

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina

Programa de Doctorado de Medicina



**Tesis Doctoral**

**ESTUDIO METABOLÓMICO EN PACIENTES  
DIAGNOSTICADOS DE SEPSIS GRAVE Y SHOCK SÉPTICO  
EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS**

**Presentada por:**

Mónica García Simón

**Directores:**

Dr. José Blanquer Olivas

Dr. José Manuel Morales Tatay

**Tutor:**

Dr. Francisco Javier Chorro Gascó

Valencia, Noviembre de 2015





**D. José Blanquer Olivas**, Jefe de la Sección de Respiratorio de la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

**D. Francisco Javier Chorro Gascó**, Catedrático de Medicina de la Universitat de València.

**D. José Manuel Morales Tatay**, responsable del Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica de la Facultat de Medicina-UCIM de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por Dña. Mónica García en esta memoria, bajo el título “Estudio metabólico en pacientes diagnosticados de sepsis grave y shock séptico en la unidad de cuidados intensivos”, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Que hemos supervisado los contenidos científicos y aspectos formales del trabajo y damos nuestra conformidad para la presentación y defensa pública.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al Grado de Doctor, expedimos la presente.

Valencia, de diciembre de

Dr. José Blanquer

Dr. Francisco J. Chorro

Dr. José M. Morales



A mi iaia María,  
la iaia de todos nosotros.



A mis padres,  
por habérmelo dado todo y estar siempre.





A Ramón, Nuria y Marc con todo mi amor,  
en agradecimiento de todo el tiempo  
que con esta tesis os he robado.



*Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.*

*(Antonio Machado)*



## **AGRADECIMIENTOS**



Este trabajo que aquí presento ha supuesto para mí un gran esfuerzo, pero sobre todo muchas satisfacciones. En él han participado directa e indirectamente muchas personas, con sus opiniones, con sus correcciones, con su cariño, apoyo y ánimos. Esta tesis me ha permitido aprender de la experiencia y de la competencia de muchas personas a las que aquí quiero agradecer.

Me gustaría nombrar en primer lugar a todas las personas cuyo ejercicio profesional ha sido y es para mí, fuente de inspiración y de motivación. A mis directores de tesis, al Dr. Pepe Blanquer por haberme confiado este trabajo, por su dedicación, por sus consejos, por sus correcciones y por el cariño con el que siempre me ha tratado; al Dr. Jose Manuel Morales que me ha abierto la puerta al mundo de los metabolitos y la resonancia, pero sobre todo por su amistad. Su buen hacer científico, su perfeccionismo y su dedicación son un ejemplo a seguir para mí. Su capacidad natural de contagiar positividad, su energía, su paciencia y el tiempo que me ha dedicado han sido un privilegio. Espero seguir aprendiendo y compartiendo con él muchos proyectos más; al Dr. Vicente Modesto por su ayuda incondicional y por su empeño en enseñar el correcto método científico y asistencial. Nunca pensé lo apasionante que la estadística podría llegar a ser. Él ha sido parte muy importante de esta tesis y soy consciente de su esfuerzo y del tiempo que me ha dedicado. Como él mismo se definió una vez, ha sido el “director espiritual” de esta tesis; a la Dra. Pilar Hernando que me hace recordar la importancia de escribir un texto y me pone al día sobre las novedades de la “Real Academia de la Lengua”, pero sobre todo por su amistad, que valoro

mucho; a mi amigo Fernando Trenor que siempre me da soluciones originales y muy acertadas a los problemas que le planteo, pero sobre todo por su preocupación constante por saber que estoy bien y su cariño; a la Dra. Ángela Jorda con la que aprendo y comparto muchas inquietudes personales y profesionales, por su cariño y su amistad; a mi pediatra el Dr. Ricardo Lliso, siempre salía de su consulta con la idea de ser como él de mayor; al Dr. Pepe Ferrando que me animó a dar un giro a mi vida profesional e iniciar los estudios de medicina; a la Dra. Susana Díaz, que me inspira con su espíritu de superación a pesar de las adversidades y su capacidad de reinventarse, aprecio mucho su amistad y su apoyo todos estos años a pesar de la distancia; a la Dra. M<sup>ª</sup>Carmen Desco que me contagia su pasión por la medicina, por sus buenos consejos y su amistad; a Ana Lendoiro por su interés en saber de qué iba “esto de los metabonitos” y cómo iban evolucionando, intentando siempre darme una visión “cómica” de los problemas, por su amistad y su cariño.

A los “Metabonitos” del laboratorio de Imagen Molecular y en especial a Vannina, “la madrina”, con su capacidad de darle la vuelta a todo, buscar opciones y encontrar la solución, siempre dispuesta a dedicarme su tiempo, siempre positiva, le estoy muy agradecida por ello y a Daniel, por su capacidad motivadora, su profesionalidad, sus consejos, sus ánimos, su alegría, su positividad y su humanidad. Me habéis hecho sentir parte de vuestro laboratorio. A la Dra. Carla Olmedo, que aunque la conozco poco tiempo, ha hecho que me sienta identificada con ella y me ha animado en este último empujón (You can).



Al servicio de Medicina Intensiva del Hospital Clínico, que es mi casa también y a todo el personal que cuida del enfermo crítico y del que tanto he aprendido y aprendo.

A mi familia: a mis padres porque me lo han dado y me lo dan todo y sé que los tengo siempre y para todo; a Ramón que me brinda cada día lo mejor que lleva dentro. Gracias por tu amor y tu apoyo durante todos estos años, siempre a mi lado, “cuando llueve en mí, cuando quiero sol”; a mi “iaia” María, incansable, fuerte, sacrificada, siempre dispuesta a seguir adelante, dándonos a todos su amor y su cariño, siempre alegre, eres un ejemplo a seguir para mí; a mis hermanas, Nuria y Marily por su cariño y por su ayuda en el cuidado de mis hijos cuando mis obligaciones profesionales me impedían hacerlo a mí, mis hijos tienen mucha suerte de teneros; a mis tíos Jose y Conchín por su cariño, su amor, sus atenciones y sus cuidados, tengo la suerte de tener “segundos” padres; a Amparo y Luis por ser los mejores tíos que mis hijos podrían tener; a mi suegra Blasi, sé que si hubieras podido ayudarme lo hubieras hecho la que más; a mis amigos, Fernando, Carlos, Pilar, Ramón, Elena, M<sup>a</sup>Carmen, Manolo, Susana, Ángela, Ana, Antonio, Virtu, Jero, Maria Ramos, Luisa Sapena, Marta Peinado, Lola y Pepa Cervera tan importantes para mí, que se han interesado mucho estos años por mi tesis, a pesar de que algunos estáis lejos. Gracias por las bandas sonoras de la tesis, pero sobre todo porque me enseñáis a ser mejor y me dais mucho.

A todos vosotros por los que siento gran admiración, por haber sido mis referentes profesionales, personales y científicos, gracias. Ha sido un lujo para mi haber contado con todos vosotros. Me siento muy afortunada.

La realización de esta tesis doctoral ha tenido como fruto la publicación del siguiente artículo científico:

- Garcia-Simon M, Morales JM, Modesto-Alapont V, Gonzalez-Marrachelli V, Vento-Rehues R, Jorda-Miñana A, Blanquer-Olivas J, Monleon D. Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by <sup>1</sup>H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit. PLoS One 2015; 10: e0140993.



# ÍNDICE

1-.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- Desarrollo histórico en la comprensión de la sepsis....	3
1.2- Definiciones de sepsis.....	5
1.3- Epidemiología.....	9
1.4- Fisiopatología de la sepsis .....	16
1.4.1- La función mitocondrial y la producción de energía.....	21
1.4.2- Disfunción mitocondrial.....	26
1.5- Escalas de severidad.....	30
1.6- Biomarcadores en sepsis.....	36
1.7- Nuevos enfoques para encontrar biomarcadores.....	44
1.8- Las ciencias –ómicas. Definición de metabolómica....	45
1.9- Plataformas analíticas para realizar estudios metabólicos: la RMN.....	48
1.10-Bases técnicas y teóricas de la RMN.....	52
Tiempos de relajación, apantallamiento y desplazamiento químico, Free induction decayment (FID) y transformación de Fourier (TF)	
1.11- Partes de un estudio metabolómico.....	63
1.11.1- Pre-tratamiento.....	64
1.11.2- Análisis de los datos. Métodos quimiométricos.	67
1.12- Distintos enfoques médicos en metabolómica.....	75
1.13- Metabolómica y cuidados intensivos.....	77

2-.	HIPÓTESIS.....	81
3-.	OBJETIVOS.....	85
4-.	MATERIAL.....	89
4.1-	Diseño del estudio.....	91
4.2-	Ámbito de estudio.....	91
4.3-	Población de estudio: muestreo, criterios de inclusión, criterios de exclusión, tamaño de la muestra.....	92
5-.	MÉTODOS.....	95
5.1-	Protocolo del estudio.....	97
5.2-	Variables estudiadas y recogida de datos.....	99
5.3-	Técnicas de medida de las variables.....	101
5.4-	Espectroscopia de RMN. Instrumentalización y determinaciones .....	103
5.5-	Análisis estadístico poblacional empleado en el estudio .....	108
5.6-	Análisis de los datos metabolómicos.....	111
5.7-	Comparación Estadística de ambos modelos: SOFA/Metabolómico.....	113
5.8-	Aspectos Médico-Legales.....	114
6-.	RESULTADOS.....	117
6.1-	Análisis descriptivo de la población estudiada.....	119
6.1.1-	Algoritmo de inclusión.....	119

6.1.2- Características generales de la población y SOFA evolutivo.....	120
6.1.3- Origen de la infección.....	123
6.1.4- Factores de riesgo y comorbilidad.....	124
6.1.5- Resultados analíticos.....	125
6.1.6- Resultados microbiológicos.....	126
6.2- Análisis poblacional según el diagnóstico de ingreso: sepsis grave vs shock séptico.....	128
6.2.1- Características de los pacientes y SOFA evolutivo.....	128
6.2.2- Origen del foco infeccioso.....	130
6.2.3- Factores de riesgo y comorbilidad.....	131
6.2.4- Resultados analíticos.....	133
6.3- Análisis poblacional según la evolución: mortalidad a los 30 días.....	135
6.3.1- Características de los pacientes y SOFA evolutivo.....	135
6.3.2- Origen del foco infeccioso.....	137
6.3.3- Factores de riesgo y comorbilidad.....	138
6.3.4- Resultados analíticos.....	140
6.4- Perfil metabólico en muestras de suero y orina de pacientes de UCI con diagnóstico de sepsis grave o shock séptico mediante RMN.....	141
6.4.1- Obtención del espectro en orina.....	141
6.4.2- Obtención del espectro en suero.....	144

6.5- Análisis metabolómico en muestras de orina según el diagnóstico de ingreso: sepsis grave vs shock séptico. .....	146
6.5.1- Análisis no discriminante: PCA.....	146
6.5.2- Análisis supervisado: PLSDA.....	149
6.5.3- Validación cruzada de la orina.....	153
6.5.4- Evolución de los metabolitos en orina según el diagnóstico.....	154
6.6- Análisis metabolómico en muestras de suero según el diagnóstico de ingreso: sepsis grave vs shock séptico.....	156
6.6.1- Análisis no discriminante: PCA.....	156
6.6.2- Análisis supervisado: PLSDA.....	158
6.6.3- Validación cruzada del suero.....	163
6.6.4- Evolución de los metabolitos en suero según el diagnóstico.....	164
6.7- Análisis metabolómico en muestras de orina según el pronóstico del paciente: mortalidad a los 30 días.....	166
6.7.1- Análisis no supervisado: PCA orina A.....	166
6.7.2- Análisis supervisado: PLS-DA orina A.....	170
6.7.3- Validación cruzada orina A.....	174
6.7.4- Análisis supervisado: PLS-DA orina B.....	177
6.7.5- Validación cruzada orina B.....	179
6.7.6- Evolución de los metabolitos en orina según el pronóstico.....	182



6.8- Análisis metabólico en muestras de suero según el pronóstico del paciente: mortalidad a los 30 días.....	184
6.8.1- Análisis no supervisado: PCA suero A.....	184
6.8.2- Análisis supervisado: PLS-DA suero A.....	186
6.8.3- Validación cruzada suero A.....	191
6.8.4- Análisis no supervisado: PCA suero B.....	192
6.8.5- Análisis supervisado: PLS-DA suero B.....	193
6.8.6- Validación cruzada suero B.....	194
6.8.7- Evolución de los metabolitos en suero según el pronóstico.....	195
6.9- Exactitud diagnóstica de los modelos para predecir mortalidad.....	197
6.9.1-Modelo SOFA.....	197
6.9.2- Modelo Metabólico.....	200
6.9.3- Comparación estadística de ambos modelos.....	202
7-. DISCUSIÓN.....	205
7.1- Incidencia, características epidemiológicas y mortalidad de los pacientes sépticos en nuestro hospital.....	207
7.2- El perfil metabólico de suero y orina como una herramienta para la estratificación de pacientes con sepsis grave vs shock séptico.....	211
7.3- El perfil metabólico de suero y orina a las primeras 24h de ingreso en la UCI como predictor de la mortalidad a los 30 días .....	222

7.4- Modelo predictivo de evolución del paciente séptico en base a su perfil metabólico inicial de orina. Comparación de la exactitud diagnóstica del modelo predictivo metabólico frente a la escala SOFA.....	226
7.5- Principales limitaciones del modelo predictivo metabólico .....	231
7.6- Implicaciones futuras en la práctica clínica.....	233
8-. CONCLUSIONES.....	235
9-. BIBLIOGRAFÍA.....	239
10-. ANEXOS.....	263

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Número de hospitalizaciones por sepsis desde el año 2000 al año 2008.

1.2: Incidencia total de Sepsis Grave en España por 100.000 habitantes y ajustada por sexo desde el año 2006 al 2011.

1.3: Porcentaje de hospitalizaciones que terminan en muerte de pacientes con diagnóstico de ingreso de sepsis, ictus, cáncer, insuficiencia respiratoria e IAM.

1.4: Mortalidad total de Sepsis Grave en España por 100.000 habitantes y ajustada por sexo desde el año 2006 al 2011.

1.5: Descenso de la tasa de letalidad desde el año 2006 al 2011.

1.6: Respuesta del organismo ante el insulto bacteriano (Bacterias Gram + y Bacterias Gram -).

1.7: Mitocondria: Foto de microscopio electrónico.

1.8: Esquema de la célula y producción de energía.

1.9: Vía glucolítica y su interconexión metabólica con la vía pentosa fosfato.

1.10: Ciclo de Krebs.

1.11: Cadena de transporte de electrones.

1.12: Mecanismo de inhibición de la actividad PDH por la IL-6 y el TNF y acumulación de lactato.

- 1.13: Usos de los biomarcadores.
- 1.14: Representación esquemática de la relación entre los componentes de un enfoque de la biología de sistemas.
- 1.15: Comparación de las sensibilidades relativas de varias herramientas metabolómicas.
- 1.16: Espectrómetro de RMN y sus partes.
- 1.17: Tiempo de relajación longitudinal.
- 1.18: Tiempo de relajación transversal.
- 1.19: Representación del campo magnético inducido por la carga de los electrones.
- 1.20: Espectro en el que se identifica la diferente posición de un  $^1\text{H}$  incluido en un grupo metil del lactato respecto otro incluido en la molécula de colina, influido por el efecto del apantallamiento.
- 1.21: Desplazamientos químicos para el  $^1\text{H}$ .
- 1.22: Espectro de la  $^1\text{H}$  RMN del acetato de metilo.
- 1.23: Free Induction Decayment.
- 1.24: Proceso de formación del espectro.
- 1.25: Partes de un estudio metabolómico
- 1.26: Binning de un espectro de orina.
- 1.27: Normalización de los espectros.
- 1.28: Matrices de carga y puntuación.

- 1.29: Resumen esquemático del método PLS-DA.
- 5.1: Esquema del protocolo del estudio.
- 5.2: Espectrómetro RMN Bruker Avance 600.
- 5.3: Preparación de las muestras antes de su medición.
- 6.1: Algoritmo de inclusión de los pacientes del estudio.
- 6.2: Evolución de los valores SOFA. El día de ingreso, a las 24 horas y a las 72 horas.
- 6.3: Origen de la sepsis según el foco de infección de los pacientes incluidos en el estudio.
- 6.4: Bacteriemia microbiológica detectada en los hemocultivos.
- 6.5: Factores de riesgo y comorbilidad presentes en los pacientes incluidos en el estudio y porcentaje de los mismos que sufren cada tipo de enfermedad.
- 6.6: Tipo de microorganismo identificado.
- 6.7: Origen del foco infeccioso en pacientes con diagnóstico de sepsis grave vs shock séptico.
- 6.8: Bacteriemia microbiológica en los hemocultivos según su diagnóstico.
- 6.9: Factores de riesgo y comorbilidad según el diagnóstico.
- 6.10: Evolución del SOFA dependiendo del pronóstico del paciente.
- 6.11: Origen del foco infeccioso en pacientes que fallecen

comparado con aquellos que sobreviven.

6.12: Factores de riesgo dependiendo del pronóstico de los pacientes.

6.13: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN representativo (parte alifática y aromática) de las muestras de orina para un caso de un paciente que sobrevive y otro que fallece.

6.14: Detalle del espectro de  $^1\text{H}$  RMN representativo de una muestra de orina, A). Parte alifática. B). Parte aromática.

6.15: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN representativo de una muestra de suero. A). Parte alifática. B). Parte aromática. El espectro superior es de un paciente superviviente y el inferior de un exitus

6.16: A) Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de orina A, y B) tras excluir las dos muestras identificadas como aberrantes.

6.17: Diagrama de puntuaciones de la primera y tercera componente del PLS-DA de las muestras de orina A.

6.18: Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las muestras de orina A, parte alifática del espectro A) y la parte aromática del mismo B).

6.19. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre sepsis grave y shock.

6.20: Evolución temporal de la concentración relativa de los metabolitos con diferencias estadísticamente significativas entre

sepsis grave y shock séptico.

6.21: A) Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, y B) tras excluir la muestra identificada como aberrante.

6.22: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de suero A.

6.23: A) Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las muestras de suero A, parte alifática del espectro, y B) la parte aromática del mismo.

6.24. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre sepsis y shock séptico en suero.

6.25: Evolución temporal de la concentración relativa de los metabolitos con mayor peso en el modelo y diferencias estadísticamente significativas entre sepsis grave y shock séptico.

6.26: Gráfico  $T^2$  de Hotelling/Q residuals del PCA obtenido para las muestras orina A.

6.27: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de orina A, tras excluir las muestra identificada como aberrantes.

6.28: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de orina A.

6.29: A) Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las

muestras de orina A, parte alifática del espectro, y B) la parte aromática del mismo.

6.30: A) Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus. B) Tabla de frecuencias para la discriminación entre pacientes supervivientes y exitus.

6.31: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de orina B.

6.32. A) Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus. B) Tabla de frecuencias para la discriminación entre pacientes supervivientes y exitus.

6.33: Evolución de los metabolitos durante el ingreso. A: muestra al ingreso, B: muestra 2º día, C: muestra 4º día, D: muestra al alta de UCI.

6.34: Gráfico  $T^2$  de Hotelling/Q residuals del PCA obtenido para las muestras suero A.

6.35: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, tras excluir la muestra identificada como aberrante.

6.36: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA (suero A).

6.37: A) Diagrama de cargas del PLS-DA obtenido con las



muestras de suero A, parte alifática del espectro, y B) parte aromática.

6.38. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus en muestras de suero A.

6.39: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, tras excluir la muestra identificada como aberrante.

6.40: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA (suero B).

6.41. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus en muestras de suero B.

6.42: Evolución de los metabolitos en suero según el pronóstico del paciente.

6.43: Curva ROC de los valores inicial y evolutivo SOFA y cuadro con los índices de rendimiento pronóstico.

6.44: Comparación de las dos curvas obtenidas del modelo metabolómica y el modelo SOFA.

Anexo III-1: Protón girando sobre su propio eje en el núcleo del átomo y electrón girando sobre su propio eje y alrededor del núcleo.

Anexo III-2: Movimiento precesional de un protón al aplicar un campo magnético externo.

Anexo III-3: Alineación del spin en el sentido de la dirección del campo magnético.

Anexo III-4: Desdoblamiento del spin al aplicar un campo magnético externo creciente.

Anexo III-5: Asimetría del número de spines en equilibrio térmico.

Anexo III-6: Dirección que tomará el vector neto al aplicar un pulso de RF  $B_1$  de  $90^\circ$ .

# ÍNDICE DE TABLAS

- 1.1: Comparación de distintas tecnologías metabolómicas.
- 6.1: Características clínicas generales de la población incluida en el estudio.
- 6.2: Resultados de las variables analíticas.
- 6.3: Número de pacientes en los que se ha identificado cada tipo de foco de microorganismos.
- 6.4: Características de los pacientes según su diagnóstico.
- 6.5: Resultados de las variables analíticas según el diagnóstico.
- 6.6: Características de los pacientes según su pronóstico.
- 6.7: Resultados de las variables analíticas según el pronóstico.
- 6.8: Concentración relativa de los metabolitos detectados en orina que presentan un peso importante en el modelo o una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.
- 6.9: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes con sepsis grave y shock séptico detectados en suero que presentan un peso importante en el modelo discriminativo.
- 6.10: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes con sepsis grave y shock séptico detectados en suero que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

6.11: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes que sobreviven y en los exitus detectados en la muestra de orina A, que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

6.12: Matriz de confusión del modelo PLS-DA para la orina A.

6.13: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes que sobreviven y en los exitus detectados en orina (orina B) que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

6.14: Matriz de confusión del modelo PLS-DA para la orina B.

6.15: Metabolitos en suero con contribución importante al modelo.

6.16: Metabolitos en suero con diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

## **ABREVIATURAS**

ACCP: American College of Chest Physician

Acetil-CoA: Acetil coenzima A.

ADP: Difosfato de adenosina.

APACHE: Acute physiology and chronic health evaluation.

ATP: Trifosfato de adenosina.

ATS: American Thoracic Society.

B<sub>0</sub>: Campo externo.

BG-: Bacterias Gram-negativas.

BG+: Bacterias Gram-positivas.

B<sub>loc</sub>: Campos Locales.

CoQ: Coenzima Q.

CP: Componentes principales.

ESICM: Sociedad Europea de Medicina Intensiva.

FADH<sub>2</sub>: Flavina hidruro.

f<sub>i</sub>: Frecuencia de resonancia del compuesto que se quiere medir.

FID: Free Induction Decayment.

f<sub>ref</sub>: Frecuencia del compuesto de referencia.

H<sub>ef</sub>: Campo magnético efectivo.

IAM: Infarto de miocardio.

IL-1: Interleucina 1.

iNOS: Enzima óxido nítrico sintasa inducible.

INR: Ratio Internacional Normalizado.

NADH-H<sub>1</sub>: Nicotamida dihidruro de dinucleótido de adenina  
adenina.

NF-kB: Factor nuclear-kB.

PAF: Factor activador plaquetario.

PAMP: Comportamientos moleculares asociados a patógeno.

PaO<sub>2</sub> Presión arterial de oxígeno.

PCA: Análisis de componentes principales.

PCR: Proteína C reactiva.

PCT: Procalcitonina.

PLS-DA: Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados  
Parciales

RCP: Resucitación cardiopulmonar.

RF: Radiofrecuencia.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SAPS: Simplified acute physiology score.

SCCM: The Society of Critical Care Medicine.

SDMO: Síndrome de disfunción multiorgánica.

SIRS Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

SIS: Sociedad de Infecciones Quirúrgicas.

SvcO<sub>2</sub>: Saturación de oxígeno en suero venosa central.

TAM: Tensión arterial media.

TAS: Tensión arterial sistólica.

TF: Transformación de Fourier.

TL: Receptor Toll-like

TMS: Tetrametilsilano.

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

TSP: 3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H] propionato sódico.

TTPa: Tiempo de tromboplastina parcial activado.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.





# **1-. INTRODUCCIÓN**



## **1.1- DESARROLLO HISTÓRICO EN LA COMPRENSIÓN DE LA SEPSIS**

Etimológicamente la palabra sepsis proviene del término griego “σηψις” que se utilizaba para definir la descomposición de animales o vegetales orgánicos (Geroulanos S y col., 2006).

Sin usar el término sepsis, el médico griego Hipócrates (460-370 aC) fue probablemente el primero en describir el curso clínico del shock séptico ("si la fiebre está presente es muy peligroso si las partes exteriores del cuerpo están frías, pero el interior está muy caliente"). Muchos años después el filósofo florentino Niccolò Maquiavelo (1469-1527) describió la dificultad en el diagnóstico y el tratamiento de la sepsis de la siguiente manera: "el comienzo de la enfermedad es fácil de curar pero difícil de detectar, pero si pasa el tiempo y no se ha detectado ni tratado, es fácil de detectar, pero difícil de curar". El concepto de contagio fue formulado por primera vez en 1546 por el médico italiano Girolamo Fracastoro, proponiendo que las

#### 4 INTRODUCCIÓN

enfermedades epidémicas pueden ser comunicadas por contacto directo o indirecto a través del aire, por semillas o gérmenes invisibles. Sin embargo, no fue hasta 1683 cuando se hicieron posibles las primeras observaciones microscópicas de la mano de Anthony van Leeuwenhoek. Fue el primero en publicar ilustraciones de bacterias desprendidas de los dientes humanos. En 1847, el médico húngaro Ignaz Semmelweis, tras la observación de un aumento de la fiebre puerperal en las parturientas tratadas por los obstetras que participaron en autopsias, introdujo prácticas antisépticas antes de los exámenes de las pacientes. Obligó al lavado de las manos con una solución de cal antes de las exploraciones ginecológicas lo que redujo la tasa de mortalidad de fiebre puerperal del 18% al 3 %. Esto representó el primer ensayo clínico en enfermedades infecciosas jamás realizado. En la segunda mitad del siglo XIX, la teoría de los gérmenes fue confirmada por Robert Koch y Louis Pasteur en 1879. Este último anunció a la Academia Francesa que el *streptococo* causaba sepsis puerperal. A partir de ahí se propuso intentar impedir la entrada de microorganismos en el cuerpo humano, lo que llevó a Joseph Lister a desarrollar métodos antisépticos en los procedimientos quirúrgicos. Richard Pfeiffer (1858-1945) que trabajó con Robert Koch, definió el concepto de endotoxina como un veneno bacteriano estable al calor y responsable de las consecuencias fisiopatológicas de ciertas enfermedades infecciosas. En 1909 Jacob publicó los primeros doce casos de pacientes con sepsis por Gram negativos causada por *Escherichia coli*, el 50% de los cuales falleció. En 1914, Hugo Schottmüller hizo la primera definición científica de sepsis: "la sepsis es un estado causado por la invasión microbiana de una fuente infecciosa local en el torrente sanguíneo que conduce a

signos de enfermedad sistémica en órganos a distancia". William Osler (1849-1919) fue el primero en reconocer el importante papel de la respuesta del huésped en la sepsis: "salvo en contadas ocasiones, el paciente parece morir de la respuesta del cuerpo a la infección en lugar de por la infección". Esta visión representó un hito importante en la moderna comprensión de la función de la respuesta del huésped a una infección (Reinhart K y col., 2012; Funk DJ y col., 2009).

Hoy en día con el avance en la comprensión de la respuesta inmunológica, se ha visto que la sepsis hace referencia a una respuesta del huésped ante la invasión de microorganismos, independientemente del tipo de microorganismo que la genera. De hecho, la sepsis puede ser iniciada por cualquier microorganismo, bacterias, hongos, virus, parásitos e incluso por productos microbianos o toxinas y una vez iniciada sus graves efectos se producen debido a la compleja red de mediadores de la inflamación que se van a propagar y generalizar (Vincent JL y col., 2009).

## 1.2- DEFINICIONES DE SEPSIS

Con estos antecedentes, uno de los primeros intentos de establecer una serie de parámetros clínicos para definir los pacientes con sepsis se produjo en 1989 cuando Roger Bone propuso el término "*síndrome séptico*" (Bone RC y col., 1989) que se definió como la presencia de:

- hipotermia (< 35 °C) o hipertermia (> 38.3 °C)
- taquicardia (frecuencia cardiaca > 90 latidos /minuto)
- taquipnea (>20 respiraciones / minuto)
- evidencia clínica de una localización de infección

## 6 INTRODUCCIÓN

- perfusión inadecuada o disfunción de al menos uno de los órganos diana expresada como: hipoxemia ( $\text{PaO}_2$  inferior a 75 mmHg en aire ambiental) o alteración de la función cerebral
- lactato plasmático elevado
- oliguria (orina  $< 30$  ml/h o  $0.5$  ml/kg sin terapia correctiva)

Sin embargo, estos criterios no definían correctamente a un grupo homogéneo de pacientes.

A raíz de esta primera definición, el American College of Chest Physicians (ACCP) y la Society of Critical Care Medicine (SCCM) convocaron una conferencia de consenso en 1991 en un intento de crear definiciones más estandarizadas. Treinta y cinco expertos en el campo de la sepsis se reunieron para definir la respuesta inflamatoria sistémica a la infección. El resultado final de esta conferencia fue la introducción del término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que se define por la presencia de al menos dos de los siguientes criterios clínicos (ACCP-SCCM, 1992):

- Temperatura corporal  $> 38$  °C o  $< 36$  °C
- Frecuencia cardíaca  $> 90$  latidos/minuto
- Frecuencia respiratoria  $> 20$  respiraciones/minuto o hiperventilación con  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- Recuento de leucocitos  $> 12.000/\text{mm}^3$ ,  $< 4000/\text{mm}^3$ , o con  $> 10\%$  de formas inmaduras.

El **SIRS**, además de en la sepsis, puede ocurrir como consecuencia de otras situaciones como la pancreatitis aguda, el trauma, la isquemia-reperusión o las quemaduras. También, durante esta reunión se definió la **infección** como una respuesta inflamatoria

secundaria a la invasión de microorganismos o toxinas microbianas en tejidos del huésped normalmente estériles. La **sepsis**, por su parte, se definió por la presencia de SIRS en asociación con una infección confirmada clínica y/o microbiológicamente.

Las definiciones de esta conferencia de consenso fueron revisadas en el año 2001 durante una Conferencia Internacional de “Definiciones de sepsis” convocada por la SCCM, la Sociedad Europea de Medicina Intensiva (ESICM), la ACCP, American Thoracic Society (ATS), y la Sociedad de Infecciones Quirúrgicas (SIS) (Levy M y col., 2003). Durante esta reunión se modificaron las definiciones y se hicieron publicar, junto con las definiciones hemodinámicas del shock séptico (Annane D y col., 2005).

Las definiciones que se describen a continuación están basadas en las conclusiones de esta conferencia.

**-Sepsis grave:** Sepsis asociada a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión atribuible a la sepsis. La disfunción orgánica se mide con alguno de los siguientes parámetros.

- Hipoxemia con  $PaO_2/FIO_2 < 300$  mmHg
- Oliguria (diuresis  $< 0.5$  ml/kg/hora durante al menos 2 horas)
- Incremento de creatinina  $> 0.5$  mg/dl o valor  $> 2$  mg/dl
- Trastornos de la coagulación (INR  $> 1.5$  o TTPa  $> 60$  segundos)
- Trombocitopenia  $< 100.000/mm^3$
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina  $> 2,0$  mg/dl)
- Hiperlactacidemia ( $> 3$  mmol/l o 24 mg/dl)
- Hipotensión arterial (TAS  $< 90$  mmHg, TAM  $< 70$  o descenso de la TAS  $> 40$  mmHg)

**-Shock séptico:** Hipotensión arterial persistente que no pueda ser explicada por otras causas diferentes a la sepsis, y que no se corrige a pesar de la reanimación con un volumen de perfusión intravenosa adecuado. Se acompaña de alteraciones de la perfusión tisular (acidosis metabólica o hiperlactacidemia), y/o disfunción de órganos. Se necesita la administración de fármacos vasoactivos para mantener una presión arterial adecuada.

Habiéndose demostrado que la sepsis grave se asocia frecuentemente con el desarrollo de disfunción múltiple de órganos y que el fallo múltiple de órganos es la causa más común de muerte en pacientes con sepsis grave, se definió el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) como la presencia de la función orgánica alterada en un paciente gravemente enfermo en el que la homeostasis no puede ser mantenida sin una intervención. El SDMO representa el extremo más grave del espectro de severidad de la enfermedad que se caracteriza por SRIS/sepsis/sepsis grave/shock séptico/SDMO. El SDMO se puede producir como consecuencia de una infección sistémica pero también de estados inflamatorios sin infección, como por ejemplo un traumatismo grave, la ruptura de un aneurisma de aorta, una embolia de líquido amniótico y otras condiciones. El desarrollo del SDMO sugiere que la patogénesis de la sepsis no puede atribuirse únicamente a organismos invasores sino que debe reflejar también la respuesta del huésped a un insulto grave.

El conocimiento y la comprensión de las interacciones patógeno-hospedador y de la respuesta inflamatoria que se produce en la sepsis, se han incrementado considerablemente. Sin embargo, se esperaba con ello un avance terapéutico en el desarrollo de



innovadoras terapias adyuvantes que no se ha producido. Uno de los motivos que podría explicar esto es que los criterios diagnósticos actuales de sepsis no son útiles para estratificar la gravedad de los pacientes y con ello poder individualizar los tratamientos para obtener mejores resultados clínicos. Necesitaríamos incorporar a las definiciones actuales métodos más precisos y exactos como podrían ser los marcadores bioquímicos que nos ayudaran a definir de forma detallada los complejos procesos moleculares que la caracteriza.

Las escalofriantes cifras de incidencia y mortalidad que vamos a ver a continuación, nos obligan a seguir investigando intensamente. La utilización de tecnologías que hasta ahora no se han utilizado en el estudio de la sepsis, como es la metabolómica, quizás nos podría ayudar a definirla con mayor profundidad y a desarrollar con esta mejor estratificación, nuevos enfoques terapéuticos y más personalizados.

### **1.3- EPIDEMIOLOGÍA**

La sepsis representa hoy la enfermedad más prevalente en las unidades de cuidados intensivos (UCI) con una tasa de mortalidad muy elevada.

La incidencia de sepsis grave varía según los estudios y la población estudiada. Según datos del Centro Nacional de Estadística de EEUU, el número de hospitalizaciones con diagnóstico principal de sepsis o septicemia ha aumentado al doble desde el año 2000 (11.6 %) al año 2010 (37.7 %). Si tenemos en cuenta el número de hospitalizaciones con diagnóstico principal sepsis, con otros diagnósticos principales pero que asocian como diagnóstico secundario el de sepsis o aquellos que desarrollan sepsis durante su

hospitalización, la tasa de hospitalización ha pasado de 22.1 % en 2000 al 37.7 % en 2010 (Figura 1.1).

En Europa los datos de incidencia son comparables a los que encontramos en nuestro país. En la población francesa la incidencia anual de sepsis grave se ha cuantificado en 95 casos por 100000 habitantes (Brun-Buisson C y col., 2004) y en Inglaterra-Gales-Irlanda del Norte en 51 casos por 100000 habitantes (Padkin A y col., 2003).

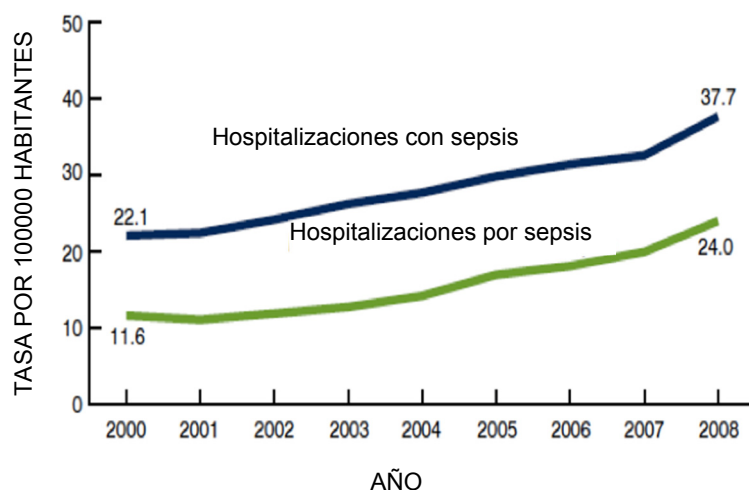


Figura 1.1: Número de hospitalizaciones por sepsis desde el año 2000 al año 2008. Línea inferior, hospitalizaciones por sepsis o septicemia como diagnóstico principal. Línea superior, hospitalizaciones con diagnóstico principal o secundario de sepsis o septicemia y sepsis o septicemia adquirida durante la hospitalización (Hall MJ y col., 2011).

En España según el estudio de Esteban que recogía datos del año 2003, se registró una incidencia de sepsis grave de 104 casos por 100000 habitantes por año y una incidencia de shock séptico de 31 casos por 100000 habitantes por año (Esteban A y col., 2007).

En un estudio más reciente realizado por Bouza en el que se recogen casos desde el año 2006 al año 2011, la incidencia general de la sepsis grave fue 86.97 casos por 100000 habitantes. En este estudio se recoge además la tasa bruta de incidencia en hombres que fue de 102.47 casos por 100000 habitantes, mientras que en las mujeres fue de 71.90 casos por 100000 habitantes (Bouza C y col., 2014).

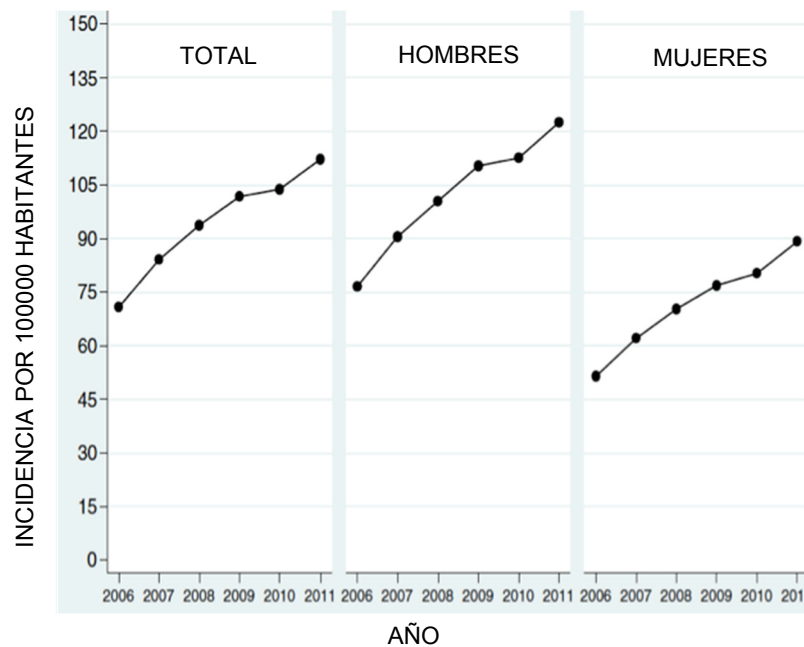


Figura 1.2: Incidencia total de Sepsis Grave en España por 100000 habitantes y ajustada por sexo desde el año 2006 al 2011 (Bouza C y col., 2014).

Con los datos recogidos en este trabajo se aprecia un aumento en la tasa estandarizada de incidencia que va desde 70.86 casos por 100000 habitantes en 2006 a 112.11 casos por 100000 habitantes en 2011, con una variación porcentual anual de 8.6% (IC del 95%: 5.1-12.1) (Figura 1.2).

Según el estudio de De Miguel-Yanes los factores que están influyendo en este aumento son varios. Las personas mayores son especialmente susceptibles a la sepsis y debido al aumento de la expectativa de vida, cada vez la población es de mayor edad. Este aumento en la edad de la población en la mayoría de los casos se asocia con el padecimiento de procesos crónicos que aumentan la probabilidad de padecer un cuadro séptico. Además, existen otros factores que influyen como son el incremento de las técnicas invasivas en la actividad médica usual, el aumento del número de pacientes con estados de inmunodepresión y los tratamientos con quimioterapia, que cada vez son más frecuentes y se emplean en gente de mayor edad (De Miguel-Yanes JM y col., 2006).

La mortalidad de la sepsis grave se encuentra alrededor del 28% y del 50% en el shock séptico, dependiendo del tipo de microorganismo causal, el lugar de la infección, edad, sexo, enfermedades concomitantes, gravedad de la enfermedad y genotipo del paciente (Alberti C y col., 2002; Brun-Buisson C y col., 2004; Esteban A y col., 2007).

En EEUU según datos del Centro Nacional de Estadística desde el año 2000 al año 2010, las hospitalizaciones que terminaron en muerte se han reducido en aquellas cuyo diagnóstico inicial fue cáncer, ictus, insuficiencia respiratoria y síndrome coronario agudo.

Sin embargo la sepsis ha visto incrementada su mortalidad de un 14 a un 16 % (Figura 1.3). Estos datos proceden de la encuesta al alta hospitalaria "National Hospital Discharge Survey" y cobran mayor importancia si tenemos en cuenta que el número de ingresos por sepsis se ha duplicado en este periodo de tiempo y aumenta en un 12% cada año (Hall MJ y col., 2011).

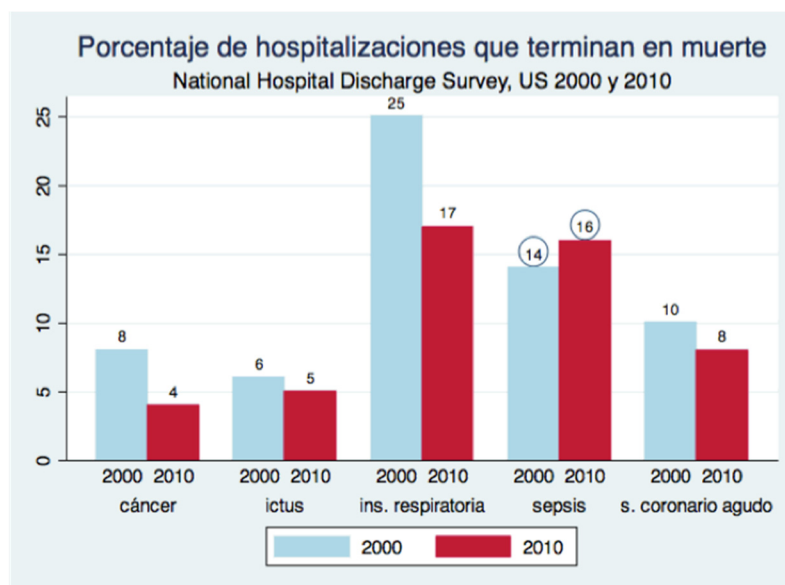


Figura 1.3: Porcentaje de hospitalizaciones que terminan en muerte de pacientes con diagnóstico de ingreso de sepsis, ictus, cáncer, insuficiencia respiratoria e IAM. (QuickStats: From the national center for health statistics, 2013).

En España, según los datos del estudio de Bouza la tasa de mortalidad global fue de 37.1 casos por 100000 habitantes. En el análisis por sexo, en los hombres fue de 43.15 mientras que en mujeres fue del 31.26 casos por 100000 habitantes (Bouza C y col., 2014).

En este mismo estudio, desde el año 2006 al año 2011, se aprecia un incremento en la tasa de mortalidad estandarizada pasando de 32.1 casos a 45.3 casos por cada 100000 habitantes en el año 2011. La tendencia de este aumento supone una variación porcentual anual del 6% (95% CI: 1.9, 10.3) (Bouza C y col., 2014) (Figura 1.4).

