0.99	0.96 a 1.04	0.98
Sexo					
Hombres (%)	10 (47.6)	38 (36.2)	1	–	–
Mujeres (%)	11 (52.4)	67 (63.8)	0.48	0.15 a 1.61	0.24
Días en la estancia corta, media (DE)	1.1 (0.3)	1.7 (0.8)	0.04	0.01 a 0.30	< 0.01
Riesgo anestésico					
I	2 (9.5)	9 (8.6)	1	–	–
II	16 (76.2)	71 (67.6)	0.91	0.16 a 5.15	0.91
III	3 (14.3)	25 (23.8)	0.39	0.04 a 3.72	0.42
Tipo de anestesia					
Local con o sin sedación	6 (28.6)	30 (28.6)	1	–	–
Regional	3 (14.3)	14 (13.3)	1	–	0.99
General balanceada	12 (57.1)	61 (58.1)	1	–	0.99
Tiempo de cirugía, media (DE)	136 (114)	126 (85.6)	1.01	0.99 a 1.01	0.15
Sangrado quirúrgico, media (DE)	114 (90.7)	115 (119)	1.01	0.99 a 1.01	0.81

* OR = Razón de probabilidades (*Odds ratio*). ** IC = Intervalo de confianza al 95%. *** DE = Desviación estándar. OR's, IC al 95% y el valor *p* fueron estimados con regresión logística condicional con uso de variables indicadoras (*dummy*) para aquellas variables con más de dos categorías.

Cuadro 2. Signos vitales y pruebas de laboratorio.

Variable	Casos n = 21	Controles n = 105	OR*	IC** al 95%	<i>p</i>
Presión arterial sistólica, media (DE)***	128.0 (25.1)	123.2 (19.2)	1.02	0.99 a 1.04	0.27
Presión arterial diastólica, media (DE)	77.0 (11.9)	75.0 (12.5)	1.02	0.98 a 1.06	0.38
Presión arterial media, media (DE)	94.0 (15.2)	91.2 (13.3)	1.03	0.98 a 1.06	0.26
Frecuencia cardíaca, media (DE)	79.9 (11.2)	75.9 (9.0)	1.04	0.99 a 1.01	0.08
Frecuencia respiratoria, media (DE)	19.4 (1.9)	19.2 (2.0)	1.10	0.84 a 1.41	0.51
Hemoglobina, media (DE)	14.7 (1.5)	14.6 (1.7)	1.02	0.77 a 1.35	0.91
Hematocrito, media (DE)	43.3 (4.2)	42.8 (4.7)	1.02	0.93 a 1.13	0.64
Leucocitos, media (DE)	7.4 (2.6)	6.9 (2.4)	1.12	0.89 a 1.40	0.33
Plaquetas, media (DE)	253.7 (94.7)	251.5 (88.3)	1.00	0.99 a 1.01	0.91
Glucosa, media (DE)	116.2 (59.4)	105.8 (30.1)	1.01	0.99 a 1.01	0.22
Nitrógeno de la urea, media (DE)	11.5 (5.9)	13.2 (7.7)	0.96	0.87 a 1.06	0.44
Creatinina, media (DE)	0.81 (0.22)	0.95 (1.24)	0.48	0.04 a 5.79	0.57
Albumina, media (DE)	3.60 (0.32)	93.7 (0.34)	0.54	0.10 a 3.16	0.49
Tiempo de protrombina, media (DE)	10.9 (1.6)	10.5 (0.7)	1.39	0.85 a 2.25	0.18
Tiempo parcial de tromboplastina, media (DE)	30.6 (5.6)	29.6 (4.5)	1.05	0.94 a 1.17	0.37

* OR = Razón de probabilidades (*Odds ratio*). ** IC = Intervalo de confianza al 95%. *** DE = Desviación estándar. OR's, IC al 95% y el valor *p* fueron estimados con regresión logística condicional.

protección y monitorización de la vía aérea, y cuatro para vigilancia tras angioplastia coronaria primaria. No hubo defunciones entre los casos.

Los análisis de regresión logística condicional univariados no evidenciaron una asociación significativa entre la ANP a la UCI y alguna de las variables independientes incluidas en el estudio por lo que los análisis multivariados no fueron necesarios.

DISCUSIÓN

Este estudio muestra que la admisión no prevista a la unidad de cuidados intensivos es rara entre los pacientes que son programados para cirugía de corta estancia hospitalaria. Las investigaciones interesadas en la búsqueda de los factores potencialmente asociados a esta complicación son inexistentes y, en

Cuadro 3. Comorbilidad de los casos y los controles.

Variable	Casos n = 21	Controles n = 105	OR*	IC** al 95%	<i>p</i>
Número de enfermedades crónicas, media (DE)***	2.14 (1.28)	2.50 (1.45)	0.79	0.53 a 1.18	0.25
Hipertensión arterial					
No (%)	13 (61.9)	57 (54.3)	1	–	–
Sí (%)	8 (38.1)	48 (45.7)	0.66	0.22 a 1.99	0.46
Diabetes mellitus					
No (%)	14 (66.7)	67 (63.8)	1	–	–
Sí (%)	7 (33.3)	38 (36.2)	0.86	0.29 a 2.54	0.78
Insuficiencia renal					
No (%)	21 (100)	101 (96.2)	1	–	–
Sí (%)	0	4 (3.8)	7.36	–	–

* OR = Razón de probabilidades (*Odds ratio*). ** IC = Intervalo de confianza al 95%. *** DE = Desviación estándar. OR's, IC al 95% y el valor *p* fueron estimados con regresión logística condicional.

nuestro conocimiento, éste es el primer reporte al respecto.

Cada vez, procedimientos quirúrgicos más complejos son realizados a través de los programas de cirugía de EC, por lo que es muy importante la prudente selección del paciente, y que se incluya una evaluación preoperatoria detallada, además de una estrecha comunicación entre cirujano, anestesiólogo y cualquier otro médico tratante. Una mala selección podría conducir la ANP no sólo a hospitalización o a la UCI, sino también a una mayor probabilidad de presentar complicaciones en el domicilio, a visitas recurrentes de los servicios de urgencias y a la readmisión hospitalaria.^{8,9}

Tal como sucede en las admisiones hospitalarias inesperadas, la ANP a la UCI podrían considerarse como un indicador de la calidad de la elección de los enfermos para el programa de cirugía ambulatoria y de corta estancia.^{10,11} La admisión hospitalaria no prevista también es un evento raro entre los pacientes de cirugía ambulatoria (< 2%).^{7,12} Distintos estudios transversales han reportado los factores asociados con la admisión hospitalaria no prevista, los cuales incluyen la edad del paciente, su estado físico previo, el tiempo quirúrgico, el nivel de hemo-globina, la cantidad de sangrado, la comorbilidad o el tipo de anestesia.¹³⁻¹⁶ Sin embargo, en el análisis de regresión logística univariado, ninguna de las variables clínicas, bioquímicas o del estado físico que fueron incluidas resultó estar asociada de forma independiente y significativa con la ANP a la UCI reflejando así la similitud entre casos y controles con respecto a sus condiciones generales de salud al momento de su ingreso al programa de cirugía de EC. Este hecho podría descartar la ANP a la UCI como una consecuencia de una selección inadecuada de los pacientes.

Si bien la edad o el tipo de cirugía servían para seleccionar a los pacientes que se beneficiarían del servicio de EC,¹⁷ la población que ahora se beneficia de este servicio es muy heterogénea (adultos mayores, pacientes con obesidad mórbida, entre muchos otros).^{6,18} Es probable que la expansión de los beneficios de la cirugía por la EC se debe a una mejor selección de los pacientes, así como al progreso en las técnicas anestésicas y quirúrgicas.^{19,20} La evaluación pre-operatoria es clave ya que no sólo aclara un diagnóstico, sino también promueve la mejoría en las condiciones médicas de los pacientes al hacer recomendaciones relacionadas con la evaluación, el manejo y el riesgo de complicaciones cardiovasculares en el periodo perioperatorio.^{8,21,22}

Si bien el desarrollo de las unidades de EC ha ofrecido ventajas para los pacientes al modificar en grado mínimo su modo de vida así como el de sus familias, sin olvidar la atención más personalizada, el menor riesgo de adquirir infecciones intrahospitalarias, y la corta convalecencia,^{23,24} de esta investigación surge la pregunta: ¿por qué ocurren ANP a la UCI cuando aparentemente los casos fueron similares a los controles? Este estudio muestra que la mayoría de las ANP fueron consecuencia de complicaciones, tanto médicas como quirúrgicas, donde destaca la isquemia miocárdica. Aunque las estancias en las UCI muchas veces son prolongadas, de los 21 casos admitidos, 14 (67%) estuvieron menos de 48 horas en la UCI.

La vigilancia postoperatoria en la UCI tras ciertos procedimientos electivos es rutinaria en muchos hospitales y, aparentemente, las razones para ser admitido en esa unidad podrían ir más allá del estado físico real del enfermo. Un estudio italiano, que evaluó la percepción del personal médico en relación al proble-

Cuadro 4. Admisiones no previstas a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI): motivo de ingreso y tiempo de estancia.

Caso	Edad (años)	Sexo	Motivo de ingreso a la Estancia Corta	Diagnostico de ingreso a la UCI	Días de estancia en la UCI	Condición de egreso de UCI
1	38	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Tiroidectomía total por cáncer papilar 	<ul style="list-style-type: none"> POP Drenaje de hematoma en cuello 	2	Vivo
2	70	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Mastectomía radical por cáncer de mama / Hipertensión arterial 	<ul style="list-style-type: none"> POP Mastectomía + Isquemia miocárdica transoperatoria (vigilancia) 	1	Vivo
3	63	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Resección transuretral prostática (RTUP) por hipertrofia 	<ul style="list-style-type: none"> Síndrome postresección transuretral de próstata 	1	Vivo
4	35	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Tiroidectomía subtotal por adenoma folicular 	<ul style="list-style-type: none"> Taquicardia supraventricular aislada transoperatoria (vigilancia) 	1	Vivo
5	44	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Colecistectomía laparoscópica hemoperitoneo 	<ul style="list-style-type: none"> POP Laparotomía exploradora y 	8	Vivo
6	76	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Resección transuretral prostática (RTUP) / Hipertensión arterial 	<ul style="list-style-type: none"> Infarto agudo del miocardio transquirúrgico 	3	Vivo
7	45	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Coronariografía por cardiopatía isquémica / Diabetes mellitus tipo 2 	<ul style="list-style-type: none"> Angor inestable / POP angioplastia coronaria primaria 	3	Vivo
8	42	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Tiroidectomía subtotal por bocio multinodular 	<ul style="list-style-type: none"> POP Drenaje de hematoma de cuello 	2	Vivo
9	23	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Tiroidectomía más resección ganglionar por carcinoma papilar 	<ul style="list-style-type: none"> POP Tiroidectomía + apoyo ventilación mecánica. 	3	Vivo
10	77	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Coronariografía por cardiopatía isquémica 	<ul style="list-style-type: none"> POP Angioplastia coronaria primaria 	2	Vivo
11	54	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Derivación gastroyeyunal laparoscópica 	<ul style="list-style-type: none"> POP Derivación gastroyeyunal abierta 	5	Vivo
12	31	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Derivación gastroyeyunal laparoscópica / Obesidad mórbida 	<ul style="list-style-type: none"> POP Laparotomía exploradora y hemoperitoneo 	5	Vivo
13	27	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Derivación gastroyeyunal laparoscópica / Obesidad mórbida 	<ul style="list-style-type: none"> POP Derivación gastroyeyunal abierta 	2	Vivo
14	47	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Coronariografía por cardiopatía isquémica primaria (vigilancia) 	<ul style="list-style-type: none"> POP Angioplastia coronaria 	1	Vivo
15	40	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Derivación gastroyeyunal laparoscópica / Obesidad mórbida 	<ul style="list-style-type: none"> Fibrilación auricular / Probable tromboembolia pulmonar 	2	Vivo
16	78	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Coronariografía por cardiopatía isquémica 	<ul style="list-style-type: none"> Angioplastia coronaria primaria (vigilancia) 	2	Vivo
17	48	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Biopsia hepática percutánea por hepatitis virus C 	<ul style="list-style-type: none"> Hematoma postbiopsia 	3	Vivo
18	18	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Biopsia hepática percutánea por síndrome hemofagocítico 	<ul style="list-style-type: none"> Hematoma postbiopsia 	2	Vivo
19	25	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Derivación gastroyeyunal laparoscópica / Obesidad mórbida 	<ul style="list-style-type: none"> Probable tromboembolia pulmonar 	1	Vivo
20	72	Hombre	<ul style="list-style-type: none"> Trabeculectomía ojo derecho / Glaucoma / Hipertensión arterial 	<ul style="list-style-type: none"> Crisis hipertensiva posterior a bloqueo retrobulbar 	1	Vivo
21	33	Mujer	<ul style="list-style-type: none"> Colecistectomía laparoscópica necesidad de reintubación (vigilancia + apoyo para extubación) 	<ul style="list-style-type: none"> Espasmo laríngeo a la extubación y 	1	Vivo