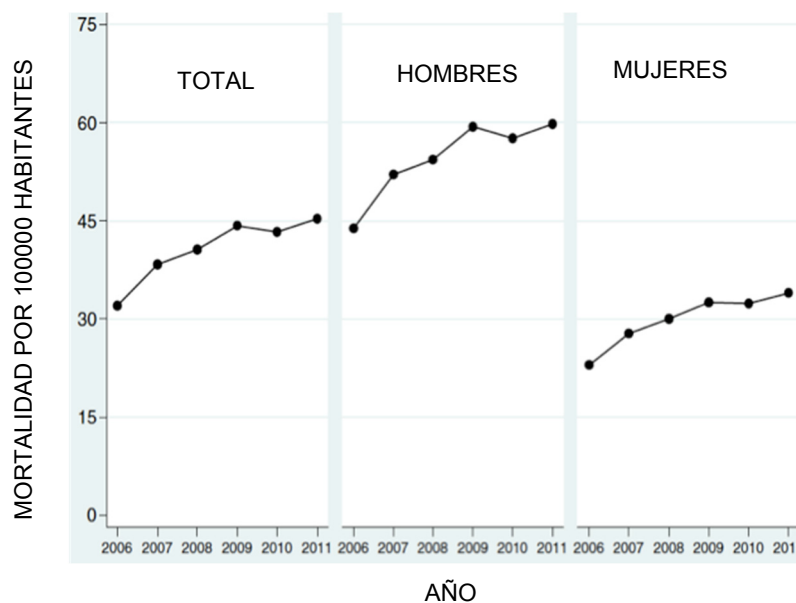


Figura 1.4: Mortalidad total de Sepsis Grave en España por 100000 habitantes y ajustada por sexo desde el año 2006 al 2011 (Bouza C y col., 2014).

El estudio de Bouza confirma una tendencia que se está repitiendo en numerosos estudios (Dombrovskiy VY y col., 2005; Dombrovskiy VY y col., 2007; Lagu T y col., 2012). Al ajustar el número de muertes por sepsis grave por el número de casos que se producen (Tasa de letalidad por sepsis), se aprecia una disminución promedio de 3,5% por año desde el 2006 hasta el 2011 (Figura 1.5). Este

descenso probablemente se deba a las iniciativas educativas para promover las mejores prácticas médicas en el manejo de la sepsis

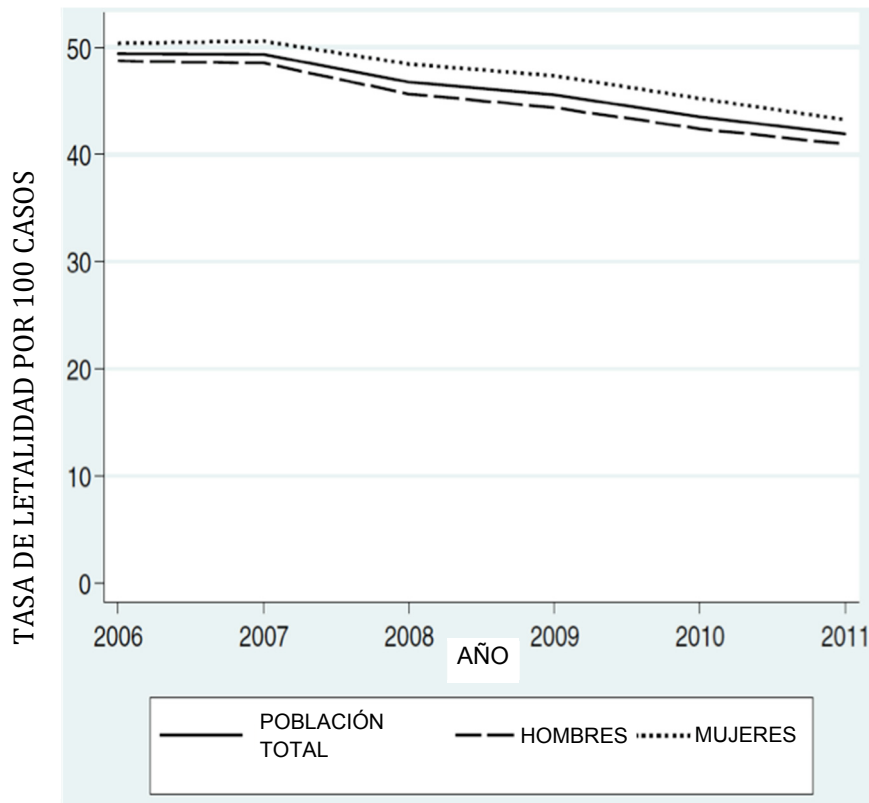


Figura 1.5: Descenso de la tasa de letalidad desde el año 2006 al 2011(Bouza y col. 2014).

grave que se han desarrollado en los últimos años en España (Ferrer R y col., 2008), sin embargo las cifras siguen siendo todavía muy elevadas y el gasto sanitario que esto conlleva, desmesurado.

Algunos autores consideran a la sepsis como un “desastre oculto de la salud pública” (hidden public health disaster), debido al elevado gasto sanitario que esta conlleva (Agnus DC, 2010).

Normalmente los costes que genera en una UCI, representan el 40% del total de sus gastos anuales. (Angus DC y col., 2001).

En EEUU el gasto anual estimado por sepsis grave fue superior a los 16 mil millones de dólares. En España, el coste anual del tratamiento se estimó en 70 millones de euros (Íñigo J y col., 2006). Hay que tener en cuenta además, que no sólo supone un gasto el tratamiento de la sepsis en sí, sino que los pacientes que sobreviven presentan un deterioro importante de su estado físico y cognitivo, además de un riesgo de muerte más del doble en los cinco años siguientes a su alta hospitalaria en comparación con pacientes controles hospitalarios. Es muy probable por tanto, que en la actualidad en España el coste del tratamiento de la sepsis grave ronde los 600 millones de euros anuales.

#### **1.4- FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS**

La respuesta normal del huésped a la infección es un proceso complejo que sirve para localizar y controlar la invasión por un microorganismo e iniciar la reparación del tejido lesionado. Cuando esta respuesta se generaliza, se extiende al tejido sano a distancia, desde el sitio inicial de lesión o infección, dando lugar a un cuadro de sepsis grave. La sepsis se inicia cuando unos activadores procedentes de los microorganismos patógenos o de sus productos, desencadenan estímulos celulares y humorales que bien directamente, o bien a través de citocinas y otros mediadores, producen unos efectos biológicos que se traducen en efectos clínicos (De Gaudio R, 2009).



Los agentes patógenos más comúnmente asociados con el desarrollo de la sepsis son las bacterias aunque los hongos, los virus y los parásitos también la pueden iniciar (Bochud PY y col., 2003).

Los activadores de la sepsis se denominan globalmente patrones moleculares asociados a patógeno o PAMP (pathogen-associated molecular patterns) y los mecanismos que los ponen en marcha difieren dependiendo del germen causal (Cinel I, 2009). En las bacterias Gram-negativas (BG-) la sepsis bacteriana se inicia por los componentes de membrana externa, los lipopolisacáridos, el lípido A, la flagelina y el peptidoglicano. Sin embargo en las bacterias Gram-positivas (BG+) su inicio se debe al ácido teicoico, el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano. Estos componentes de la membrana externa y otros componentes de la pared celular son capaces de unirse al receptor CD14, una proteína anclada en la parte exterior de la superficie de los monocitos. Los componentes bacterianos también interactúan con unos correceptores denominados Toll-like (TL). Se han identificado hasta 10 tipos diferentes de correceptores de la familia TL mostrando cada uno de ellos una especificidad diferente para los microorganismos y sus productos (por ejemplo el TLR2 del peptidoglicano, ácido lipoteicoico o TLR4 del lipopolisacárido). La unión a los receptores TL inicia una activación intracelular de los factores de transcripción, como el factor nuclear- $\kappa$ B, que a su vez controla la expresión genética de la respuesta inmune que produce la liberación de citocinas (Figura 1.6). De las citocinas que se secretan, algunas van a tener propiedades inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), la interleucina-1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) y la 6 (IL-6) y otras citocinas van a tener propiedades anti-

inflamatorias como la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 10 (IL-10) (De Gaudio R, 2009).

Una red de mediadores de la inflamación activa los leucocitos y promueve su adhesión vascular dando lugar a un daño endotelial. Este daño endotelial, a su vez, conduce a la expresión del factor tisular y éste a la activación de la cascada de la coagulación con la formación subsiguiente de trombina, microagregados de fibrina, plaquetas, neutrófilos y eritrocitos de la sangre capilar. Todo esto pone en peligro el flujo de sangre al disminuir el oxígeno y el aporte de nutrientes a los tejidos. Las primeras citocinas inflamatorias aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en las células endoteliales, dando lugar a un aumento de la síntesis de óxido nítrico que actúa como un potente vasodilatador que disminuye las resistencias vasculares sistémicas, que es característica del shock (De Backer y col., 2014; De Gaudio R, 2009).

Otras citocinas inflamatorias como el TNF contribuyen a la interrupción de las uniones estrechas entre las células endoteliales provocando un aumento de la permeabilidad a las proteínas del plasma y a fluidos que ocasiona un edema tisular generalizado. La IL-6 altera la síntesis de proteínas del hepatocito, aumenta la inducción de reactivos de fase aguda y favorece el desarrollo de anemia. Como respuesta a esta fase aguda se va a producir un descenso de la producción de albúmina y proteínas anticoagulantes como la proteína C. La disfunción de la microcirculación desempeña un papel clave en el desarrollo de la disfunción de órganos en los pacientes sépticos (De Gaudio R, 2009).

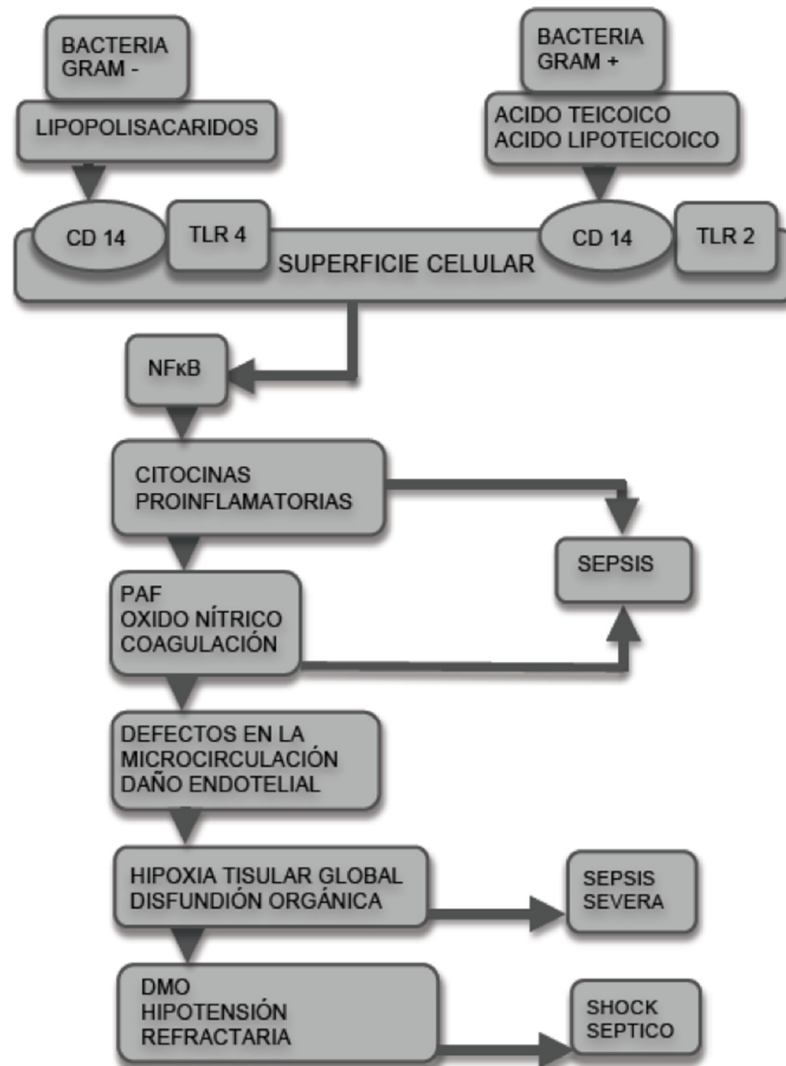


Figura 1.6: Respuesta del organismo ante el insulto bacteriano (Bacterias Gram + y Bacterias Gram -). Adaptado de: De Gaudio R. (2009). Severe sepsis. En Bersten A, y Soni N. Oh's Intensive Care Manual (730-8). UK: Butterworth-Heinemann Elsevier.

Como resultado del círculo vicioso de la inflamación, la coagulación, la insuficiencia cardiovascular (en el sentido de depresión miocárdica debido al TNF, la vasodilatación y la fuga capilar) y el fallo multiorgánico, a menudo se produce una situación irreversible que provoca la muerte (Hoffmann JN y col., 2006).

Todas estas alteraciones fisiopatológicas que tienen lugar en la sepsis, son el reflejo de las alteraciones celulares y moleculares que se producen como consecuencia de un insulto infeccioso. Estas alteraciones son comunes en la mayoría de células y órganos. Una posibilidad que se está investigando es que ocurra un defecto en la producción de energía a nivel mitocondrial que se va a traducir en una anomalía en la producción de adenosina trifosfato (ATP) y, por lo tanto, en una anomalía en la función de las mitocondrias.

Antes de pasar a ver cuáles son las alteraciones mitocondriales que se producen en la sepsis vamos a describir cuáles son las funciones normales de las mitocondrias (Figura 1.7).



Figura 1.7: Mitocondria: Foto de microscopio electrónico. Márquez S y Zabala C 2011: Respiración celular. Introducción a la biología celular. Recuperado el 20 de enero de 2014 de <http://genomasur.com/index.htm>.

### 1.4.1- La función mitocondrial y la producción de energía.

La principal función de una célula es mantener activos todos los procesos metabólicos que le son propios para mantener así su homeostasis. Para lograr esto, cada célula debe ser capaz de producir ATP que le permita llevar a cabo todas aquellas reacciones bioquímicas anabólicas necesarias para el crecimiento, la reproducción y la síntesis. El ATP puede generarse tanto en forma anaeróbica como aeróbica. La generación anaeróbica de ATP ocurre principalmente en el citoplasma y se denomina glucólisis. El principal mecanismo de producción aeróbica de ATP, tiene lugar exclusivamente en el interior de la mitocondria y para ello se consume aproximadamente el 95% de oxígeno celular (Figura 1.8).

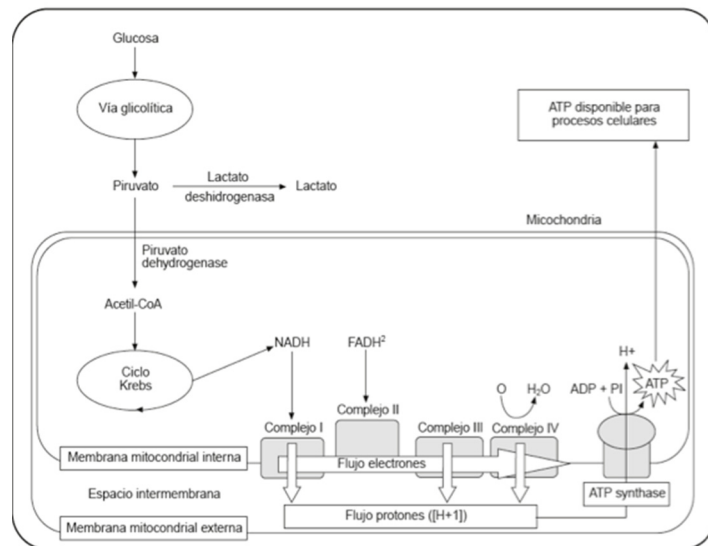


Figura 1.8: Esquema de la célula y producción de energía. Diagrama que muestra el flujo metabólico de la glucosa desde su entrada a la célula, la vía glucolítica, la entrada de piruvato a la mitocondria y al ciclo de Krebs, y la entrega de compuestos reductores a la cadena de fosforilación oxidativa (Regueira T y col., 2009).

La producción de energía mitocondrial a través de la glucólisis se produce a partir de la glucosa que, o bien se ingiere a través de los alimentos, o bien se sintetiza por el hígado o el riñón y culmina con la formación de dos moléculas de piruvato (Figura 1.9). El piruvato se puede utilizar de varias maneras. Una vía común implica la continuación de la glucólisis citoplásmica, con la transformación de piruvato en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa, dando lugar a dos moléculas de ATP por cada molécula de piruvato.

Frecuentemente y en presencia de oxígeno, el piruvato entra en las mitocondrias a través de la piruvato deshidrogenasa y se convierte en acetato de etilo, vinculado a la coenzima A para formar acetil coenzima A (acetil-CoA) y se combina con el oxalacetato para formar citrato. El proceso mediante el cual el citrato contribuye a este proceso, también llamado el ciclo del ácido cítrico, ciclo de ácido tricarbónico o ciclo de Krebs, implica enzimas localizadas dentro de la matriz mitocondrial (Figura 1.10).

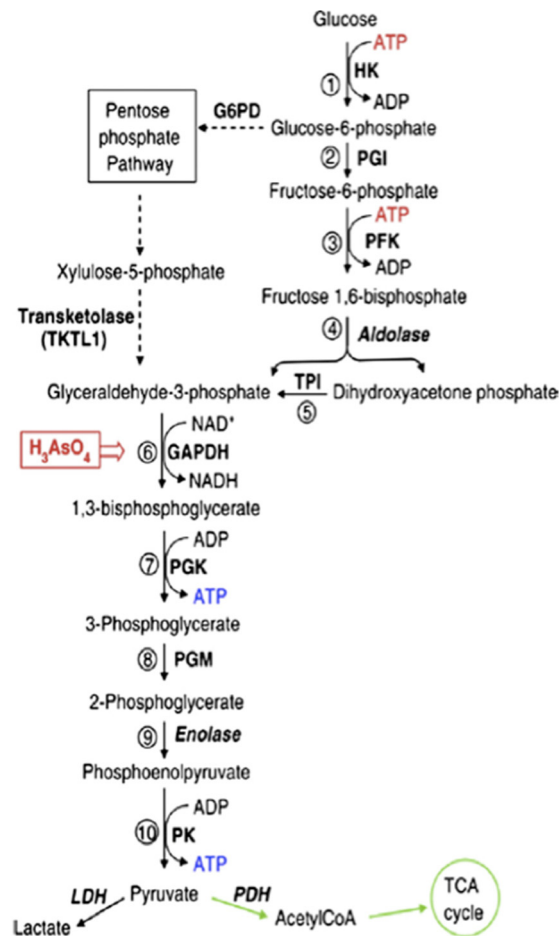


Figura 1.9: Vía glucolítica y su interconexión metabólica con la vía pentosa fosfato. Las flechas continuas indican reacciones glucolíticas, mientras que las flechas discontinuas muestran la vía pentosa fosfato. Las flechas verdes indican, además, el metabolismo del piruvato. HK, hexoquinasa; IGP, isomerasa fosfoglucoasa; PFK, fosfofructoquinasa; TPI, triosafosfato isomerasa; GAPDH, deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato; PGK, fosfoglicerato quinasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; PK, piruvato quinasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; LDH: lactato deshidrogenasa. (Ruggieri AJ y col., 2010).

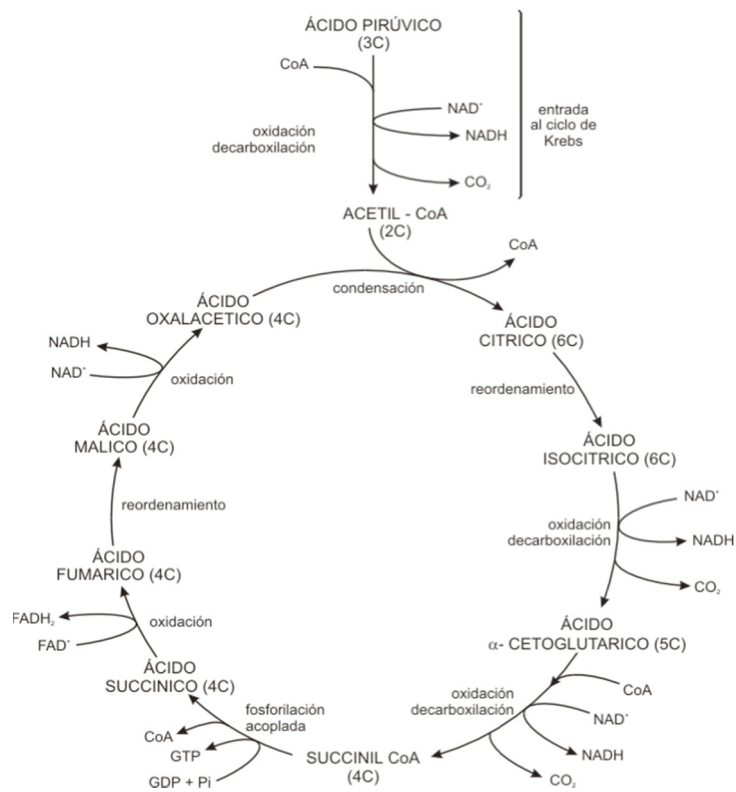


Figura 1.10: Ciclo de Krebs. Márquez S y Zabala C 2011: Respiración celular. Introducción a la biología celular. Recuperado el 20 de enero de 2014 de <http://genomasur.com/index.htm>.

Durante estas reacciones enzimáticas se crean una serie de compuestos reducidos que se almacenan en forma de nicotinamida adenosina dinucleótido hidruro (NADH-H<sub>1</sub>), flavina adenina dinucleótido hidruro (FADH<sub>2</sub>), y la coenzima Q (CoQ) dentro de la matriz mitocondrial. Estos compuestos sirven para mantener el transporte de electrones a través de cuatro complejos proteicos en la



membrana mitocondrial interna que, finalmente, culminará con la síntesis de ATP por enlaces de alta energía (Figura 1.11).

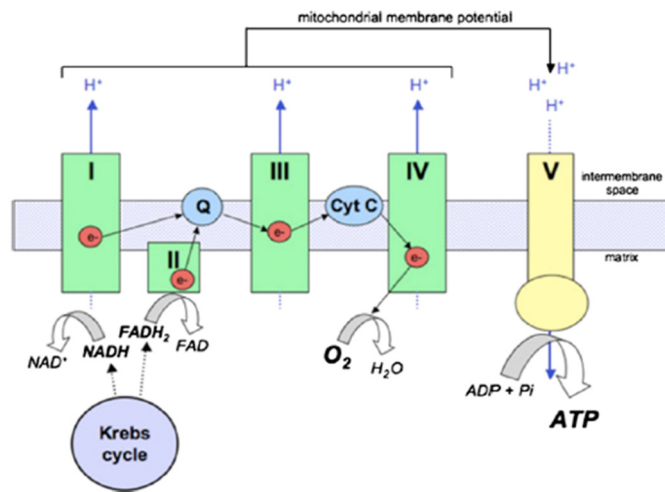


Figura 1.11: Cadena de transporte de electrones. Complejo I, II, III, IV, V. Cyt C: Citocromo C, Q: Complejo Q. (Ruggieri AJ y col. 2010)

Las reacciones llevadas a cabo en los complejos proteicos I, III y IV mantienen el movimiento de electrones hasta culminar en la formación de ATP y agua. Mediante la liberación de citocromo c (Cyt C) al citoplasma mitocondrial, la mitocondria favorece la apoptosis. Sin embargo, estudios en animales así como estudios clínicos, confirman que la presencia de daño celular (necrosis o apoptosis), a excepción del sistema inmunitario y del epitelio gastrointestinal, es escasa durante la sepsis con SDMO. Hotchkiss realizó un estudio histológico de veinte pacientes que fallecieron a causa de sepsis con SDMO en el que sólo encontraron una grave depleción de linfocitos y focos de

apoptosis en células intestinales; el resto de los órganos presentaba mínimos signos de daño celular (Hotchkiss RS y col., 1999). Una explicación complementaria para la disfunción orgánica de la sepsis es el fallo metabólico celular asociado a la disfunción mitocondrial (Zingarelli B y col., 1997), así como la limitación del proceso de biogénesis a partir del cual se generan nuevas mitocondrias.

#### **1.4.2 Disfunción mitocondrial.**

Durante la última década, numerosos estudios han demostrado que durante la sepsis existe disfunción mitocondrial y que ésta podría asociarse al desarrollo de la disfunción de órganos y a un peor pronóstico. Diversos trabajos han demostrado la presencia de esta disfunción tanto en órganos vitales, como en el hígado y en el tejido muscular. Parece que la patogénesis de la disfunción mitocondrial es multifactorial. Se han propuesto varios mecanismos como el déficit de sustratos, el bloqueo enzimático y el daño de membranas, entre otros (Porta F y col., 2006; Crouser ED y col., 2006; Ruggieri AJ y col., 2010; De Backer D y col., 2014).

Existen varias teorías para explicar esta disfunción:

1. Inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH). El producto final de la glucólisis anaeróbica es el piruvato. Este compuesto en condiciones aeróbicas normales difunde hacia la matriz mitocondrial, donde por medio de un complejo enzimático PDH, es metabolizado para continuar con el ciclo de Krebs. Sin embargo, durante la sepsis existe un incremento en la actividad de enzimas PDH cinasas, que inhiben la función de PDH y disminuyen los sustratos disponibles para

la fosforilación oxidativa, de tal manera que se reduce la producción de ATP.

Este aumento en la expresión de las PDH cinasas es probablemente mediado por señales desde la membrana por parte de citoquinas pro inflamatorias (TNF $\alpha$  e IL-6). El bloqueo de la PDH trae como consecuencia la acumulación de piruvato y su conversión en lactato por vías metabólicas alternativas (Figura 1.12) (Alamdari N y col., 2008).

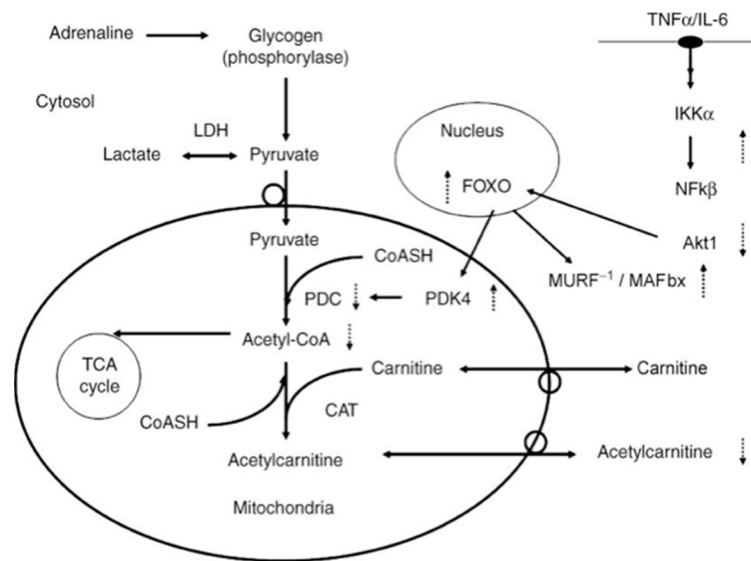


Figura 1.12: Mecanismo de inhibición de la actividad PDH por la IL-6 y el TNF y acumulación de lactato. PDC (= PDH: Piruvato deshidrogenasa), LDH: lactato deshidrogenasa; PDK4: Isoforma piruvato deshidrogenasa quinasa; CAT: acetil carnitina; TCA: ciclo del ácido tricarboxílico; FOXO: factor de transcripción forkhead; MURF-1 y MAFbx: Proteínas musculares mediadas por el TNF. ↑ denota regulación, ↓ denota baja regulación. (Alamdari N y col., 2008)

2. Aumento en los niveles de iNOS durante la sepsis. Durante la sepsis existe un aumento en la expresión de iNOS con la consiguiente sobreproducción del radical libre óxido nítrico (NO). Existe una fuerte correlación entre la inhibición de la respiración mitocondrial y niveles elevados de NO (Brealey D y col., 2004). La inhibición del consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial mediada por NO es el resultado de la competición por los dos gases (NO· y O<sub>2</sub>) por el mismo sitio de enlace en el complejo enzimático, guiando a una respiración celular reducida. Además, el NO es capaz de reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), compuesto con alta capacidad oxidante y nitrosante capaz de dañar membranas lipídicas (lipoperoxidación), y producir fragmentación y mutación del ADN y daño proteico (Radi R y col., 2002; Hoffman DL y col., 2009).

3. Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP-1). Es una enzima nuclear que participa en una variedad de funciones celulares, como la reparación y la replicación del ADN nuclear. En estados de inflamación aguda, las especies reactivas incluyendo el ONOO<sup>-</sup> pueden inducir la rotura de la cadena simple en el ADN y activar la PARP-1. Su activación trae consigo el consumo masivo de NAD, con una importante caída en sus niveles celulares y disminución de la tasa de glucólisis, transporte de electrones y formación de ATP dando lugar a hipoxia citopática. Además la PARP-1 estimula la expresión de varios mediadores proinflamatorios, a través de la activación del NF-κB y otras vías intracelulares (Goldfarb RD y col., 2002).

4. Alteración de la morfología y el contenido celular mitocondrial. La alteración en la morfología mitocondrial se ha correlacionado con el grado de disfunción y la disminución en el

contenido de mitocondrias parece que está relacionado con un mayor aclaramiento lisosomal (Crouser ED y col., 2006).

La disfunción mitocondrial y las alteraciones en la biogénesis tienen un efecto deletéreo en la evolución de la sepsis (Brealey D y col., 2002). Sin embargo, las alteraciones funcionales mitocondriales observadas en las fases iniciales de la sepsis podrían tener una finalidad diferente, en vez de constituir un riesgo de mortalidad de los pacientes sépticos. Una idea alternativa propuesta por algunos investigadores es que la disfunción mitocondrial en la sepsis puede deberse a una estrategia de adaptación celular para reducir el gasto energético celular, similar a la hibernación. Este efecto de hibernación mitocondrial podría efectuarse con fines adaptativos protectores, provocando una disminución importante del metabolismo que a su vez disminuiría la función orgánica a expensas de conservar su estructura (Bayl H y col., 2008).

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para encontrar una terapia que frene o revierta la disfunción mitocondrial, de modo que se ha desarrollado una corriente experimental en busca de evidencia principalmente por medio de estudios en animales con modelos de sepsis. Este nuevo enfoque podría ofrecer nuevas terapias para los pacientes sépticos con insuficiencia multiorgánica. (Dare AJ y col., 2009; Azevedo LC, 2010; Kozlov AV y col., 2011).

Las aplicaciones recientes de la metabolómica para estudiar trastornos mitocondriales en campos como la oncología, indican que potencialmente podría ser una herramienta prometedora para investigar la relación entre la sepsis y la disfunción mitocondrial (Nagrath D y col., 2011).

### 1.5- ESCALAS DE SEVERIDAD

Como ya hemos visto al hablar de la fisiopatología de la sepsis es una enfermedad de gran complejidad. En un intento de cuantificar su gravedad y evaluar su pronóstico se inició una búsqueda de herramientas que pudieran ser útiles para conseguir estos objetivos.

Es por ello que en los años 80 comenzaron a desarrollarse los scores o escalas de severidad, con la intención de tener elementos más sensibles y objetivos que permitieran analizar la gravedad, estratificar a los enfermos y la evaluación de forma más precisa de su pronóstico. El posterior avance en la década de los 90 en el conocimiento de determinadas entidades clínicas, entre las que se encuentra el SDMO, implicó también un avance en la capacidad diagnóstica, descriptiva y de evaluación de estos pacientes. Se crearon principalmente dos tipos de escalas:

- Las **escalas de gravedad**, que tiene como objetivo evaluar la supervivencia.

- Las **índices de disfunción orgánica**, cuyo objetivo era determinar el número de órganos en disfunción y la magnitud de las disfunciones encontradas.

Para poder evaluar la exactitud diagnóstica y pronóstica de estas escalas de severidad y de los índices de disfunción orgánica, se realizan pruebas estadísticas que engloban el análisis de la discriminación y el de la calibración.

- Por *discriminación* entendemos la capacidad de toda escala de clasificar correctamente a los enfermos según una variable dada,

por ejemplo, la mortalidad.

- La **calibración** es una medida de cuanto se acercan las probabilidades predichas por el modelo a las probabilidades reales, en todo el rango de valores que pueda tener una variable dada.

### **Escalas de gravedad**

Las escalas de gravedad fueron diseñadas principalmente para determinar la mortalidad. Las dos más usadas y más ampliamente validadas son el “Acute physiology and chronic health evaluation” (APACHE) (Knaus WA y col., 1985, Knaus WA y col., 1991), en sus distintas versiones (Anexo I) y el “Simplified acute physiology score” (SAPS) (Le Gall JR y col., 1993), tanto el inicial como el desarrollado posteriormente en los años 90.

Nosotros sólo vamos a hablar del APACHE II que es el que hemos utilizado para esta tesis.

El APACHE II, a través de un modelo multivariante, permite cuantificar la gravedad de los pacientes críticos mediante la puntuación de los peores valores obtenidos en las primeras 24 horas de ingreso. Incluye variables fisiológicas (tensión arterial, frecuencia cardiaca, temperatura, creatinina...), datos demográficos (edad), y de comorbilidad del paciente. En función de la puntuación total obtenida es posible estimar la probabilidad de muerte durante el ingreso en el hospital (Vincent JL y col., 2000). Sin embargo, al ser recogidas en el momento del ingreso no evalúan otros factores que ocurren durante la estancia en UCI y que también influyen en la supervivencia (Ferreira FL y col., 2001). Es decir, si tenemos en cuenta que aquellos enfermos con puntuaciones elevadas mueren pronto y que aquellos paciente con scores bajos reciben el alta rápida, tenemos en las primeras 24

horas un subgrupo de enfermos con valores intermedios, que son los que van a permanecer más tiempo en la UCI y en los que se hace necesario contar con otras herramientas para poder estratificarlos mejor. Para ello se crearon nuevos instrumentos de medición denominados índices de disfunción orgánica.

### **Índices de disfunción orgánica**

Los índices de disfunción orgánica en su desarrollo no fijan su objetivo en la mortalidad, sino que están centrados en la morbilidad: en las complicaciones y sucesos que se desarrollan durante la estancia hospitalaria.

Estos índices se constituyeron en función de una serie de variables que reunían características consideradas como “ideales”:

1) Variables continuas, medidas en escala, dado que la sepsis es un proceso dinámico y no un evento estático.

2) Variables que puedan recogerse de manera diaria, ya que el tiempo es un factor fundamental.

3) Variables simples, medibles de manera rutinaria en cualquier centro hospitalario, específicas de cada órgano y, en la medida de lo posible, independientes del tratamiento.

Aunque estos scores surgen inicialmente para describir y cuantificar la función de un órgano y no fueron diseñados para predecir mortalidad, es obvia la relación entre la puntuación obtenida y el riesgo de muerte, y en diversos estudios ha sido demostrada (Ferreira FL y col., 2001). En la actualidad, la posibilidad de establecer un pronóstico objetivo sobre la evolución del paciente constituye una de sus mayores utilidades (Vincent JL y col., 2000).



Los principales índices de disfunción multiorgánica son el SOFA (sequential organ failure assessment score) (Vincent JL y col., 1996), el MODS (Multiple organ dysfunction score) (Marshall JC y col., 1995) y el LODS (Logistic organ dysfunction score) (Le Gall JR y col., 1996). Nosotros solamente vamos a describir el SOFA que es el que hemos utilizado en esta tesis.

El SOFA fue creado por el grupo de trabajo sobre la sepsis de la Sociedad Europea de Medicina Intensiva en 1994 sobre una base de datos internacionales de 1.643 enfermos críticos sépticos a los que se les aplicó el score en las primeras 24 horas de ingreso en UCI (Vincent JL y col., 1996). Los criterios que se utilizaron para definir qué órganos se iban a incluir en este score, qué marcadores cuantificaban la función y cuál era el límite entre fracaso y disfunción, se determinaron por consenso tras distintos estudios. Finalmente se decidió incluir 6 sistemas orgánicos: respiratorio, cardiovascular, hematológico, renal, hepático y neurológico. Cada órgano es una escala que puntúa entre 0-4 de acuerdo al grado de disfunción o fracaso, siendo el 0 el valor asignado para una función normal. El fracaso de un órgano se determina por una puntuación  $\geq 3$ . Se recogen los peores valores de cada día y de esta forma es posible analizar un órgano de forma individual y al mismo tiempo obtener una puntuación global.

El SOFA fue validado inicialmente en una población de UCI mixta, médica y quirúrgica (Vincent JL y col., 1996; Metnitz PG y col., 2001; Cook R y col., 2001; Timsit JF y col., 2002) y desde entonces ha sido validado y aplicado a varios grupos de pacientes (Vincent JL, 1998 y col.; Ceriani R y col., 2003; Vosylius S y col., 2004; Lorente JA

y col., 2009). Es por eso que inicialmente se le llamó: “**sepsis-related organ failure assessment**” (SOFA score), pero después sus iniciales se corresponderán con “**sequential organ failure assessment score**” (Anexo II).

De todos los índices de disfunción orgánica, el SOFA es el score más utilizado. Al usar menos variables que otras escalas, es el más simple de recoger. Además, entendiendo la sepsis como un proceso dinámico, se hace necesario el uso de sistemas o de escalas que permitan la evaluación diaria. El SOFA ofrece esta posibilidad. La evaluación diaria también hace posible describir de forma individual la disfunción o fracaso de un órgano, permitiendo la comparación entre distintos grupos de enfermos, determinar el beneficio de nuevas terapias (Vincent JL y col., 1998), valorar los cambios o los efectos secundarios al tratamiento (Ferreira FL y col., 2001), así como añadir información pronóstica e intentar facilitar la toma de decisiones (Moreno R y col., 1999; Junger A y col., 2002; Kajdacsy-Balla A y col., 2005). Con ello han surgido scores derivados como son, el SOFA máximo (la suma de las peores puntuaciones obtenidas en cada órgano), el delta SOFA (Puntuación máxima SOFA – SOFA ingreso), el SOFA medio (media de todos los SOFAs recogidos) y el SOFA final (Puntuación SOFA en el momento del alta de la UCI). Tanto el SOFA al ingreso como sus scores derivados han sido validados para predecir mortalidad, presentando de buena a excelente capacidad discriminatoria.

En un análisis prospectivo de 1449 pacientes, una puntuación inicial de SOFA máximo mayor de 15 correlaciona con una tasa de mortalidad de 90% (Vincent JL y col., 1998). Los cambios en la

puntuación SOFA a lo largo del ingreso también son útiles en la predicción del resultado. En un estudio prospectivo de 352 pacientes de la UCI dirigido por Ferreira, el aumento del SOFA durante las primeras 48 horas en la UCI, independiente de la puntuación inicial, predijo una tasa de mortalidad de al menos 50%, mientras que una disminución de sus valores se asoció con una tasa de mortalidad en la UCI de sólo el 27% (Ferreira FL y col., 2001). Estos resultados son similares a los encontrados en otro estudio por otro autor (Moreno R y col., 1999).

En un estudio prospectivo observacional de 1340 pacientes con SDMO, Cabré y colaboradores observaron hasta un 100% de mortalidad en los pacientes con edad superior a 60 años, un SOFA máximo total superior a 13 en cualquier de los primeros cinco días de ingreso en la UCI, SOFA mínimo mayor de 10 en todo momento, y una tendencia positiva o sin cambios en el SOFA durante los primeros cinco días de ingreso en la UCI (Cabré L y col., 2005). Sin embargo el estudio de Cabré tiene como limitaciones que es complejo de calcular y que la inclusión de la tendencia del SOFA durante los primeros cinco días, obliga a esperar ese tiempo para poder calcularlo.

A pesar de que la capacidad predictiva del SOFA es buena, presenta una pobre calibración, por lo que no existe suficiente evidencia para un uso individual ni en la toma de decisiones particulares (Afessa B y col., 2007; Minne L y col., 2008). En la actualidad se está intentando mejorar la capacidad predictiva del SOFA, añadiendo otros factores como la edad del paciente y la comorbilidad (Lee KS y col., 2014).

Uno de los objetivos de este estudio es el de analizar la utilidad de la escala SOFA para predecir mortalidad (al ingreso y durante su evolución) en nuestro ámbito de trabajo y valorar si la utilización de la metabolómica para predecir mortalidad podría ayudar a mejorar esta predicción.

### **1.6- BIOMARCADORES EN SEPSIS**

La ausencia de marcadores biológicos que predigan la progresión y la gravedad de la sepsis ha tenido un impacto negativo en nuestra capacidad para identificar y desarrollar eficazmente un tratamiento farmacológico dirigido a la mejora de la morbimortalidad en pacientes críticos con esta enfermedad (Serkova NJ y col., 2011). En los últimos años ha habido un interés creciente en la búsqueda de biomarcadores en la sepsis. Según el grupo de trabajo de biomarcadores en sepsis, su utilización podría tener diversas y muy importantes utilidades en esta patología. Podría indicar su presencia o ausencia, estratificar la gravedad, diferenciar infección bacteriana, viral y fúngica, y discriminar entre una sepsis sistémica y una infección local. Otros usos potenciales de los biomarcadores incluyen su papel en el pronóstico, guiando la terapia antibiótica, la evaluación de la respuesta a la terapia y la recuperación de la sepsis, así como diferenciar sus microorganismos causantes (BG+/BG-), predecir sus complicaciones y el desarrollo de disfunción de órganos (corazón, riñones, hígado o disfunción orgánica múltiple) (Biomarkers Definitions Working Group, 2001; Marshall JC y col., 2009) (Figura 1.13).

FORO INTERNACIONAL DE BIOMARCADORES EN SEPSIS
USOS DE BIOMARCADORES
<b>SCREENING:</b> Diagnóstico e identificación de pacientes con riesgo de presentar mal pronóstico para realizar una intervención temprana.
<b>DIAGNÓSTICO:</b> Establecer un diagnóstico con mayor seguridad, más barato y más rápido que los métodos disponibles hasta ese momento.
<b>ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO:</b> Identificar subgrupos de pacientes dentro de un diagnóstico concreto que se pueden beneficiar de una intervención terapéutica concreta.
<b>MONITORIZACIÓN:</b> Medir la respuesta a la intervención para valorar la dosis y duración del tratamiento.
<b>VARIABLE PRONÓSTICA SURROGADA:</b> Aportar mayor sensibilidad a las variables pronosticas que se miden directamente del paciente (Fisiológicas o de laboratorio) como consecuencia del tratamiento.

Figura 1.13: Usos de los biomarcadores. Modificado de Chong S y col., 2011.

El descubrimiento de biomarcadores no es una empresa fácil y por lo general requiere años de pruebas de validación antes de que estos se puedan aplicar (Koulman A y col., 2009).