ma de las admisiones "imprevistas" a la UCI, reveló que esta conducta era una práctica común y estaba atribuida, principalmente, a factores tales como la presión por parte de las familias de los enfermos o de alguna autoridad hospitalaria o como una protección contra acciones legales.²⁵ El ingreso precautorio recomendado por el personal de anestesia también fue mencionado. En nuestro caso, varias ANP a la UCI fueron debidas a la *necesidad de vigilar y monitorizar* de manera más estrecha al paciente postoperado por la posibilidad de aparición de alguna complicación. Lawlor, *et al.* mostraron que la adecuada valoración pre-operatoria de pacientes sometidos a una cirugía puede excluirlos en el postoperatorio de una vigilancia precautoria especializada en servicios como la UCI.²⁶ Beauregard, *et al.* demostraron también lo inapropiado del ingreso "precautorio" a la UCI de pacientes sometidos a cirugías electivas tras su adecuada recuperación anestésica.²⁷ De la misma forma, Brunelli, *et al.* reportaron que, entre pacientes sometidos a un programa de cirugía, el número de complicaciones postoperatorias o de muertes no fue diferente entre aquellos atendidos con los cuidados generales ofrecidos en la unidad de EC comparados con los pacientes que sí tuvieron un ingreso precautorio a la UCI.^{28,29} Por lo tanto, la admisión precautoria o rutinaria tras un procedimiento realizado de forma electiva, con la creencia de disminuir graves complicaciones inmediatas, no está adecuadamente fundamentado. De forma contraria, los recursos de las UCI pudieran ser escasos, la estancia hospitalaria prolongarse y los costos de atención elevarse, lo cual rompe la esencia de los servicios ambulatorios. Ancona-Berk, *et al.* demostraron que, en comparación a los pacientes hospitalizados, en los pacientes ambulatorios se reducen los gastos hospitalarios, en parte gracias a que la mayor parte de la convalecencia ocurre en el hogar del enfermo o a la supresión de los cuidados especializados de enfermería.³⁰

Sin embargo, los resultados de esta investigación de ninguna manera descartan que los pacientes admitidos en las unidades de EC, a pesar de su aparente buen estado físico, queden exentos de una atención médica especializada. Al contrario, se debe continuar con una vigilancia adecuada en la EC para la rápida detección de indicadores clínicos de un posible deterioro agudo (como hipotensión, trastorno del estado de alerta, etc.), los cuales podrían ser subestimados y así oscurecer el pronóstico del enfermo al retrasar su tratamiento especializado ya sea en hospitalización o en las UCI.³¹

El número reducido de casos, lo cual es el reflejo de la poca frecuencia del fenómeno, constitu-

ye el principal límite de este trabajo. No obstante, el diseño del estudio y el método de pareamiento escogido le otorgan robustez en su validez interna. Un seguimiento más prolongado con la inclusión de otras variables representativas del estado físico de los pacientes o de los procedimientos realizados cuando son admitidos en las unidades de EC podría arrojar resultados novedosos que lleven a la prevención de las ANP a la UCI a través de una cuidadosa selección y planeación pre-operatoria de los pacientes, una apropiada vigilancia transoperatoria, así como la identificación de aquéllos de alto riesgo de complicaciones postoperatorias.³²

La unidad de EC constituye una excelente alternativa para la atención de los pacientes que requieren de una cirugía donde la hospitalización prolongada es innecesaria y que su estado físico se los permite. De esta forma, se ofrece la ventaja de reservar las camas de hospitalización para admisiones de emergencia o para los pacientes con un riesgo quirúrgico elevado. Cuando los pacientes deban ser admitidos en la UCI, el trasladado debe ser cuidadosamente analizado, altamente seleccionado y la decisión debe basarse en una evaluación integral multidisciplinaria. La admisión para "vigilancia" no se encuentra sólidamente fundamentada en evidencia científica. Estudios con un diseño longitudinal y que incluyan un número más grande de enfermos son necesarios para saber si la evaluación pre-anestésica rutinaria es suficiente para excluir del riesgo de ser admitidos de forma no prevista a la UCI cuando se ingresa a un enfermo en la unidad de EC. En este sentido, resaltamos la importancia de la adecuada valoración cardiovascular pre-operatoria, para poder así establecer tanto el estado como la gravedad de estos sujetos con riesgo de isquemia perioperatoria y además poder clasificarlos con fines pronósticos, de monitoreo y manejo anestésico. La minuciosa valoración al momento de seleccionar a los pacientes podría identificar a aquéllos con un bajo riesgo de presentar complicaciones tras los procedimientos electivos efectuados para que, de esta forma, puedan ser egresados a sus domicilios de manera segura, dentro del marco de la unidad de estancia corta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis A. Jáuregui Flores, jefe del departamento de anestesiología del INCMNSZ, por su revisión crítica e invaluable comentarios para la realización de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Ford JL, Reed WA. The surgicenter. An innovation in the delivery and cost of medical care. *Ariz Med* 1969; 26: 801-4.
2. White PF. Outpatient anesthesia. En: White PF (ed.). *Outpatient anesthesia-an overview*. 1st Ed. New York: Churchill Livingstone; 1990, p. 1-15.
3. García-Aguado R, Moro B, Martínez-Pons V, et al. The road to the standardization of ambulatory anesthesia. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2003; 50: 433-8.
4. Keats AS. The ASA classification of physical status—a recapitulation. *Anesthesiology* 1978; 49: 233-6.
5. Guía de Actuación en Cirugía Mayor Ambulatoria [Sitio en Internet]. 2002. Disponible en: <http://193.145.164.73/publicaciones/documentos/V.1699-2002.pdf> [Consultado el 18 de febrero de 2008].
6. Bryson GL, Chung F, Finegan BA, et al. Patient selection in ambulatory anesthesia - an evidence-based review: part I. *Can J Anaesth* 2004; 51: 768-81.
7. Lee A, Lum ME, Perry M, et al. Risk of unanticipated intraoperative events in patients assessed at a preanaesthetic clinic. *Can J Anaesth* 1997; 44: 946-54.
8. Galindo-Palazuelos M, Peraza-Sánchez M, Ramos-Goicoechea JF, et al. Resultados de un programa de cirugía mayor ambulatoria: Implicaciones en el manejo anestésico. *Cir May Amb* 2003; 8: 151-7.
9. Coley KC, Williams BA, DaPos SV, et al. Retrospective evaluation of unanticipated admissions and readmissions after same day surgery and associated costs. *J Clin Anesth* 2002; 14: 349-53.
10. Vaghadia H. Outcomes in outpatients—what occurs outside? *Can J Anesth* 1998; 45: 603-6.
11. Chung F, Mezei G, Tong D. Adverse events in ambulatory surgery. A comparison between elderly and younger patients. *Can J Anaesth* 1999; 46: 309-21.
12. Norsidah AM, Yahya N, Adeeb N, et al. Ambulatory surgery and anaesthesia in HUKM, a teaching hospital in Malaysia: the first two years experience. *Med J Malaysia* 2001; 56: 58-64.
13. Westman HR. Postoperative complications and unanticipated hospital admissions. *Semin Pediatr Surg* 1999; 8: 23-9.
14. Junger A, Benson M, Klasen J, et al. Influences and predictors of unanticipated admission after ambulatory surgery. *Anaesthesist* 2000; 49: 875-80.
15. Fleisher LA, Pasternak LR, Lyles A. A novel index of elevated risk of inpatient hospital admission immediately following outpatient surgery. *Arch Surg* 2007; 142: 263-8.
16. Junger A, Klasen J, Benson M, et al. Factors determining length of stay of surgical day-case patients. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 314-21.
17. Lagoe RJ, Bice SE, Abulencia PB. Ambulatory surgery utilization by age level. *Am J Public Health* 1987; 77: 33-7.
18. De la Torre A, Rubial M. Anestesia en Cirugía Ambulatoria. Criterios de Alta hospitalaria. *ANALES Sis San Navarra* 1999; 22(Supl. 2): 101-6.
19. Imasogie N, Chung F. Effect of return hospital visits on economics of ambulatory surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* 2001; 14: 573-8.
20. Ansell GL, Montgomery JE. Outcome of ASA III patients undergoing day case surgery. *Br J Anaesth* 2004; 92: 71-4.
21. White PF. Ambulatory anesthesia advances into the new millennium. *Anesth Analg* 2000; 90: 1234-5.
22. Fernández TB, García OC, Márquez EC, et al. Caracterización de la Cirugía Mayor Ambulatoria en un Hospital General Básico. *Rev Esp Salud Pública* 1999; 73: 71-80.
23. Pauly MV, Erder MH. Insurance incentives for ambulatory surgery. *Health Serv Res* 1993; 27: 813-39.
24. Aylin P, Williams S, Jarman B, et al. Trends in day surgery rates. *BMJ* 2005; 331: 803.
25. Giannini A, Consonni D. Physicians' perceptions and attitudes regarding inappropriate admissions and resource allocation in the intensive care setting. *Br J Anaesth* 2006; 96: 57-62.
26. Lawlor DK, Lovell MB, DeRose G, et al. Is intensive care necessary after elective abdominal aortic aneurysm repair? *Can J Surg* 2004; 47: 359-63.
27. Beauregard CL, Friedman WA. Routine use of postoperative ICU care for elective craniotomy: a cost-benefit analysis. *Surg Neurol* 2003; 60: 483-9.
28. Brunelli A, Pieretti P, Al Refai M, et al. Elective intensive care after lung resection: a multicentric propensity-matched comparison of outcome. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2005; 4: 609-13.
29. Varela G, Jiménez M, Novoa N. ¿Cuál es la estancia hospitalaria adecuada para una resección pulmonar? *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 233-6.
30. Ancona-Berk VA, Chalmers TC. An analysis of the costs of ambulatory and inpatient care. *Am J Public Health* 1986; 76: 1102-04.
31. McGloin H, Adam SK, Singer M. Unexpected deaths and referrals to intensive care of patients on general wards. Are some cases potentially avoidable? *J R Coll Physicians Lond* 1999; 33: 255-9.
32. Tewfik MA, Frenkiel S, Gasparrini R, et al. Factors affecting unanticipated hospital admission following otolaryngologic day surgery. *J Otolaryngol* 2006; 35: 235-41.

Reimpresos:

Dr. José A. Ávila-Funes
 Departamento de Geriatria
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas
 y Nutrición Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga 15, Tlalpan
 14000, México, D.F.
 Tel.: 52 (55) 5487-0900, Ext. 2258
 Fax: 52 (55) 5655-2510
 Correo electrónico: avilaf1@hotmail.com

Recibido el 13 de marzo de 2008.
 Aceptado el 23 de mayo de 2008.