Según Afessa y colaboradores, un biomarcador ideal no sólo debe ser sensible y predictivo, se debe medir fácilmente en un fluido biológico y su coste debe ser accesible. Además, la utilidad de un biomarcador en pacientes con enfermedades graves como la sepsis

se basa en su capacidad para diferenciar los cambios sutiles en el fenotipo que pueden predecir diferencias evolutivas. Un ejemplo sería poder predecir aquellos pacientes con SIRS que pueden evolucionar a un SDMO o aquellos pacientes sépticos que desarrollarán una lesión pulmonar aguda de forma precoz. Un biomarcador ideal también va a requerir su validación con indicadores clínicos de gravedad de sepsis que ya estén validados, por ejemplo, la puntuación APACHE o SOFA o con variables de resultado como, por ejemplo, la mortalidad (Afessa B y col., 2007). Es probable que dada la heterogeneidad de los pacientes ingresados en la UCI se necesite más de un biomarcador para poder representar a la sepsis con mayor precisión. Sin embargo, aunque existe esta variabilidad significativa y de difícil control entre los pacientes graves no parece que ésta vaya a ser el motivo que impida identificar biomarcadores útiles. En general, las características que diferencian a los pacientes sépticos no son necesariamente debidas a la propia sepsis, sino más bien debido a los procesos fisiológicos relacionados con la edad, la dieta, la hora del día y el género. Por todo ello, es razonable esperar que exista un perfil o un patrón metabólico que distinga la sepsis y que se pueda desmarcar de otros parámetros que van a dar mayor variabilidad (Serkova NJ, 2011).

En los estudios realizados hasta el momento en pacientes sépticos, se han propuesto una multitud de biomarcadores (más de 100), muchos más que en otros procesos. Por ejemplo, un estudio de pacientes con infarto de miocardio reveló 14 biomarcadores adecuados para el diagnóstico y la determinación del pronóstico (Penttila I y col., 2000) mientras que en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, se identificaron sólo 8 biomarcadores (Tang BL y col., 2008).

Esta gran diferencia en el números de biomarcadores, además de estar relacionada con la compleja fisiopatología de la sepsis que involucra mediadores de la inflamación y otros muchos mecanismos fisiopatológico (Coagulación, complemento, activación del sistema de complemento, apoptosis), se debe también a su naturaleza sistémica. En la sepsis se ven involucrados un gran número de tipos de células, tejidos y órganos diferentes que amplían el número de potenciales biomarcadores candidatos, en comparación con otros procesos de enfermedad que involucran a órganos individuales o son procesos patológicos que están más localizados (Marshall JC y col., 2003).

Pierrakos y Vincent han publicado recientemente una revisión sobre los biomarcadores que hasta ahora se han estudiado en la sepsis. Hasta la fecha se han descrito 178 biomarcadores diferentes, 18 en estudios experimentales, 101 en estudios clínicos y 58 en ambos. En el artículo de Pierrakos, se han evaluado biomarcadores para su uso específico en el diagnóstico de la sepsis; de ellos sólo cinco presentan una sensibilidad y una especificidad superior al 90 % y ninguno de ellos actualmente se utiliza de forma rutinaria en la práctica clínica diaria. Estos biomarcadores son el CD11B, el CD 64, la IL 12, la IP-10 y la PLA2-II soluble. Lo mismo sucede con los biomarcadores que se han estudiado con fines pronósticos y con aquellos que se han estudiado para predecir fallos orgánicos (Pierrakos Ch y col., 2010).

De los muchos marcadores propuestos para la sepsis, las proteínas de fase aguda han sido las más utilizadas en la práctica clínica. Nosotros en esta tesis sólo hemos medido la proteína C

reactiva (PCR) y la procalcitonina (PCT) que son de las que vamos a tratar a continuación.

### **La proteína C reactiva**

La PCR es una de las proteínas más comúnmente utilizada como marcador de respuesta inflamatoria a la infección en la práctica clínica habitual (Póvoa P y col., 2005). Se descubrió por primera vez en 1930 en el laboratorio de Oswald Avery al estudiar pacientes infectados con *Streptococcus pneumoniae* debido a que el suero de estos pacientes en los primeros estadios de la enfermedad contenía una proteína capaz de precipitar el polisacárido C de la pared celular del neumococo. Cuarenta años más tarde, Volakanis y Kaplan identificaron que el receptor de la PCR era la fosfatidilcolina, componente del ácido teicoico de la pared celular del neumococo. La PCR circulante está formada por un pentámero de cinco polipéptidos no glicosilados iguales de 21 kD (206 aminoácidos) cada uno, que se disponen simétricamente alrededor de un poro central adquiriendo un peso molecular total de 118.000 D.

Se sintetiza fundamentalmente en el hígado tras su estimulación por mediadores de la inflamación, como la IL-6. La PCR se une a las fosfocolinas que se localizan en múltiples bacterias y es un constituyente de la esfingomielinina y fosfatidilcolina de las membranas eucarióticas. Sin embargo, estos puntos de unión solo son accesibles para la PCR en células dañadas y apoptóticas.

Tiene actividad tanto antiinflamatoria como proinflamatoria y como consecuencia de estas actividades contrapuestas se postula que actúa en los sistemas de defensa del organismo mientras que



inhibe los efectos nocivos de una reacción inflamatoria exacerbada (Edward TH, 2004).

En individuos sanos su concentración media es de 0.8 mg/l, manteniéndose por debajo de 10 mg/l en el 99% de las muestras (Vigushin DM, 1993). Sus valores en plasma aumentan rápidamente a las 4-6 horas del estímulo, duplicando su valor cada 8 horas y alcanzando un pico máximo a las 36-50 horas que puede ser de hasta 500 mg/l (1000 veces más elevado que los valores de referencia) (Chong S y col., 2011).

La PCR es de bajo valor predictivo para el diagnóstico de sepsis, sin embargo, desempeña un papel importante en la orientación de la terapia antibiótica cuando la infección está localizada (Schmit X y col., 2008). No se ha podido demostrar su correlación con la gravedad de la respuesta del huésped ni es capaz de diferenciar entre supervivientes y no supervivientes de procesos sépticos (Tschaikowsky K y col., 2010, Suberviola B y col., 2012).

En los pacientes ingresados en la UCI, las determinaciones seriadas de PCR pueden ser útiles para el diagnóstico precoz de las infecciones nosocomiales (aumento a niveles  $\geq 5\text{mg/dl}$  o  $\geq 25\%$  del valor previo), ya que es menos costosa y más accesible, sencilla y rápida que la de otros marcadores (Reny JL y col., 2002, Castelli GP y col., 2004). Además, algunos autores han comprobado que la medición diaria tiene un mayor valor diagnóstico que los ascensos térmicos o el aumento de leucocitos en el diagnóstico de infección en el enfermo crítico (Póvoa P y col., 2006).

En un grupo heterogéneo de pacientes críticos, las concentraciones de PCR disminuyen con la resolución de la disfunción

orgánica, en aquellos que sobreviven, pero siguen siendo elevadas en los que no sobreviven. Por su parte, una alta concentración de PCR cuando el paciente se va de alta de la UCI, fue predictor independiente de mortalidad intrahospitalaria (Ho KM y col., 2008).

Sin embargo, uno de los problemas que plantea la PCR es que no es específica de sepsis y se encuentra en muchas enfermedades no infecciosas, tales como enfermedades autoinmunes y reumáticas, los síndromes coronarios agudos, los tumores malignos y después de una intervención quirúrgica (Reinhar K y col., 2006).

### **La Procalcitonina**

La utilización de la PCT en el paciente con infección grave es relativamente reciente ya que se documenta desde 1993. Es un péptido de 116 aminoácidos, prohormona de la calcitonina, descrita como una “hormocina” porque puede ser liberada como hormona por células neuroendocrinas (como las células C del tiroides o las células K pulmonares) o como citocina por una gran variedad de células parenquimatosas, incluyendo hígado, riñón y monocitos (Christ-Crain M y col., 2007). El paso final en la síntesis de la calcitonina es inhibido por citocinas y endotoxinas liberadas durante las infecciones bacterianas, por lo que los valores de PCT están elevados de manera selectiva en pacientes con infecciones bacterianas, tanto en población pediátrica como en adultos, sean inmunocompetentes o inmunodeprimidos (Castelli GP y col., 2004; Muñoz P y col., 2004; Erten N y col., 2004; van Rossum y col., 2004). Las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos) y las citocinas proinflamatorias, especialmente la IL-6 y el TNF $\alpha$ , estimulan la producción de PCT. Ésta

puede aumentar sus niveles en situaciones de sepsis bacteriana rápidamente hasta alcanzar un pico en menos de 24 horas; el incremento se correlaciona con la severidad de la sepsis y puede llegar a niveles incluso 1.000 veces superiores a los basales (Kopterides P y col., 2012; Singh M y col., 2014). Su liberación depende de varios factores: el tipo y la extensión de la infección, el grado de inflamación sistémica, el microorganismo causal, el estado inmunológico del huésped e incluso episodios previos de infección (Charles PE y col., 2008).

En comparación con otras pruebas diagnósticas, la PCT tiene la ventaja de ser más temprana y más específica en infecciones bacterianas importantes (frente a la PCR y a la leucocitosis) y niveles bajos en sangre descartan bacteriemia. En cuanto a sus puntos de corte, es improbable que pacientes con valores menores de 0.5 mg/ml presenten sepsis ni shock séptico, mientras que determinaciones por encima de 2 mg/dl identifican a pacientes de alto riesgo; concentraciones superiores a 10 mg/dl van asociadas a pacientes que presentan fallo de órganos. Los focos de infección localizada sin inflamación sistémica no presentan elevación de los niveles de PCT. Con las técnicas recientes de determinación de PCT se puede excluir la infección bacteriana con un alto valor predictivo negativo (Chirouze C y col., 2002).

Su función biológica es aún desconocida; estudios experimentales sugieren que podría actuar como mediador en la infección bacteriana, como regulador de citocinas y con efecto antiinflamatorio no esteroideo (Casado J y col., 2001; Becker K y col., 2010). Además, amplifica la expresión de los marcadores de superficie de los

neutrófilos e incrementa la producción de citocinas liberadas por leucocitos y de óxido nítrico (Maruna P y col., 2000). Todas estas acciones que presenta la PCT en la cascada de la sepsis la asemejan a una citocina.

Sin embargo, al igual que sucede con la PCR, no es específica de sepsis y existen diversas condiciones que elevan sus niveles en ausencia de infección activa: cirugía mayor, traumatismo, neonatos o shock cardiogénico prolongado. En estos casos se ha propuesto su control y seguimiento como marcador para descartar complicaciones infecciosas. Pese a sus limitaciones, resulta útil para distinguir entre causas infecciosas y no infecciosas causantes de SIRS y para distinguir entre infecciones bacterianas y víricas.

### **1.7- NUEVOS ENFOQUES PARA ENCONTRAR BIOMARCADORES**

Viendo las numerosas limitaciones que tienen los biomarcadores cuando se analizan de forma individual, se han propuesto combinaciones de ellos (panel de biomarcadores) que traten de cubrir los diferentes aspectos de la respuesta del huésped. La combinación de varios biomarcadores tiene la ventaja teórica de mejorar la exactitud del diagnóstico y su utilidad clínica (Gibot S y col., 2012; Rey C y col., 2013; Suberviola B y col., 2013).

Un ejemplo del uso de un panel de biomarcadores lo podemos ver en estudios como el de Lacombe en el que tratan de establecer la correlación entre los niveles de PCT, PCR, neopterin, péptido natriurético auricular, proadrenomodulina, y las escalas predictivas de gravedad en pacientes con neumonía adquirida. Los autores concluyen que los niveles de biomarcadores son superiores en

pacientes con peor pronóstico, según las escalas predictivas de gravedad, así como en aquellos pacientes que van a desarrollar complicaciones (Lacoma A y col., 2013).

Es evidente, pues, que el uso de biomarcadores se debe considerar en el contexto de la rutina clínica y en el manejo del paciente séptico, valorando las alteraciones de estos biomarcadores en relación con factores relacionados con las características del paciente (sobre todo su situación clínica, fallos orgánicos, etc.) y con su evolución.

Uno de los enfoques que hoy en día se está investigando en el paciente crítico para intentar obtener biomarcadores en la sepsis, es la obtención de perfiles metabólicos, mediante la aplicación de la metabolómica. El uso de las nuevas tecnologías «ómicas» y entre ellas, la metabolómica, parece que podrían contribuir a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la sepsis, y así permitir el desarrollo de biomarcadores más específicos (Serkova NJ y col., 2011; Skibsted S y col., 2013). Sin lugar a dudas, la metabolómica podría tener aplicaciones muy significativas en la medicina de cuidados críticos, ya que una enfermedad aguda grave produce alteraciones significativas en la homeostasis química que la metabolómica es capaz de identificar.

#### **1.8- LAS CIENCIAS –ÓMICAS. DEFINICIÓN DE METABÓLOMICA.**

Las ciencias –ómicas son las disciplinas que estudian los eventos e interacciones de las estructuras celulares y sus procesos, desde el DNA hasta la función biológica, es decir desde los genes hasta los metabolitos. Todos los procesos que contribuyen en el

fenotipo son analizados a través de este complejo sistema para intentar comprender los distintos eventos moleculares que se encuentran implicados. La genómica los analiza a través del genoma, la proteómica a través de las proteínas en su globalidad, la transcriptómica mediante la expresión de la génica global y la metabonómica mediante un conjunto de metabolitos o metaboloma. Los metabolitos son moléculas de bajo y de medio peso molecular (< 1.500 Dalton) que intervienen en los procesos celulares y aportan información de cómo está funcionando el metabolismo en un ser vivo. La ausencia o presencia de algunos de estos metabolitos, así como su concentración, puede ser un indicador de enfermedad o de factores de predisposición para ella.

La metabonómica ha sido la última en desarrollarse de las ciencias -ómicas. Es parte del proceso continuo de la biología de sistemas y representa una lectura de la genética y la fisiológica (Xu EY y col., 2009). Los datos que se obtienen a partir de los estudios metabolómicos, nos van a permitir vincular todas las disciplinas "ómicas" (Coen M y col., 2008). Esta idea se basa en un principio que vincula las moléculas de metabolitos pequeños de forma que estos se encuentran en la parte superior de un sistema biológico continuo. Los metabolitos van así a reflejar y magnificar (varios miles de veces) los eventos que ocurren a nivel del genoma, transcriptoma y proteoma, es decir, que los cambios en el proteoma, transcriptoma, o genoma, se reflejan como alteraciones en las concentraciones de metabolitos en muestras de fluidos biológicos y tejido (Wishart DS, 2007; Raamsdonk LM y col., 2001). La metabonómica por tanto, nos ayuda en las observaciones médicas del mundo real, relacionando los datos de otras tecnologías -ómicas que están menos directamente relacionadas

con los resultados biológicos reales que el metabolismo (Figura 1.14).

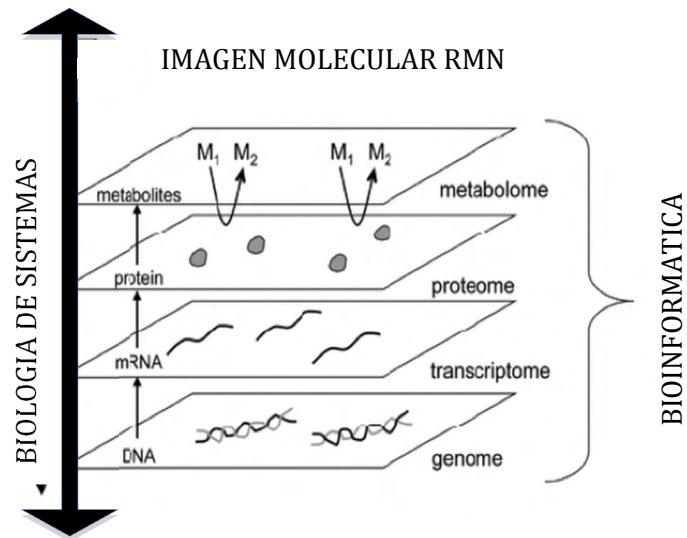


Figura 1.14: Representación esquemática de la relación entre los componentes de un enfoque de la biología de sistemas. Genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. La bioinformática es un elemento clave en la gestión de datos y el análisis de los conjuntos de datos recogidos Adaptado de Xu EY y col., 2009.

Podemos definir la metabonomía como la medida cuantitativa de la respuesta dinámica metabólica de los sistemas vivos ante estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas (Nicholson JK y col., 1999). La metabonomía intenta descubrir cómo se modifica el perfil molecular de un ser vivo frente a ciertos factores externos (Wishart DS, 2007) y relaciona estos cambios en el perfil molecular, con las fases de los sucesos fisiológicos y fisiopatológicos (Tang H y col., 2006).

En paralelo a la metabonomía, una aproximación diferente basada en la obtención del perfil metabólico de muestras biológicas *in vitro* mediante espectrometría de masas acuñó el término “metabolómica” como el análisis comprensivo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema vivo (Fiehn O, 2002). A pesar de las diferencias entre metabolómica y metabonomía, la metodología y filosofía de ambas ciencias son muy similares, convirtiéndolas en disciplinas convergentes muy difíciles de distinguir. Esto ha hecho que los términos “metabolómica” y “metabonomía” sean usados indistintamente en el mundo científico.

### **1.9- PLATAFORMAS ANALÍTICAS PARA REALIZAR ESTUDIOS METABOLÓMICOS: LA RMN.**

Para poder realizar estudios metabolómicos y obtener diferentes perfiles metabólicos se han utilizado técnicas distintas como son la resonancia magnética nuclear (**RMN**); la cromatografía de gas-espectrometría de masas (**CG-EM**); la cromatografía líquida-espectrometría de masas (**CL-EM**). En la siguiente tabla vemos las ventajas e inconvenientes que presentan las diferentes técnicas para el análisis de perfiles metabólicos (Tabla 1.1).

Estas técnicas presentan diferentes grados de sensibilidad en cuanto al análisis de perfiles metabólicos. La representación gráfica de las diferentes sensibilidades podría aproximarse a la estructura de un iceberg (Figura 1.15). Entre las numerosas ventajas de la RMN, destaca la alta reproducibilidad y la eficiencia de muestreo (10-15 minutos de medida por muestra). Otra ventaja añadida es que la muestra no necesita ningún tratamiento físico ni químico previo al



análisis, sólo las condiciones de solución como son la temperatura, el pH y la concentración salina, que deben estar ajustadas para asemejarse al máximo a un fluido fisiológico. Por otra parte, su carácter no destructivo permite que la muestra sea utilizada posteriormente para la realización de otros análisis. Como desventajas, incluye la baja sensibilidad (límite de detección en el orden de milimolar), lo que permite la visualización de solamente los metabolitos más concentrados, es decir, la punta del iceberg. Precisa concentraciones relativamente grandes de la muestra, presenta alto grado de solapamiento de sus señales incluso a alto campo y hay una falta de bases de datos sistematizadas que permitan la identificación unívoca de las señales (Wüthrich K, 2002).

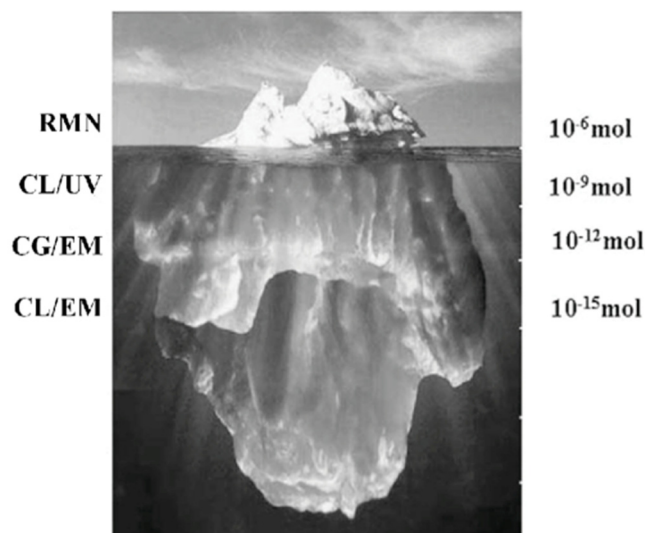


Figura 1.15: Comparación de las sensibilidades relativas de varias herramientas metabolómicas: Resonancia magnética nuclear (RMN); cromatografía líquida ultravioleta (CL-UV); la cromatografía de gas-espectrometría de masas (CG-EM); la cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM). (Adaptada de Summer LW y col., 2002).

**Tabla 1.1 Comparación de las diferentes tecnologías metabolómicas.**

TECNOLOGIAS METABONÓMICAS		
TECNOLOGIA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
RMN	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cuantitativa</li> <li>-No destructiva</li> <li>-Rápida (2-3 min/muestra)</li> <li>-No requiere derivatización</li> <li>-No requiere separación</li> <li>-Detecta todas las clases orgánicas</li> <li>-Permite la identificación de productos químicos nuevos</li> <li>-Tecnología robusta</li> <li>-Puede usarse para obtener imágenes de metabolitos (fMRI)</li> <li>-Gran cantidad de programas y bases de datos para identificar metabolitos</li> <li>-Compatible con líquidos y sólidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Poco sensible</li> <li>-Instrumentación cara</li> <li>-No puede detectar sales ni iones inorgánicos</li> <li>-No puede detectar compuestos no protonados</li> <li>-Requiere muestras mayores (0,5 ml)</li> </ul>
CG-EM	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tecnología robusta</li> <li>-Relativamente barata</li> <li>-Cuantitativa (con calibración)</li> <li>-Requiere muestras de tamaño moderado</li> <li>-Buena sensibilidad</li> <li>-Gran cantidad de programas y bases de datos para identificar metabolitos</li> <li>-Detecta la mayoría de moléculas orgánicas y algunas inorgánicas</li> <li>-Excelente reproducibilidad de la separación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La muestra no es recuperable</li> <li>-Requiere derivatización de la muestra</li> <li>-Requiere separación</li> <li>-Lenta (20-30 min/muestra)</li> <li>-No se puede usar para imágenes</li> <li>-La identificación de compuestos nuevos es difícil</li> </ul>
CL-EM	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sensibilidad potente</li> <li>-Tecnología muy flexible</li> <li>-Detecta la mayoría de moléculas orgánicas y algunas inorgánicas</li> <li>-Requiere una muestra de tamaño mínimo</li> <li>-Puede usarse para obtener imágenes de metabolitos (MALDI)</li> <li>-Puede usarse sin separación (inyección directa)</li> <li>-Tiene potencial para detectar la mayor parte del metaboloma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La muestra no es recuperable</li> <li>-Poco cuantitativa</li> <li>-Instrumentación cara</li> <li>-Lenta (20-30 min/muestra)</li> <li>-Reproducibilidad y resolución de la separación pobres (frente a CG)</li> <li>-Instrumentación menos robusta que la RMN o CG-EM</li> <li>-Programas y bases de datos de identificación de metabolitos limitados</li> <li>-La identificación de compuestos nuevos es difícil</li> </ul>

RMN, resonancia magnética nuclear; CG-EM, cromatografía de gas-espectrometría de masas; CL-EM, cromatografía líquida-espectrometría de masas. Adaptado de Wishart DS. 2008).

Por otro lado, los estudios de EM normalmente necesitan que los metabolitos se separen de la muestra, antes de su detección o que los metabolitos se puedan modificar químicamente para hacer que sean volátiles, como para utilizarlos en el CG-EM (Goodacre R y col., 2004).

En nuestro trabajo hemos utilizado la espectrometría de RMN como plataforma para el análisis de perfiles metabólicos. La RMN es un método relativamente moderno en comparación con otras espectroscopias. Data de 1946, año en el que Purcell en la Universidad de Harvard y Bloch y Packard en la Universidad de Stanford, obtuvieron los primeros resultados y elaboraron la teoría. El primer espectro con señales separadas para una molécula orgánica se obtuvo en 1951. Desde entonces esta técnica no ha dejado de desarrollarse y convertirse en una herramienta analítica indispensable para la medicina.

La aplicación de la RMN al análisis de muestras biológicas permite detectar un amplio número de metabolitos si se encuentran en suficiente abundancia natural y contienen átomos de hidrógeno. Por lo tanto, en una muestra típica (un fluido biológico en una investigación médica), todas las moléculas que contengan hidrógeno (casi todos los metabolitos) darán un espectro de  $^1\text{H}$  RMN, siempre y cuando estén presentes en concentraciones por encima de los límites de detección. El espectro que se obtiene, es la superposición del espectro de todos los metabolitos de la muestra, comúnmente llamado "la huella" (Duarte FI y col., 2002; Amaral FM y col., 2005).

La ampliación de su aplicación, así como la atención que los científicos prestan a esta técnica, puede atribuirse tanto a la elevada

especificidad y versatilidad de la técnica, como a la mejora en el rendimiento y la disponibilidad de los aparatos.

Las ventajas de la RMN hacen de ella una técnica inigualable para el estudio de grandes series de muestras, estudios epidemiológicos, y detección de huellas metabólicas con valor clasificatorio, diagnóstico, pronóstico y/o predictivo. Todas estas características hacen de la RMN una técnica ideal para el estudio de la metabolómica y la búsqueda de perfiles metabólicos diferenciales entre grupos con el objetivo de identificar posibles biomarcadores y establecer nuevas hipótesis.

Para poder comprender la base metodológica empleada en este estudio vamos a describir en un anexo los conceptos físicos básicos de la RMN (Anexo III).

#### **1.10- BASES TÉCNICAS Y TEÓRICAS DE LA RMN.**

El espectrómetro de RMN tal y como se observa en la Figura 1.16 consta de cuatro partes:

1. Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
2. Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
3. Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
4. Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

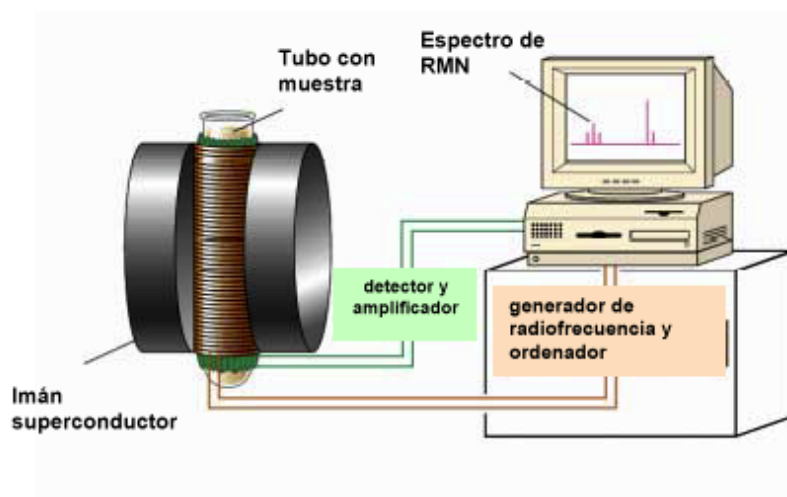


Figura 1.16: Espectrómetro de RMN y sus componentes.

### TIEMPOS DE RELAJACIÓN, APANTALLAMIENTO Y DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

Los parámetros principales utilizados para tratar los datos de RMN para el análisis de muestras biológicas son los **tiempos de relajación** y el **desplazamiento químico**. Vamos a describirlos a continuación.

La **relajación** describe la vía física mediante la cual los núcleos perturbados vuelven a su estado de equilibrio original. Clásicamente, la vuelta al equilibrio tras un pulso de radiofrecuencia (RF), se describía como un proceso de relajación en el que la magnetización transversal iba desapareciendo a la vez que la magnetización longitudinal iba recuperando el valor que presentaba antes de la aplicación del pulso de RF. Sin embargo hoy sabemos que existen sistemas de espín en los que tras la aplicación de RF y durante la vuelta al equilibrio, hay un momento en el que se pierde toda la

magnetización transversal, y sin embargo la magnetización longitudinal aún no ha recuperado su valor de equilibrio. Esto se explica porque existen dos procesos de relajación diferentes, la denominada **relajación transversal** (también conocida como **espín-espín**), caracterizada por una constante de tiempo  $T_2$ ; y la denominada **relajación longitudinal** (también conocida como **espín-red**), que vendrá caracterizada por una constante de tiempo  $T_1$ .

La pérdida de la **magnetización longitudinal** tras un pulso de RF, se produce por una ocupación igual del nivel de energía fundamental y el nivel de energía excitado. La restauración completa del equilibrio existente antes del pulso requerirá la recuperación de la magnetización longitudinal. Por lo tanto la constante de tiempo  $T_1$  define el tiempo que tarda el sistema en recuperar su posición de equilibrio después de una excitación (Figura 1.17).

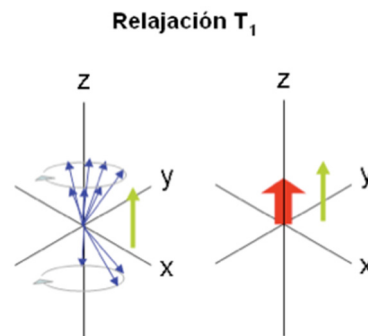


Figura 1.17: Tiempo de relajación longitudinal.  
Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

La **relajación transversal** también recibe el nombre de relajación espín-espín, ya que es el resultado del desfase de los diferentes momentos magnéticos individuales como consecuencia de

su diferente velocidad de precesión, debida a la interacción de espines nucleares (Figura 1.18). Cada momento magnético individual genera un momento magnético local que afectará a los núcleos vecinos. El resultado será que cada núcleo se verá sometido al campo externo ( $B_0$ ) y a la contribución de los campos locales ( $B_{loc}$ ) de sus vecinos. Para los diferentes núcleos, esta contribución se sumará o restará del campo  $B_0$ , en dependencia de las orientaciones relativas que se establezcan en los momentos magnéticos nucleares. Por lo tanto no todos los núcleos experimentan el mismo campo magnético y precesan a diferentes velocidades angulares.

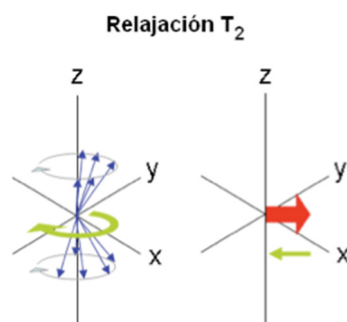


Figura 1.18: Tiempo de relajación transversal.  
Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

Aunque de una forma menor las inhomogeneidades del propio campo magnético también van a influir en la relajación transversal. Es por eso que en el momento de la preparación de un experimento es muy importante la homogeneidad del campo y así obtener la máxima información de los diferentes tiempos de recuperación característicos de cada sistema de espín.

La relajación longitudinal no puede completarse hasta que no

desaparezca la magnetización transversal. Por consiguiente T1 es siempre superior a T2. Por tanto, dado que la medición de T2 es más rápida que la longitudinal (los tiempos de adquisición de datos para las soluciones acuosas puras son de aproximadamente 3 y 40 minutos respectivamente) y que además los datos de relajación transversa pueden contener más información, a veces sólo se informa de los datos de relajación transversa.

Como ya hemos comentado, el valor de los tiempos de relajación va a estar influenciado por la naturaleza física y química del entorno que rodea a los núcleos y por la naturaleza de estos. Hasta ahora se ha descrito el concepto de resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético, pero en realidad los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Los electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo (Figura 1.19).

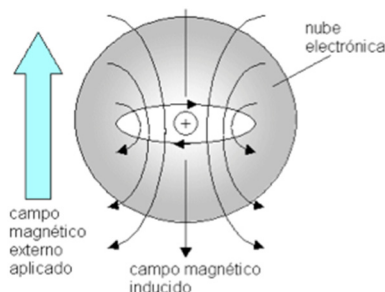


Figura 1.19: Representación del campo magnético inducido por la carga de los electrones. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>



En cualquier molécula la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este **apantallamiento** es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor. En la siguiente fórmula vemos cual sería el campo magnético efectivo ( $H_{ef}$ ), donde al campo magnético aplicado ( $H_0$ ) habría que restarle el campo inducido por los electrones o campo local ( $H_{loc}$ ).

$$H_{ef} = H_0 - H_{loc}$$

Si todos los protones de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes y, por tanto, se encuentran diferentemente protegidos o apantallados. Esto hace que los efectos de protección o **apantallamiento**, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón sean diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN (Figura 1.20). Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.

Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de **desplazamientos químicos** [unidades  $\delta$  o partes por millón (ppm)].

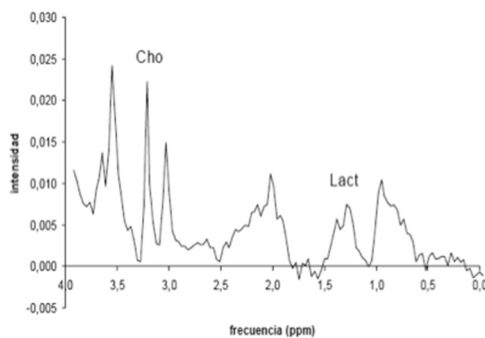


Figura 1.20: Espectro en el que se identifica la diferente posición de un  $^1\text{H}$  incluido en un grupo metil del lactato (Lact) respecto otro incluido en la molécula de colina (Cho), influido por el efecto del apantallamiento. Adaptado de Majos C. Espectroscopia por resonancia magnética de protón en el diagnóstico de tumores cerebrales.

El **desplazamiento químico** de un núcleo concreto en una molécula proporciona información sobre la manera en la que el átomo de ese núcleo está unido a los otros átomos de esa molécula. Describe la dependencia de los niveles de energía magnética nuclear respecto al entorno electrónico de una molécula.

En la práctica es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe con suficiente exactitud para distinguir protones individuales ya que las absorciones sólo varían en unas pocas milésimas. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia

que se añade a la muestra. La diferencia en la intensidad del campo magnético necesario para la resonancia de los protones de la muestra y de los protones de referencia se puede medir con mayor exactitud. En la siguiente fórmula se observa cómo se mide la frecuencia de resonancia de un compuesto teniendo en cuenta la frecuencia de resonancia de un compuesto de referencia.

$$\delta \text{ (ppm)} = (f_i - f_{\text{ref}}) / (2 \pi B_0) \cdot 10^6$$

donde  $f_i$  es la frecuencia de resonancia del compuesto que se quiere medir y  $f_{\text{ref}}$  es la frecuencia del compuesto que se añade como referencia.

En los espectros de protón el intervalo de desplazamiento químico es reducido. El intervalo normal se encuentra entre 0 y 12 ppm, usando como referencia el TMS (tetrametilsilano). (Figura 1.21).

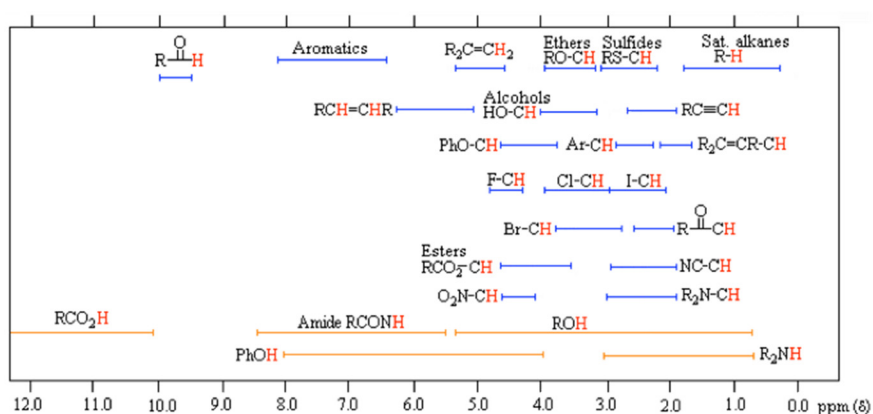


Figura 1.21: Desplazamientos químicos para el  $^1\text{H}$ . Las referencias pertenecen a muestras de solución de  $\text{CDCl}_3$ . La escala  $\delta$  (ppm) es en relación al TMS a  $\delta=0$ =ppm. Los amplios intervalos que se observa al final del gráfico son típicos de las entidades formadoras de puentes de hidrógeno (OH y NH). Estas señales son dependientes de la concentración y la temperatura. La figura está adaptada a partir de [www.cem.msu.edu](http://www.cem.msu.edu).

En el espectro de RMN de un compuesto orgánico, los picos espectrales aparecen en las posiciones de absorción, también llamadas posiciones de resonancia o frecuencias de precesión, para los distintos núcleos de la molécula. El eje de las x del espectro tiene como unidades las ppm, y el eje de las y es una escala de intensidad (Figura 1.22).

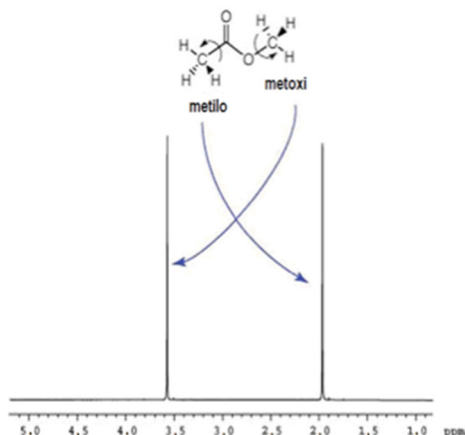


Figura 1.22: Espectro de la  $^1\text{H}$  RMN del acetato de metilo. Muestra dos picos: uno en  $\delta=2,1$  para los tres protones metilo equivalentes y otro a  $\delta=3,7$  para los tres protones metoxi equivalentes. Figura adaptada a partir de <http://orgchem.colorado.edu>.

La altura del pico es proporcional al número de núcleos de  $^1\text{H}$  de la molécula con el mismo desplazamiento químico.

El desplazamiento químico es un parámetro relevante especialmente en la **RMN de alta resolución**. Entre todas las técnicas de RMN, la de alta resolución ofrece una elevada sensibilidad y utiliza campos magnéticos muy elevados que permiten la observación de parámetros espectrales muy detallados. Estos dos factores son de hecho muy importantes para asignar los componentes y medir su

proporción de intensidades. Desde un punto de vista cualitativo, en términos de linealidad y selectividad, la RMN es definitivamente el mejor método analítico de acuerdo con la linealidad, puesto que la intensidad de resonancia es estrictamente proporcional al número de núcleos resonantes a una frecuencia concreta. La selectividad también es buena, dado que la RMN diferencia todos los isótopos de los elementos e incluso para un isótopo determinado, es capaz de proporcionar diferencias medibles de desplazamiento químico para distintos entornos químicos. Desde el punto de vista cuantitativo, la sensibilidad depende de la proporción señal/ruido, que puede considerarse aceptable cuando es superior a diez. La precisión y la exactitud pueden determinarse a partir de las desviaciones estándar medias en las réplicas.

#### **Free Induction Decayment (FID) y Transformacion de Fourier (TF).**

La señal que se obtiene cuando los núcleos vuelven a su estado de equilibrio inicial, es una señal digitalizada compleja en forma de senoide que se denomina Free Induction Decayment (FID) (Figura 1.23). En el caso del  $^1\text{H}$  de muestras biológicas, la señal que se recibe es una mezcla de agua y de los metabolitos en disolución (con menor intensidad estos dada su menor concentración). Por tanto para poder observar las señales de los metabolitos es necesario realizar la supresión de la señal del agua mediante métodos electrónicos que consisten en someter a la muestra a una RF de baja intensidad de forma mantenida y cuya frecuencia sea igual a la del pico del agua. A este método se le conoce como presaturación.

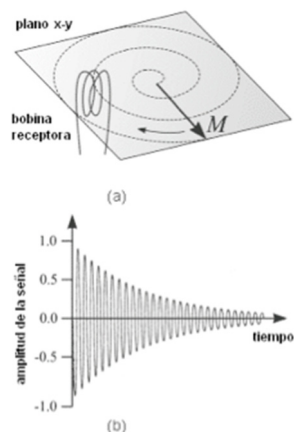


Figura 1.23: Free Induction Decayment. La señal que emite el campo magnético cuando los núcleos vuelven a su estado de equilibrio inicial la recoge la bobina receptora, en forma de sinusoide. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>.

Para el procesamiento y la obtención de espectros de las señales de RMN es necesario que se realice una transformación de la señal FID obtenida, que se denomina transformación de Fourier (TF), que consiste en transformar la señal en función del tiempo en una señal en función de la frecuencia (Figura 1.24).

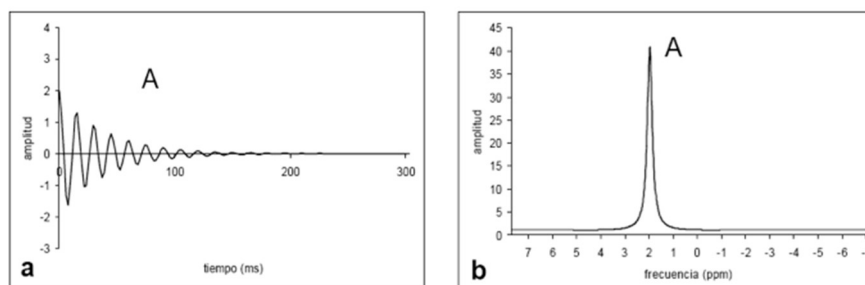


Figura 1.24: Proceso de formación del espectro. La figura a) muestra una FID que cuando se realiza la TF se obtiene la figura b), que nos da una representación del espectro según la cantidad de señal obtenida. Espectros obtenidos mediante un programa que permite simular espectros (programa jMRUI).

### 1.11- PARTES DE UN ESTUDIO METABOLÓMICO.

El estudio metabolómico por RMN consta de varias fases (figura 1.25): Tras la adquisición de los espectros por RMN, será necesario realizar un pretratamiento o preprocesado de las señales para evitar varianzas propias de la adquisición y hacer los análisis posteriores más robustos. Una vez preprocesados los datos espectrales, podremos comenzar el análisis estadístico supervisado y no supervisado. Todas estas fases del análisis se realizan mediante un programa informático.

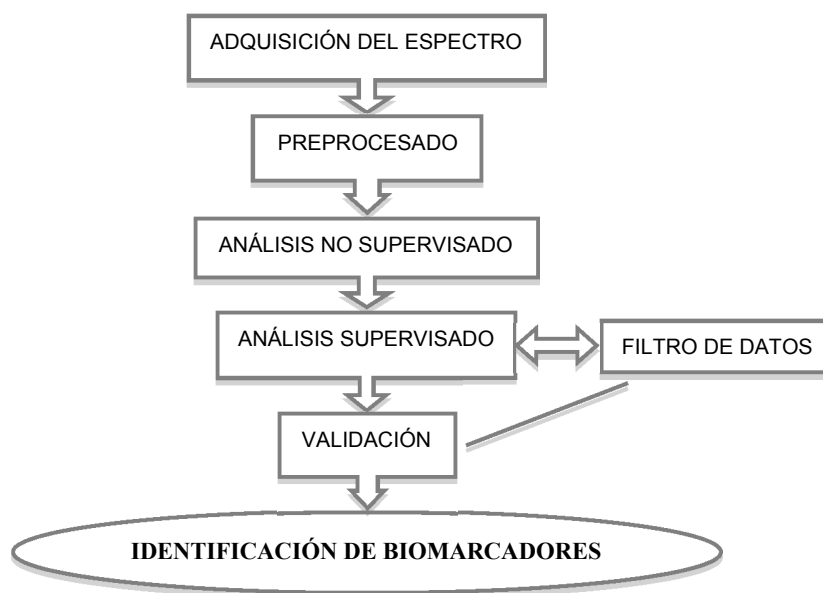


Figura 1.25: Partes de un estudio metabolómico. (Tomado de Izquierdo JL, 2011a)

### **1.11.1- Pre-tratamiento.**

Los métodos de pre-tratamiento del espectro están diseñados para reducir las diferencias y posibles influencias externas que puedan interferir en el análisis de los datos.

#### **Exclusión de regiones espectrales**

El primer paso generalmente implica la exclusión de las regiones del espectro, que, o bien contienen información no reproducible o no contienen información metabólica (Ross A y col., 2007). Por un lado, la anchura espectral al adquirir los datos de RMN es generalmente mayor que la necesaria para digitalizar todos los desplazamientos químicos asociados con los metabolitos endógenos. Por lo tanto, las regiones espectrales de los extremos, en las que no aparecen señales de ningún metabolitos endógenos son excluidas. Por otra parte, regiones espectrales muy dependientes de los parámetros experimentales, tales como las regiones del agua y de las señales del metabolito de referencia, que en nuestro estudio es el 3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H] propionato sódico (TSP), también se excluirán del análisis.