Anexo. Sistema de clasificación de la *American Society of Anesthesiologists* (ASA).^{4*}

Estado de ASA (A-E)**	Definición
Clase I	<ul style="list-style-type: none">• Paciente sano normal
Clase II	<ul style="list-style-type: none">• Paciente con enfermedad sistémica leve, controlada, no incapacitante y sin daño a órganos blanco.• Puede o no relacionarse con la causa de la intervención.
Clase III	<ul style="list-style-type: none">• Paciente con enfermedad sistémica grave, que limita su actividad, con daño a órganos blanco, pero no es incapacitante.
Clase IV	<ul style="list-style-type: none">• Paciente con enfermedad sistémica grave e incapacitante, que constituye además amenaza constante para la vida, y que no siempre se puede corregir por medio de la cirugía.
Clase V	<ul style="list-style-type: none">• Paciente moribundo, cuya expectativa de vida no se espera sea mayor de 24 horas, con o sin la realización de la intervención quirúrgica.
Clase VI	<ul style="list-style-type: none">• Paciente declarado con muerte cerebral y que donará sus órganos para propósitos de trasplante

* Modificado de su versión original. ** La designación de E es en caso de cirugía desarrollada en cualquier estado físico, pero en una situación de urgencia. La letra A se otorga a procedimientos realizados en pacientes, que van a ser dados de alta el mismo día de la intervención.

Acute myelogenous leukemia switch lineage upon relapse to acute lymphoblastic leukemia: a case report

Elisa Dorantes-Acosta*¹, Farina Arreguin-Gonzalez¹, Carlos A Rodriguez-Osorio², Stanislaw Sadowinski³, Rosana Pelayo⁴ and Aurora Medina-Sanson¹

Address: ¹Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez, Mexico City, Mexico, ²Department of Critical Care Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico, ³Department of Pathology, Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez, Mexico City, Mexico and ⁴Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico

Email: Elisa Dorantes-Acosta* - elisadorantes@hotmail.com; Farina Arreguin-Gonzalez - farreg@hotmail.com; Carlos A Rodriguez-Osorio - rosocahoo@yahoo.com.mx; Stanislaw Sadowinski - stansadow@aol.com; Rosana Pelayo - rosana.pelayo@yahoo.com; Aurora Medina-Sanson - aurmesan@aol.com

* Corresponding author

Published: 15 October 2009

Received: 6 January 2009

Cases Journal 2009, 2:154 doi:10.1186/1757-1626-2-154

Accepted: 15 October 2009

This article is available from: <http://www.casesjournal.com/content/2/1/154>

© 2009 Dorantes-Acosta et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Acute leukemia, the most common form of cancer in children, accounts for approximately 30% of all childhood malignancies, with acute lymphoblastic leukemia being five times more frequent than acute myeloid leukemia. Lineage switch is the term that has been used to describe the phenomenon of acute leukemias that meet the standard French-American-British system criteria for a particular lineage (either lymphoid or myeloid) upon initial diagnosis, but meet the criteria for the opposite lineage at relapse. Many reports have documented conversions of acute lymphoblastic leukemia to acute myeloid leukemia.

Here, we report the case of a 4-year-old child with acute myeloid leukemia, which upon relapse switched to acute lymphoblastic leukemia. The morphologic, phenotypic, and molecular features suggest the origin of a new leukemic clone.

Introduction

Leukemia is a group of malignant diseases of the hematopoietic system characterized by the uncontrolled overproduction of either immature (acute leukemia) or terminally differentiated (chronic leukemia) leukocytes.

Acute leukemia, the most common form of cancer in children, accounts for approximately 30% of all childhood malignancies [1]. A frequency of $\geq 20\%$ blasts is required to confirm a diagnosis of acute leukemia. The first comprehensive morphologic classification system for acute leukemias was the French-American-British (FAB) classification, which was established in 1976 and revised in

1985. Other recommended tests are immunophenotyping, cytogenetics, and molecular genetics tests [2].

Acute leukemias can be further sub classified by determining whether the malignant leukocytes are of myeloid origin (cells of granulocyte, monocyte, erythroid, or megakaryocyte lineage) or lymphoid origin (B-cells, T-cells) [3].

Overall survival for patients with acute lymphoblastic leukemia is approximately 80%; currently for acute myeloid leukemia (AML), most large studies show a five-year event-free-survival rate of almost 50%, despite the fact

that between one third and one half of patients with AML experience relapse, and no standard therapy is recognized for patients with relapsed and/or refractory AML. Relapses mostly exhibit the same FAB subtype. Patients with relapsed/refractory AML usually respond less well and for a shorter duration to reinduction therapies. This clearly points to the induction of drug-resistant mechanisms and is, in part, related to specific chromosomal abnormalities and the duration of the first remission [4,5].

However, unexplained variability in clinical course still exists among some individuals within defined risk-group strata.

"Lineage switch" is the term that has been used to describe the phenomenon of acute leukemias that meet standard FAB criteria for a lineage (lymphoid or myeloid) at initial diagnosis but upon relapse meet the criteria for the opposite lineage [6].

Most reports of lineage switching have demonstrated acute lymphoblastic leukemia (ALL) to acute myeloid leukemia (AML) conversions [7-9]. The prognosis for these patients is variable, and there is no standard treatment for them.

Case presentation

A 4-year-old Mexican Mestizo (Hispanic) male was admitted to the Hospital Infantil de México Federico Gómez presenting a 30-day history of fever, pallor, and enlarged cervical lymph nodes.

The initial laboratory findings revealed a white blood cell count of 4,300/mm³, with 16% blasts in the peripheral blood, 8.8 g/dL hemoglobin, and a platelet count of 49,000/mm³.

Cerebrospinal fluid was negative for blast cells. The bone marrow was hypercellular, with 64% blasts, which were large in size and showed low nucleus: cytoplasm ratio, monocytoid features, and blue-gray cytoplasm; > 80% of the blast cells were monoblasts, and the rest were promonocytes or monocytes (Figure 1). The surface immunophenotype was CD45⁺ (91.1%), CD15⁺ (95.4%), CD14^{+/+} (37.7%), CD13^{+/+} (78.5%), HLA-DR^{+/+} (78.5%), CD22^{+/+} (42.8%), CD10⁻ (2.1%) CD19⁻ (2.5%) CD20⁻ (0.7%) CD7⁻ (0.07%), CD3^{+/+} (19.4%), and CD33⁻ (7.9%) (Figure 2).

Cytochemistry was positive for myeloperoxidase (MPO). Conventional cytogenetic analysis using direct and 24-hour unstimulated and unsynchronized cultures revealed a 46 XY karyotype. A diagnosis of M5 AML was made. The patient started chemotherapy with a modified MRC-10 protocol: daunorubicin 50 mg/m² (days 1, 3 & 5); cytarabine

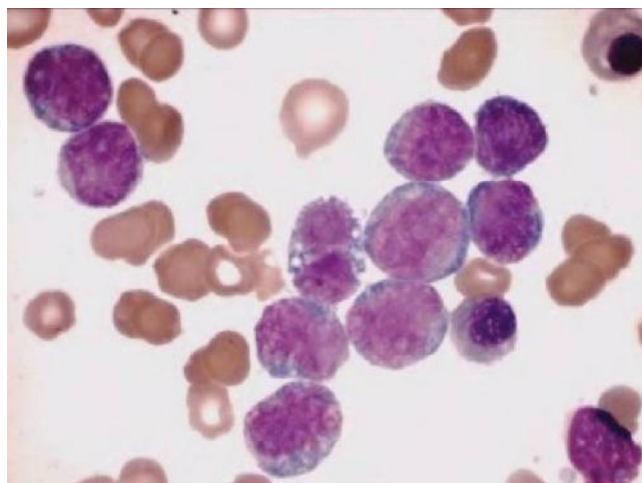


Figure 1
Bone marrow aspiration at AML diagnosis. Blast cells were large in size and had a low nucleus:cytoplasm ratio, monocytoid aspect, and blue-gray cytoplasm. Wright stain, 1000 \times .

100 mg/m² in a 1-hour infusion every 12 hours through days 1 to 10; and etoposide 100 mg/m² in a 4-hour infusion every 24 hours through days 1 to 5.

Due to oral candidiasis and an episode of sepsis secondary to *Acinetobacter iwoffii*, the patient was treated with meropenem, amphotericin, and fluconazole.

Remission was determined by marrow aspiration with no blast cells at day 27th after first chemotherapy cycle.

Thirty days after the first course of chemotherapy, a second chemotherapy cycle was administered without complications daunorubicin 50 mg/m² days 1, 3 & 5; cytarabine 100 mg/m² in a 1-hour infusion every 12 hours through days 1 to 4; and etoposide 100 mg/m² in a 4-hour infusion every 24 hours through days 1 to 5.

A third cycle: etoposide 100 mg/m² in a 4-hour infusion every 24 hours on days 1-5 and cytarabine 1000 mg/m² in a 1-hour infusion every 12 hours (days 1-3) was stopped on day 3 because of a life-threatening episode of pneumonia; the patient was transferred to the ICU and supported by mechanical ventilation. Because a lung CT scan showed features of a right lung abscess, a medium and right lobectomy was performed.

Upon clinical and hematologic recovery, the patient received a fourth cycle of chemotherapy with mitoxantrone 10 mg/m² in a 1-hour infusion every 24 hours (days 1-5) and cytarabine 1000 mg/m² in a 1-hour infusion every 12 hours (days 1-3). Two weeks later, an

episode of fever, along with neutropenia and mucositis, was recorded, and the patient was treated with cefepime and amikacin.

The patient received a fifth cycle of chemotherapy: etoposide 100 mg/m² in a 4-hour infusion every 24 hours for 5 days and cytarabine 1000 mg/m² in a 1-hour infusion every 12 hours for 3 days.

Seven months later, after the diagnosis, the chemotherapy protocol was completed with a clearance of blast cells.

Two months later, the patient presented at the hospital with petechiae. Initial laboratory data revealed a white blood cell count of 7,700/mm³, 13% blast cells, 13.7 g/dL hemoglobin, and a platelet count of 33,000/mm³. The marrow was hypercellular and contained 85% blasts. In contrast to the previous neoplasm, the blasts in the current specimen were smaller, with a predominance of small cells, scanty cytoplasm, moderate cytoplasmic basophilia, and variable cytoplasmic vacuolation (Figure 3), along with the immunophenotype CD45⁺ (81.6%), CD10⁺ (77%), CD19⁺ (89%), CD22⁻ (0%), CD20⁻ (3.7%), CD15⁻ (0%), CD14⁻ (4.5%), CD7⁻ (7.8%), CD3⁻ (13.1%), CD13⁻ (0.27%), CD33⁻ (0.62%), and HLA-DR⁻ (0.2%) (Figure 4). These lymphoblasts were negative for myeloperoxidase (data not shown).

The patient was diagnosed with pro-B lymphoblastic leukemia. Cytogenetic studies performed on the marrow aspirate revealed a karyotype of 46 XY.

We tried to induce remission with the national protocol for acute lymphoblastic leukemias, adapted from TOTXV protocol from St Jude Children's Research Hospital with vincristine 2 mg/m² once a week for four weeks, daunorubicin 30 mg/m² once a week for two weeks, L-asparaginase 10,000 IU/m² three times a week for a total of nine doses, and dexamethasone 6 mg/m² for four weeks. However, the bone marrow examination on the 14th and 21th days of induction showed persisting infiltration with 50% blasts, and the patient remained pancytopenic. After an episode of fever, abdominal pain, and diarrhea, antibiotic therapy was conducted.

As the bone marrow examination showed persisting infiltration, we indicated cycle 1 and 2 to myeloid leukemia (described above). This scheme of chemotherapy is used in our hospital for patients with early relapse or refractory acute leukemia. After that, the patient had infectious complications, followed by development of tumor lysis syndrome and septic shock. Chemotherapy was stopped and the patient was transferred to the ICU and supported by mechanical ventilation. After clinical recovery, the bone marrow showed persisting infiltration with 85% blasts, and the patient's parents asked for palliative care; the

child was cared for at home for four weeks under the surveillance of a palliative care clinic. Despite supportive measures, he died six months after the diagnosis of relapse. No autopsy was authorized by the family.