#### **Corrección de la línea base**

La corrección de la línea base es un paso esencial en el objetivo de obtener espectros de RMN de alta calidad para el análisis estadístico posterior. Líneas de base ondulantes pueden hacer muy difícil el proceso de identificación de picos, así como introducir errores significativos en las medidas cuantitativas de las señales metabólicas (Xi Y y col., 2008).



### Desplazamiento de señales

Muchas variables como el pH, la temperatura, la concentración de sales, la concentración relativa de iones específicos, etc., pueden influir en la localización de una determinada señal. Estos cambios no afectan a todos los picos por igual, incluso cuando éstos pertenezcan a un mismo metabolito. Los métodos de análisis multivariante o de reconocimiento de patrones trabajan comparando las variaciones de intensidad entre las muestras para una misma posición del espectro, consecuentemente los resultados de estos análisis se verán fuertemente afectados por pequeños desplazamientos en las posiciones de los picos. Los procedimientos automáticos para corregir esta influencia se pueden dividir en dos categorías: disminución de la resolución espectral (Binning o Bucketing) y la detección y alineamiento de picos (Figura 1.26).

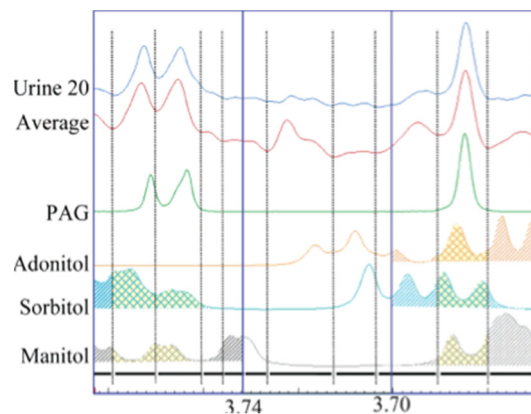


Figura 1.26: Binning de un espectro de orina.  
Tomado de Dieterle F y col., 2006.

Con el binning, el espectro se subdivide en múltiples regiones llamadas “bins” o “buckets” y el área espectral contenida en cada una

de esas regiones es integrada a un único valor que se utilizará como representación del espectro original. A través de este procedimiento se mitigarán los errores motivados por pequeños desplazamientos en la posición de los picos (Holmes E y col., 1994). El alineamiento de picos es una segunda alternativa para corregir los desplazamientos de las señales sin reducir la resolución espectral (Veselkov KA y col., 2009).

### Normalización

La normalización de los espectros es un paso necesario para controlar las posibles variaciones de la concentración de las muestras analizadas (Figura 1.27). Si los espectros son almacenados utilizando un diferente número de adquisiciones (scans) o por dos dispositivos diferentes, los valores absolutos del espectro variarán. Uno de los métodos más comunes de normalización para espectros de RMN es la normalización por el área espectral (Craig A y col., 2006). Se realiza dividiendo cada variable entre la suma del valor absoluto de todas las variables para una muestra concreta. El resultado es un vector de área unitaria (área=1) “bajo la curva” (Wise BM y col., 2006).

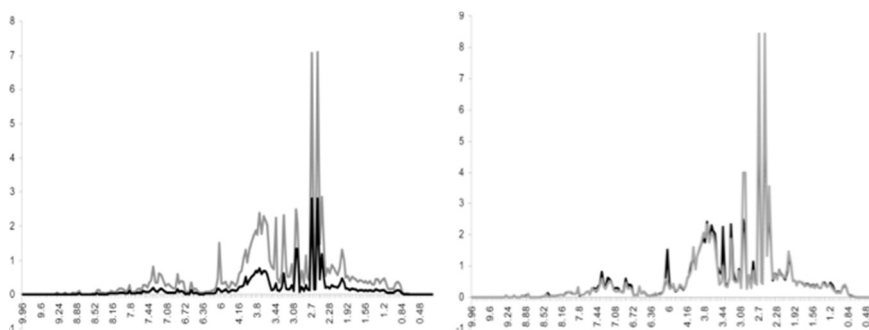


Figura 1.27. Normalización de los espectros. En el lado izquierdo, dos espectros antes de la normalización (uno de color gris y otro de color negro) y en el lado derecho después de realizarla. Tomado de Lindon JC, 2007)

### 1.11.2- Análisis de los datos. Métodos quimiométricos.

La variabilidad entre las diferentes muestras es muy difícil de detectar mediante la observación directa de los espectros de RMN y hace necesaria la introducción de técnicas estadísticas que permitan evaluar esas diferencias en relación a las variables que se conocen de cada muestra, entre las que se encuentran desde los datos clínicos del individuo hasta los parámetros instrumentales de adquisición del experimento de RMN.

Los métodos de análisis estadístico multivariante proporcionan un medio para poder evaluar los perfiles espectrales obtenidos mediante RMN de alta resolución y reconocer patrones químicos en los espectros de RMN de muestras complejas. Estos métodos analíticos reciben el nombre de métodos **quimiométricos**.

La quimiometría se define como la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar los procedimientos de medición y para proporcionar el máximo de información analizando datos químicos (Winning H y col., 2008).

Las herramientas de estadística multivariante o de reconocimiento de patrones proporcionan un método adecuado para detectar la información relevante en cuanto a diferencias o similitudes entre los perfiles metabólicos. Generalmente, en primer lugar se emplean los métodos de análisis no supervisado, que permiten evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo. Seguidamente, los modelos supervisados, que utilizan la información sobre la clasificación de las muestras para maximizar la separación entre grupos, aportan información de gran utilidad para la identificación de potenciales biomarcadores

característicos de cada grupo.

Entre estos métodos, las técnicas más populares son el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el análisis discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) (Nicholson JK y col., 2008).

### **Análisis de componentes principales**

**El PCA** es una técnica exploratoria no supervisada, es decir, no requiere conocimiento previo de las muestras, para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de los grupos de muestras (Trygg J y col., 2007).

El PCA funciona descomponiendo la matriz  $X$  (que contiene el conjunto de datos original) como producto de dos matrices más pequeñas, que se llaman matrices de **carga** y **puntuación**. La matriz de carga ( $\mathbf{V}$ ) contiene información sobre las variables: está compuesta por varios vectores que son los componentes Principales (CP), que se obtienen como combinaciones lineales de las variables  $X$  originales. La matriz de puntuación ( $\mathbf{U}$ ) contiene información sobre los objetos (Figura 1.28). Cada objeto se describe en términos de sus proyecciones en los CP (en lugar de las variables originales) según vemos en la siguiente ecuación:

$$X = VT * U$$

El PCA permite decidir cuántos CP se deben extraer (el número de componentes significativos, es decir, la dimensionalidad del modelo). Cada nuevo CP obtenido aumenta aún más la cantidad de información (varianza) que se explica mediante el modelo. Sin embargo, normalmente los primeros cuatro de los cinco CP explican más del 90% de la varianza X.

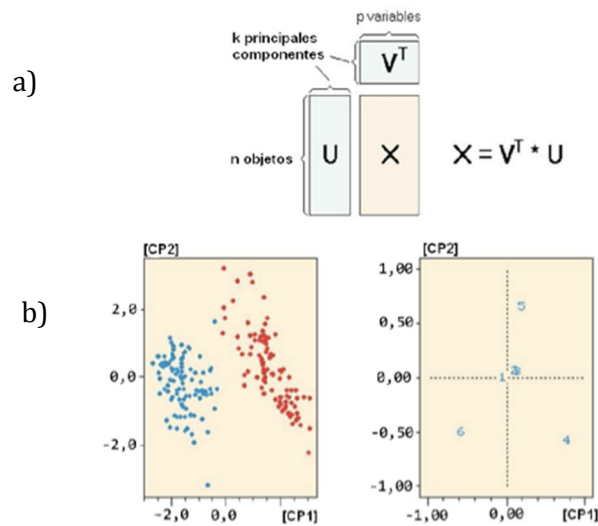


Figura 1.28: Matrices de carga y puntuación. a) Matrices V y U ortogonales. La matriz V es la matriz de carga y la matriz U es la matriz de puntuación. b) Gráficos en relación con el PCA: 1) el gráfico de puntuación/puntuación (parte izquierda) y 2) el gráfico de carga/carga correspondiente (parte derecha). Figuras adaptadas de Lohninger H, 1999).

Una particularidad de este método es que los CP son ortogonales entre ellos, de manera que la representación gráfica de los datos en el espacio bidimensional definido por los dos primeros CP proporciona una proyección de los datos multidimensionales conocido como gráfico de puntuaciones de las muestras en función de los

componentes principales (score plot), en el que pueden apreciarse las agrupaciones y tendencias entre las muestras. De manera análoga, en el gráfico de las puntuaciones de las variables en función de los componentes principales (loading plot), definen la relación entre las variables que integran la matriz de datos original con las mismas direcciones que las del score plot, lo que permite identificar fácilmente, de forma gráfica, cuáles son las variables responsables de las tendencias observadas entre las distintas muestras. El PCA es el método de elección para obtener una visión global de la variabilidad entre muestras, y su correspondiente score plot es el gráfico generalmente utilizado para la identificación de posibles tendencias o agrupaciones que se den dentro de los grupos de muestras y que sean debidas a otras variables, distintas de la variable de estudio (p. ej., edad, sexo, estilo de vida, etc.). Este tipo de análisis es también de gran utilidad para la identificación de outliers o muestras aberrantes, que son las que se desvían significativamente del perfil metabólico que muestran, de forma global, el resto de muestras incluidas dentro de los grupos del estudio. Otro gráfico muy utilizado para la identificación de outliers dentro de los grupos incluidos en el estudio es el gráfico  $T^2$  de Hotelling. En este tipo de gráficos se pueden identificar todas las muestras que se encuentran fuera del intervalo de confianza del 95% en el modelo no supervisado (Ringnér M, 2008).

### **Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales**

El Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA) es un método de regresión lineal supervisada basado en la combinación de una matriz de datos observables (datos espectrales) y una matriz de valores cualitativos. El objetivo del PLS-DA es mejorar

la separación entre grupos de observaciones, utilizando el conocimiento previo que se tiene de las muestras. De esta forma se reduce la influencia de las variables no relacionadas con la clasificación y además se obtienen modelos más precisos y fácilmente interpretables. Los modelos obtenidos permitirán posteriormente predecir la clase a la que pertenecerá una muestra sin necesidad de estar previamente clasificada (Trygg J y col., 2007).

La Figura 1.29 proporciona un resumen esquemático de este método. Al extraer las variables latentes T (grupo de descriptores) y U (variables dependientes) de los factores y las respuestas de las muestras, respectivamente, los factores T obtenidos (también conocidos como valores X) se utilizan para predecir los valores Y de la U. Por otro lado, los valores Y predichos se utilizan para construir predicciones en relación con las respuestas (Randall DT, 2004).

Por lo tanto, en este caso, las variables latentes son seleccionadas basándose en la explicación contemporánea de los descriptores y los predictores. Estas variables latentes (VL) son similares a los CP calculados mediante el PCA (el primero representa a la cantidad más grande de información seguido por el resto de componentes que representan la varianza residual máxima). Respecto a los CP, las últimas VL son las máximas responsables de las variaciones aleatorias y el error experimental. Las cantidades óptimas de VL, deben ser aquellas que predigan la respuesta en Y evitando el ruido. Esto se va a determinar con el cálculo de la varianza residual en la predicción.

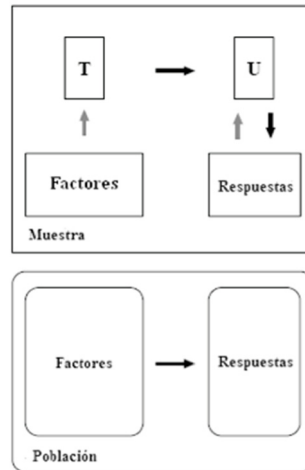


Figura 1.29: Esquema del funcionamiento del modelo PLS-DA. Adaptado de Randall DT 2004.

En este tipo de modelos supervisados, basados en un conocimiento previo de las propiedades de las muestras, es muy importante evaluar la calidad de los análisis realizados y la fiabilidad de los modelos obtenidos (Westerhuis y col., 2008).

Para ello, existen distintas aproximaciones que permiten la validación de los modelos de clasificación. Una de ellas es el test de permutación, que consiste en el cálculo de nuevos modelos de clasificación obtenidos tras una asignación aleatoria de las variables de clasificación entre las distintas muestras del modelo. El resultado esperado es que la capacidad predictiva de los modelos aleatorios sea significativamente diferente a la obtenida para el modelo original, es decir  $p < 0.05$ .

Otra aproximación consiste en la denominada validación cruzada, en la que se vuelve a construir el mismo modelo, pero esta vez dejando fuera un porcentaje del conjunto de muestras originales.



Existen varios tipos de pruebas para realizar la validación cruzada, una de ellas es la de Venetian Blinds que consiste en repetir el modelo  $n$  veces dejando cada vez fuera el 10 % de las muestras de forma aleatoria. Los resultados se plasman en dos curvas ROC, la curva del modelo con todas las muestras y la curva de entrenamiento. La curva de entrenamiento debe aproximarse a la curva del modelo pero siempre será inferior. Para evaluar numéricamente la capacidad predictiva del modelo utilizamos los estadísticos  $R^2Y$  que mide la bondad de ajuste del modelo a los datos originales y  $Q^2$  que da una idea de su capacidad predictiva. Además podemos medir la calidad de las clasificaciones binarias observadas y predichas en base al modelo obtenido. Para ello se utiliza el coeficiente de correlación de Matthews, que tiene en cuenta los verdaderos y falsos positivos. Un coeficiente de +1 es la predicción perfecta, mientras que -1 indica un desacuerdo total entre lo observado y lo predicho.

Los enfoques quimiométricos como el PCA y el PLS-DA, por sí mismos, no permiten la identificación directa o la cuantificación de los compuestos. En otro enfoque de la metabolómica (**metabolómica cuantitativa** o **creación de perfiles diana**) el foco de atención se centra en intentar identificar y/o cuantificar tantos compuestos de una muestra como sea posible.

Para ello, una vez identificadas las señales más relevantes en la discriminación entre grupos y los metabolitos responsables de las diferencias, se realiza de nuevo una integración de los espectros de RMN, pero esta vez dirigida específicamente a las señales identificadas. A partir de las intensidades obtenidas para cada señal se comprueba, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, si la

mayoría de las variables siguen una distribución normal. En caso positivo, y para confirmar la importancia estadística univariante de las variables identificadas, se utiliza la prueba paramétrica Student para la comparación de dos medias independientes. En los casos en los que la mayoría de las variables no sigan una distribución normal, se emplea una prueba no paramétrica para la comparación de dos medias independientes, la prueba de Mann-Whitney. El objetivo de este análisis es poder descartar cualquier variable que, de manera individual, no contribuya de manera significativa a la discriminación entre grupos.

Entre las regiones identificadas como relevantes para la discriminación, a partir del modelo multivariante, pueden existir: regiones del espectro que, presentando desplazamientos químicos distintos, correspondan al mismo metabolito, y regiones que correspondan a metabolitos distintos pero cuyos niveles en suero varían de manera conjunta (p.ej., metabolitos implicados en las mismas rutas metabólicas). Por tanto, en los casos en que las regiones identificadas como relevantes son numerosas, y con el fin de simplificar el modelo de predicción, se realiza un análisis de regresión logística que permite identificar entre todas las variables seleccionadas, cuáles aportan información esencial y cuáles están aportando información redundante.

Una vez identificados los metabolitos que juegan un papel importante en la separación entre grupos, y confirmada su relevancia estadística, la última etapa en un estudio de metabolómica consiste en la interpretación biológica de las variaciones encontradas entre los distintos perfiles metabólicos. Esto se logra normalmente comparando los datos de espectroscopia (conseguidos a partir de las muestras de

RMN) con la biblioteca de referencia de datos espectroscópicos obtenidos usando compuestos puros (Serkova NJ y col., 2011). Una de las base de datos que se utiliza para la asignación de los metabolitos en los espectros de RMN es la *Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca>), de libre acceso.

De forma complementaria, también es necesaria la búsqueda en la literatura de información relacionada que permita situar los metabolitos encontrados en un contexto clínico adecuado.

### **1.12- DISTINTOS ENFOQUES MÉDICOS EN METABOLÓMICA**

Dentro de los estudios metabolómicos existen varios enfoques que tienen diferentes aplicaciones médicas.

1- Un primer enfoque consiste en la medida de la *huella metabólica* en un entorno biológico determinado. Normalmente dispondremos de un espectro de picos obtenido por resonancia magnética nuclear. El objetivo es comparar los espectros de distintas muestras aplicando métodos de reconocimiento de patrones, sin necesidad de conocer la naturaleza de los metabolitos involucrados. De esta forma veríamos como se agrupan las muestras, y nos permitiría separar individuos sanos, de individuos enfermos, y al mismo tiempo podríamos definir grupos a los que asignamos diversos factores de riesgo, en relación a la enfermedad estudiada. Una vez hemos clasificado las muestras, surge una pregunta evidente: ¿cuáles son las regiones del espectro que provocan la agrupación de las muestras? Si somos capaces de asociarlas a determinados metabolitos, estaremos identificando los biomarcadores que intervienen en el proceso (Goodacre R, 2004).

Existen diversos estudios relacionados con enfermedades cardiovasculares (Brindle y col., 2002; Kirschenlohr y col., 2006), diabetes (Fiehn O y col., 2010), alteraciones metabólicas en neonatos (Arn PH, 2007; Wikoff WR y col., 2007), daño hepático inducido por alcohol (Manna SK y col., 2011) y cáncer (Chan EC y col., 2009; Mamas M y col., 2011).

2- Un segunda enfoque es el *perfilado metabolómico*, que consiste en seleccionar, *a priori*, el conjunto de metabolitos con los que queremos trabajar, en general los relacionados con una determinada ruta, y analizar cómo evolucionan. Normalmente es posible identificarlos y cuantificarlos de forma relativa. En el caso en que conozcamos qué metabolitos son clave en el proceso, podremos particularizar el tratamiento de la muestra y utilizar la técnica de medida más conveniente para identificarlos y cuantificarlos de forma absoluta. Esta aproximación se denomina *metabolic targeting* y se suele aplicar cuando tenemos bien definido el experimento y conocemos los marcadores involucrados en el proceso que estudiamos (Goodacre R, 2004). A través de este tipo de estudios podemos identificar a aquellos pacientes que van a responder favorablemente a una terapia (Clayton TA y col., 2009; Nicholson JK y col., 2011) y cuáles son los que poseen una mayor probabilidad de desarrollar efectos adversos. Esta información resulta de gran utilidad para la estratificación de pacientes y puede contribuir significativamente al desarrollo de terapias más eficaces y seguras.

3- Un tercer enfoque es el desarrollo de nuevas terapias a partir de la información que ofrece la metabolómica. La identificación de las enzimas responsables de las alteraciones específicas observadas en el metaboloma de las células tumorales permite el desarrollo de terapias dirigidas, mucho más selectivas y eficaces (D'Alessandro A y col., 2012; Nicholson JK y col., 2011).

### **1.13- METABOLOMICA Y CUIDADOS INTENSIVOS**

La metabolómica cuantitativa ofrece una nueva y poderosa herramienta para el desarrollo de biomarcadores de numerosas enfermedades, sobre todo de aquellas con un inicio rápido y altas tasa de mortalidad, como son la sepsis grave y el shock séptico (Stringer KA y col., 2011). El uso de la espectrometría de RMN para la realización de estos estudios va a permitir identificar y cuantificar cientos de metabolitos en muestras biológicas y de esta forma poder caracterizar una enfermedad como la sepsis de un modo que nunca antes había sido posible, con su perfil metabólico. Además, obtener una huella o perfil metabólico para mostrar la progresión de la enfermedad de un paciente individual en poco tiempo (Lacy P, 2011). Sin embargo, en el momento actual existen pocos estudios de metabolómica en pacientes de UCI.

El primer estudio que se publicó sobre sepsis y metabolómica fue un estudio experimental del grupo de Zhong-ying Li y col., 2009. Se analizó la sangre de 40 ratas con sepsis de origen abdominal y se comparó sus muestras de sangre con un grupo control de 20 ratas sanas. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis metabolómico en diferentes periodos temporales, a las 6, 12, 18 y 24 horas, y se analizó además parámetros sanguíneos de función

hepática, renal y respiratoria. Estos parámetros no empezaron a modificarse hasta la muestra de las 12 horas, pero no se alcanzó la significación estadística hasta las 18 horas, en comparación con la sangre de las ratas del grupo control, siendo todo esto congruente con los resultados del examen histológico de las muestras del pulmón y riñón. Sin embargo, en los perfiles metabólicos, se observaron alteraciones claramente ya en la muestra de sangre de las 12 horas. Los resultados sugieren que los cambios en el suero de los perfiles metabólicos de las ratas se detecta antes que la disfunción de órganos, y por lo tanto, es posible establecer un modelo predictivo de mal pronóstico a las 12 horas por RMN basado en un enfoque metabólico. El modelo predictivo metabólico que obtuvieron, se sustentaba en seis metabolitos: hidroxibutirato, lactato, alanina, acetato, acetoacetato, y formato. Estos metabolitos se encuentran involucrados en el metabolismo energético. Las diferencias entre el grupo de ratas sépticas y ratas sanas. Los niveles de estos metabolitos entre el grupo de ratas séptica y de ratas sanas cambia de forma significativa, siendo más llamativa la diferencia en aquellas que no sobreviven (Lin ZY y col., 2009).

En España el primer trabajo experimental que hay publicado, es del grupo de Izquierdo-García y col. El objetivo de este trabajo era obtener un perfil metabólico medido por RMN en muestras de sangre, tejido pulmonar y lavado bronco alveolar de ratas sépticas, que fuera útil para el diagnóstico. Basándose en la información integral de los metabolitos del tejido pulmonar, lavado bronco alveolar y suero se obtuvo un modelo predictivo de diagnóstico de sepsis con una especificidad del 100%. Este modelo incluía creatina, formato,

acetoacetato, mioinositol y fosfoetanolamina (Izquierdo-García y col., 2011b).

En humanos los trabajos en metabolómica y sepsis son escasos y todos ellos muy recientes. Destacan trabajos como el de Schmerler y col. que realizaron un estudio metabolómico para obtener un perfil metabólico que diferenciara a pacientes de SIRS no infeccioso y pacientes de sepsis, utilizando para ello CL-MC. Los resultados de este trabajo mostraron que los metabolitos de los grupos acilcarnitinas y glicerofosfatidilcolinas podían ser biomarcadores altamente específicos y sensibles en pacientes graves con niveles de procalcitonina elevados, para diferenciar sepsis sistémica de inflamación no infecciosa (Schmerler D y col., 2012). Estos metabolitos, podrían no sólo reflejar los lípidos inducción por los componentes bacterianos, sino que también traducen la inflamación producida por la baja regulación de ciertas proteínas (por ejemplo, palmitoil carnitina transferasa o acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media, que participan en el transporte de ácidos grasos y la oxidación). Además de estos cambios en las acilcarnitinas y el glicerofosfolípidos en el plasma, Weber y col. identificaron alteraciones similares en hígado y pulmón en la enfermedad neumocócica. Junto a estas alteraciones también observaron que existían alteraciones del metabolismo del ácido araquidónico, ácido biliar, y de la biosíntesis del colesterol, siendo esta último en particular, dependiente del serotipo del patógeno. En concreto, esta respuesta metabólica se identificó como específica para infecciones pulmonares producidas por estreptococo y mediadas por la neumolisina (Weber M y col., 2012). Esto indica que la metabolómica puede contribuir indirectamente a la identificación de patógenos.

En un estudio realizado por Slupsky y col. identifican microorganismos en orina mediante RMN en pacientes con infección por *Streptococcus pneumoniae*. Los perfiles metabólicos que obtenían en la orina de estos pacientes diferían significativamente de la obtenida en infecciones de otros agentes patógenos. Esto podría llevar a guiar el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad en base a una sola muestra de orina (Slupsky CM y col., 2009; Slupsky CM, 2010).

Un elemento importante que se necesita para establecer la utilidad clínica de la metabolómica en pacientes críticos es la asociación entre los metabolitos y un marcador de resultados clínicos como podría ser una escala de gravedad o la mortalidad (Afessa B y col., 2007).

Mickiewicz y col. realizaron los dos primeros estudios que comparan datos clínicos y puntuaciones de escalas de gravedad, tanto en sepsis pediátrica y en adultos, con datos de metabolómica para predecir mortalidad. En ambos estudios llegaron a la conclusión de que el modelo metabolómico era mejor en la identificación precoz de mal pronóstico (Mickiewicz B y col., 2013; Mickiewicz B y col., 2014).

Esta tesis sigue la misma línea que los trabajos de Mickiewicz y col., ya que se compararán los perfiles metabólicos que se obtengan con la escala SOFA, para predecir la mortalidad.



## **2-. HIPÓTESIS**



Hasta el momento, la búsqueda de biomarcadores que predigan el pronóstico del paciente de sepsis con valores altos de acierto y de una forma reproducible, no ha tenido éxito. Esta situación nos hace plantearnos la necesidad de buscar un biomarcador o un conjunto de ellos que puedan contribuir a la construcción de un modelo robusto y sólido de predicción.

La hipótesis principal del estudio es que el perfil metabólico del paciente séptico con mal pronóstico es diferente al de buen pronóstico. Por tanto, la determinación de la composición metabólica en muestras de suero y/o orina dentro de las primeras 24 horas tras el ingreso podría ser la base para establecer un predictor de mortalidad a los 30 días. Igualmente, la variación del perfil metabólico del paciente con el tiempo podría constituir un indicador adicional de la buena evolución del paciente en la UCI. Consideramos que la herramienta analítica más potente para la determinación del fenotipo metabólico diferencial es la RMN.

La hipótesis secundaria es que el poder predictivo del modelo metabólico combinado con la escala SOFA puede presentar una mejora notable del pronóstico del paciente de sepsis.



### **3-. OBJETIVOS**



En relación con lo anteriormente expuesto, los objetivos de esta tesis son los siguientes:

- 1- Describir la incidencia, las características epidemiológicas y la mortalidad a los 30 días de los pacientes sépticos en la UCI del Hospital Clínico de Valencia.
- 2- Obtener el perfil metabolómico en muestras de suero y orina de pacientes de UCI con diagnóstico de sepsis grave o shock séptico a cuatro puntos temporales mediante  $^1\text{H}$  RMN.
- 3- Analizar la posibilidad de estratificar los pacientes según las definiciones actuales de sepsis grave vs shock séptico en base a su perfil metabólico.
- 4- Construir, mediante técnicas quimiométricas de análisis discriminante, un modelo predictivo de mortalidad a 30 días en base a la información metabolómica obtenida tanto en suero como en orina. Evaluar la potencia predictiva del modelo utilizando técnicas estadísticas como la validación cruzada.
- 5- Comparar la exactitud diagnóstica del modelo metabolómico obtenido frente al de la escala SOFA.





## **4.- MATERIAL**



#### **4.1- DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se ha realizado un estudio abierto prospectivo observacional de cohortes en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Las muestras analizadas provienen de pacientes atendidos en la UCI durante el periodo comprendido entre octubre de 2010 hasta octubre de 2011.

#### **4.2- ÁMBITO DE ESTUDIO**

El Hospital Clínico Universitario de Valencia se ubica en el centro de la ciudad, junto a la Facultad de Medicina. Es un centro terciario dotado de 623 camas, que atiende una población de 350.000 habitantes.

La UCI es una unidad polivalente principalmente médica que consta de 16 camas de cuidados críticos. Se nutre tanto de pacientes que ingresan desde urgencias médicas, como de otros servicios del

propio hospital y de pacientes que provienen de hospitales de primer y segundo nivel por ser su centro de referencia.

El estudio metabolómico, de muestras de orina y suero obtenidas de los pacientes de UCI, se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica. Este laboratorio es una unidad mixta que pertenece a la Unidad Central de Investigación en Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y a la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

### **4.3- POBLACIÓN DE ESTUDIO**

#### **Muestreo poblacional**

Para el estudio de la cohorte se ha realizado un muestreo poblacional de un año de duración. En él se han incluido todos los pacientes diagnosticados de shock séptico o sepsis grave que ingresaron en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia y que cumplían los criterios de inclusión.

#### **Criterios de inclusión**

Pacientes mayores de 18 años diagnosticados de sepsis grave o shock séptico, de acuerdo a los criterios de la Conferencia de Consenso del American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine de 2001 (Levy M y col., 2003).

Los pacientes y/o sus familiares próximos han sido informados de los fines del estudio así como de la confidencialidad de la información y del carácter voluntario de su participación. La firma del

consentimiento informado fue condición “*sine qua non*” para la inclusión del paciente en este estudio (Anexo IV y V).

**Criterios de exclusión:**

Se excluyeron del estudio los pacientes que cumplían alguno de los siguientes criterios:

- Pacientes con una esperanza de vida inferior a 24 horas.
- Pacientes con una edad mayor de 85 años o menor de 18 años.
- Pacientes procedentes de otro hospital con una estancia allí mayor de 24 horas.
- Pacientes procedentes de la sala de hospitalización con un cuadro séptico evolucionado (más de 24 horas).
- Pacientes quirúrgicos.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes que no otorgan su consentimiento.
- Pacientes que han precisado RCP avanzada.
- Pacientes diagnosticados de sepsis grave o shock séptico después de 24 horas de ingresados en UCI.
- Pacientes con insuficiencia renal crónica anúrica.

**Tamaño de la muestra**

Basándonos en el trabajo previo de Luis Cabré y col, (Cabré L et al, 2005) en el que se describe un modelo predictivo de mortalidad en base a los valores de la escala SOFA, su tendencia y la edad, se espera que la prueba de SOFA tenga valores de sensibilidad y especificidad superiores al 75 %. Por todo ello, se considera que una diferencia clínicamente relevante en la exactitud diagnóstica correspondería a un test con sensibilidad del 100% y especificidad del 99 %.

Para esta diferencia y con un nivel de significación del 0.05 (nivel de confianza 95%), se ha calculado con el programa Epidat (Análisis Epidemiológico de Datos tabulados 3.13.1, Galicia, España), que un tamaño muestral entre 50 y 70 pacientes proporcionaría una potencia de entre 88 y 96%.

## **5.- MÉTODOS**





### **5.1- PROTOCOLO DEL ESTUDIO.**

Diariamente se revisaban todos los pacientes ingresados en la UCI, para detectar aquellos con sospecha de infección que cumplieran criterios de sepsis grave o shock séptico en el momento del ingreso o durante las primeras 24 horas de su estancia en la Unidad. La inclusión en el estudio se realizó por consenso de dos investigadores con acceso a todos los datos clínicos del paciente, incluidas las pruebas microbiológicas y de imagen radiológica diagnóstica. A los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión se solicitó el consentimiento informado al enfermo o a sus familiares.

Una vez obtenido el consentimiento del paciente, se inició el protocolo de recogida de muestras. En la Figura 5.1 se muestra esquemáticamente el protocolo seguido para la recogida de muestras.

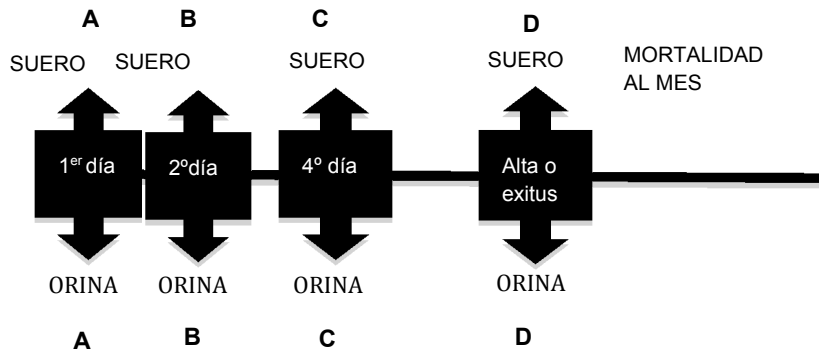


Figura 5.1: Esquema del protocolo del estudio.

Dentro de la rutina clínica diaria de toma de muestras, se recogieron muestras de suero y orina para el análisis metabólico de cada paciente incluido en el estudio. Las primeras muestras (muestra de ingreso /suero A, orina A), se obtuvieron durante las primeras 24 h de estancia del paciente en la UCI. La muestra de orina se obtuvo a partir de la primera muestra tras sondaje vesical o en su defecto tras pinzar la sonda durante 20-30 minutos y despinzar posteriormente para recoger la orina retenida. La orina recogida se almacenó en tubos de 1,5 ml (Eppendorf®, Oldenburg, Alemania) previamente identificados con un código alfanumérico consecutivo. El código se estableció de forma que se identificase inequívocamente cada muestra pero que no fuese posible relacionarla con el paciente. La muestra de suero se recogió en un tubo seco de 5 ml, junto con las muestras de la analítica diaria del paciente extraídas según los protocolos del servicio. La suero para el estudio metabólico, se centrifugó para la extracción del suero, durante 12 minutos a 3000 revoluciones por minuto en una centrifuga Eppendorf® 5702, situada en el propio servicio de cuidados intensivos. Finalmente, la muestra

de suero se recogió en un tubo de 1.5 ml y fue identificado con un código similar al empleado para las muestras de orina. Inmediatamente después de su recolección, las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la medición mediante RMN.

Se realizó una segunda extracción de suero y de orina el segundo día de ingreso (orina B, suero B), una tercera el cuarto día (orina C, suero C) y por último el día que fue dado de alta el paciente de la UCI o se preveía su fallecimiento en menos de 24-48 horas (orina D, suero D).

## **5.2- VARIABLES ESTUDIADAS Y RECOGIDA DE DATOS.**

Se diseñó una hoja de recogida con soporte físico en papel para la recolección de los datos (Anexo VI), que fue transcrita a un formulario de base de datos diseñado al efecto en programa Excel:Mac 2008.

La variable dependiente o de resultado principal del estudio es la mortalidad a los 30 días. Es una variable cualitativa nominal dicotómica (sí/no).

Además se recogieron las siguientes variables independientes:

- 1- Datos demográficos: Edad (medida en años): Variable cuantitativa continua. Sexo: Variable cualitativa nominal dicotómica.
- 2- Procedencia del paciente: Urgencias, o bien sala de hospitalización /otro hospital. Variable cualitativa nominal.
- 3- Días de ingreso: Variable cuantitativa continua.

4- Diagnóstico de ingreso: Sepsis grave o shock séptico, de acuerdo con los criterios de la Conferencia de Consenso del American College of ChestPhysicians y la Society of Critical Care of Medicine de 2001. Variable cualitativa nominal dicotómica.

5- Foco de origen de la sepsis. Pulmonar, abdominal, urinaria, partes blandas, hueso, sistema nervioso central y bacteriemia. Cada una de ellas se recoge como una variable cualitativa nominal dicotómica.

6- Escalas de gravedad y fallos orgánicos:

a) APACHE II al ingreso.

b) SOFA al ingreso (SOFA A), el segundo día de ingreso (SOFA B) y el tercero (SOFA C).

Ambas variables son cuantitativas continuas.

7- Factores de riesgo: Diabetes Mellitus (DM), Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), Insuficiencia cardiaca crónica clase III-IV según la clasificación funcional de la New York Heart Association, hepatopatía crónica, tratamiento crónico con corticoides (> 40 mg/día) u otros tratamientos inmunosupresores, VIH, neutropenia (<500/ml), trasplante de órganos sólido, neoplasia sólida y/o neoplasia hematológica con/sin trasplante de medula ósea, alcoholismo (> 80 gr /día), tabaquismo. Todas ellas medidas por separado como variable cualitativa nominal dicotómica (Si/No).

8- Tratamientos administrados en la UCI: Hemodiafiltración venovenosa continua y/o hemodiálisis convencional. Variable cualitativa nominal dicotómica (Si/No).

9)- Ventilación mecánica o ventilación no invasiva. Variable cualitativa nominal dicotómica (Si/No).

10- Datos analíticos al ingreso, el segundo día, el cuarto y el día de alta o exitus.

a) Recuento y fórmula leucocitaria: hemoglobina (Hb), leucocitos totales y plaquetas.

b) Datos de bioquímica sanguínea: glucosa, urea, creatinina, bilirrubina total, troponina I.

c) Medición de PCT y PCR.

d) Gasometría sanguínea: lactato y pH.

Todas ellas medidas como variables cuantitativas continuas.

11- Datos microbiológicos:

a) Resultados de los hemocultivos, urinocultivos, cultivos de esputo o aspirado traqueobronquial, antígenos urinarios, cultivos de muestras en otras localizaciones. Variables cualitativas nominales no dicotómicas.

### **5.3- TÉCNICAS DE MEDIDA DE LAS VARIABLES**

#### **Recuento y fórmula.**

En el laboratorio de hematología del Hospital Clínico se determinaron el hemograma junto con el recuento leucocitario y plaquetar, utilizando un autoanalizador de tipo Technicon H-3-RIX de Bayer. La hemoglobina se determinó en mg/dl y el número de leucocitos y plaquetas en  $10^9$  cel/L.

### **Bioquímica.**

En el laboratorio de Bioquímica del propio hospital, se utilizaron diferentes técnicas para la obtención de las distintas determinaciones:

Empleando los sistemas Roche/Hitachi cobas c 501 y mediante un test de cinética calorimétrica en suero, se han obtenido las determinaciones cuantitativas de creatinina (mg/dl), urea (mg/dl) y bilirrubina total (mg/dl).

Para la determinación cuantitativa de la glucosa (mg/dl) en suero se han empleado los sistemas Roche/Hitachi cobas c 501 mediante un test fotométrico. La medición se obtuvo en mg/dl.

La medición de la PCR en suero se ha realizado mediante los sistemas Roche/Hitachi cobas c 501 utilizando tests inmunturbidimétricos. La medición se realiza a través de la aglutinación que se produce por partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-CRP de la PCR humana, valorando el precipitado alcanzado mediante turbidimetría. El resultado se expresa en mg/l.

Se ha utilizado el test de la electroquimioluminiscencia Elecsys BRAHMS PCT, mediante el inmunoensayo "ECLIA" en los inmunoanalizadores Elecsys y cobas e 601 para la determinación cuantitativa de la PCT en suero. La medición de la PCT se realizó en ng/ml.

Para la medición de gases en suero se ha utilizado el analizador ABL800 FLEX en el que se determinó el lactato (mmol/l).

#### 5.4- ESPECTROSCOPIA DE RMN. INSTRUMENTALIZACIÓN Y DETERMINACIONES

Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro de RMN Bruker Avance DRX 600, operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 600,13 MHz. El equipo está dotado con una sonda QXI 5mm de cuádruple resonancia  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$  una unidad enfriador BCU Xtreme y un robot muestreador termostatizado SampleJet. (Figura 5.2)

Las muestras han permanecido almacenadas en un ultracongelador (REVCO) a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta el mismo instante de la preparación de la muestra para su medida. El tiempo de preparación (Figura 5.3) de cada muestra fue inferior a 5 min. Para la preparación de las muestras se emplearon los siguientes reactivos: óxido de deuterio 99.8% ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Cortecnet, Francia), sal sódica del ácido 3'-trimetilsililpropionato-2, 2, 3, 3- $\text{d}_4$  (TSP) (Sigma-Aldrich, EEUU), fosfato sódico monohidratado monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , Fluka, Alemania) y fosfato sódico heptahidratado dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Fluka, Alemania).

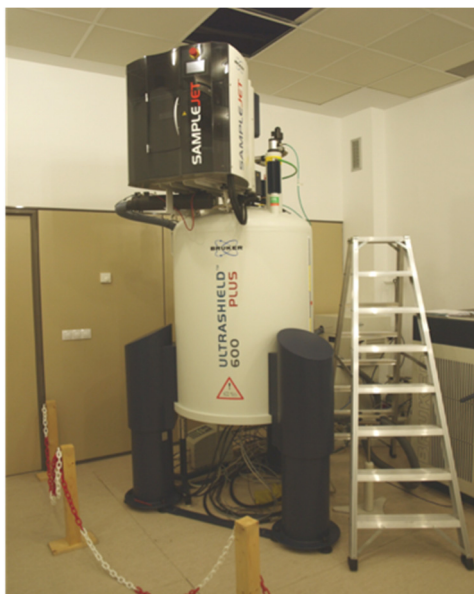


Figura 5.2: Espectrómetro de RMN Bruker Avance 600 MHz.

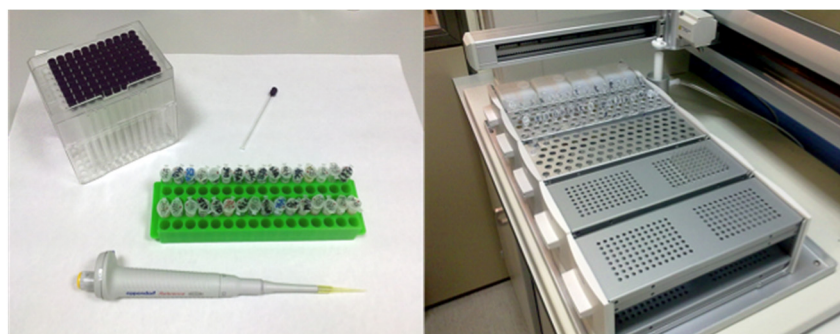


Figura 5.3: Preparación de las muestras antes de su medición.



**Muestras de orina.**

El procedimiento general de preparación de las muestras de orina consistió en la adición de 80  $\mu\text{L}$  de una mezcla tampón pH 7 con referencia interna y  $\text{D}_2\text{O}$  (tampón fosfato sódico monohidratado monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )/fosfato sódico heptahidratado dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), TSP 31mM y 10% v:v de  $\text{D}_2\text{O}$ ) a 420  $\mu\text{L}$  de muestra en un tubo de 5 mm de alta resolución de RMN. La concentración final del TSP en la muestra es 4.96 mM. La homogeneidad del campo magnético se consiguió mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad, usando un experimento 1D con presaturación de agua en modo interactivo. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se ha mantenido constante en 310K. Para todas las muestras se ha adquirido un experimento de un pulso simple con presaturación de agua, con 256 repeticiones y 65.000 puntos. La presaturación del agua se usó durante 1 segundo a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. La anchura espectral para todos los espectros fue de 8000 Hz para el espectro de  $^1\text{H}$ . Antes de aplicar la transformada de Fourier a los datos, multiplicamos la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 0.3 Hz. El desplazamiento químico de los picos se referenció al pico de la referencia interna de TSP 0 ppm para todos los espectros.

**Muestras de suero.**

La preparación para las muestras séricas consistió en la adición de 45  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  a 455  $\mu\text{L}$  de muestra en un tubo de 5 mm de alta resolución de RMN. La temperatura nominal de la muestra durante

las mediciones se ha mantenido constante en 310 K. Los experimentos adquiridos para todas las muestras han sido los mismos que en el caso de las muestras de orina.