In order to investigate if a B lymphoid transcription factor was already expressed at the time of remission of the myeloid leukemia, we performed detection of PAX5 (B-cell-specific activator protein for B cells, including B-lymphoblastic neoplasms) [10], in bone marrow biopsy taken at the end of the first scheme of chemotherapy, when the patient started surveillance (Figure 5).

Briefly, one marrow biopsies fixed in Bouin's solution were decalcified, and paraffin-embedded tissue sections were stained with an antibody against the PAX5. The immunocytochemistry revealed scanty PAX5 expression. (Only 15% of cells in the specimen were positive). The same test was not conducted at relapse because no autopsy was performed.

Discussion

Lineage commitment and differentiation to a mature cell type are considered to be unidirectional and irreversible processes under physiological conditions. However, a number of studies with murine models suggest that plasticity is a significant attribute of hematopoietic progenitors, and the process of cell formation is much more dynamic than previously thought [11]. Lineage switching is an example of the lineage heterogeneity that exists in some acute leukemias [12]. The frequency of lineage switching among patients with acute leukemia that relapse is estimated to be between 6% and 9% [6].

Some conditions could explain the lineage change at relapse, being one of them the possibility of a second neoplasm, following two or three years of high dose etoposide treatment [13]. Our patient received 1,700 mg/m² of etoposide in the first chemotherapy cycle, and the relapse occurred only 2 months after treatment. It is less probable to develop a secondary leukemia before a latency period of two years. Another hypothesis to explain immunophenotype changes at relapse is clonal selection. This mechanism has been proposed in patients with a persistent TEL-AML1⁺ preleukemic/leukemic clone at relapse [14].

We performed karyotype analysis for our patient and did not find any cytogenetic alteration. In some instances, an acute leukemia lineage switch may represent the emergence of a new leukemic clone characterized by different morphology than the observed upon initial diagnosis, without gene rearrangements upon conversion to another lineage. Zardo et al. propose that the plasticity and reversibility of modifications affecting chromatin structure are important in the expression of genes involved in cell fate decisions and in maintenance of cell-differentiated states.

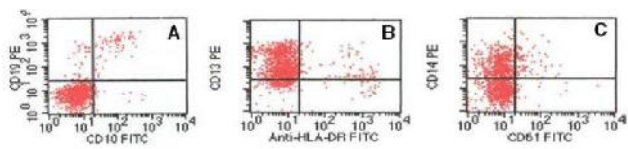


Figure 2
Flow cytometry AML at diagnosis. Immunophenotyping of leukemic cells by flow cytometric analyses revealed myeloid blasts negative for CD10 and CD19 (A) but positive for CD13 (B) and CD14 (C).

Epigenetic changes in DNA and chromatin, which must occur to allow accessibility to transcription factors at specific DNA-binding sites, are regarded as emerging major players for hematopoietic stem cell lineage differentiation [15].

Mantadakis et al. [16] described the *in vivo* conversion of T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), with an early thymocyte immunophenotype and no myeloid markers, to acute myeloid leukemia (AML). This evidence suggests that a subset of T-cell leukemias with minimal differentiation can display a relapse as another lineage, AML.

Palomero et al. suggest that the leukemic transformation may occur in early progenitors and might be influenced by external and internal clues; they propose mutations in the NOTCH1 transcription factor as responsible in lineage switch leukemias [17].

In our patient, lineage markers revealed the emergence of apparently new lymphoid populations. In this case the

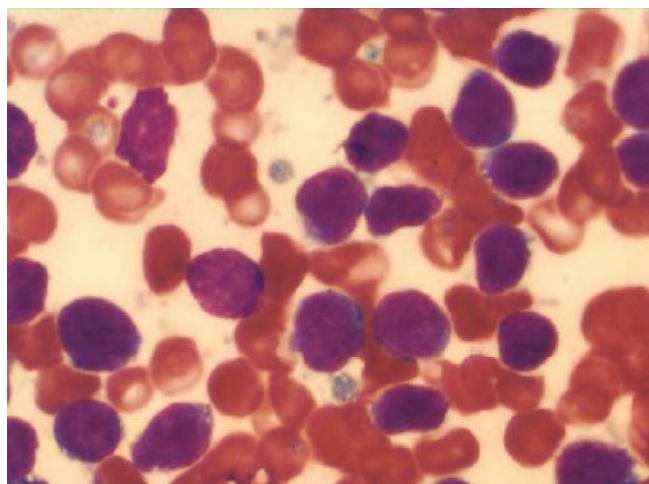


Figure 3
Bone marrow aspiration at relapse. Blasts were smaller, with a predominance of small cells, scanty cytoplasm, moderate cytoplasmic basophilia, and variable cytoplasmic vacuolation. Wright stain, 1000x.

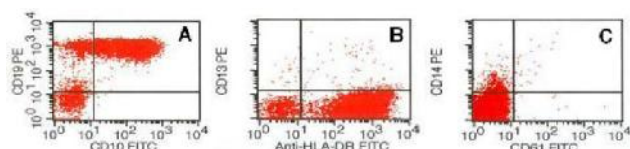


Figure 4
Flow cytometry at relapse. Flow cytometric analyses of leukemic cells at relapse. Blast cells were identified as lymphoblasts because the immunophenotype was positive for CD10 and CD19 (A) but negative for CD13 and CD14 (B, C).

new 'relapse lymphoid clone' was not detected at the moment of surveillance in between the first and secondary diagnosis by investigation of the B related transcription factor PAX5. The selection and emergence of chemoresistant sub-clones that are undetectable by routine methods, or selection of a new leukemic clone have been previously reported by Henderson et al [18], and we can not ruled out either of this possibilities for our patient.

Studies of normal blood cell development and malignant transformation of hematopoietic cells have shown that the correctly regulated expression of stage- and lineage-specific genes is a key issue in hematopoiesis. The transcription factor PAX5 has been shown to be a B-cell-specific activator protein and seems to be crucial for B lymphopoiesis, including B-lymphoblastic neoplasms [19,20].