### **Adquisición de la señal de RMN.**

La determinación del perfil metabolómico de las diferentes muestras se realizará mediante la obtención de espectros de RMN de alta resolución de los siguientes tipos:

#### 1.- Espectros $^1\text{H}$ monodimensionales (1D):

a) Empleamos un experimento simple de dos pulsos tipo PRESAT, que utiliza un pulso de radiofrecuencia relativamente largo y de baja potencia para saturar selectivamente la frecuencia específica del agua, y un segundo pulso no selectivo de  $45\text{-}90^\circ$  para excitar el resto de las moléculas. Esta secuencia de pulso es especialmente adecuada para muestras acuosas y para la cuantificación de las moléculas presentes en la muestra. Preferimos emplear experimentos de pulso único sin filtrar tipo PRESAT sobre secuencias de pulso filtrada, como Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) o espectroscopia efecto Overhauser nuclear (NOESY) para evitar posibles efectos sobre la intensidad de la señal ajena a la cantidad de metabolitos presentes.

#### 2.- Espectros bidimensionales:

a) homonucleares de correlación total  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  (TOCSY) que permiten la identificación de los sistemas de espín asociados a cada molécula.

b) heteronucleares de correlación  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  a un enlace (HSQC) que por una parte posibilitan la asignación más precisa de resonancias gracias

a la mayor dispersión de los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$ , y por otra proporcionará información adicional para la identificación de los diferentes compuestos.

### **Procesamiento de la señal.**

Todos los espectros han sido procesados usando MestReNova 5.3 (MestrelabResearch S.L., Santiago de Compostela, España), transferidos a MATLAB 7.6 R2012a (The MathWorks Inc, Natick, EEUU) y analizados usando rutinas de análisis de datos desarrolladas por el laboratorio. El espectro se dividió en dos partes, la región de desplazamientos químicos comprendida entre 0.50 y 4.50 ppm (región alifática), y entre 5.20 y 10.00 ppm (región aromática). A cada espectro se le aplicó la corrección de fase, un ajuste de la línea de base mediante una función lineal de 2º grado y la referencia del desplazamiento químico. En el caso de las muestras de orina el desplazamiento químico se ajustó a la señal de la molécula de TSP (0 ppm), y para las muestras de suero, a la señal doblete del  $\text{CH}_3$  de la molécula de alanina (1.46 ppm). El espectro se troceó en segmentos de 0.005 ppm para reducir el volumen de puntos, y finalmente, se normalizó al área total alifática para eliminar diferencias entre concentraciones totales de metabolitos. Los datos del espectro troceado se centraron previamente al análisis multivariable.

Para la asignación de las señales empleamos el programa Chenomx NMR suite versión 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canadá), la base de datos de libre acceso *Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca>) y la literatura disponible (Nicholson JK et al, 95). Para mejorar la asignación de los picos cuando el

solapamiento de éstos fue muy alto, se empleó la ayuda de secuencias especiales de asignación 2D (tipo TOCSY correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y HSQC correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) que fueron adquiridas para un grupo seleccionado de muestras.

### **5.5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO POBLACIONAL EMPLEADO EN EL ESTUDIO.**

Toda la información demográfica y clínica de los pacientes se ha recogido de forma anonimizada en una base de datos tipo EXCEL (Microsoft Excel: Mac 2008), para posteriormente llevar a cabo a cabo el análisis estadístico mediante el programa SPSS (Statistical Packaged for social sciences software), versión 20 para MAC y el programa Epidat 3.1 (Análisis Epidemiológico de Datos, Galicia, España). Hemos aceptado como nivel de significación estadística un valor de  $p \leq 0.05$ .

#### **Estadística descriptiva.**

En primer lugar se ha realizado un análisis descriptivo de las características de la cohorte recogida. Para evaluar la normalidad de la distribución de los datos, a las variables continuas se les ha realizado un test de Kolmogorov-Smirnov o de Shapiro-Wilk (cuando el número de casos era inferior a 30). Las variables continuas normales ( $p \geq 0.05$ ) se describen con la media  $\pm$  la desviación estándar ( $X \pm SD$ ). Las variables cuantitativas continuas no normales se describen con la mediana y el rango intercuartílico [P25-P75]. A su

vez, las variables cualitativas se resumieron mediante su frecuencia y su porcentajes sobre 100 (%) asociado. Los intervalos se calcularon con una confianza del 95%.

### **Estadística analítica poblacional.**

Para analizar la población comparando los dos grupos que resultan de la variable dependiente (exitus/supervivientes), se han realizado diversas pruebas estadísticas:

Con las variables categóricas hemos aplicado el test  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher, (si los efectivos esperados eran menores de 5), y para las variables continuas se contrastó la hipótesis de una distribución normal (de forma similar al estudio de una única variable). En función de los resultados, se realizó el test t de Student (cuando la distribución es normal) o el test de Mann-Whitney (cuando la distribución no lo es).

Se ha aplicado idéntico procedimiento en la comparación entre el grupo de pacientes diagnosticados con sepsis grave y aquellos con diagnóstico inicial de shock séptico.

### **Análisis de regresión lineal y ajuste del modelo predictivo de regresión logística.**

Para estudiar la relación entre la variable dependiente (Y) (mortalidad a los 30 días) con las variables independientes o predictoras ( $X_1, X_2, \dots, X_k$ ) se ha efectuado un análisis de regresión

lineal, que también ha permitido desarrollar una ecuación lineal con fines predictivos.

La ecuación para esta recta de regresión sería:

$$Y = a + bX$$

donde  $a$  es la ordenada en el origen, es decir el valor de  $Y$  cuando  $X$  vale cero, y  $b$  la pendiente de la recta, que representa el incremento que experimenta el valor de  $Y$  por cada unidad que se incrementa el valor de  $X$

El objetivo del análisis de regresión lineal es predecir los valores de la variable respuesta en función de los valores de la variable independiente.

Primero se ha realizado este análisis con los valores SOFA construyendo una recta para cada paciente. La ordenada en el origen es el valor SOFA inicial, SOFA A y la pendiente está definida por la evolución de los valores SOFA B y SOFA C.

Con los datos obtenidos de la ecuación de regresión lineal se ha ajustado a un modelo de regresión logística multivariable, mediante el Método Secuencial por Pasos hacia adelante en base a la razón de verosimilitud ( $p$  entrada 0.05). Este análisis permite pronosticar la probabilidad de que ocurra o no un suceso, mediante la valoración de la contribución de cada una de las variables independientes sobre la variable de resultado.

### **Evaluación de la exactitud diagnóstica del modelo SOFA.**

La calidad del modelo como método de predicción se ha evaluado midiendo su poder de discriminación y su calibración.

La capacidad de **discriminación** es una medida de lo bien que el modelo clasifica a los individuos en las dos categorías: muertos y vivos. Las medidas utilizadas para evaluar la capacidad discriminante son la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y las razones de verosimilitud para positivos y para negativos, la *odds ratio* diagnóstica y el área bajo la curva ROC. Para calcular estos índices, se ha determinado el punto de corte óptimo como aquel que corresponde al punto más cercano de la curva ROC al extremo superior izquierdo del gráfico, considerando, por simplicidad, que tiene el mismo impacto un resultado falso positivo que un falso negativo.

La **calibración** es una medida de cuanto se acercan las probabilidades predichas por el modelo a las probabilidades reales de muerte de cada uno de los individuos. Para su evaluación se utiliza la prueba de Hosmer y Lemeshow. Se divide la muestra en grupos pequeños (de al menos 5 individuos), utilizando para ello los deciles de riesgo de mortalidad predicha por el modelo. Se calcula la suma de eventos predichos y la suma de eventos realmente observados dentro de cada grupo, y se determina si existen diferencias estadísticamente significativas entre los números observados y los predichos, mediante la aplicación de un test de  $\chi^2$ .

## 5.6- ANÁLISIS DE LOS DATOS METABOLÓMICOS.

### Métodos de proyección.

Para el análisis multivariable de los datos metabolómicos se ha utilizado la librería de análisis estadístico multivariable PLS\_Toolbox (Eigenvector Research, Inc. Wenatchee, EEUU) para MATLAB.

Inicialmente, hemos aplicado un Análisis de Componentes Principales (PCA) al conjunto de datos procesados para explorar la posibilidad de una separación espontánea entre los grupos experimentales e identificar que variables contribuían más a la separación. Un análisis PCA es un método no supervisado que permite proyectar en un espacio de pocas dimensiones la complejidad de un sistema experimental complejo multivariable. Cuando la separación entre grupos fue compleja e incompleta, se procedió a realizar un análisis discriminante supervisado conocido como es el PLS-DA (Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales). La calidad predictiva del modelo PLS-DA fue valorada mediante una validación cruzada empleando el método Venetian Blinds. Los resultados de dicha validación se representaron de forma gráfica mediante una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) donde se muestra la variación del valor de sensibilidad frente a la especificidad para un sistema según varía el umbral de discriminación.

Una vez construido el modelo discriminante a partir de las muestras de orina procedimos a identificar las variables (regiones del espectro) que contribuían con más peso al modelo (loadings) y a qué metabolitos correspondían en el espectro.

Finalmente, identificados los picos más significativos para el modelo discriminatorio, se procedió a integrar el área bajo la curva y a



asignar cada señal a su metabolito correspondiente. La determinación de la significación estadística entre las medias de las integrales de los picos entre dos grupos, se realizó mediante el análisis de una vía de la varianza (ANOVA).

Para ciertas señales, la correcta asignación de cada pico a un metabolito resulta especialmente compleja. Esto viene dado por la baja concentración en la muestra de un metabolito o también por el alto grado de solapamiento de las señales. En estos casos, hemos empleado los experimentos 2D tipo TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para tratar de elucidar el solapamiento de las señales.

### **Análisis de regresión lineal y ajuste del modelo predictivo de regresión logística.**

Con los valores de probabilidad de clasificación del modelo predictivo metabolómico, hemos construido una recta de regresión lineal para cada paciente. El valor obtenido para el primer día (orina A) se ha considerado como la ordenada en el origen, y el valor obtenido el segundo día (orina B) se ha considerado como la pendiente.

Con los datos obtenidos de la ecuación, hemos ajustando un modelo de regresión logística multivariable de la misma forma que lo descrito en el modelo SOFA.

**Evaluación de la exactitud diagnóstica del modelo metabolómico.**

La calidad del modelo como método predictivo se ha evaluado midiendo su poder de discriminación y su calibración, de la misma forma que lo anteriormente explicado para el modelo SOFA.

**5.7- COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE AMBOS MODELOS: SOFA/METABOLÓMICO.**

La comparación analítica de ambas curvas ROC se ha hecho con el programa EPIDAT 3.1. La comparación de los valores de área bajo la curva es posible cuando las curvas son correlacionadas, esto es, construidas con los mismos pacientes. Hemos utilizado el método no paramétrico de De Long para calcular la significación estadística de las diferencias de las áreas, que tiene como hipótesis nula la de igualdad de las áreas bajo la curva.

**5.8- ASPECTOS MÉDICO-LEGALES**

Este estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Edimburgo, octubre de 2000), siguiendo las recomendaciones de la Buena Práctica Clínica de la CEE (documento 111/3976/88, julio 1990) y la normativa española vigente (Ley del Medicamento- 25/90, Real Decreto 711/2002, Circular 15/2001 de la AEM).

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les solicitó su consentimiento. Los datos obtenidos se incorporaron a un fichero de

datos de carácter personal, y fueron tratados de forma confidencial conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos Personales 15/1999, teniendo acceso a ellos solo las personas autorizadas, pudiendo ser utilizados para posteriores investigaciones, siempre con la garantía del principio de confidencialidad y cumpliendo la legislación de nuestro país en materia de protección de datos.



## **6-. RESULTADOS**



## **6.1- ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN.**

### **6.1.1- Algoritmo de inclusión.**

Durante el año de inclusión, ingresaron en la unidad de cuidados intensivos un total de 690 pacientes. Entre los pacientes diagnosticados de sepsis/shock séptico, finalmente, se pudieron incluir un total de 67 que cumplían los criterios de inclusión descritos en el apartado anterior, y se excluyeron 35. Las causas más comunes para la exclusión fueron: no poder obtener el consentimiento informado, no quedar claro el diagnóstico de sepsis grave/shock séptico o por no haberse podido recoger las muestras biológicas durante las primeras 24 horas. En la Figura 6.1 se muestra de forma esquemática el algoritmo de inclusión de los pacientes empleado en este estudio. En

un año en nuestra unidad ingresaron un total de 102 pacientes con sepsis, que representa el 14.7 % de los ingresos totales.

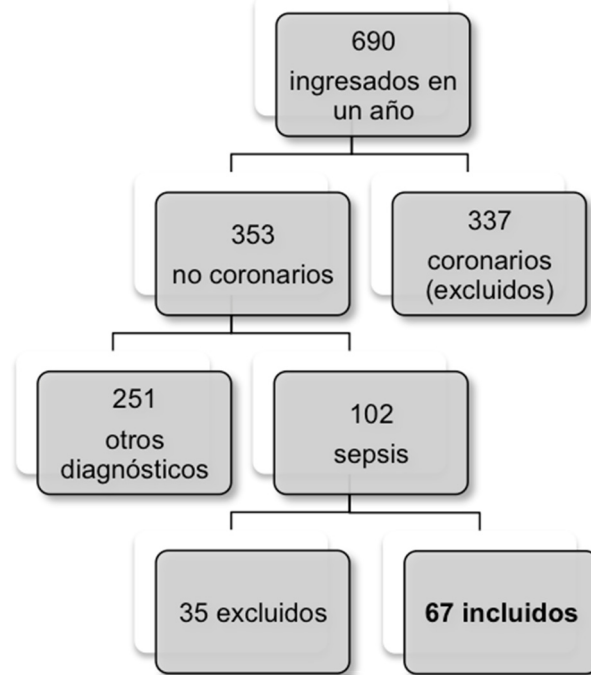


Figura 6.1: Algoritmo de inclusión de los pacientes del estudio.

### 6.1.2- Características generales de la población.

En la Tabla 6.1 se muestran, de forma resumida, los datos clínicos más relevantes que caracterizan la población incluida en el estudio. La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 60 años, siendo 44 (65.7%) hombres y 23 mujeres (34.3%). El diagnóstico de ingreso fue de sepsis grave en el 50.7% de los casos y de shock séptico en un 49.3 % de los casos.



**Tabla 6.1: Características clínicas generales de la población incluida en el estudio.**

VARIABLES	PACIENTES (N= 67)	IC 95 %
Sexo: Hombres	44 (65.7%)	53.6-77.8
Mujeres	23 (34.3%)	24.3-46.2
Edad	60 [47;73]	55.3-62.8
Sepsis grave	34 (50.7%)	38-63.5
Shock séptico	33 (49.3%)	36.5-62
Días en UCI	7 [4;11]	5-9
Procedencia:		
- Urgencias	38 (56.7%)	44.1-69.3
- Hospital	29 (43.3%)	27.8-52.8
APACHE II	19.60 ( $\pm$ 6.03)	18.1-21.07
SOFA		
Respiratorio	3 [2;3]	2-3
Hematológico	0 [0;1]	0-2
Hepático	0 [0;1]	0-1
Cardiovascular	2 [0;4]	1-3
Neurológico	0 [0;2]	0-3
Renal	1 [0;2]	0-2
Total	7.87 ( $\pm$ 3.63)	6.98-8.7
Ventilación Mecánica	29 (43.3 %)	31.5-55.1
VNI	19 (28.4 %)	23.7-33.1
Depuración extra renal	5 (7.5 %)	2.3-12.7
Mortalidad al mes	13 (19.4%)	9.2-29.6
Mortalidad al año	22 (32.8%)	21- 44.8

Los valores aparecen expresados como media ( $\pm$  desviación estándar de la media), (% sobre el total de los pacientes); mediana [P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>] percentil 25 y 75; IC, Intervalo de confianza; VNI, Ventilación no invasiva.

La procedencia de los pacientes fue en un 56% del servicio de urgencias y en un 43% de otros centros sanitarios o de la sala de hospitalización del propio hospital. La mediana de días ingresados en la UCI fue de 7 días.

La media de puntuación al ingreso de la escala APACHE II fue de 19.6 y de SOFA 7.87. La evolución de los valores de la escala SOFA durante el ingreso la podemos ver en la siguiente Figura 6.2. En el gráfico se aprecia como sus valores van disminuyendo durante todo el ingreso. Con respecto a la mortalidad al mes fue de 19.4% y al año fue de 32.8%.

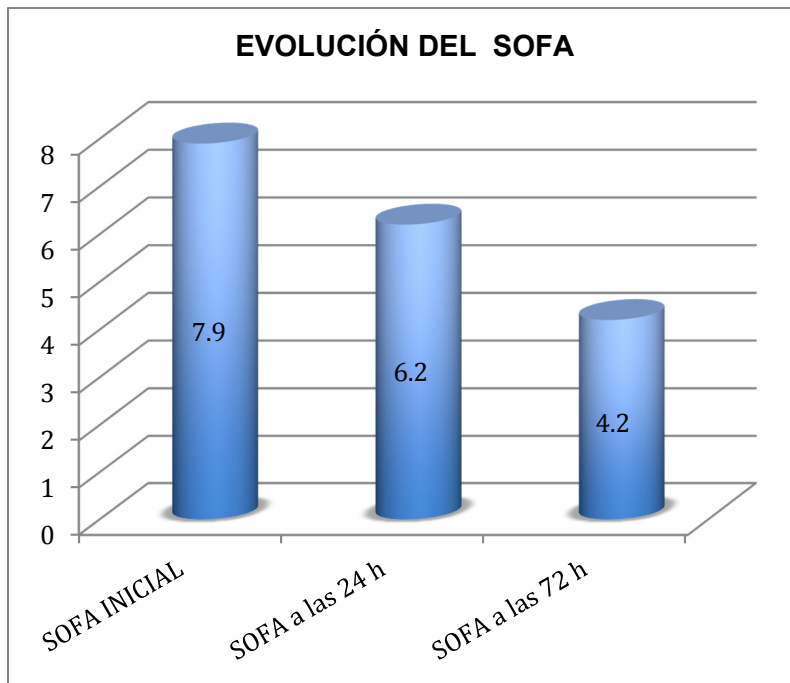


Figura 6.2: Evolución de los valores SOFA. El día de ingreso, a las 24 h y a las 72 h. Los valores que aparecen en las barras son los de la media.

**6.1.3- Origen de la infección.**

El origen de la sepsis fue en 43 pacientes (64%) pulmonar, en 9 (13%) nefrourológico, en 7 (10%) abdominal, en 4 (6%) por infecciones del SNC y en 5 (7%) no se determinó de forma concluyente el foco. En 24 pacientes, 35% de los casos, hubo un resultado positivo para bacteriemia en los hemocultivos que se realizaron al ingreso (Figura 6.3 y 6.4).

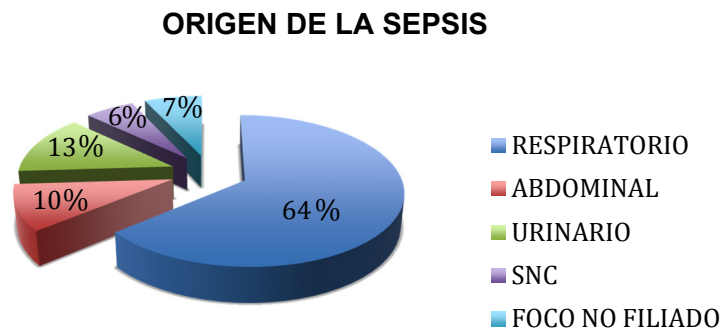


Figura 6.3: Origen de la sepsis según el foco de infección de los pacientes incluidos en el estudio.

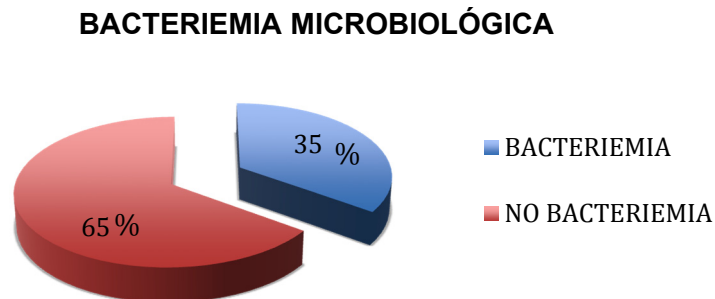


Figura 6.4: Bacteriemia microbiológica detectada en los hemocultivos.

#### 6.1.4- Factores de riesgo y comorbilidad.

Con respecto a los antecedentes patológicos de los pacientes, 16 (24%) padecían diabetes mellitus, 11 (16.4%) estaban diagnosticados de EPOC, 7 enfermos (10 %) de insuficiencia cardiaca congestiva crónica, 6 (9%) presentaban algún tipo de hepatopatía crónica, un 17.9 %, 12 enfermos, tomaban tratamiento inmunosupresor, 2 (3%) estaban diagnosticados de VIH, 2 (3%) presentaban neutropenia en la analítica, 7 (7.5%) padecían una neoplasia sólida y 9 (13,5%) de tipo hematológico. Existían antecedentes de enolismo en 4 (6%) y eran fumadores 6 enfermos (9 %) (Figura 6.5).

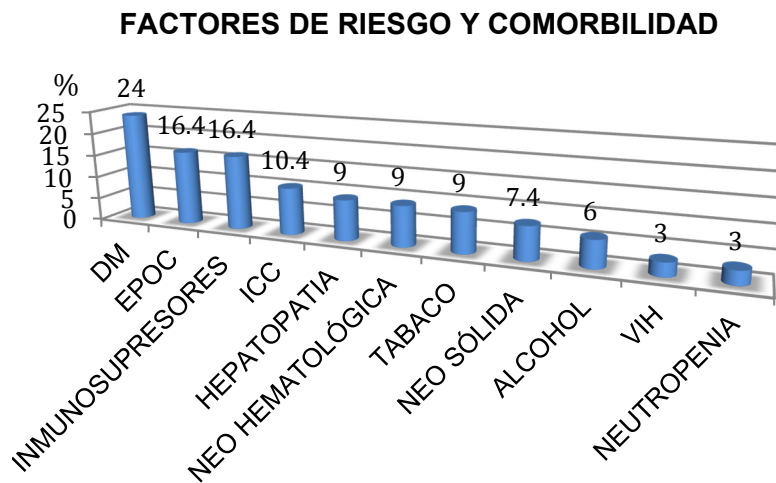


Figura 6.5: Factores de riesgo y comorbilidad presentes en los pacientes incluidos en el estudio y porcentaje de los mismos que sufren cada tipo de enfermedad. DM, Diabetes mellitus; EPOC, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ICC, Insuficiencia cardiaca crónica; VIH, Virus de inmunodeficiencia adquirida; NEO, Neoplasia.

### 6.1.5- Resultados analíticos.

Los resultados de la analítica sanguínea de las primeras 24 horas, extraída dentro de la rutina clínica de ingreso, se recogen en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2: Resultados de las variables analíticas.**

VARIABLES	Pacientes (N= 67)	IC 95 %
PH	7.33 ( $\pm$ 0.97)	7.29-7.35
HCO <sub>3</sub>	20 [16;24]	19-21
Lactato	2.6 [1.7;3.6]	2.3-3.1
Hemoglobina	11.1 ( $\pm$ 1.7)	10.6-11.5
Leucocitos	14.8 ( $\pm$ 107.1)	10.4-17.5
Plaquetas	193 ( $\pm$ 94.8)	169.8-231.3
Glucosa	140 [107;175]	127-151
Creatinina	1.6 [0.9;2.5]	1.2-2
Urea	74 ( $\pm$ 46)	61.9-91.32
Bilirrubina	0.9 [0.5;1.4]	0.6-1.1
PCR	172 ( $\pm$ 46)	134-182
PCT	3.9 [0.6;20]	1.4-9.8

N (%) Porcentaje de pacientes ( $\pm$  DE) Desviación estándar de la media; Mediana [P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>] percentil 25 y 75; IC, Intervalo de confianza; PCR, Proteína C activada; PCT, Procalcitonina.

Con respecto a los resultados analíticos obtenidos, observamos que la población de pacientes sépticos se caracteriza por presentar de forma global acidemia analítica con valores de bicarbonato bajo y lactato elevado. En el hemograma destaca leucocitosis con descenso en los valores de la hemoglobina y plaquetas. En la bioquímica destaca una elevación de los valores de creatinina y cifras de glucemia por encima de lo normal, así como de los reactantes de fase aguda, PCR y PCT, que se encuentran elevados.

#### 6.1.6- Resultados microbiológicos

Los resultados de los estudios microbiológicos se recogen en la Figura 6.6 y en la Tabla 6.3.

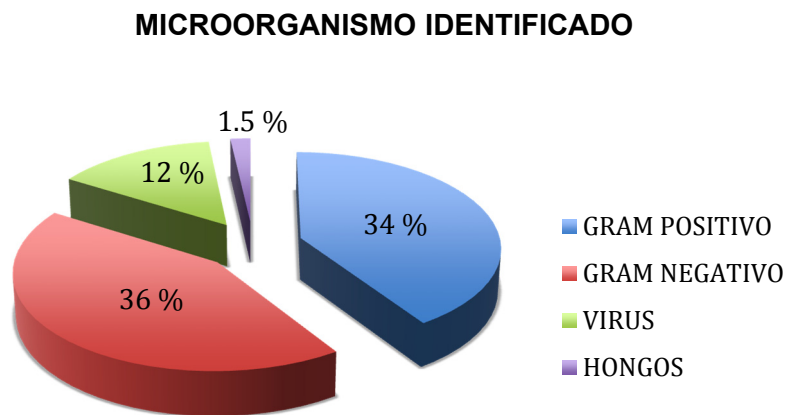


Figura 6.6: Tipo de microorganismo identificado.

El porcentaje de microorganismos Gram positivos (34%) y negativos (36%) se encuentran en la misma proporción. Hay una tasa elevada de infecciones víricas, 12% que es resultado de los casos de gripe A que se produjeron durante el periodo de recogida. El porcentaje de infecciones fúngicas fue del 1.5 %.

**Tabla 6.3: Número de pacientes en los que se ha identificado microorganismos en función del tipo de muestra biológica.**

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS	Suero	Orina	Aspirado Traqueal	LCR	Bilis
<b>GRAM NEGATIVOS</b>					
<i>Escherichia coli</i>	7	5			2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1			
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1			
<i>Morganella morganii</i>	1				
<i>Pseudomona aeruginosa</i>		1			
<i>Moraxella catarrhalis</i>			1		
<i>Enterobacter cloacae</i>		1			
<b>GRAM POSITIVOS</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	4		2		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1		1		
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	4				
<i>Enterococcus faecalis</i>		1			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2		4	2	
<i>Rothia mucilaginosa</i>			1		
<i>Corynebacterium</i>	1				
<b>OTROS</b>					
<i>Virus H1N1</i>			8		
<i>Candida albicans</i>	1				

El foco donde más microorganismos se aislaron fue el sanguíneo, seguido del respiratorio donde destacaron los 8 casos de gripe A. El tercer foco en frecuencia es la orina.

## **6.2- ANÁLISIS POBLACIONAL SEGÚN EL DIAGNÓSTICO DE INGRESO: SEPSIS GRAVE (SG) VS SHOCK SÉPTICO (SS).**

### **6.2.1- Características de los pacientes.**

En la Tabla 6.4 se resumen las principales características demográficas y clínicas de los pacientes, con una distribución homogénea según su diagnóstico: SG y SS, tienen prácticamente el mismo número de pacientes (34 vs 33 enfermos). La mediana de edad de los pacientes diagnosticados de SG fue de 54.5 años y la de los diagnosticados de SS de 67, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Respecto al género, ingresaron con diagnóstico de SG un total de 22 (64.7%) hombres y 12 (35.3%) mujeres, mientras que con SS 22 hombres (66.7%) y 11 mujeres (33.3%). La procedencia de urgencias en el caso de los pacientes con SG fue de un 58.8% y de un 41.1% de los enfermos de la sala de hospitalización y en el caso del SS un 54.5% de los pacientes procedían del servicio de urgencias y un 45.4% de la sala de hospitalización del propio hospital.

La media de puntuación de la escala Apache II al ingreso fue de 16.4 en los pacientes con SG y en los de SS de 23. La puntuación SOFA al ingreso fue de 5.29 en los pacientes de SG y de 10.5 en aquellos de SS. La mediana de días ingresados en la UCI fue de 7.5 días para los diagnosticados de SG y de 6 para los de SS. La mortalidad al mes fue de 4 pacientes (11.8%) en el caso de SG y de 9 pacientes (27.3%) en el caso del SS.



**Tabla 6.4: Características de los pacientes según su diagnóstico.**

VARIABLES	SEPSIS GRAVE (N= 34)	SHOCK SÉPTICO (N= 33)	P
Sexo (H)	22 (64.7%)	22 (66.7%)	NS
(M)	12 (35.3%)	11 (33.3%)	NS
Edad	54.5 [43.5;65]	67 [56.5;77.5]	<0.05
Días en UCI	7.5 [4.75;12]	6 [4;9.5]	NS
Procedencia:			
Urgencias	20 (58.8%)	18 (54.5%)	NS
Sala	14 (41.1%)	15 (45.4%)	NS
APACHE II	16.4 (±4.7)	23 (±5.4)	<0.05
SOFA			
Respiratorio	3 [2;3]	3 [2;4]	NS
Hematológico	0 [0;1]	1 [0;2]	NS
Hepático	0 [0;0]	1 [0;2]	<0.05
Cardiovascular	0 [0;0.25]	4 [3;4]	<0.05
Neurológico	0 [0;1]	0 [0;2]	NS
Renal	0 [0.1;25]	2 [0;2]	<0.05
Total	5.29 (±2.3)	10.5 (±2.7)	<0.05
VM	12 (35.3%)	17 (51.5 %)	NS
VNI	13 (38.2%)	6 (18.2%)	NS
HDFVVC	4 (12 %)	1 (3%)	NS
Mortalidad al mes	4 (11.8%)	9 (27.3%)	NS

N (%) Porcentaje de pacientes; Media (± DE) Desviación estándar de la media; Mediana [P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>], Percentil 25 y percentil 75; NS, No significativo; VM, Ventilación mecánica; VNI, Ventilación no invasiva; HDFVVC, Hemodiafiltración venovenosa continua.

### 6.2.2- Origen del foco infeccioso.

El origen del foco infeccioso lo vemos en la siguiente figura (Figura 6.7). Los pacientes diagnosticados de SG presentaron mayoritariamente una infección de origen respiratorio, seguida del SNC y del urinario. Los diagnosticados de SS presentaron igualmente el foco respiratorio como más frecuente, seguido del urinario y el abdominal.

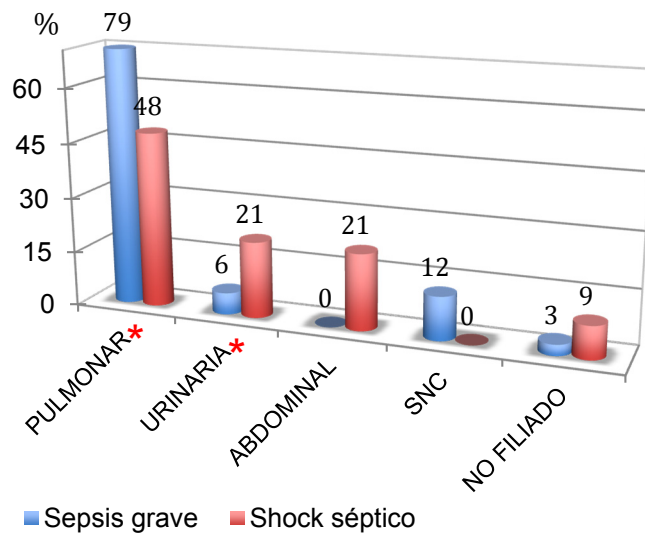


Figura 6.7: Origen del foco infeccioso en pacientes con diagnóstico de sepsis grave vs shock séptico. La diferencia de incidencia entre pacientes de SG y SS con el origen en el foco abdominal y el pulmonar son estadísticamente significativos (\*).

La presencia de bacteriemia fue más frecuente en los pacientes diagnosticados de SS, con una diferencia estadísticamente significativa frente a los pacientes de SG. El resultado positivo de los hemocultivos dependiendo de la gravedad del diagnóstico de los

pacientes se puede apreciar en la siguiente figura (Figura 6.8). La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa.

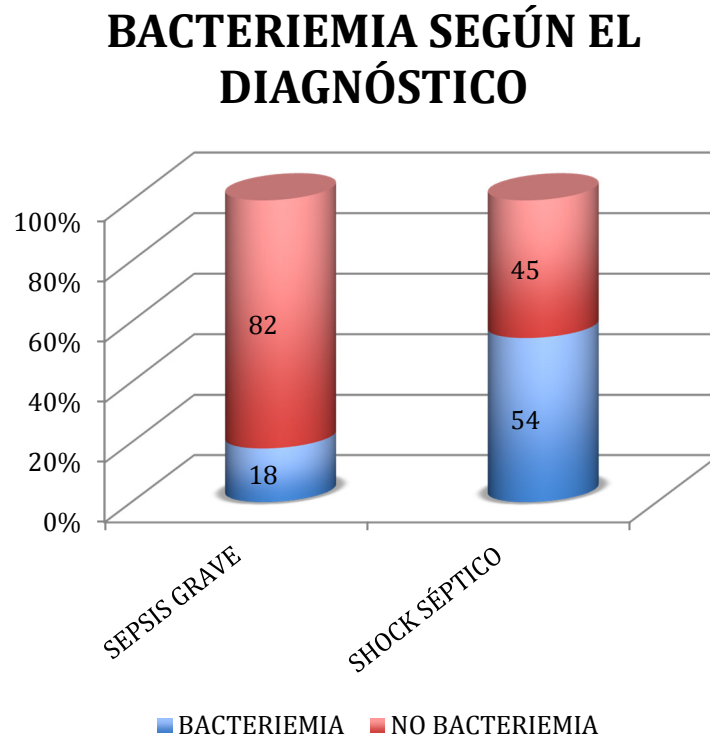


Figura 6.8: Bacteriemia microbiológica en los hemocultivos según su diagnóstico. La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa.

#### 6.2.3- Factores de riesgo y comorbilidad.

Los factores de riesgo que presentaron los pacientes dependiendo de su diagnóstico, SG o SS, lo podemos ver en la siguiente figura (Figura 6.9).

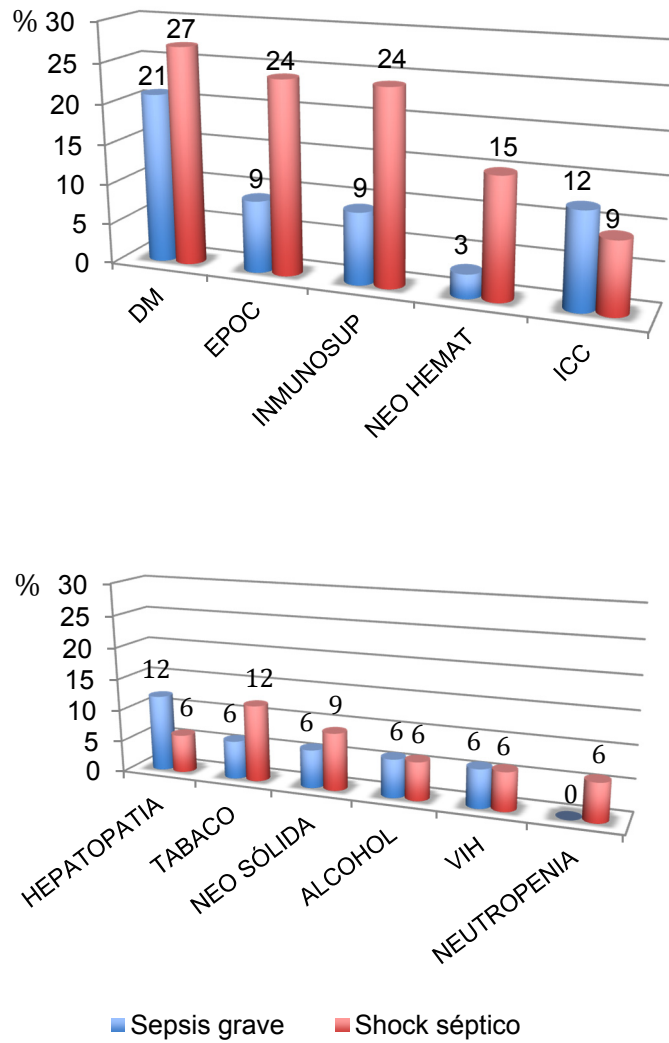


Figura 6.9: Factores de riesgo y comorbilidad según el diagnóstico; DM, Diabetes mellitus; EPOC, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ICC, Insuficiencia cardiaca crónica; VIH, Virus de inmunodeficiencia adquirida; IMMUNOSUP, Inmunosupresión; NEO, Neoplasia; No existe diferencia estadísticamente significativa entre ningún factor de riesgo comparando ambos grupos.

Los pacientes que mostraban como cuadro inicial un shock séptico, presentaron con más frecuencia los siguientes factores de riesgo: DM, EPOC, tratamiento con inmunosupresores, neutropenia, neoplasia de cualquier origen, sólida o hematológica y tabaquismo. Por otro lado en el subgrupo de pacientes con sepsis grave, los factores de riesgo que se dan con mayor frecuencia son: ICC, hepatopatía e infección por VIH. La proporción de pacientes con hábito enólico fue similar en ambos grupos.

#### **6.2.4 Resultados analíticos.**

En los resultados analíticos según el diagnóstico de gravedad inicial, existen algunos valores en los que aparecen diferencias significativas al compararlos estadísticamente: en los pacientes con shock séptico, los valores de pH y bicarbonato fueron inferiores a los que presentaban los pacientes con sepsis grave, siendo esta diferencia significativa. Por otro lado las cifras de lactato, creatinina, urea, bilirrubina y procalcitonina fueron más elevadas en los pacientes que ingresaron como shock séptico frente a los que lo hicieron con sepsis grave, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 6.5: Resultados de las variables analíticas según el diagnóstico.**

VARIABLES	SEPSIS GRAVE (N= 34)	SHOCK SÉPTICO (N= 33)	P
PH	7.36 ( $\pm$ 0.09)	7.30 ( $\pm$ 0.1)	<0.05
HCO <sub>3</sub>	23 [20;27.25]	18 [16;20]	<0.05
Lactato	2.3 [1.6;2.7]	3.5 [2.4;5]	<0.05
Hemoglobina	11.1 ( $\pm$ 1.8)	11 ( $\pm$ 1.7)	NS
Leucocitos	12.5( $\pm$ 7.7)	17.1 ( $\pm$ 14.4)	NS
Plaquetas	206.8 ( $\pm$ 98.7)	179 ( $\pm$ 115)	NS
Glucosa	142 ( $\pm$ 59.4)	163 ( $\pm$ 74.9)	NS
Creatinina	1.12 [0.7;1.9]	2.04 [1.3;3.2]	<0.05
Urea	41.5 [33;91]	80 [46.5;122]	<0.05
Bilirrubina	0.6 [0.4;0.9]	1.2 [0.5;1.7]	<0.05
PCR	166 ( $\pm$ 90.3)	178 ( $\pm$ 79)	NS
PCT	1.01 [0.3;3.4]	17 [4.3;48.7]	<0.05

Tabla 6.5: N (%) Porcentaje de pacientes; Media ( $\pm$  DE) Desviación estándar de la media; Mediana [P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>], Percentil 25 y percentil 75; ICD, Intervalo de confianza de la diferencia; PCR, Proteína C reactiva; PCT, Procalcitonina; NS, No significativo.

### **6.3- ANÁLISIS POBLACIONAL SEGÚN LA EVOLUCIÓN: MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS.**

#### **6.3.1- Características de los pacientes.**

Si se analiza la población en función de su supervivencia a los 30 días, se aprecia que no existen diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere al sexo, edad, días de estancia en UCI, el diagnóstico de sepsis grave y shock séptico en ambos grupos, la procedencia del paciente ni la puntuación APACHE al ingreso.

La puntuación de la escala SOFA al ingreso presenta diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que fallecen y los que sobreviven, siendo más elevada en el grupo de exitus que en el de pacientes que sobreviven en todos los momentos de la evolución. Si tenemos en cuenta las diferentes puntuaciones que se incluyen en el SOFA, las diferencias entre los dos grupos con respecto a la puntuación hematológica también es significativa (Tabla 6.6). La evolución de las cifras de SOFA durante el ingreso se parecía en la Figura 6.10. La reducción de sus cifras durante el ingreso es mayor en el grupo de supervivientes.

**Tabla 6.6: Características de los pacientes según su pronóstico.**

VARIABLES	EXITUS (N= 13)	NO EXITUS (N= 54)	P
Sexo (H)	8 (61.5%)	36 (66.7%)	NS
Edad	58 [44.5;68.5]	61.5 [48.5;75.2]	NS
Sepsis grave	4 (30.8%)	30 (55.6%)	NS
Shock séptico	9 (69.2%)	24 (44.4%)	NS
Días en UCI	7 [3;22.5]	6.5 [4.7;11]	NS
Procedencia:			
Urgencias	7 (53.8%)	31 (57.4%)	NS
Sala	6 (46.2%)	23 (42.6%)	NS
APACHE II	21 ( $\pm$ 5)	19 ( $\pm$ 6)	NS
SOFA inicial			
Respiratorio	3 ( $\pm$ 1.1)	2.6 ( $\pm$ 0.86)	NS
Hematológico	1.5 ( $\pm$ 1.2)	0.6 ( $\pm$ 0.86)	<0.05
Hepático	0.54 ( $\pm$ 0.84)	0.5 ( $\pm$ 0.77)	NS
Cardiovascular	2.62 ( $\pm$ 1.8)	1.7 ( $\pm$ 1.65)	NS
Neurológico	0.54 ( $\pm$ 0.8)	0.85 ( $\pm$ 1)	NS
Renal	1.5 ( $\pm$ 1.45)	1.2 ( $\pm$ 1.2)	NS
Total	11 [7;13.5]	7 [5;10]	<0.05
VM	8 (61.5 %)	21 (38.9 %)	NS
VNI	5 (38.5 %)	14 (25.9 %)	NS
HDFVVC	3 (23.1 %)	2 (3.7 %)	<0.05

N (%) Porcentaje de pacientes; Media ( $\pm$  DE) Desviación estándar de la media; Mediana [P<sub>25</sub>;P<sub>75</sub>], Percentil 25 y percentil 75; ICD, Intervalo de confianza de la diferencia; NS, No significativo; VM, Ventilación mecánica; VNI, Ventilación no invasiva; HDFVVC, Hemodiálisis continua.



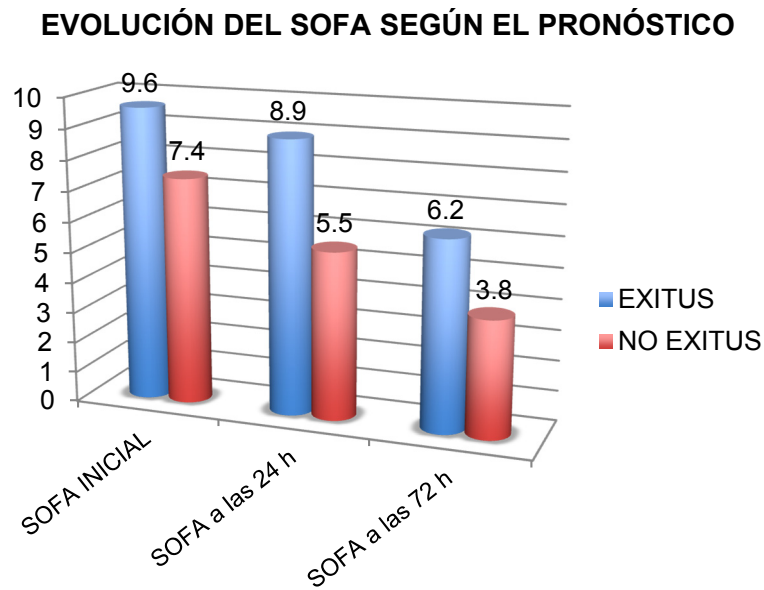


Figura 6.10: Evolución del SOFA dependiendo del pronóstico del paciente. SOFA inicial, SOFA a las 24 h y SOFA a las 72 h.