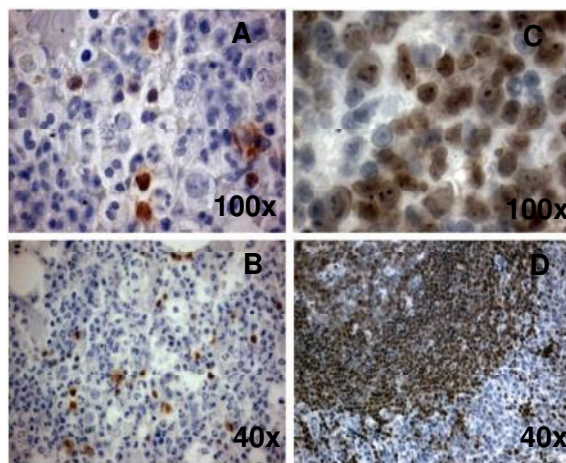


Figure 5
PAX5 expression in bone marrow from pro-B ALL at AML remission. Immunohistochemistry for PAX5 was performed on a marrow biopsy. The frequency of PAX5 cells was 15% (A, B). PAX5 expression by lymph node germinal center cells is shown for control (C, D).

The immunocytochemistry for PAX5 suggests that at least at the moment of the clinical remission, there was no expression of a transcription factor of lymphoid origin, and between the first and second leukemias, there was a period of time where there were no data supporting lymphoid malignancy until the patient relapsed.

The absence of a lymphoid transcription factor at the beginning of surveillance suggests that the lineage switch occurred upon relapse. These data put forward the possibility of *de novo* lymphoid leukemia after myeloid leukemia. Further studies on the mechanisms of lineage commitment and differentiation in acute leukemia cases will help us to understand the cell and molecular biology of this phenomenon.

Conclusion

Here, we present one case of lineage switch, from AML to ALL which we consider of great interest due to the importance of early recognition of the specific leukemic lineage, and the medical aid necessary for appropriate treatment. Lineage switching is a rare but well-documented phenomenon. The change in morphology, the cell phenotype at relapse, and the absence of a crucial lymphoid transcription factor when the patient was under clinical surveillance all suggest that a lineage switch from AML to ALL might represent a heterogeneous original clone at the molecular level or the emergence of a second new leukemic clone that lacks molecular heterogeneity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EDA analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the relapse. SS performed the histological examination of the bone marrow. EDA, FAG, CARO, RP, and AMS were major contributors in writing the manuscript and analyzing the results. All authors read and approved the final manuscript.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient's father for publication of this case report and accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

References

- Pui CH, Evans WE: **Treatment of acute lymphoblastic leukemia.** *N Engl J Med* 2006, **354**:166-178.
- Smith OP, Hann IM: **Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia.** In *Pediatric Hematology* 3rd edition. Edited by: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. Oxford: Blackwell Publishing; 2006:450-481.
- Krause DS, Van Etten RA: **Right on target: eradicating leukemic stem cells.** *Trends Mol Med* 2007, **13**:470-481.
- Harned TM, Gaynon PS: **Treating refractory leukemias in childhood, role of clofarabine.** *Ther Clin Risk Manag* 2008, **4**:327-336.
- Golub TR, Arceci RJ: **Acute Myelogenous Leukemia.** In *Principles and practice of pediatric oncology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia; 2006:591-644.
- Gagnon GA, Childs CC, LeMaistre A, Keating M, Cork A, Trujillo JM, Nellis K, Freireich E, Stass SA: **Molecular heterogeneity in acute leukemia lineage switch.** *Blood* 1989, **74**:2088-2095.
- Stass S, Mirro J, Melvin S, Pui CH, Murphy SB, Williams D: **Lineage switch in acute leukemia.** *Blood* 1984, **64**:701-706.
- Stass SA, Mirro J Jr: **Lineage heterogeneity in acute leukemia: Acute mixed-lineage leukemia and lineage switch.** *Clin Haematol* 1986, **15**:811-827.
- Zarrabi MH, Rosner F, Grunwald HW: **Second neoplasms in acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer* 1983, **52**:1712-1719.
- Cobaleda C, Schebasteda A, Delogu A, Busslinges M: **PAX5: the guardian of B cell identity and function.** *Nat Immunol* 2007, **8**:463-470.
- Welner RS, Pelayo R, Kincade PW: **Evolving views on the genealogy of B cells. Evolving views on the genealogy of B cells.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:95.
- Hurwitz CA, Mirro J Jr: **Mixed-lineage leukemia and asynchronous antigen expression.** *Hematol Oncol Clin North Am* 1990, **4**:767-794.
- Tolcher AW, Rowinsky EK: **DNA Topoisomerase II inhibitors.** In *The Chemotherapy Source Book* 3rd edition. Edited by: Perry MC. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:278-289.
- Panzer GE, Cazzaniga G, Velden V van der, Giudice L, Peham M, GeorgMann J, Eckert C, Schrauder A, Germano G, Harbott J, Basso G, Biondi A, van Dongen J, Gadner H, Haas O: **Immunogenotype Changes Prevail in Relapses of Young Children with TEL-AML1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia and Derive Mainly from Clonal Selection.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:7719-7727.
- Zardo G, Cimino G, Nervi C: **Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming.** *Leukemia* 2008, **22**:1503-1518.
- Mantadakis E, Danilidou V, Stiakaki E, Paterakis G, Papadimitriou S, Kalmanti M: **T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Relapsing as Acute Myelogenous Leukemia.** *Ped Blood Cancer* 2007, **48**:354-357.
- Palomero T, McKenna K, O-Neil J, Galinsky I, Stone R, Suzukawa K, Stiakaki E, Kalmanti M, Fox EA, Caligiuri MA, Aster JC, Look AT, Ferrando AA: **Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias.** *Leukemia* 2006, **20**:1963-1966.
- Henderson M, Choi S, Beesley AH, Sutton R, Venn NC, Marshall GM, Kees UR, Haber M, Norris MD: **Mechanism of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Cell Cycle* 2008, **7**(10):1315-1320.
- Falini B, Mason DY: **Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry.** *Blood* 2002, **99**:409-426.
- Smith E, Sigvardsson M: **The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation.** *J Leukoc Biol* 2004, **75**:973-981.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