### 6.3.2- Origen del foco infeccioso.

Si comparamos el subgrupo de pacientes que sobreviven con aquellos que fallecen (Figura 6.11), no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al origen del foco, excepto en la presencia de bacteriemia microbiológica que es más frecuente en el subgrupo de pacientes que fallecen. En ambos subgrupos el foco infeccioso más frecuente es el respiratorio. Destaca en tercer lugar la infección urinaria seguida de la abdominal. Los casos de infección en el SNC son poco frecuentes y con buena evolución.

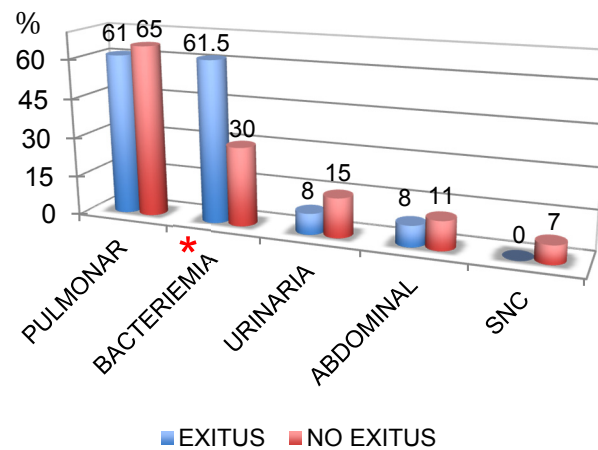


Figura 6.11: Origen del foco infeccioso en pacientes que fallecen comparado con aquellos que sobreviven. La diferencia entre la bacteriemia en el grupo de éxitos, comparada con el grupo de no éxitos, es estadísticamente significativa (\*). Ajuste numérico a la unidad.

### 6.3.3- Factores de riesgo y comorbilidad.

Con respecto a los factores de riesgo y comorbilidad (Figura 6.12), destaca en el grupo de éxitos más pacientes que en el de los que sobreviven con ICC, hepatopatía, inmunosupresores, neoplasias sólidas o hematológicas, neutropenia, alcohol y tabaco. La diferencia entre estos factores de riesgo es significativa para el tratamiento con inmunosupresores, la neutropenia y la neoplasia hematológica.

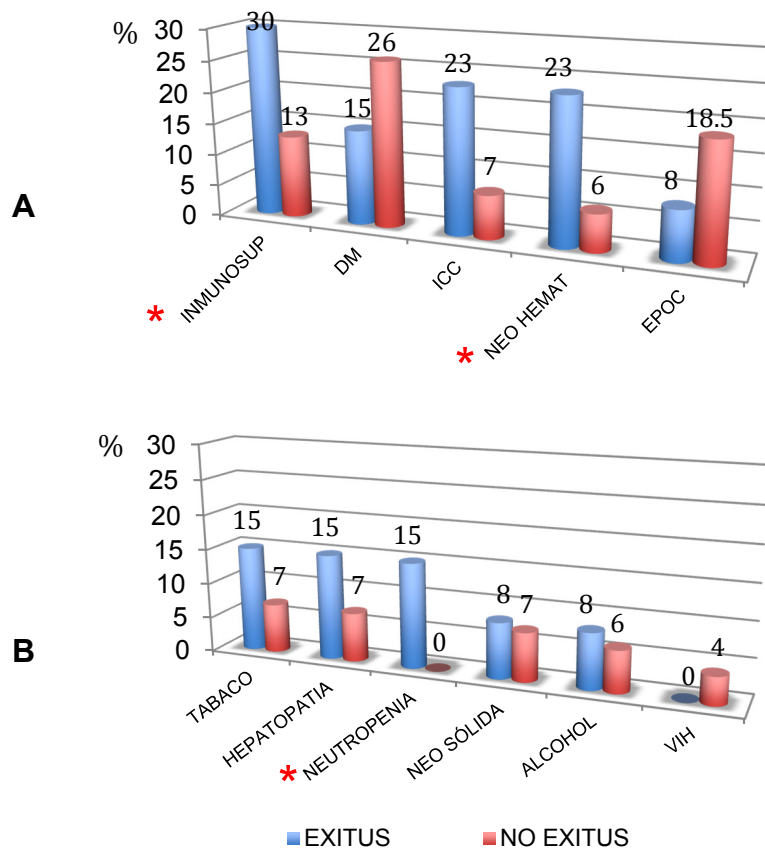


Figura 6.12: (A y B) Factores de riesgo y comorbilidad dependiendo del pronóstico de los pacientes. Los porcentajes se han aproximado a la unidad. (\*) Diferencia estadísticamente significativa.

**6.3.4- Resultados analíticos.****Tabla 6.7 Resultados de las variables analíticas según el pronóstico.**

VARIABLES	EXITUS (N= 13)	NO EXITUS (N= 54)	P
pH	7.32 ( $\pm$ 0.13)	7.33 ( $\pm$ 0.08)	NS
HCO <sub>3</sub>	19.5 ( $\pm$ 6.8)	20.8 ( $\pm$ 5.1)	NS
Lactato	5.2 ( $\pm$ 5.8)	3.1 ( $\pm$ 2.8)	NS
Hemoglobina	9.9 ( $\pm$ 1.7)	11.4 ( $\pm$ 1.6)	<0.05
Leucocitos	10.2 ( $\pm$ 9.6)	15.9 ( $\pm$ 11.9)	NS
Plaquetas	135( $\pm$ 94.8)	207( $\pm$ 106)	<0.05
Glucosa	157 ( $\pm$ 57)	151 ( $\pm$ 70)	NS
Creatinina	2.5 ( $\pm$ 2.7)	1.9 ( $\pm$ 1.3)	NS
Urea	89 ( $\pm$ 55)	70 ( $\pm$ 4)	NS
Bilirrubina	1.13 ( $\pm$ 5.1)	1.2 ( $\pm$ 1.35)	NS
PCR	162 ( $\pm$ 76)	174 ( $\pm$ 87)	NS
PCT	22 ( $\pm$ 31.9)	18.7 ( $\pm$ 29.6)	NS

N (%) Porcentaje de pacientes; Media ( $\pm$  DE) Desviación estándar de la media; ICD, Intervalo de confianza de la diferencia; PCR, Proteína C reactiva; PCT, Procalcitonina; NS, No significativo.

La diferencia de los valores analíticos entre el grupo de exitus y supervivientes es significativa para los valores de plaquetas y hemoglobina. Las cifras de procalcitonina, a pesar de ser más elevadas en el grupo de exitus, no alcanzan diferencias estadísticamente significativas, al igual que ocurre con las cifras de creatinina que en el grupo de exitus son más elevadas, pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

#### **6.4- PERFIL METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO Y ORINA DE PACIENTES DE UCI CON DIAGNÓSTICO DE SEPSIS GRAVE O SHOCK SÉPTICO MEDIANTE RMN.**

El segundo objetivo de esta tesis era obtener y describir un perfil metabólico en muestras de suero y orina, en pacientes con diagnóstico de sepsis grave o shock séptico, el día de ingreso (muestra A), a las 24 horas (muestra B), 72 horas (muestra C) y al alta o cuando se prevé que vaya a existir un desenlace fatal (muestra D) mediante el análisis por espectrometría de RMN.

##### **6.4.1- Obtención del espectro en orina.**

Para poder analizar los espectros hemos elegido uno representativo del grupo de supervivientes y uno representativo del grupo de exitus. Cada señal o pico que se obtiene en el espectro es atribuible inequívocamente a un tipo de molécula o metabolito, y el área contenida bajo la señal es directamente proporcional a la concentración de dicho metabolito en la muestra. Un metabolito puede presentar varias señales en diferentes partes del espectro, una por cada grupo magnéticamente activo. Sin embargo, cada pico solo puede ser asignado a un tipo de metabolito.

De los 67 pacientes iniciales se descartaron 3 por no contar con la muestra de las primeras 24 horas (orina A) (# 11, #41, #62). En la Figura 6.13 se presenta la comparativa de dos espectros representativos de muestras de orina correspondientes a los dos grupos de pacientes. Se obtuvieron un total de 64 espectros de buena calidad en ambos grupos. Los espectros presentan una buena relación señal/ruido y una resolución de la multiplicidad de la mayoría de la señales de buena calidad. Los espectros se pueden dividir en dos grandes zonas; la zona alifática comprendida entre 0-4.6 ppm y la zona aromática, entre 4.8-10 ppm. La región comprendida entre 4.6-4.8 ppm corresponde a la señal intensa de los protones de agua.

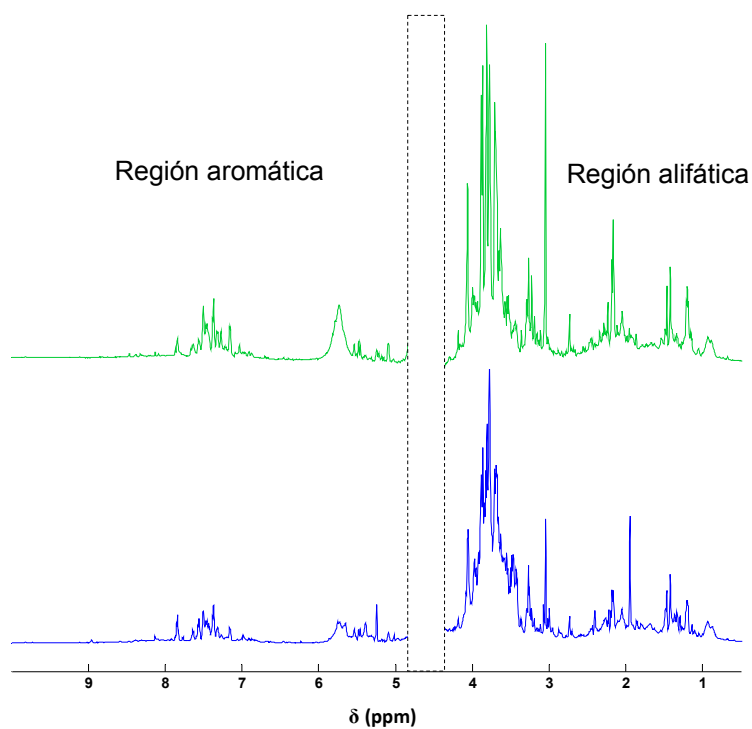


Figura 6.13: Espectro de <sup>1</sup>H RMN representativo de las muestras de orina de un paciente que sobrevive (superior) y otro que fallece (inferior).

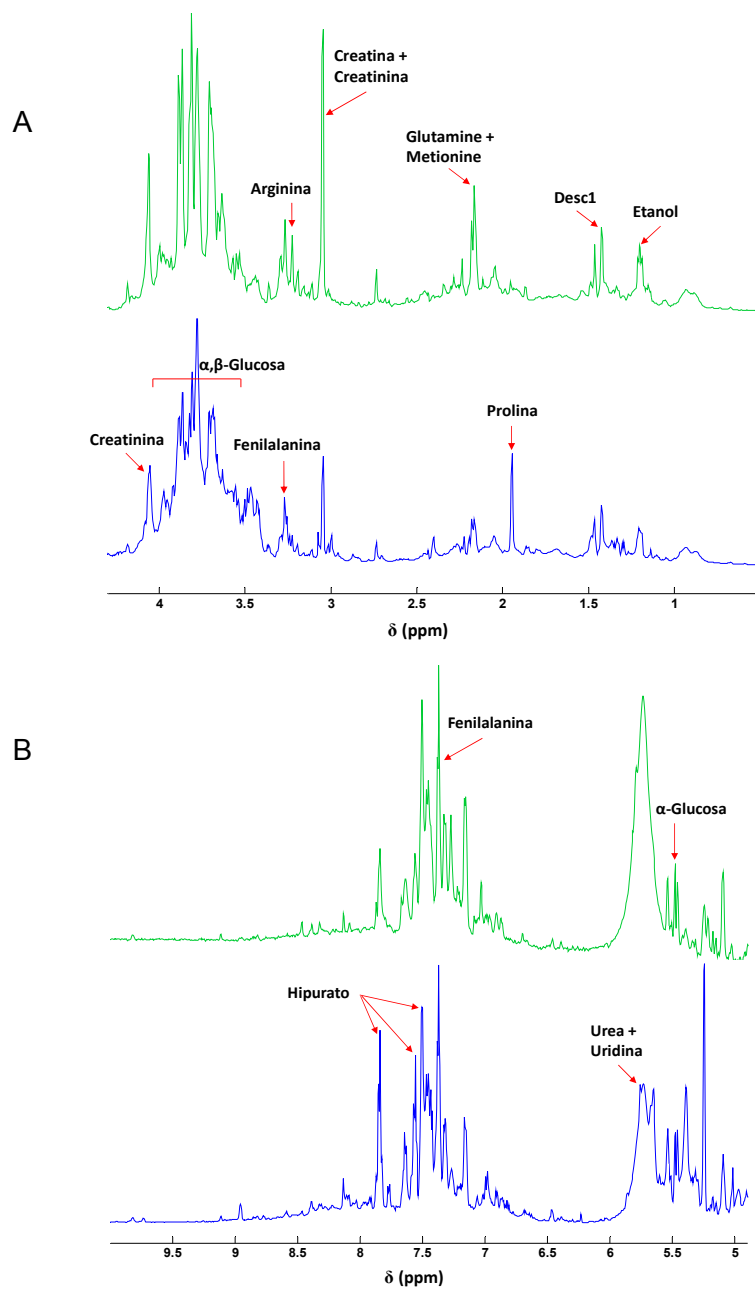


Figura 6.14: Detalle del espectro de <sup>1</sup>H RMN representativo de una muestra de orina, A) Parte alifática y B) parte aromática. El verde corresponde a un paciente superviviente y el azul, a uno que fallece.

El análisis detallado del espectro de resonancia (Figura 6.14), permite apreciar la gran cantidad de señales presentes especialmente en la zona alifática. Entre los metabolitos que se pueden identificar resalta en la parte alifática la presencia de señales atribuibles a las moléculas de  $\alpha$ , y  $\beta$ -glucosa, creatina, creatinina, fenilalanina, prolina, arginina, glutamina, metionina y etanol. En la parte aromática se observa la señal de la  $\alpha$ -glucosa, fenilalanina, hipurato, urea y uridina.

#### **6.4.2- Obtención del espectro en suero.**

En las muestras de suero se obtuvieron un total de 67 espectros de buena calidad en ambos grupos. Los espectros presentan una buena relación señal/ruido y una resolución de la multiplicidad de la mayoría de la señales de buena calidad.

Un análisis detallado del espectro de resonancia (Figura 6.15), permite apreciar la gran cantidad de señales presentes especialmente en la zona alifática. Entre los metabolitos que se pueden identificar destaca en la parte alifática la presencia de señales atribuibles a las moléculas de  $\alpha$ , y  $\beta$ -glucosa, arginina, acetoacetato, prolina, lípidos, lactato, colesterol, leucina, glicerol, colina, creatina, creatinina, glutamina, glutamato, lactato e isoleucina. En la parte aromática destaca fenilalanina, histidina, metilhistidina,  $\alpha$  glucosa, formato, 3-metilhistidina, tirosina, y la señal de los lípidos insaturados.



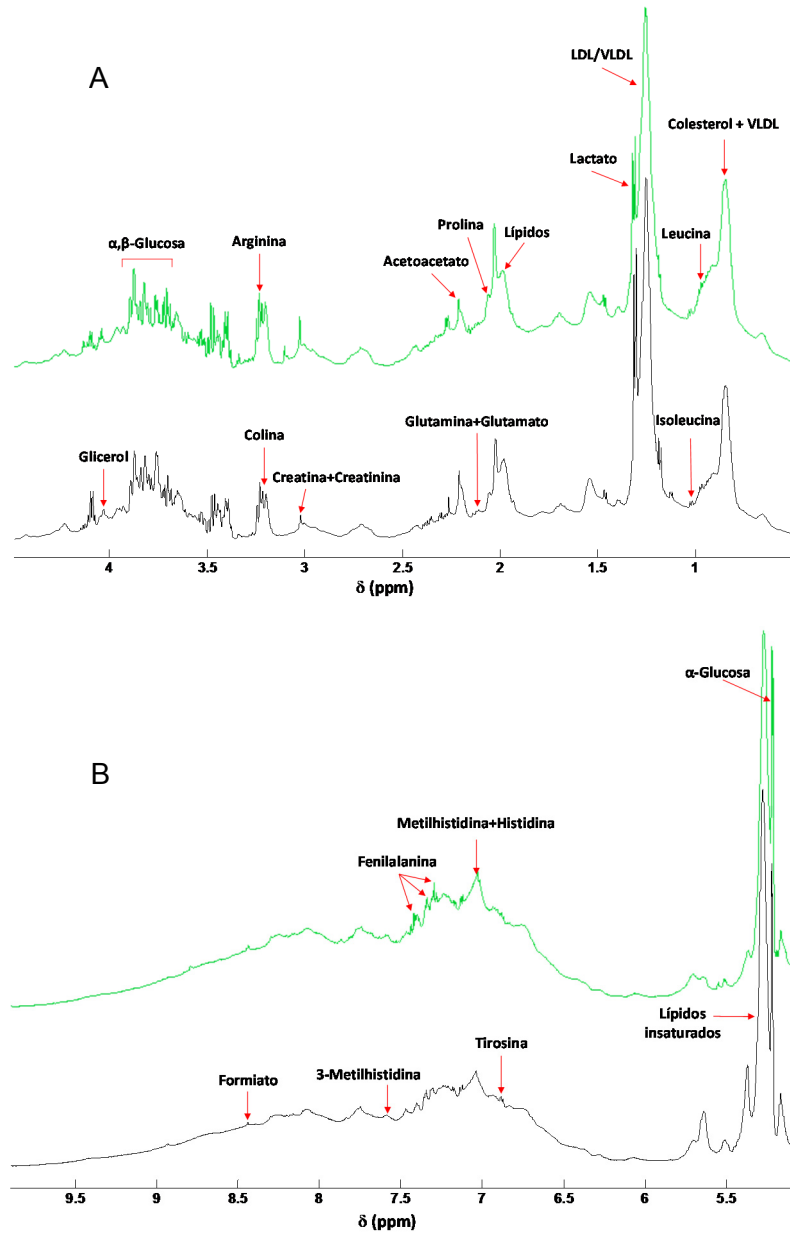


Figura 6.15: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN representativo de una muestra de suero. A) Parte alifática y B) parte aromática. El espectro superior es de un paciente superviviente y el inferior, de un exitus.

## **6.5- ANÁLISIS METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE ORINA SEGÚN EL DIAGNÓSTICO DE INGRESO: SEPSIS GRAVE VS SHOCK SÉPTICO.**

### **6.5.1- Análisis no discriminante: PCA.**

El tercer objetivo de esta tesis era comprobar si la estratificación de los pacientes según las definiciones actuales, de sepsis grave y shock séptico, se correspondía con un perfil metabólico diferencial medido en muestras de suero y/u orina.

Comenzaremos la presentación de los resultados por las muestras de orina del día de ingreso, a estas muestras las denominamos orina A. Para el análisis se han incluido 64 muestras, 33 de sepsis grave y 31 de shock séptico. Hubo tres muestras de orina de pacientes con shock que no se pudieron obtener (# 11, #41, # 62). El motivo de no poder contar con estas muestras fue por falta de diuresis durante las primeras 24 horas.

Primero se han utilizado métodos de análisis no supervisado, que permiten evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta la clasificación de los pacientes dentro de ningún grupo. Para ello, empleamos un análisis de componentes principales (PCA). El objetivo de este tratamiento de los datos es condensar toda la información metabólica dada por una serie de variables, en un número restringido de variables latentes o componentes principales. El resultado del PCA se presenta de forma visual en un gráfico de puntuaciones donde cada punto representa una muestra con su perfil metabólico completo. Tras el troceado del espectro en segmentos de 0.005 ppm, la composición

metabólica de cada muestra quedó caracterizada por 2000 variables (el espectro completo excepto la región del H<sub>2</sub>O).

El diagrama de puntuaciones del grupo de muestras de orina A (Figura 6.16) muestra un solapamiento total de las muestras de los dos grupos. Adicionalmente, se identificó la presencia de dos muestras (#54 y #66) con un contenido metabólico muy diferente, tanto respecto de su grupo como del conjunto total de pacientes. Estas dos muestras pertenecen al grupo de pacientes diagnosticado de sepsis grave, y en el gráfico se aprecia que quedan fuera del intervalo de confianza del 95%. El porcentaje recogido en cada uno de los ejes del PCA hace referencia a la porción de variabilidad explicada sobre el total.

Con objeto de buscar una razón a la importante diferencia de estas muestras respecto del conjunto, se realizó una revisión exhaustiva de los datos incluidos en la historia clínica de estos pacientes. Desde un punto de vista clínico, la muestra #54 corresponde a un paciente varón de 77 años con diagnóstico de sepsis grave de origen respiratorio sin bacteriemia. La muestra #66 corresponde a una mujer de 44 años con diagnóstico de sepsis grave pulmonar con bacteriemia y que como antecedentes patológicos de interés tenía una hepatopatía.

Una vez excluidas estas muestras volvemos a realizar el PCA. Aunque continúa habiendo un solapamiento de los dos grupos se aprecia cierta tendencia de agrupación, de forma que los pacientes de shock se sitúan más en los cuadrantes inferiores, y los de sepsis grave en los cuadrantes superiores.

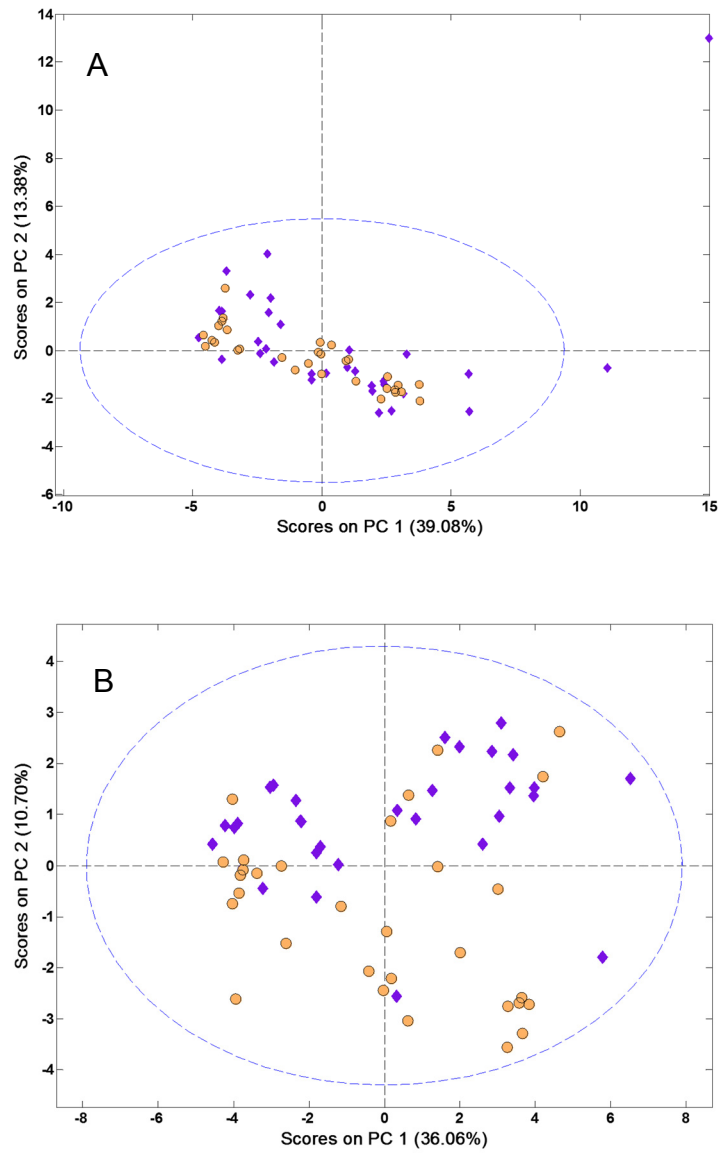


Figura 6.16: A) Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de orina A, y B) tras excluir las dos muestras identificadas como aberrantes. Los rombos representan los pacientes diagnosticados de sepsis grave y los círculos, los pacientes de shock séptico.

### 6.5.2- Análisis supervisado: PLS-DA.

Una vez comprobado que las muestras no se agrupan espontáneamente en base a nuestros criterios (sepsis grave/shock séptico), se procede a construir un modelo discriminador PLS-DA, excluyendo del mismo las dos muestras identificadas como aberrantes en el PCA. En los sistemas donde la separación entre grupos es compleja, como fue nuestro caso, el análisis PLS-DA favorece la separación entre los grupos establecidos.

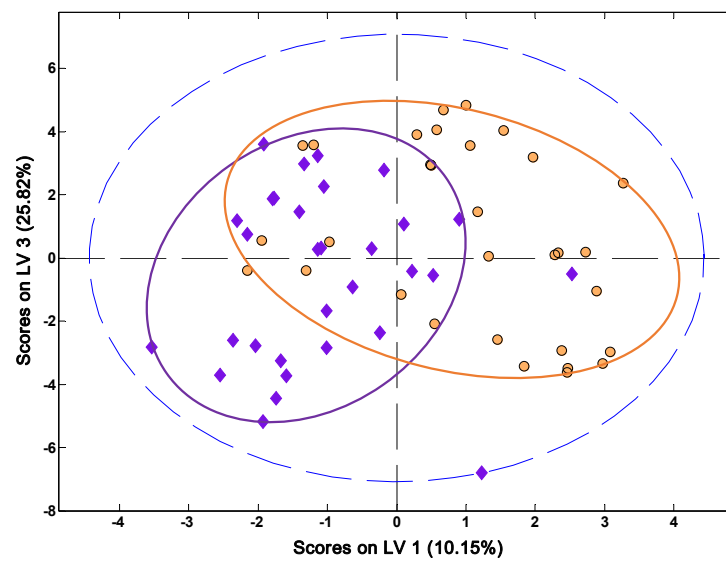


Figura 6.17: Diagrama de puntuaciones de la primera y tercera componente del PLS-DA de las muestras de orina A. Los rombos representan los pacientes diagnosticados de sepsis grave y los círculos, los pacientes de shock séptico. Las elipses dibujadas han sido incluidas sólo con un objetivo ilustrativo.

Se emplearon las tres primeras componentes principales del PLS-DA, que explican hasta un 26 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación. El resultado final del PLSDA muestra que no es posible separar completamente los dos grupos aunque se observa un agrupamiento (Figura 6.17). Los pacientes diagnosticados de shock se agrupan más en los dos cuadrantes derechos y sobre todo en el superior mientras existe un predominio de los pacientes con sepsis grave en los cuadrantes izquierdos e inferior.

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso es la identificación de las regiones o picos del espectro que más participan en el modelo. Para ello se consulta el diagrama de cargas del PLSDA y se comprueba como las regiones con mayor contribución al modelo discriminativo son aquellas asociadas, en el área alifática, a metabolitos como la glucosa (diversos picos), arginina, alanina, fenilalanina, dimetilamina, creatinina + creatina, prolina, piruvato, metionina + glutamina, lactato, etanol y butirato como puede verse en la (Figura 6.18). Dentro del área aromática las regiones que en mayor medida contribuyen a dicha separación son hipurato, tirosina, fenilalanina, uridina, glucosa y urea.

Una vez identificadas las regiones se realiza la asignación e integración de la señal. Para comprobar que las variables continuas se ajustan a una distribución normal se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov.

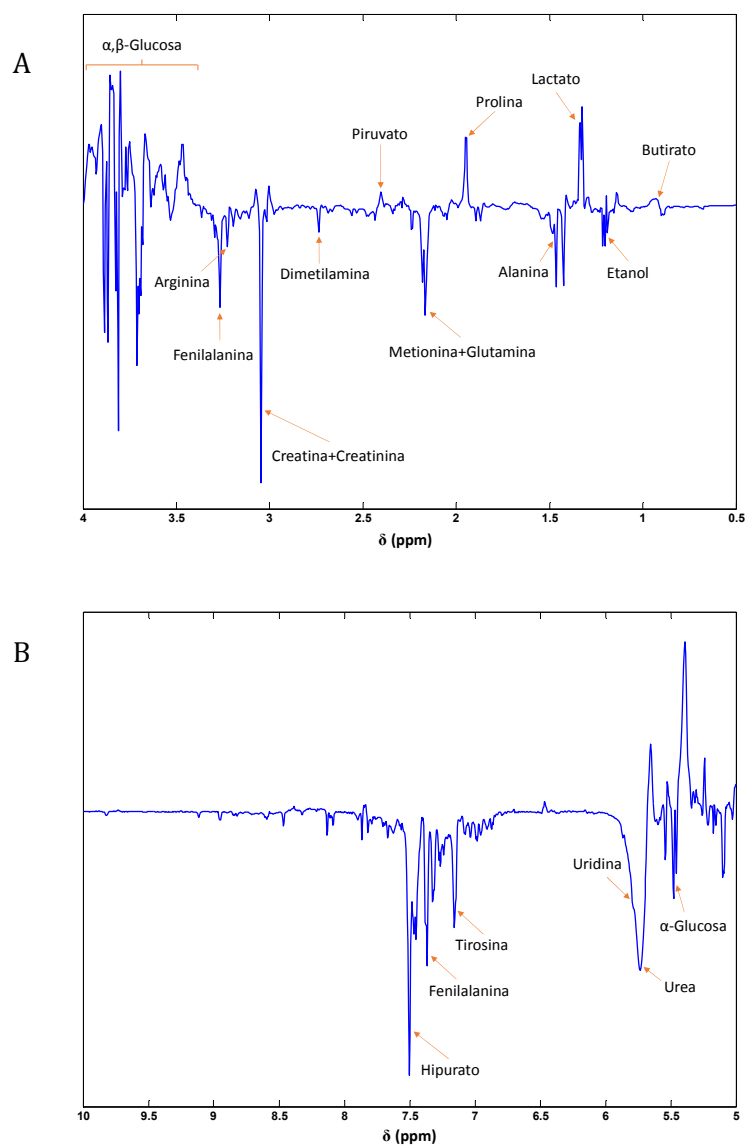


Figura 6.18: Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las muestras de orina A, parte alifática del espectro A) y la parte aromática del mismo B). En la figura se han identificado los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio.

La comparación entre las medias de las integrales de los dos grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El resultado de la cuantificación de los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio y que presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (sepsis grave/shock séptico) se presenta en la Tabla 6.8.

**Tabla 6.8: Concentración relativa de los metabolitos detectados en orina que presentan un peso importante en el modelo o una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.**

Metabolitos	Región	Sepsis Grave	Shock séptico	p
Dimetilamina	2.73-2.75	0.45 ± 0.2	0.35 ± 0.2	0.161
2-hidroxisovalerato	1.07-1.09	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.09	0,147
Acetato	1.93-1.97	0.71 ± 0.5	1.3 ± 0.2	0,099
Histidina	8.35-8.42	0.36 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0,093
Uridina	5.775-5.805	0.89 ± 0.1	0.51 ± 0.06	0,063
Valina	1.03-1.04	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0,074
Glucosa	5.465-5.495	0.49 ± 0.07	0.27 ± 0.02	0,074
Creatina+ creatinina	3.03-3.07	4.14 ± 2	3.01 ± 2	0,053
Metionina + glutamina	2.13-2.195	3.55 ± 1	2.4 ± 1	0.014
Formato	8.45-8.47	0.12 ± 0.01	0.054 ± 0.01	0.014
Fenilalanina	3.10-3.125	0.48 ± 0.2	0.32 ± 0.2	0.008
Hipurato	3.96-3.99	1.26 ± 0.6	2.05 ± 0.8	0.000

La diferencia entre los metabolitos del grupo sepsis grave y shock séptico se expresa con la media ± el error standard de la media. \*p ≤ 0.05). La media y el error se han multiplicado por 10<sup>3</sup> para mayor claridad.



### 6.5.3- VALIDACIÓN CRUZADA.

Para evaluar el modelo obtenido, que contribuye a la separación de los pacientes según su estratificación en sepsis grave vs shock séptico, se realizó una validación cruzada de los datos obtenidos en el modelo PLS-DA. El resultado de esta validación cruzada se presenta de forma gráfica con la construcción de la curva ROC.

Los resultados obtenidos (Figura 6.19) muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) presenta una diferencia importante frente a la de entrenamiento (en color azul), y el valor del área bajo la curva (AUC) es de 0.69 (IC 95 %; 0.64-0.88).

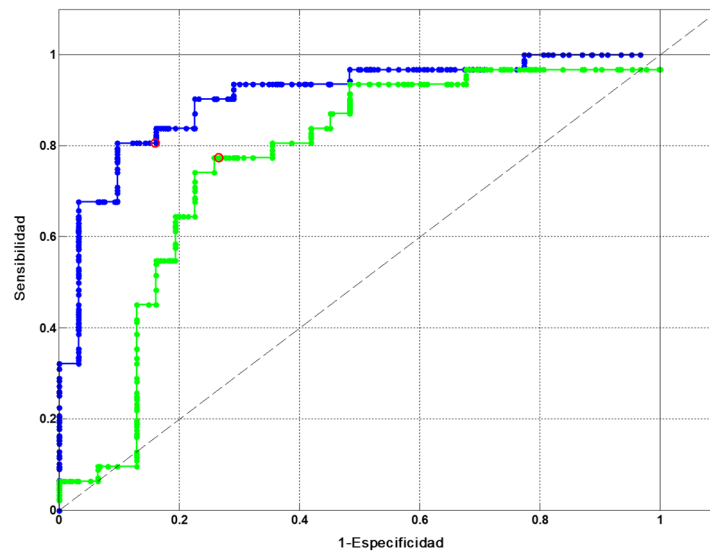


Figura 6.19. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre sepsis grave y shock. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada.

#### **6.5.4- Evolución de los metabolitos en orina.**

La evolución de los niveles de estos metabolitos a lo largo de la estancia del paciente en la UCI la podemos ver en la Figura 6.20. La tendencia de cada metabolito es diferente a la que presenta el resto.

El hipurato es el único metabolito que se encuentra más elevado en los pacientes de shock el primer día frente a la metionina, glutamina, fenilalanina y formato que están más elevados en los pacientes de sepsis grave. En el caso del hipurato y la fenilalanina, sus niveles en los pacientes de sepsis grave permanecen constantes durante toda la evolución. Sin embargo los niveles de estos dos metabolitos en los pacientes de shock, muestran mayor variabilidad a lo largo de la evolución y se van igualando a los de sepsis grave. El hipurato lo hace descendiendo sus niveles y la fenilalanina aumentándolos.

En el caso de la metionina, la evolución de los niveles en los dos grupos presenta una tendencia casi paralela, pero con mayor pendiente descendente en el caso del grupo de sepsis grave, que hace que casi se igualen sus niveles el último día.

La glutamina presenta un descenso inicial en paralelo y un ascenso a partir de la muestra del segundo día que es más pronunciado en las muestras de shock.

Finalmente, el formato, los niveles en el grupo de sepsis grave, inicialmente más elevados, pasan a ser menores a los presentados por el grupo de shock en la muestra del segundo día.

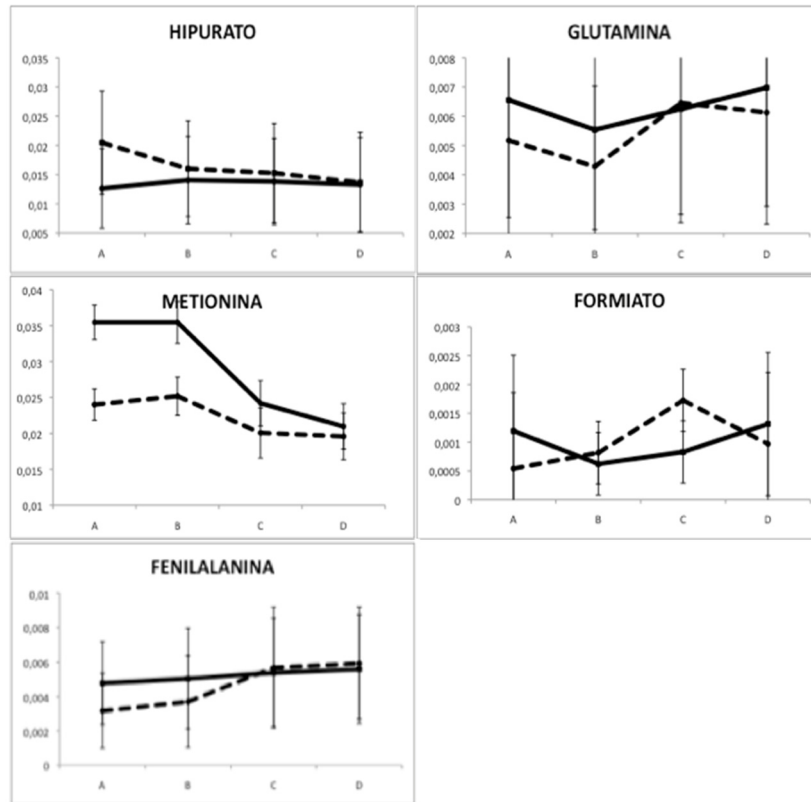


Figura 6.20: Evolución temporal de la concentración relativa de los metabolitos con diferencias estadísticamente significativas entre sepsis grave (línea recta) y shock séptico (línea a trazos).

## **6.6 ANÁLISIS METABOLÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO SEGÚN EL DIAGNÓSTICO DE INGRESO: SEPSIS GRAVE VS SHOCK SÉPTICO.**

### **6.6.1- Análisis no discriminante: PCA**

El análisis de las muestras de suero se ha desarrollado mediante un procedimiento similar al seguido con las muestras de orina. Se ha realizado el análisis no supervisado de 67 muestras de suero A, cuyo resultado se muestra visualmente en el diagrama de puntuaciones (Figura 6.21). Se identificaron dos muestras fuera del intervalo de confianza del 95% (#30 y #34). Se realizó una revisión exhaustiva de los datos clínicos de estos pacientes con el fin de buscar alguna razón que justificase la diferencia de composición metabólica respecto del conjunto de muestras.

La muestra #30 corresponde a una mujer de 80 años con diagnóstico de shock séptico urinario sin bacteriemia, que presentó buen pronóstico en la UCI, pero que falleció en la sala de hospitalización dos semanas después de ser dada de alta. Destacaban como antecedentes haber padecido una neoplasia de mama y estar en la actualidad libre de enfermedad. La #34 corresponde a un varón de 35 años con diagnóstico de sepsis grave pulmonar sin bacteriemia y con antecedentes de diabetes y hábito enólico. Este paciente evolucionó favorablemente y fue dado de alta. Retiramos la muestra #34, por ser muy diferente del conjunto, y repetimos el PCA. El resultado se muestra de forma gráfica en la Figura 6.21 donde se observa un solapamiento casi completo de las muestras de ambos grupos.

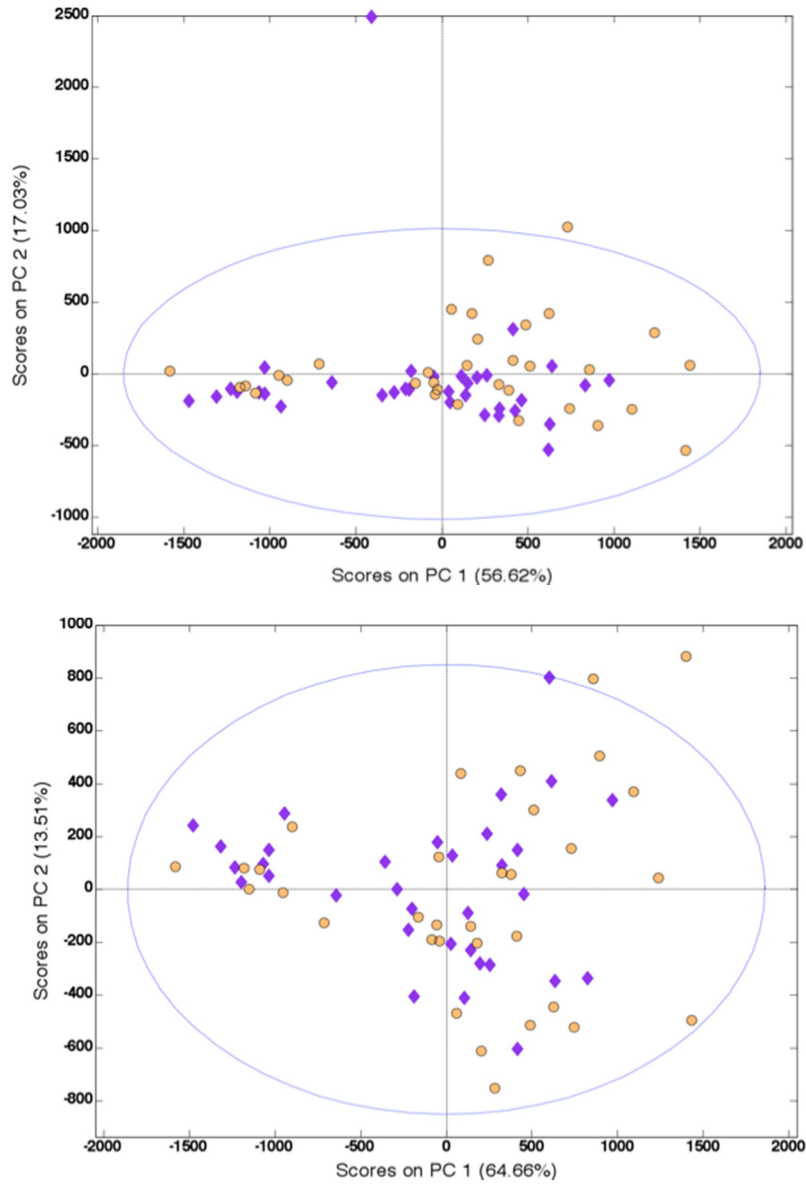


Figura 6.21: A) Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, y B) tras excluir la muestra identificada como aberrantes. Los rombos representan los pacientes diagnosticados de sepsis grave y los círculos, los pacientes de shock séptico.

### **6.6.2- Análisis supervisado: PLSDA.**

Una vez se ha comprobado que las muestras no se agrupan espontáneamente, se procede a construir un modelo discriminador PLS-DA. Se emplearon las dos primeras componentes principales, que explican hasta un 63 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación. El resultado muestra un solapamiento muy importante de las muestras, principalmente en la zona central de la figura, aunque se aprecia una ligera tendencia a la agrupación en dos grupos (Figura 6.22). Los pacientes diagnosticados de shock se agrupan más en los dos cuadrantes derechos y sobre todo en el superior mientras existe un predominio de los pacientes con sepsis grave en los cuadrantes izquierdos e inferior.

Una vez construido el modelo discriminante, procedimos a la identificación de las regiones o picos del espectro con mayor peso en el eje de separación de las muestras. Para ello se consultó el diagrama de cargas del PLSDA, y se comprobó cómo las regiones con mayor contribución al modelo discriminativo eran aquellas asociadas, en el área alifática, a metabolitos como la glucosa (diversos picos), colina, acetoacetato, glicoproteínas, lípidos, VLDL/LDL, colesterol, arginina, creatinina + creatina, prolina, alanina. En la región aromática, las regiones que en mayor medida contribuyeron a la separación entre los dos grupos fueron los lípidos insaturados, la histidina y la metilhistidina (Figura 6.23).

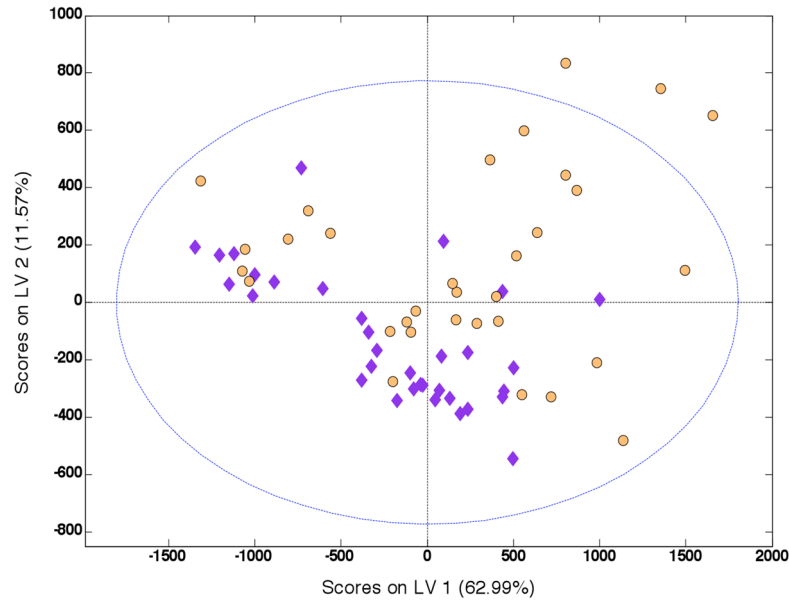


Figura 6.22: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de suero A. Los rombos representan los pacientes diagnosticados de sepsis grave y los círculos, los de shock séptico.

Una vez identificadas las regiones se realizó la asignación e integración de la señal. Para comprobar que las variables continuas se ajustaban a una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre las medias de las integrales de los dos grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El resultado de la cuantificación de los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio y que presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (sepsis grave/shock séptico) se presenta en la Tabla 6.9 y 6.10 respectivamente.

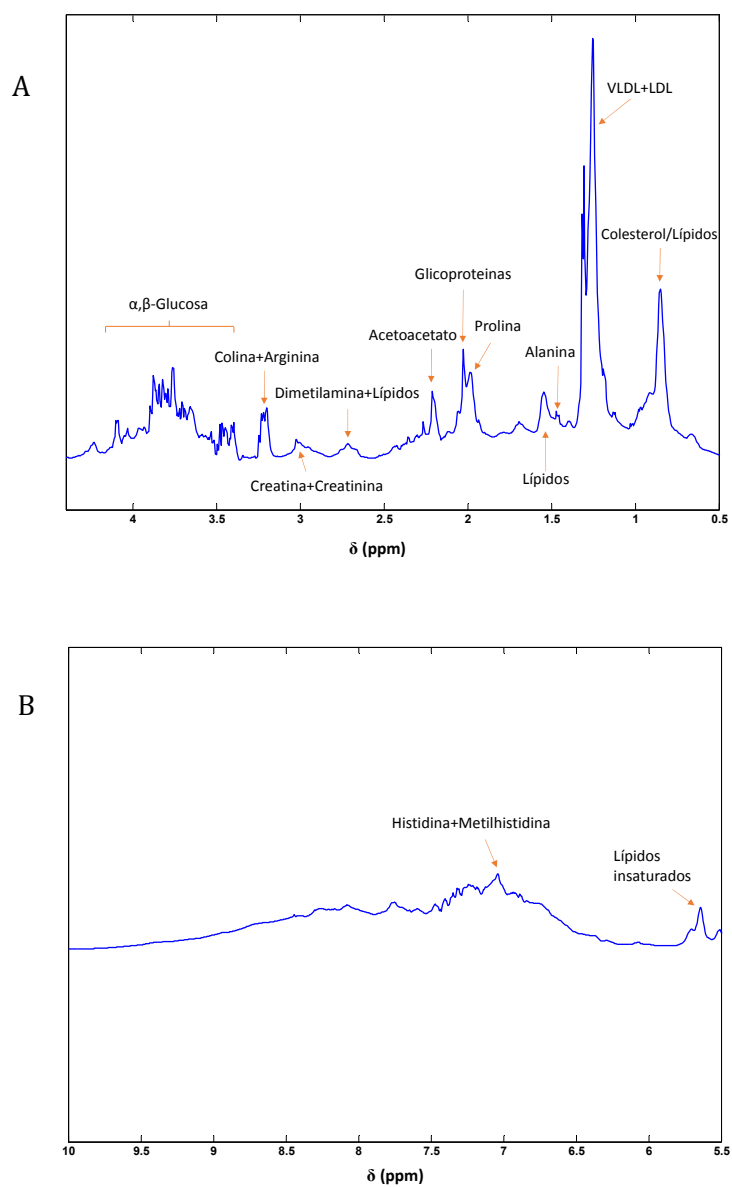


Figura 6.23: Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las muestras de suero A, parte alifática del espectro A) y la parte aromática B). En la figura identifican los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminadorio.



**Tabla 6.9: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes con sepsis grave y shock séptico detectados en suero que presentan un peso importante en el modelo discriminativo.**

Metabolitos	Región	Sepsis grave	Shock séptico	p
Colesterol (LDL/VLDL)	1.23-1.29	10.26 ± 3	9.82 ± 3	0.608
Fenilalanina	7.37-7.43	0.34 ± 0.02	0.31 ± 0.08	0.538
Hidroxibutirato	4.12-4.14	0.26 ± 0.04	0.21 ± 0.01	0.510
Acetoacetato	2.20-2.225	0.77 ± 0.1	0.81 ± 0.2	0.461
Fenilalanina	3.09-3.12	0.2 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.363
Formato	8.42-8.46	0.154 ± 0.02	0.145 ± 0.2	0.112
3-Metilhistidina	7.56-7.62	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.05	0.086
Valina	1.105-1.135	1.04 ± 0.1	0.95 ± 0.2	0.082
Lactato	1.30-1.32	2.10 ± 0.5	2.49 ± 1	0.073
Tirosina	6.88-6.92	0.246 ± 0.03	0.228 ± 0.04	0.068
Lípidos	1.50-1.58	3.17 ± 0.4	2.95 ± 0.4	0.053

La diferencia entre los metabolitos del grupo sepsis grave y shock séptico se expresa con la media ± el error standard de la media. (\*p ≤ 0.05). La media y el error se han multiplicado por 10<sup>3</sup> para mayor claridad.

**Tabla 6.10: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes con sepsis grave y shock séptico detectados en suero que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.**

Metabolitos	Región	Sepsis grave	Shock séptico	p
Histidina Metilhistidina	6.99-7.06	0.57 ± 0.1	0.51 ± 0.1	0.041
Lípidos insaturados	5.23-5.33	1.62 ± 0.3	1.43 ± 0.4	0,037
Colesterol VLDL	0.78-0.89	8.45 ± 1	7.61 ± 1	0.020
Lípidos	2.64-2.78	1.25 ± 0.2	1.11 ± 0.2	0.012
Colesterol	0.61-0.68	1.32 ± 0.2	1.14 ± 0.2	0.012
Isoleucina	1.01-1.035	0.83 ± 0.1	0.72 ± 0.1	0.005
Leucina	0.955-0.985	1.40 ± 0.2	1.21 ± 0.2	0.003
Alanina	1.445-1.485	1.54 ± 0.2	1.35 ± 0.2	0.003
Glucosa	3.37-3.43	0.79 ± 0.1	1.06 ± 0.4	0,002

La diferencia entre los metabolitos del grupo sepsis grave y shock séptico se expresa con la media ± el error standard de la media. (\*p ≤ 0.05). La media y el error se han multiplicado por 10<sup>3</sup> para mayor claridad.

### 6.6.3- Validación cruzada.

Para evaluar el modelo obtenido, que contribuye a la separación de los pacientes según la estratificación de los enfermos en sepsis grave vs shock séptico, se realizó una validación cruzada de los datos obtenidos en el modelo PLS-DA. El resultado de esta validación cruzada se presenta de forma gráfica con la construcción de la curva ROC.

Los resultados obtenidos (Figura 6.24) muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) presenta una diferencia importante frente a la de entrenamiento (en color azul). El valor del área bajo la curva (AUC) es de 0.69 (IC 95 %; 0.64-0.88).

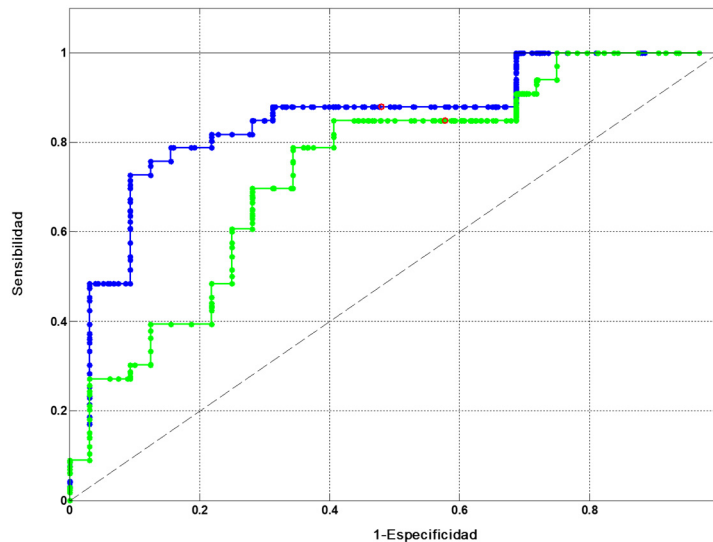


Figura 6.24. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre sepsis y shock séptico en suero. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada.

#### **6.6.4- Evolución de los metabolitos con la evolución.**

La evolución de los niveles de estos metabolitos a lo largo de la estancia del paciente en la UCI la podemos ver en la Figura 6.25. La tendencia de cada metabolito es diferente, sin embargo se pueden ver algunas tendencias parecidas. La leucina, isoleucina, alanina y colesterol presentan valores más elevados en el grupo de sepsis grave y además permanecen casi constantes durante toda la evolución. Sin embargo en el grupo de shock el primer y segundo día sus valores son constantes y a partir del segundo día ascienden para igualarse al grupo de sepsis grave. El colesterol VLDL también parece que permanece constante en el grupo de sepsis grave mientras que en el grupo de shock que inicialmente estaba más reducido, asciende del primer al segundo día para casi igualarse al grupo de sepsis grave. La gráfica de lípidos y sobre todo la de lípidos insaturados, presentan una tendencia casi en paralelo de forma que los valores en el grupo de sepsis grave siempre están por encima y los valores del último día son mayores en ambos grupos a los que presentaban dentro de su grupo inicialmente. La histidina y metilhistidina que inicialmente estaban más elevados sus valores en el grupo de sepsis grave, pasan a ser más reducidos en este grupo comparado con el de shock en la muestra del último día. Con respecto a la glucosa que es el único metabolito que se encuentra más elevado en el grupo de shock, durante la evolución se van reduciendo sus valores e igualando a los del grupo de sepsis grave que permanecen casi constantes durante todo el tiempo.

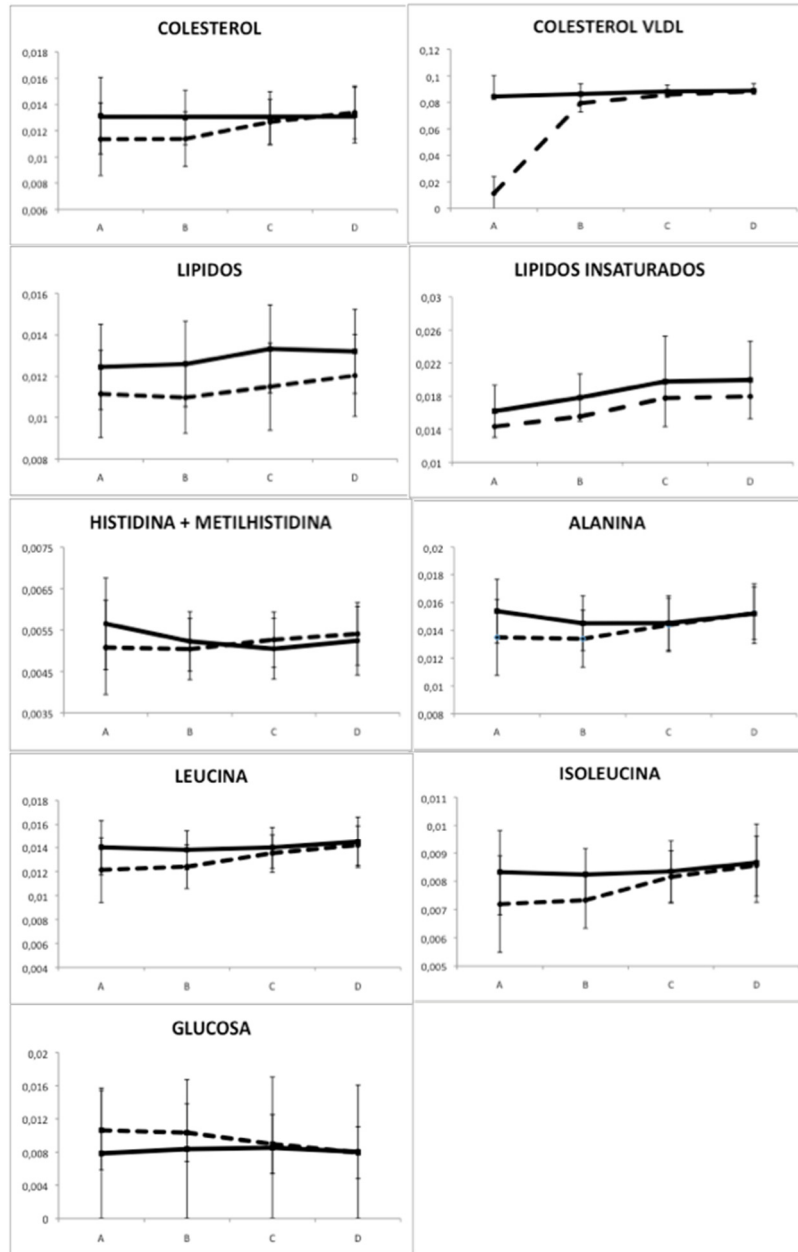


Figura 6.25: Evolución temporal de la concentración relativa de los metabolitos con mayor peso en el modelo y diferencias estadísticamente significativas entre sepsis grave (línea recta) y shock séptico (línea a trazos).

## **6.7- ANÁLISIS METABONÓMICO EN MUESTRAS DE ORINA SEGÚN EL PRONÓSTICO DEL PACIENTE: MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS.**

El cuarto objetivo de esta tesis era obtener y describir un perfil metabólico en muestras de suero y orina, en pacientes con diagnóstico de sepsis grave o shock séptico mediante RMN, durante las primeras 24 h de ingreso en UCI, que pudiera ser utilizado como predictor de mortalidad a los 30 días.

### **6.7.1- Análisis no supervisado: orina A.**

En primer lugar se han utilizado métodos de análisis no supervisado para evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo, comprobar si la distribución de las muestras es homogénea y detectar la presencia de posibles muestras aberrantes.

En el diagrama de puntuaciones del PCA de las muestras de orina A, observamos la presencia de cuatro muestras con una composición metabólica muy diferente del conjunto restante de muestras. Nos ayudamos del gráfico  $T^2$  de Hotelling/Q residuals del PCA (Figura 6.26) para identificar las muestras (#42, #37, #54, #64), y corroborar que las mismas mostraban un comportamiento estadísticamente distinto al del resto de su grupo. Las cuatro quedan fuera del intervalo de confianza del 95%. Tres de ellas pertenecían al grupo de pacientes que sobrevivieron y la cuarta al grupo de pacientes que fallecieron. Con objeto de profundizar en la razón por la cual estas muestras presentaban una composición diferente, se realizó una revisión exhaustiva de los datos incluidos en la historia clínica de estos

pacientes. Desde un punto de vista clínico, el paciente no superviviente (#42) era un hombre que presentó como diagnóstico de ingreso una sepsis grave de origen respiratorio, sin aislamiento de ningún microorganismo en las muestras microbiológicas. Su comportamiento clínico (neumonía atípica) y analítico (PCT0.26, PCR 312) fue de infección vírica. De los tres pacientes supervivientes, el único que era mujer (#37) ingresó con un shock séptico de origen pulmonar y como antecedentes patológicos era obesa mórbida y diabética insulino dependiente. Se aisló en los hemocultivos *Eschericia coli*. El segundo era un hombre de 78 años de edad (#54) con una sepsis grave de origen pulmonar que no presentó ningún aislamiento microbiológico; destacaban como antecedentes patológicos haber padecido una neoplasia de vejiga y encontrarse en la actualidad libre de enfermedad. El tercero (#64) era un hombre de 55 años que ingresó por una sepsis grave abdominal que en el aislamiento microbiológico del aspirado traqueal, apareció *Rothia mucilaginosa*. Este coco Gram positivos aeróbico, se encuentra en la orofaringe y las vías respiratorias superiores, como parte de la flora normal y se considera un patógeno oportunista, más a menudo en pacientes inmunocomprometidos, observándose con menos frecuencia en sujetos inmuno competentes. El enfermo no refirió ninguna patología concomitante ni inmunosupresión. Procedimos a repetir el análisis PCA una vez eliminadas las cuatro muestras anómalas. El diagrama de puntuaciones obtenido (Figura 6.27) muestra un solapamiento casi total de las muestras de los dos grupos.

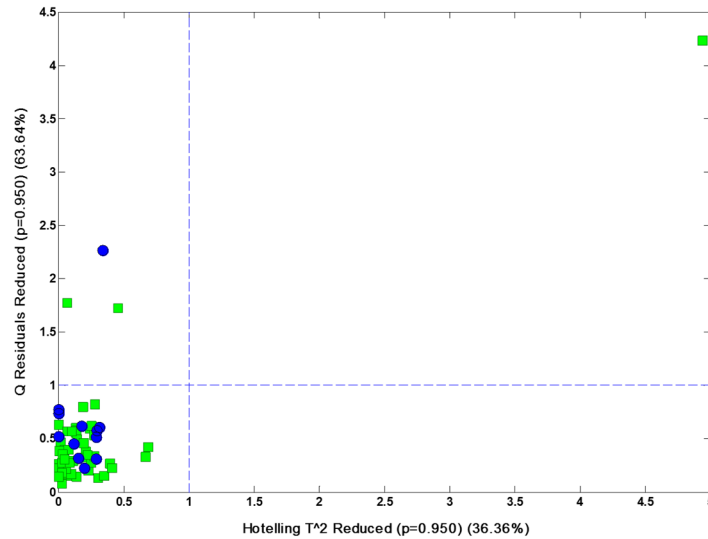


Figura 6.26: Gráfico  $T^2$  de Hotelling/Q residuals del PCA obtenido para las muestras de orina A. Los cuadrados representan a los pacientes supervivientes y los círculos, a los éxitus. Los límites marcados denotan los intervalos de confianza del 95%. Las muestras fuera de este límite pueden considerarse como anómalas o aberrantes.

Adicionalmente, las muestras que corresponden al grupo de éxitus se agrupan formando dos subgrupos. Esto podría deberse a la existencia de otra fuente de variabilidad incluida en los datos, diferente al pronóstico del paciente. En el cuadrante superior se observan tres muestras de pacientes éxitus que se agrupan, separadas del resto de pacientes éxitus (#26, #40, #65).



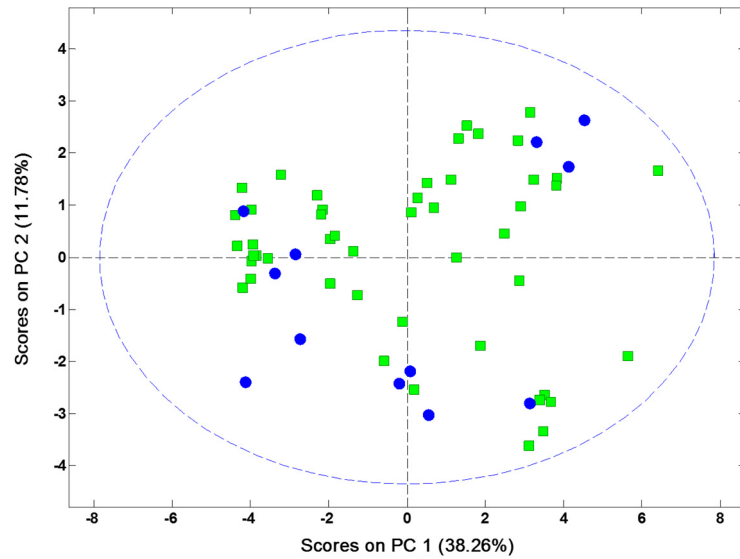


Figura 6.27: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de orina A, tras excluir las muestra identificada como aberrantes. Los cuadrados son las muestras de los supervivientes y los círculos las de los exitus.

Con objeto de entender la separación de estas muestras del resto, se realizó una revisión exhaustiva de los datos incluidos en la historia clínica. Los tres pacientes provenían de una sala de hospitalización. Uno de ellos (#65) era una mujer de 39 años que ingresó con un shock séptico con foco infeccioso no bien definido, y que presentaba una neutropenia secundaria a una neoplasia hematológica. Se aisló una bacteriemia por *E. coli* y falleció al cuarto día de ingreso. Los otros dos pacientes eran hombres jóvenes (44 y 58 años). El más joven (#26) ingresó con una sepsis grave por endocarditis con bacteriemia por *S. aureus* metilicilín resistente y tenía

como antecedentes patológicos insuficiencia cardiaca congestiva terminal. Había estado ingresado en un hospital de crónicos y se encontraba en su domicilio, con apoyo hospitalario. El tercero (#40) de ellos ingresó con un shock séptico de origen pulmonar sin que se pudiera identificar ningún microorganismo. Como comorbilidades era obeso tipo I y fumador.

### **6.7.2 Análisis supervisado: PLSDA orina A.**

Una vez comprobado que las muestras no se agrupan espontáneamente en base a nuestros criterios (supervivientes vs exitus), procedimos a construir un modelo discriminatorio PLS-DA, pero excluyendo del mismo las cuatro muestras identificadas como aberrantes en el PCA.

Se emplearon las dos primeras componentes principales del PLS-DA, que explicaban hasta 28 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase la mayor parte de la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación. Utilizando este análisis, se aprecia una buena separación entre los dos grupos con un mínimo solapamiento (Figura 6.28). Claramente se aprecia una agrupación de los pacientes fallecidos en los dos cuadrantes derechos, sobre todo en el superior, y un predominio de los pacientes supervivientes en los cuadrantes izquierdos.

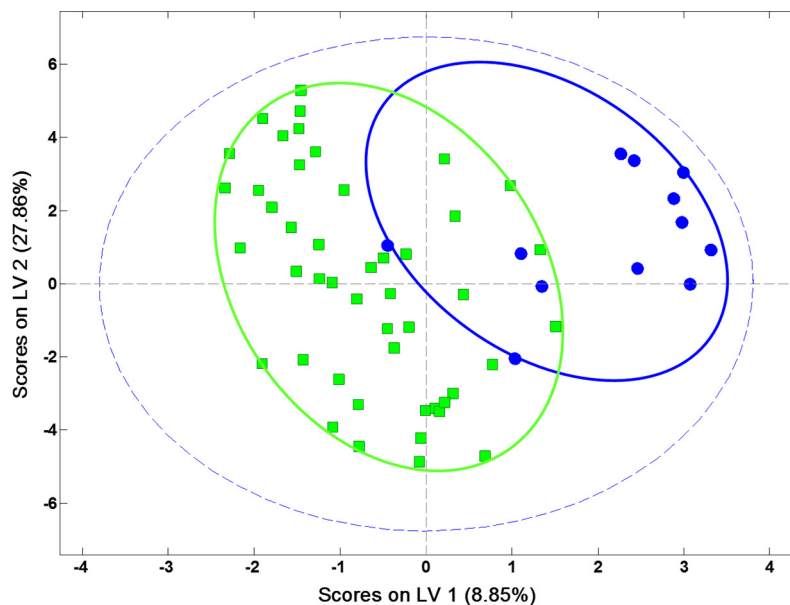


Figura 6.28: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de orina A. Los círculos son las muestras pertenecientes a los pacientes fallecidos al mes y los cuadrados las muestras de los pacientes que sobreviven. Las elipses dibujadas han sido incluidas sólo con un objetivo ilustrativo.

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso fue la identificación de las regiones o picos del espectro que más contribuían en la obtención del modelo discriminante, es decir, las regiones del espectro con mayor peso en el eje de separación de las muestras. Para ello se consultó el diagrama de cargas del PLS-DA (Figura 6.29) y comprobamos como las regiones con mayor contribución al modelo discriminativo fueron aquellas asociadas, en el área alifática, a metabolitos como la glucosa (diversos picos), fenilalanina, arginina, dimetilamina, creatinina + creatina, piruvato,

metionina + glutamina, prolina, alanina, lactato, etanol y butirato. Dentro del área aromática, las regiones que en mayor medida contribuyeron a dicha separación fueron el hipurato, la  $\alpha$ -glucosa y la urea.

Una vez identificadas las regiones con mayor peso en el modelo discriminativo PLS-DA, se realizó la asignación e integración de la señal. Para comprobar que las variables continuas se ajustaban a una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre las medias de las integrales de los dos grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En la Tabla 6.11 se presenta la cuantificación de las regiones que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio. Se incluyen los datos de valor del área promedio representada por el valor del área promedio, el error estándar de la media y el valor de la significación estadística de la comparación de las medias de metabolitos obtenidos de supervivientes frente a exitus. Los metabolitos que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos eran: etanol, metionina, glutamina, arginina, fenilalanina, glucosa e hipurato.

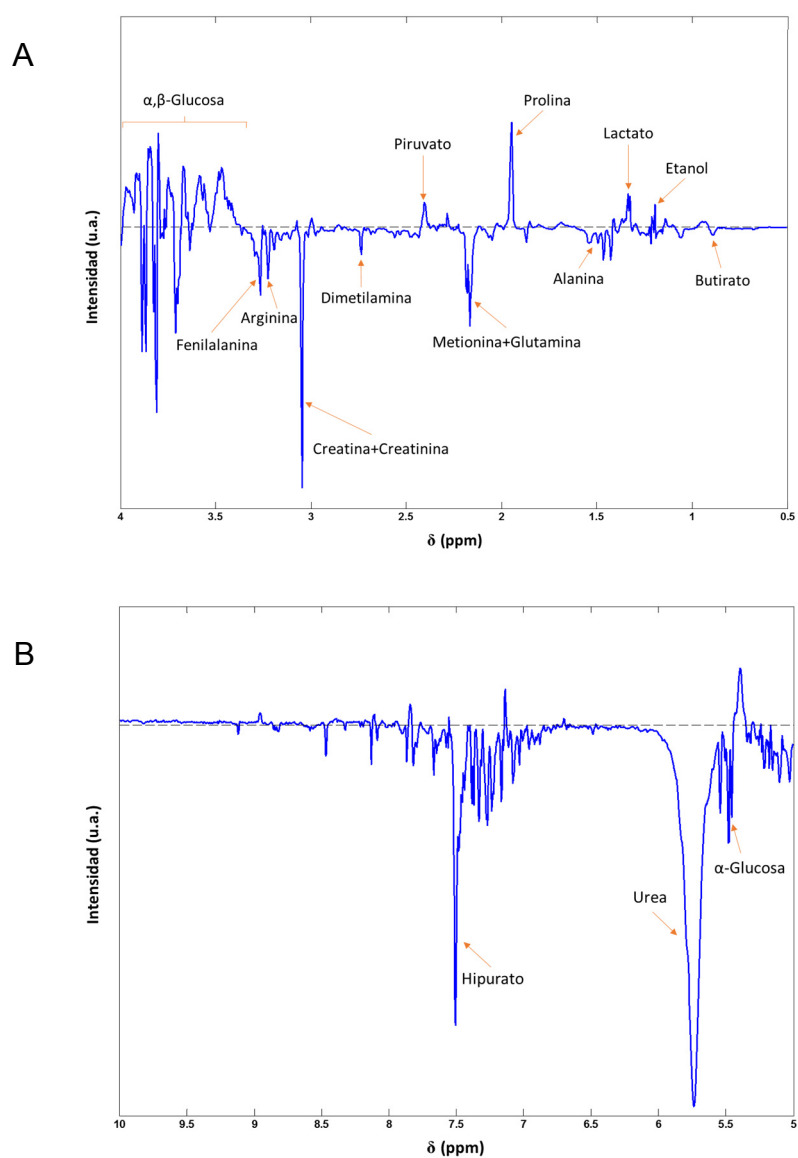


Figura 6.29: Diagrama de cargas del PLS-DA construido con las muestras de orina A, parte alifática del espectro A) y la parte aromática del mismo B). En la figura se han identificado los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminador.

**Tabla 6.11: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes que sobreviven y en los exitus detectados en la muestra de orina A, que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.**

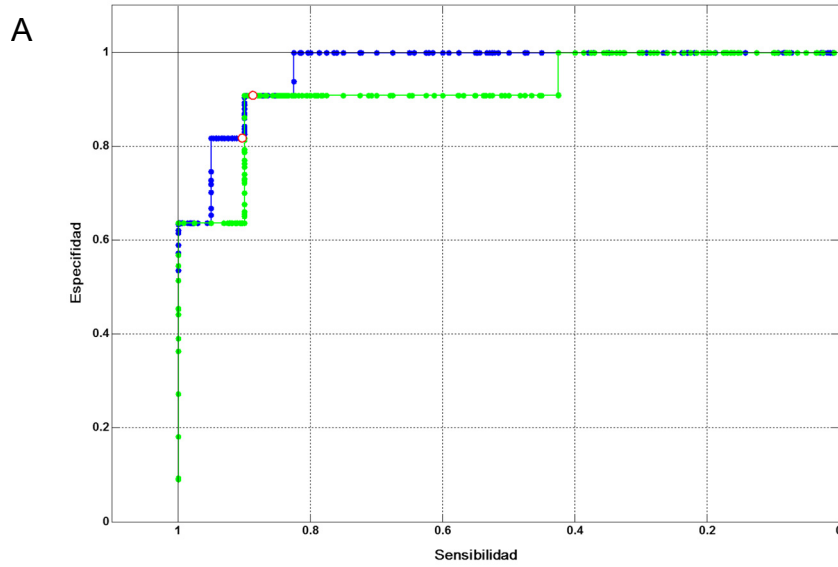
METABOLITOS DOMINANTES	ORINA A supervivientes	Orina A exitus	*P
Desconocido	7.2 ± 0.9	11 ± 2	0.05
Etanol	9.5 ± 0.9	14 ± 2	0.036
Metionina + Glutamina	32 ± 3	18.5 ± 0.9	0.029
Arginina	10.3 ± 0.9	6.2 ± 0.8	0.016
Fenilalanina	12 ± 1	5.7 ± 0.7	0.007
Glucosa	0.53 ± 0.06	1.6 ± 0.3	8e-5
Hipurato	0.67 ± 0.07	3 ± 0.7	8e-5

La diferencia entre los metabolitos del grupo exitus y el grupo supervivientes se expresa con la media ± el error standard de la media. \*p ≤ 0.05). La media y el error se han multiplicado por 10<sup>3</sup> para mayor claridad.

### 6.7.3 Validación cruzada

Para evaluar la calidad y robustez del modelo se ha realizado una validación cruzada de los datos. Para comprobar la bondad del modelo predictivo se empleó una validación cruzada tipo Venetian Blinds. El resultado de esta validación cruzada se presenta de forma gráfica con la construcción de la curva ROC (Figura 6.30). La curva obtenida de la validación cruzada (en color verde) fue muy similar a la de entrenamiento (en color azul), y el valor del área bajo la curva

(AUC) fue de 0.83 (IC 95 %; 0.71-0.95), lo que señala la robustez del modelo predictivo.



B

	Exitus	Supervivientes
Exitus predichos	11	4
Supervivientes predichos	1	44

Figura 6.30: A) Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada. B) Tabla de frecuencias para la discriminación entre pacientes supervivientes y exitus.

De forma numérica, se valoró la potencia y exactitud del modelo en base a los parámetros estadísticos de validación R<sup>2</sup><sub>Y</sub> y Q<sup>2</sup>. La medida R<sup>2</sup><sub>Y</sub> describe el porcentaje de variación explicada por el modelo y Q<sup>2</sup> muestra su habilidad predictiva. Los altos valores de los parámetros estadísticos R<sup>2</sup><sub>Y</sub>=0.84 y Q<sup>2</sup>=0.44 confirmaron que existía una clara separación entre ambos grupos, así como la elevada potencia del modelo predictivo.

Con el fin de validar los resultados obtenidos para el modelo estadístico y descartar un posible sobreajuste del mismo, se calculó el test de permutación para el modelo PLS-DA equivalente. El p-valor obtenido en el test de permutación, Rand t-test ( $p < 0.05$ ), reflejó la validez de los resultados alcanzados.

Como medida de la calidad de las clasificaciones binarias observadas y predichas se utilizó el coeficiente de correlación de Matthews, que tiene en cuenta verdaderos y falsos positivos y es una medida equilibrada que puede usarse incluso si los tamaños de las clases son muy diferentes entre sí. Un coeficiente de +1 es la predicción perfecta, mientras que -1 indica un desacuerdo total entre lo observado y lo predicho.

La lectura detallada de la matriz de confusión obtenida para el modelo discriminativo (Tabla 6.12) indicó que el modelo predice con un 92% de acierto las muestras que presentan mal pronóstico y sólo indicaría falsos exitus en un 8% de los casos. Por otro lado, con respecto a los supervivientes, el modelo fue capaz de predecir con un 92% de acierto las muestras de pacientes supervivientes y también en un 8% de los casos indicó de forma errónea que sobrevive al proceso.



**Tabla 6.12: Matriz de confusión del modelo PLS-DA para la orina A.**

GRUPOS	VP	FP	VN	FN
Exitus	0.9166	0.0833	0.9166	0.0833
Supervivientes	0.9166	0.0833	0.9166	0.0833

Coeficiente de correlación de Matthew = 0.834, VP, verdaderos positivos; FP, Falsos positivos; VN, verdaderos negativos; FN, Falsos negativos.

#### 6.7.4 Análisis supervisado: PLS-DA orina B.

Una vez analizada la orina del día del ingreso, se analizó la orina a las 24 h de estancia en UCI. Se emplearon las dos primeras componentes principales del PLS-DA, que explicaban hasta un 28 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación. En la gráfica de puntuaciones del PLS-DA (Figura 6.31) podemos observar como las muestras de orina B se agrupan en base a los criterios de clasificación (supervivientes y exitus), con un mínimo solapamiento. La separación en el espacio multivariable PLS-DA entre ambos grupos es mayor que el que se podía observar para las muestras de orina A.

Una vez construido el modelo discriminante, el siguiente paso fue la identificación y cuantificación de las regiones o picos del espectro que más participan en nuestro modelo para explicar la varianza del conjunto. En la Tabla 6.13 se muestran los valores de la

cuantificación de los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminativo, el valor del área relativa promedio para cada uno de los dos grupos, el error estándar de la media y el valor de significación estadística  $p$ , de la comparación de las medias de metabolitos obtenidos de pacientes supervivientes frente a exitus, en la muestra de orina del segundo día en UCI.

Comparándolo con los resultados obtenidos para las muestras de orina A, comprobamos como la región que comprende un pico solapada de metionina-glutamina ya no presenta diferencias estadísticamente significativas el segundo día.

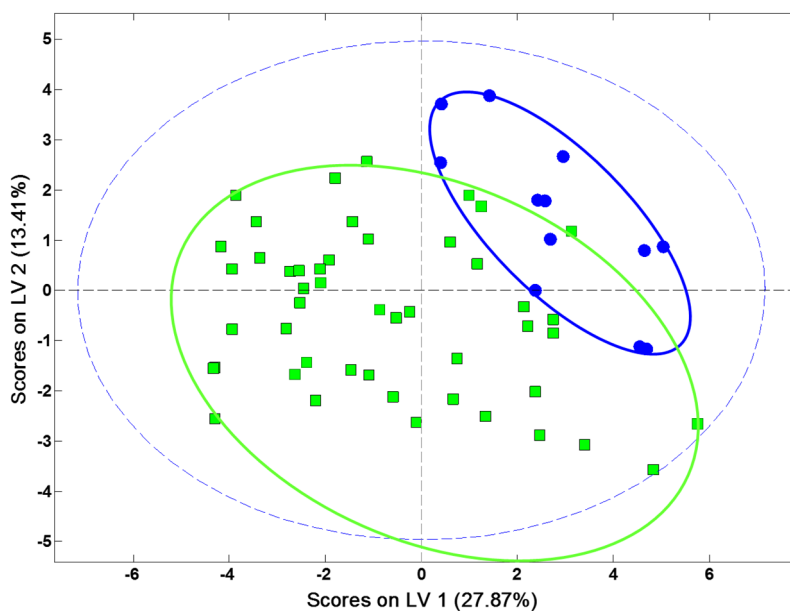


Figura 6.31: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA de las muestras de orina B. Los círculos son las muestras pertenecientes a los pacientes fallecidos al mes y los cuadrados las muestras de los pacientes que sobreviven. Las elipses dibujadas han sido incluidas sólo con un objetivo ilustrativo.

**Tabla 6.13: Concentración relativa de los metabolitos en pacientes que sobreviven y en los exitus detectados en orina (orina B) que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.**

METABOLITOS DOMINANTES	Orina B supervivientes	Orina B exitus	*p
Metionina + Glutamina	27 ± 3	23 ± 3	0.49
Etanol	11 ± 1	17 ± 3	0.018
Glucosa	0.33 ± 0.02	2.5 ± 0.7	0.0043
Hipurato	0.9 ± 0.1	4 ± 1	0.0013
Fenilalanina	11.2 ± 0.8	6.1 ± 0.6	0.0011
Desconocido	6.1 ± 0.5	12 ± 3	0.009
Arginina	13 ± 1	46 ± 0.5	0.0005

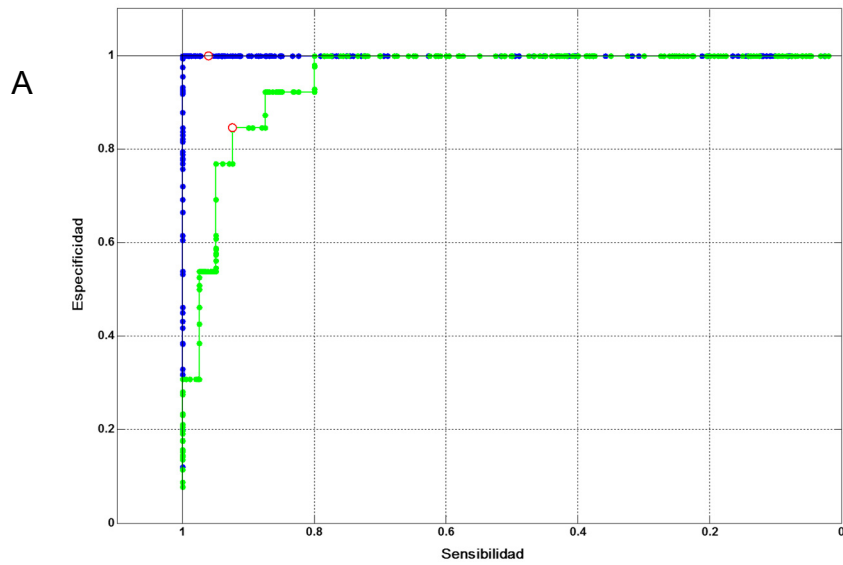
La diferencia entre los metabolitos del grupo exitus y el grupo supervivientes se expresa con la media ± el error standard de la media. \*p ≤ 0.05). Para mayor clarificación se ha multiplicado la media y el error por 10<sup>3</sup>.

### 6.7.5 VALIDACIÓN CRUZADA.

El resultado de la validación cruzada al igual que hemos hecho en la orina A, se presenta de forma gráfica con la construcción de la curva ROC, y de forma numérica en base a los parámetros de validación R2Y y Q2.

Los resultados obtenidos (Figura 6.32) mostraron que la curva de validación cruzada (en color verde) era muy similar a la de entrenamiento (en color azul), y el valor del AUC es 0.88 (IC 95%;

0.78-0.97). Este valor fue superior (+6%) al que se obtuvo para la curva ROC construida con las orinas A.



B

	Exitus	Supervivientes
Exitus predichos	10	2
Supervivientes predichos	2	46

Figura 6.32. A) Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada. B) Tabla de frecuencias para la discriminación entre pacientes supervivientes y exitus.

Los altos valores de los parámetros estadísticos  $R^2Y=0.81$  y  $Q^2=0.43$  confirmaron la potencia del modelo predictivo, y que existía una clara separación entre los dos grupos. Con el fin de validar los resultados obtenidos para el modelo estadístico, se calculó el test de permutación para el modelo PLS-DA equivalente. El p-valor obtenido en el test de permutación, Rand t-test ( $p < 0.05$ ), reflejó la validez de los resultados alcanzados.

La lectura detallada de la matriz de confusión obtenida para el modelo discriminativo (Tabla 6.14) indica que el modelo predice con un 83% de acierto las muestras que presentan mal pronóstico y sólo indicaría falsos exitus en un 5% de los casos. Por otro lado, en los pacientes supervivientes, el modelo sería capaz de predecir con un 96% de acierto las muestras de pacientes supervivientes y en un 17% de los casos nos indicará de forma errónea que el paciente sobrevive.

**Tabla 6.14: Matriz de confusión del modelo PLS-DA para la orina B.**

GRUPOS	VP	FP	VN	FN
Éxitus	0.8333	0.0416	0.9583	0.1666
Supervivientes	0.9583	0.1666	0.8333	0.0416

Coefficiente de correlación de Matthew = 0.800, VP: verdaderos positivos, FP: Falsos positivos, VN: verdaderos negativos, FN: Falsos negativos.

#### **6.7.6- Evolución de los metabolitos.**

Los metabolitos seleccionados para construir el modelo presentan una evolución temporal a lo largo del ingreso del paciente, que es característica de cada uno de los grupos según el paciente sobreviva o fallezca (Figura 6.33).

Si analizamos la evolución de los metabolitos podemos apreciar dos tendencias. Por un lado, los metabolitos que estaban en mayor cantidad en los pacientes que fallecían (glucosa, hipurato, etanol y el metabolito desconocido), durante la evolución presentaban un aumento de sus niveles al segundo día y al último. Sin embargo en los supervivientes se mantenían muy estables (casi una línea recta).

La otra tendencia que observamos se produjo en los metabolitos que estaban en mayor concentración en los pacientes que sobrevivían (fenilalanina, glutamina+ metionina, arginina). Vemos que durante la evolución, sus valores se iban igualando a los de los pacientes que fallecían, es decir, se apreciaba una convergencia.

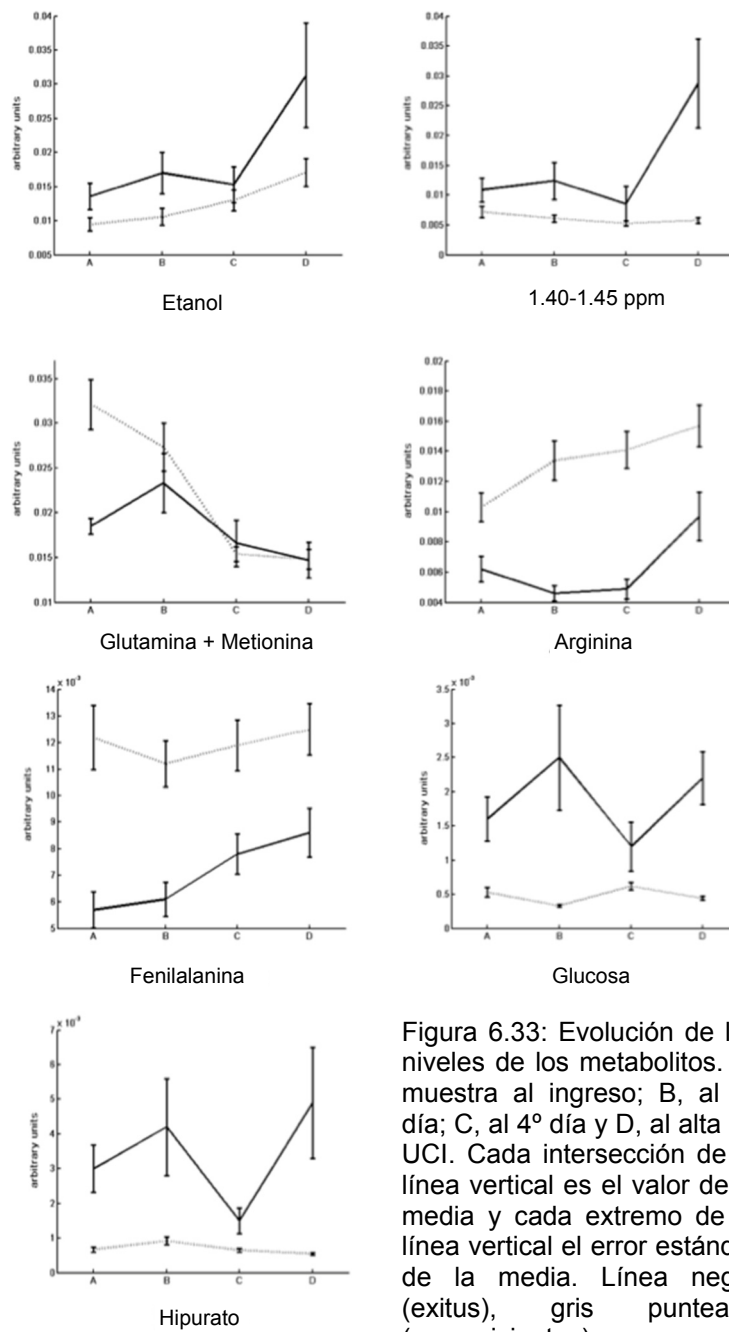


Figura 6.33: Evolución de los niveles de los metabolitos. A, muestra al ingreso; B, al 2º día; C, al 4º día y D, al alta de UCI. Cada intersección de la línea vertical es el valor de la media y cada extremo de la línea vertical el error estándar de la media. Línea negra (exitus), gris punteada (supervivientes).

## **6.8- ANÁLISIS METABONÓMICO EN MUESTRAS DE SUERO SEGÚN EL PRONÓSTICO DEL PACIENTE: MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS.**

### **6.8.1- Análisis no supervisado: PCA suero A.**

Se midieron un total de 67 muestras de suero de similar manera a como procedimos en el PCA de las muestras de suero en el estudio de sepsis grave/shock séptico. Inicialmente se realizó un gráfico  $T^2$  de Hotelling/Q residuals del PCA que se muestra en la Figura 6.34. Las muestras situadas fuera de los límites del 95% de confianza pueden considerarse como anómalas o aberrantes.

Posteriormente retiramos la muestra #34 (superviviente) por ser muy diferente del conjunto, y procedimos a repetir el PCA (Figura 6.35). El diagrama de puntuaciones mostró el solapamiento de los dos grupos de muestras, aunque ya se apreciaba una tendencia de separación del grupo de los exitus hacia la derecha y del grupo de pacientes supervivientes hacia los cuadrantes izquierdos. La separación entre los dos grupos no era definitiva y por ello procedimos a aplicar un método discriminativo tipo PLS-DA.



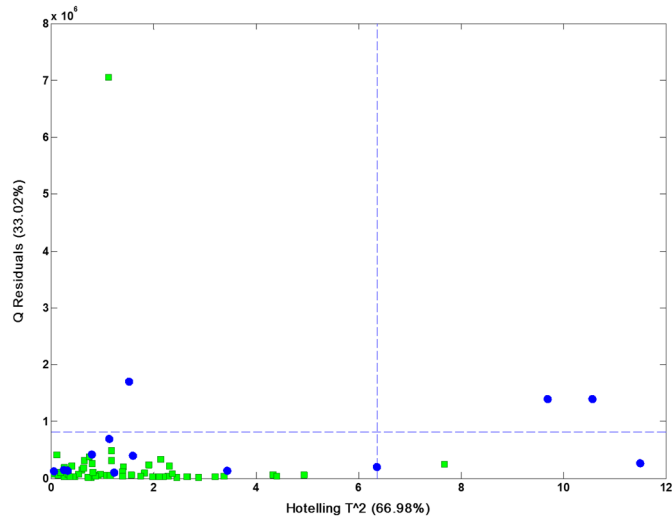


Figura 6.34: Gráfico T<sup>2</sup> de Hotelling/Q residuals del PCA obtenido para las muestras de suero A. Los cuadrados representan a los supervivientes y los círculos, los exitus. Los límites marcados denotan los intervalos de confianza del 95%.

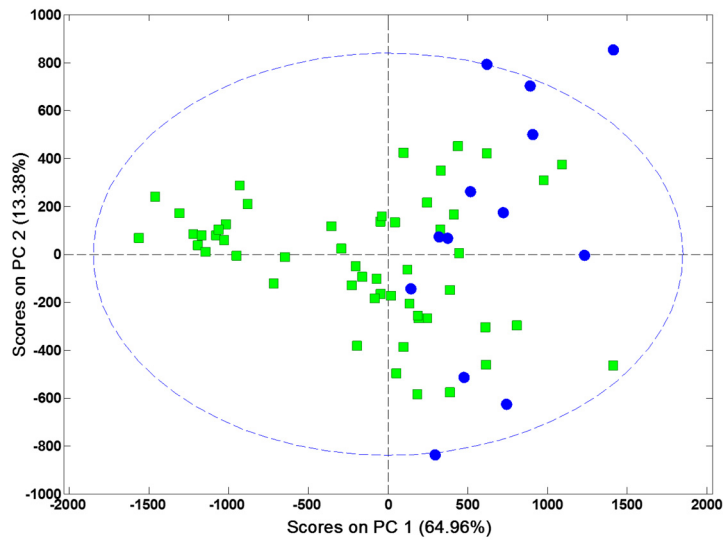


Figura 6.35: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, tras excluir la muestra identificada como aberrante. Los cuadrados son las muestras de los supervivientes y los círculos, los exitus.

### 6.8.2- Análisis supervisado PLS-DA. SUERO A.

En base a nuestros criterios, supervivientes vs exitus, procedemos a construir un modelo discriminador PLS-DA. Se emplearon las dos primeras componentes principales del PLS-DA, que explicaban hasta un 56 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo que eliminase toda la variabilidad no relacionada directamente con nuestro criterio de clasificación. Utilizando este análisis, se observó que se obtenía una separación de los dos grupos y un mínimo solapamiento de las muestras (Figura 6.36). Claramente se aprecia una agrupación de los pacientes fallecidos en los dos cuadrantes derechos y más predominantes en el superior, y una disposición de los pacientes vivos en los cuadrantes izquierdos e inferiores.

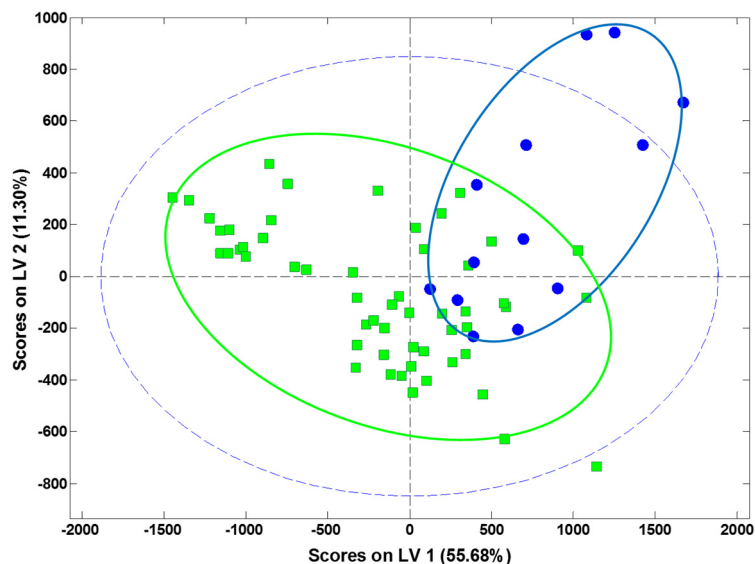


Figura 6.36: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA (suero A). Los círculos son los pacientes fallecidos al mes, y los cuadrados los que sobreviven. Las elipses han sido incluidas con un objetivo ilustrativo.

En este análisis se identificaron 4 muestras fuera del intervalo de confianza del 95%, 3 del grupo de exitus y una del grupo de supervivientes (#24, #30, #53, #61). Todos ellos ingresaron como shock séptico. De estos cuatro pacientes, 3 de ellos presentaron bacteriemia. Uno de ellos (#53) era un hombre joven, 41 años, con una neoplasia hematológica y neutropenia, que ingresó con un shock séptico de origen pulmonar y bacteriemia por *S. aureus* meticilin resistente. Los otros dos pacientes eran dos sepsis urinarias. Una de ellas (#24) en un hombre de 79 años con bacteriemia por un *Corynebacterium* spp. y antecedentes de diabetes. La muestra del otro paciente (#30) con infección urinaria, permaneció en la nevera 24 horas antes de su congelación. Es probable que aunque macroscópicamente la muestra no presentaba ninguna alteración, metabólicamente sí que estuviera alterada, y esto se pudiera ver reflejado en la composición metabólica de la muestra. La cuarta paciente (#61) era una mujer sin foco infeccioso claro, en la que como resultado microbiológico se aisló en el hemocultivo *S. agalactiae*. Como comorbilidades destacaba que era diabética y padecía una hepatopatía crónica por virus C. En los últimos años existe en adultos un aumento en el número de infecciones por este microorganismo, siendo la manifestación clínica más frecuente la bacteriemia primaria sin puerta de entrada conocida. La padecen especialmente los adultos mayores de 60 años y los que presentan enfermedades crónicas siendo las más comunes la diabetes y las enfermedades hepáticas.

La identificación de las regiones o picos del espectro que tenían más peso en nuestro modelo para explicar la varianza del conjunto la realizamos en base al diagrama de cargas (Figura 6.37).

En las Tabla 6.15 y 6.16 se recogen los datos de la cuantificación de las regiones que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio de supervivientes frente a exitus. Dentro del área alifática metabolitos como la glucosa (diversos picos), glicerol, colina, prolina, fenilalanina, acetoacetato, lactato, VLDL + LDL, colesterol/lípidos tenían un peso importante en el PLS-DA. En el área aromática se identificaron metabolitos como el formiato, fenilalanina, lípidos insaturados, histidina + metilhistidina.

**Tabla 6.15: Metabolitos en suero con contribución importante al modelo.**

Metabolitos	Región	No exitus	Exitus	p
Glicerol	4.01-4.07	0.93 ± 0.5	1.02 ± 0.2	0.56
Lípidos insaturados	5.54-5.76	0.38 ± 0.04	0.45 ± 0.03	0.56
Arginina	3.22-3.24	0.54 ± 0.1	0.57 ± 0.2	0.50
Lípidos	1.96-2.01	2.65 ± 0.3	2.78 ± 0.5	0.29
Colina	3.13-3.21	1.13 ± 0.3	1.01 ± 0.2	0.21
Fenilalanina	7.37-7.43	0.34 ± 0.2	0.27 ± 0.03	0.14
Colesterol	0.61-0.65	0.66 ± 0.2	0.58 ± 0.1	0.09

La diferencia entre los metabolitos del grupo exitus y el grupo supervivientes se expresa con la media ± el error standard de la media. (\*p ≤ 0.05). Para mayor clarificación se ha multiplicado la media y el error por 10<sup>3</sup>.

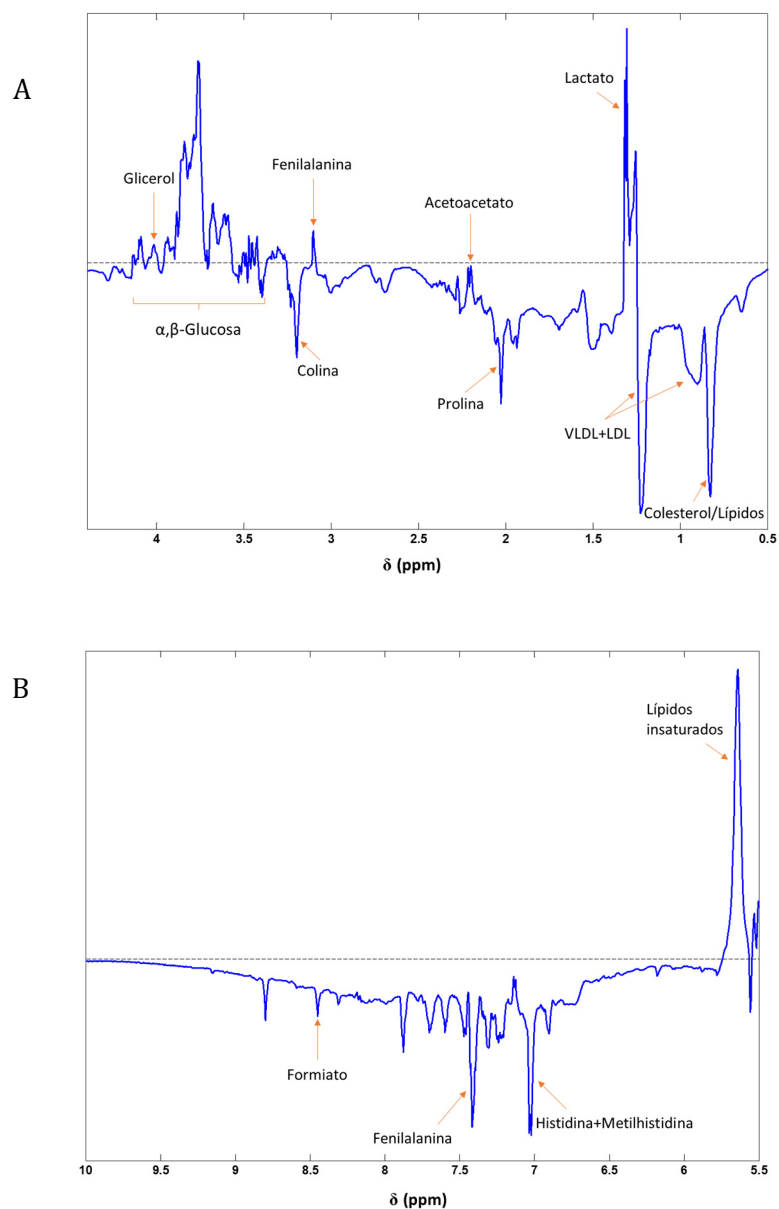


Figura 6.37: Diagrama de cargas del PLS-DA obtenido con las muestras de suero A, A) parte alifática del espectro, B) parte aromática. En la figura se han identificado los metabolitos que contribuyen en mayor medida al modelo discriminatorio.

**Tabla 6.16: Metabolitos en suero con diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.**

Metabolitos	Región	No exitus	Exitus	p
Glucosa	3.70-3.90	6.63 ± 3	8.87 ± 5	0.036
Leucina	0.96-0.985	1.12 ± 0.2	0.96 ± 0.2	0.018
Isoleucina	1.01-1.035	0.8 ± 0.2	0.68 ± 0.1	0.012
Lípidos (LDL/VLDL)	1.23-1.30	10.41 ± 3	13.23 ± 5	0.012
Acetoacetato	2.18-2.22	1.25 ± 0.3	1.47 ± 0.3	0.009
Histidina	6.99-7.06	0.56 ± 0.1	0.46 ± 0.08	0.005
Colesterol VLDL	0.875-0.92	2.68 ± 0.4	2.29 ± 0.3	0.001
3-Metilhistidina	7.56-7.62	0.28 ± 0.05	0.23 ± 0.04	0.001
Tirosina	6.88-6.92	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.03	8e-4
Glutamina Glutamato	2.08-2.14	1.53 ± 0.2	1.25 ± 0.2	1-e4
Lactato	1.30-1.32	2.06 ± 0.6	3.18 ± 1	1e-5
Prolina Glutamina	2.05-2.08	1.08 ± 0.1	0.87 ± 0.1	6-e6
Formato	8.42-8.48	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.03	8e-5

La diferencia entre los metabolitos del grupo exitus y el grupo supervivientes se expresa con la media ± el error standard de la media. \*p ≤ 0.05). Para mayor clarificación se ha multiplicado la media y el error por 10<sup>3</sup>.

### 6.8.3- Validación cruzada.

Los resultados obtenidos muestran que la curva de validación cruzada (en color verde) era muy similar a la de entrenamiento (en color azul), y el valor del AUC era 0.79 (IC 95%; 0.67-0.91). El valor del AUC era inferior al obtenido para las muestras de orina A (0.83) (Figura 6.38).

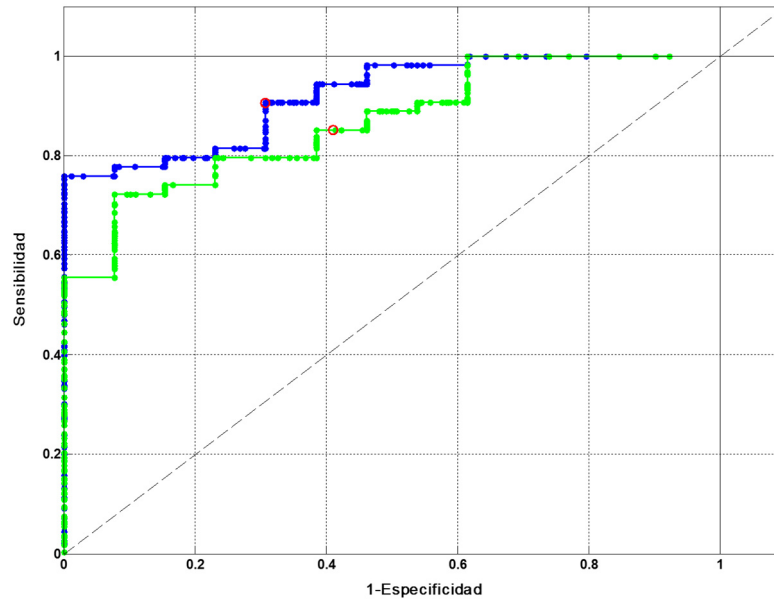


Figura 6.38. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus en muestras de suero A. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada.

Los parámetros estadísticos,  $R^2Y=0.86$  y  $Q^2=0.33$ , para valorar la bondad de ajuste y la capacidad predictiva del modelo, eran peores a los obtenidos en orina como potencia predictiva del modelo.

#### 6.8.4- Análisis no supervisado. PCA. Suero B

Para el estudio metabólico del suero B se pudieron incluir un total de 65 muestras. El resultado del análisis no supervisado PCA con las muestras de suero B se muestra de forma visual con su diagrama de puntuaciones (Figura 6.39) Las muestras aparecían solapadas aunque se apreciaba una tendencia a su agrupación. Las muestras de pacientes exitus aparecían en los cuadrantes derechos y los supervivientes, ocupaban prácticamente todo el espacio de proyección multivariable. No se apreciaba una buena separación de los dos grupos.

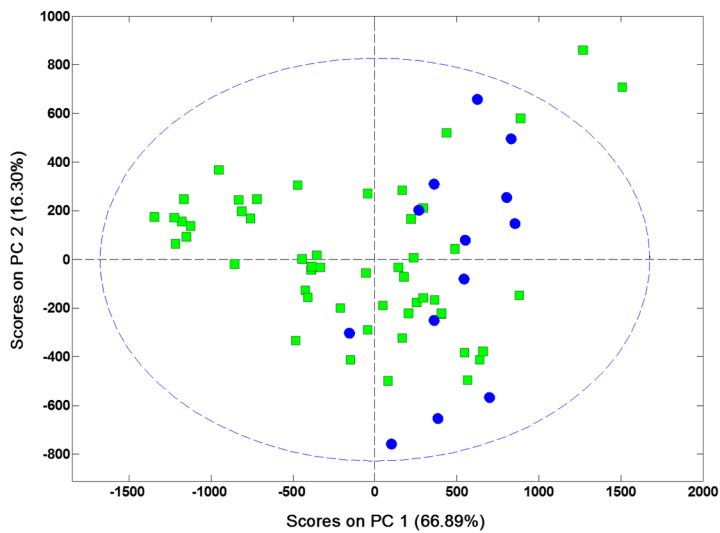


Figura 6.39: Diagrama de puntuaciones de las dos primeras componentes del PCA de todas las muestras de suero A, tras excluir la muestra identificada como aberrante. Los cuadrados son las muestras de los supervivientes y los círculos las de los exitus.



### 6.8.5- Análisis supervisado: PLS-DA suero B.

Se emplearon las dos primeras componentes principales del PLS-DA, que explicaban hasta un 66 % de la variabilidad total, y se procedió a construir un modelo discriminativo. Utilizando esta técnica discriminativa comprobamos como igualmente no se obtenía muy buena separación de los dos grupos y persistía el solapamiento de las muestras (Figura 6.40).

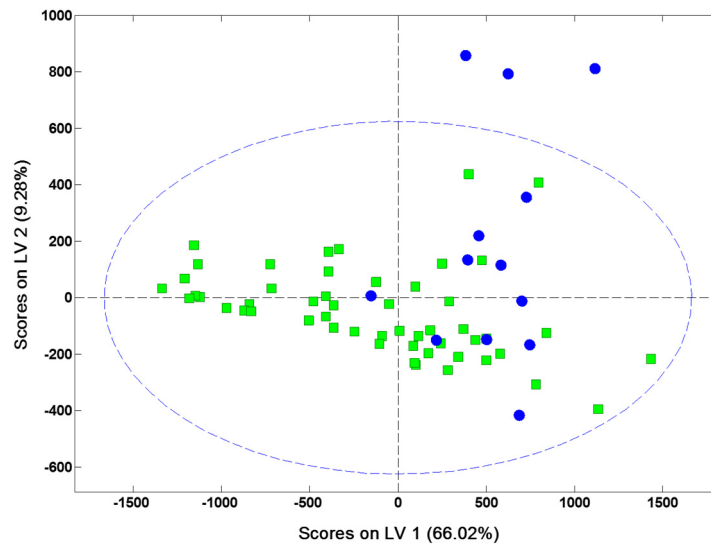


Figura 6.40: Diagrama de puntuaciones de la primera y segunda componente del PLS-DA (suero B). Los círculos son las muestras pertenecientes a los pacientes fallecidos al mes y los cuadrados las muestras de los que sobreviven.

Identificamos tres pacientes que se proyectaban fuera del intervalo de confianza del 95% (# 30, # 53, # 60), dos eran similares a los encontrados en el PLS-DA de la muestra A. La muestra #60 correspondía a una mujer de 70 años, diabética, que ingresó con un

cuadro de shock séptico pulmonar, que pertenecía al grupo de exitus y en la que se aisló un *Streptococo aureus* meticilin resistente en la muestra de aspirado traqueal.

Al analizar con detalle el diagrama de puntuaciones del PLS-DA pudimos observar cómo había un agrupamiento de las muestras de exitus hacía los valores positivos de la primera variable latente, aunque el solapamiento era total con las muestras de supervivientes.

#### 6.8.6- Validación cruzada.

Los resultados obtenidos (Figura 6.41) mostraron que la curva de validación cruzada (verde) era muy similar a la de entrenamiento (azul), y el valor del AUC era 0.76 (IC 95%; 0.63-0.89).

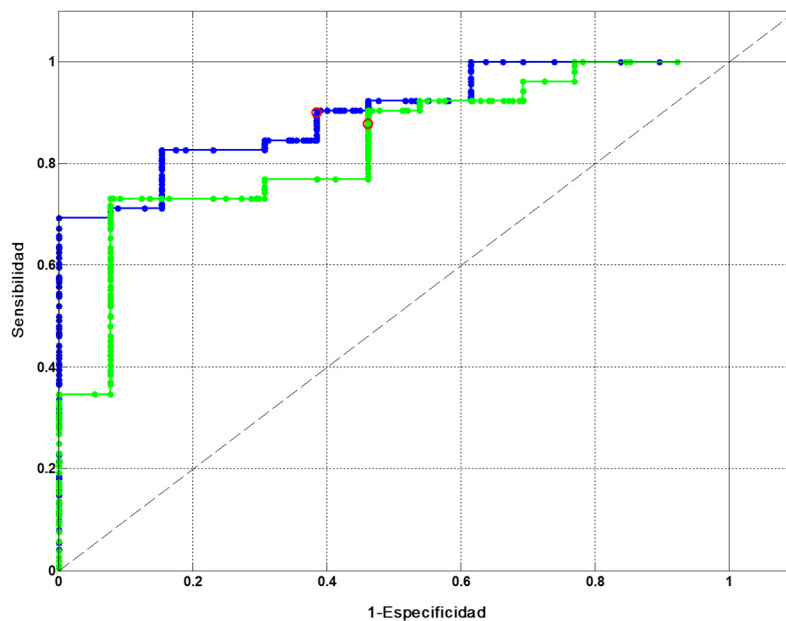


Figura 6.41. Curva ROC obtenida de la validación cruzada del modelo PLS-DA que discrimina entre supervivientes y exitus en muestras de suero B. La línea azul corresponde a los datos de entrenamiento y la línea verde, a la validación cruzada.

Los resultados de los parámetros estadísticos,  $R^2=0.86$  y  $Q^2=0.25$ , para valorar la bondad de ajuste y la capacidad predictiva del modelo, eran peores a los obtenidos en orina como potencia predictiva del modelo.

#### **6.8.7- Evolución de metabolitos en suero según pronóstico.**

La evolución de los metabolitos en suero de forma global presentaba en todos los casos una tendencia parecida ya que existía una confluencia de los niveles de metabolitos de los dos grupos a las 72 horas del ingreso, es decir en la muestra C (Figura 6.42).

Si los analizáramos por separado podíamos observar que leucina, colesterol VLDL, histidina/metionina, metilhistidina, isoleucina, glutamina/glutamato, formato y prolina/glutamina se encontraban más elevados en los pacientes que sobrevivían, durante toda la evolución. La tendencia a converger en la muestra C, no era tan evidente en los metabolitos histidina/metionina, metilhistidina y parecía que sus valores discurrían en paralelo.

Los metabolitos que eran más abundantes en el grupo de pacientes que fallecían, colesterol LDL, acetoacetato y lactato, en este grupo sus valores disminuían hasta igualarse a los del grupo de supervivientes, en la muestra C. La glucosa sin embargo iba disminuyendo más lentamente y se igualaba al grupo de supervivientes en la muestra del día de alta o exitus del paciente, es decir en la muestra D.

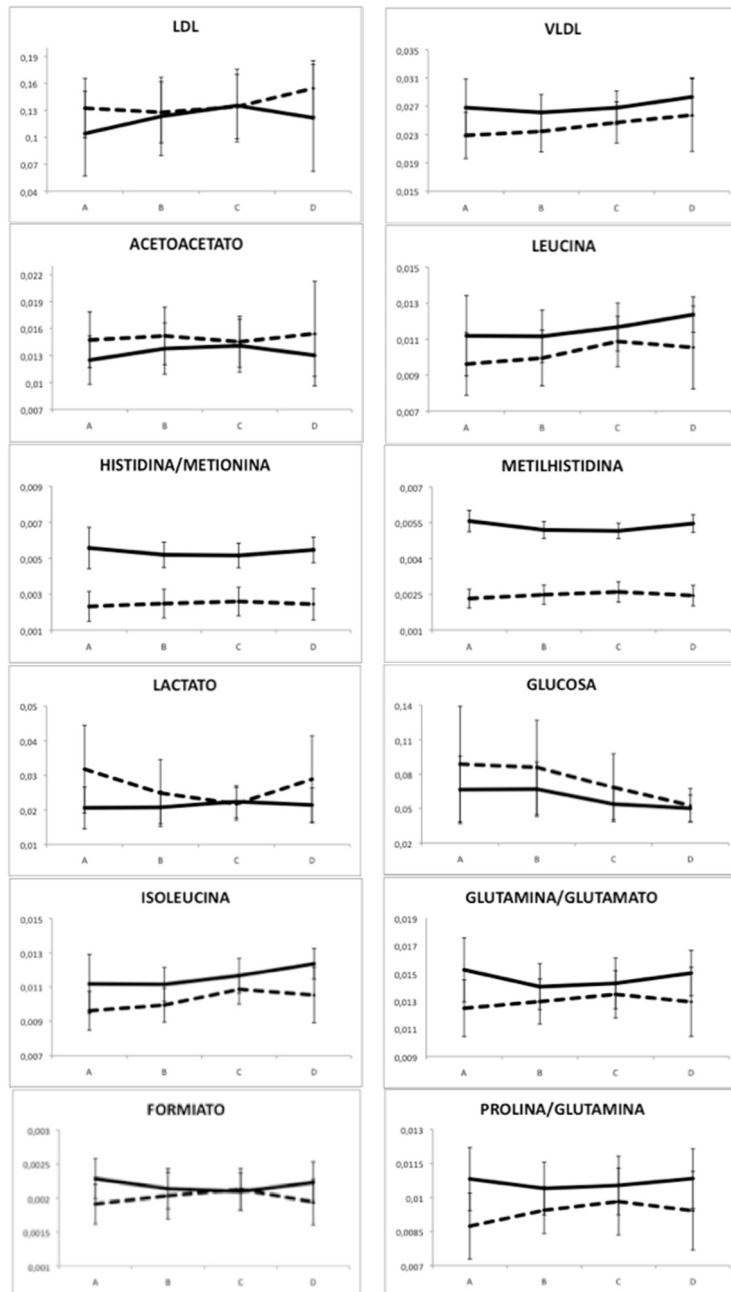


Figura 6.42: Evolución de los niveles en suero. A, muestra al ingreso; B, 2º día; C, 4º día y D, al alta de UCI. La intersección de la línea vertical es el valor de la media y su error estándar. Línea negra (exitus), gris punteada (supervivientes).

Finalmente, los modelos PLS-DA construidos con las muestras de suero (A y B) presentaban una separación entre grupos y un poder predictivo inferior al conseguido con los modelos predictivos basados en las muestras de orina. Por esta razón, decidimos comparar el poder de clasificación de los modelos construidos con las muestras de orina frente a una herramienta clínica establecida en la rutina de la UCI como es la escala SOFA.

### **6.9- Comparación de la exactitud diagnóstica de los modelos para predecir mortalidad.**

#### **6.9.1-Modelo SOFA.**

Uno de los objetivos de este estudio era analizar la posibilidad de que la metabolómica pudiera ser una herramienta que mejorara la escala SOFA para la predicción de mortalidad en nuestro ámbito de trabajo.

Para ello se utilizó como referencia el estudio multicéntrico de Luis Cabré en el que se demostró mediante un análisis estadístico, que la mortalidad llegaba al 100% para aquellos pacientes que durante 5 días de evolución de fracaso multiorgánico presentaban una puntuación SOFA por encima de 10 puntos, con una edad superior o igual a 60 años y con una tendencia a estar igual o empeorar, la mortalidad era del 100% (Cabré L y col., 2005). Siguiendo una línea parecida, pretendimos analizar la predicción de la mortalidad a partir del valor inicial del SOFA (SOFA A) y su evolución los primeros días (SOFA B y C).

Para ello primero se calculó para cada paciente una recta de regresión lineal. El valor inicial SOFA A correspondería a la ordenada en el origen de la ecuación de la recta, y los valores evolutivos SOFA B y C, la pendiente de la misma. Si el paciente fallecía antes de poder valorar el SOFA C, sólo se ha utilizaría el SOFA B.

Con estos datos se realizó un modelo predictivo de regresión logística, que permitiría medir la calibración del modelo obtenido y una curva ROC que permitiría medir la discriminación.

La curva ROC que se obtenía tenía un AUC de 0.78 (IC 95 % de 0.6-0.9). La curva ROC y los índices de rendimiento diagnóstico se aprecian en el cuadro adjunto y son para un punto de corte de 0.167 que es el que presenta máxima sensibilidad y especificidad (Figura 6.43).

En la Tabla 6.17 se aprecian los índices de rendimiento diagnóstico y los valores predichos con los valores observados según el punto de corte de probabilidad empleado para clasificar a los individuos (0.167). Esto significa que aquellos sujetos para los que la ecuación calcula una probabilidad inferior a 0.167, se clasifican como superviviente (estado: 0), mientras que si la probabilidad resultante es mayor de 0.167 se clasifican como exitus (estado: 1). En este primer paso, el modelo clasificó correctamente a un 75.9% de los supervivientes y el 76,9 % de los exitus.

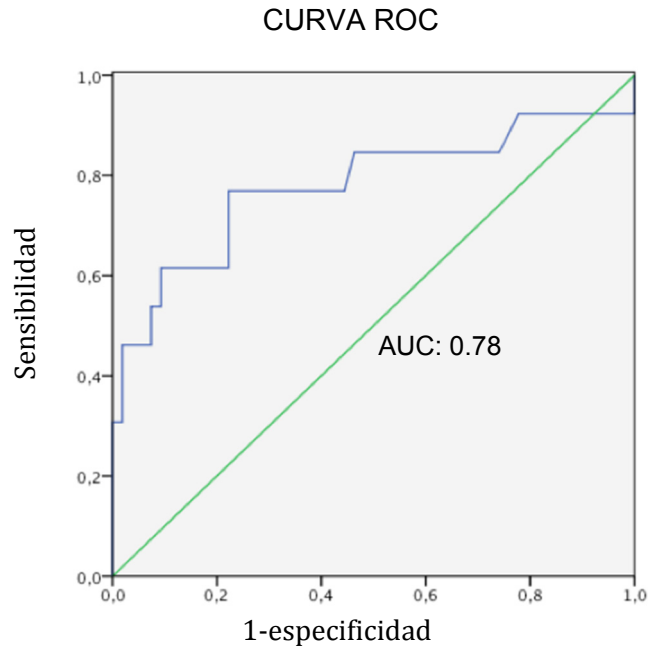


Figura 6.43: Curva ROC obtenida de los valores SOFA A, B y C.

**Tabla 6.17: Índices de exactitud diagnóstica del modelo SOFA.**

	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
SOFA	76.9	76.1	43.5	93.2
(IC 95%)	(50.2-100)	(63.6-88.2)	(21-65.9)	(84.6-100)

OBSERVADO	PRONOSTICADO			% correcto
		1	0	
	1	10	3	
0	13	41	75.9	
Porcentaje global				76.1
(1) Exitus (0) Superviviente. Punto de corte 0.167				

S, Sensibilidad; E, Especificidad; VPP, Valor predictivo positivo; VPN, Valor predictivo negativo.

La p de Hosmer y Lemeshow dio un valor  $\chi^2= 5.706$  al que correspondía un valor  $p=0.574$  lo que significaba, que la bondad de ajuste era buena. Es decir, no se podía descartar la hipótesis nula de que el modelo estaba correctamente calibrado.

#### **6.9.2- Modelo metabólico.**

Siguiendo la misma estructura que con el modelo SOFA, primero se calculó un modelo de regresión lineal para cada paciente con dos datos, el valor de ingreso obtenido en orina metabólico A y el valor evolutivo metabólico B de forma que el valor A es la ordenada en el origen y el valor B la pendiente.

Con los datos obtenidos se realizó un modelo predictivo de regresión logística, para medir la calibración y una curva ROC para medir la discriminación.

La curva ROC y los índices de rendimiento diagnóstico se aprecian en la Figura 6.44 y la Tabla 6.18. La curva que se obtuvo tenía un área de 0.85 (IC 95%; 0.68-1). En la Tabla 6.18 se muestran los índices de exactitud diagnóstica obtenidos para un punto de corte de 0.33, que es donde se obtiene la máxima sensibilidad y especificidad.



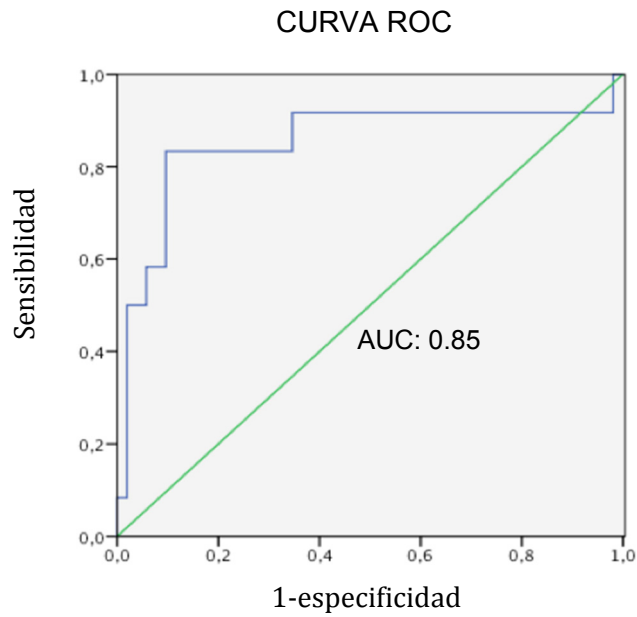


Figura 6.44: Curva ROC obtenida de los valores metabólica A y B.

**Tabla 6.18: Índices de exactitud diagnóstica del modelo metabólica.**

	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
METABOLÓMICA	83.3	90.4	66.7	93.2
(IC 95%)	(58-100)	(81.4-99.4)	(39.5-94)	(89.4-100)

	PRONOSTICADO			% correcto
	1	0		
OBSERVADO	1	10	2	83.3
	0	5	47	90.4
Porcentaje global				89.1
(1) Exitus (0) Superviviente. Punto de corte 0.33				

S, Sensibilidad; E, Especificidad; VPP, Valor predictivo positivo; VPN, Valor predictivo negativo.

Los valores recogidos en la Tabla 6.18 permiten evaluar el ajuste del modelo de regresión comparando los valores predichos con los valores observados, empleando para ello el punto de corte de la probabilidad de Y para clasificar a los individuos de 0.33. Esto significa que aquellos sujetos para los que la ecuación calcula una probabilidad inferior a 0.33 se clasifican como estado 0 (superviviente), mientras que si la probabilidad resultante es mayor de 0.33, se clasifican como estado 1 (exitus). En este primer paso, el modelo clasificó correctamente a un 90.4 % de los supervivientes y los exitus fueron sido clasificados correctamente en el 83.3 % de los casos.

La p de Hosmer y Lemeshow dio un valor  $\chi^2= 16.53$  al que correspondía un valor  $p=0.035$  lo que significaba, que la bondad de ajuste no era buena. Es decir, rechazamos la hipótesis nula de que el modelo estaba correctamente calibrado.

Con este procedimiento construimos un modelo que incluyera al modelo SOFA y el de metabólica. La combinación de ambos no consiguió mejorar los resultados obtenidos de forma individual por el modelo metabólico basado en las muestras de orina.

### **6.9.3- Comparación estadística de ambos modelos**

Para poder realizar una comparación estadística de las dos curvas ROC obtenidas (Figura 6.45), la del modelo SOFA y la del modelo metabólica, se utilizó el test de Hanley and McNeil (Hanley JA y col., 1983). Esta prueba evalúa la homogeneidad de áreas. Los datos obtenidos, ( $\chi^2=1.6711$ ;  $p=0.1961$ ), indicaban que no existía diferencia significativa para predecir mortalidad en nuestra muestra, entre la utilización del modelo SOFA y los valores obtenidos mediante

el análisis del modelo metabólico.

Los principales parámetros estadísticos obtenidos de la prueba de Hanley and McNeil y los índices de exactitud diagnóstica de ambos modelos se aprecian en la Tabla 6.19.

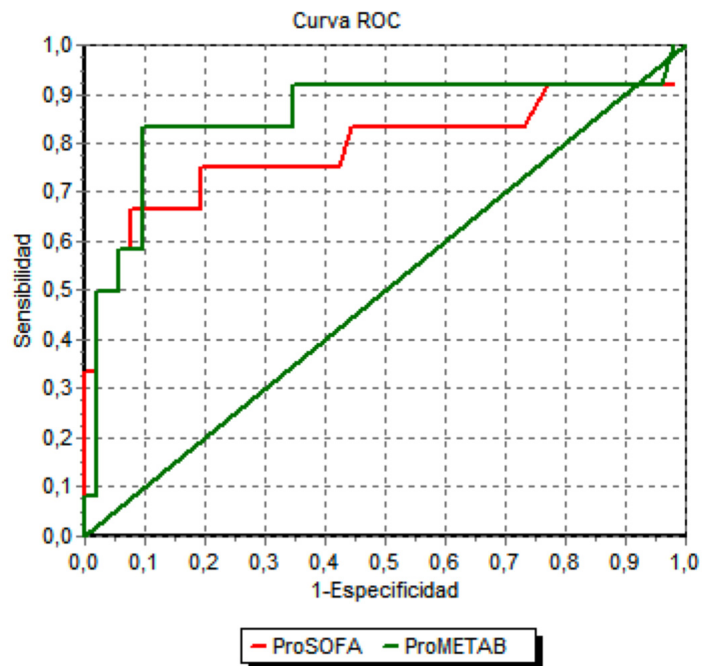


Figura 6.45: Comparación de las dos curvas obtenidas del modelo metabólica y el modelo SOFA.

**Tabla 6.19: Comparación estadística de las dos curvas ROC obtenidas.**

MODELOS	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	AUC
SOFA	76.92 (50.2-100)	76.12 (63.6-88.2)	43.48 (21-65.9)	93.18 (84.6-100)	0.78 (0.6-0.9)
METABOLÓMICO	83.33 (58-100)	90.38 (81.4-99.4)	66.67 (39.5-93.9)	95.92 (89.4-100)	0.85 (0.68-1)
Prueba de homogeneidad de áreas: $\chi^2= 1.6711$ ; $p=0.1961$					

## **DISCUSIÓN**



### **7.1- INCIDENCIA, CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS DE LOS PACIENTES SÉPTICOS EN NUESTRO HOSPITAL.**

En este estudio se han analizado las características de la población de pacientes sépticos que ingresan en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Valencia durante el periodo de un año. En este periodo ingresaron en nuestra unidad un total de 102 pacientes con sepsis grave o shock séptico que representaban el 14.7 % sobre el total de ingresos. Las cifras de incidencia de la sepsis en nuestro centro son similares a las que se recogen en otros estudios previos (Finfer y col., 2004; Brun-Buisson C y col., 2004; Blanco J y col., 2008, Azkárate I y col., 2012). Con respecto a las características epidemiológicas de nuestros pacientes, nuestra muestra la compone 44 (65.7%) hombres y 23 (34.3%) mujeres con una mediana de edad de 60 años [47- 73]. Estas cifras de edad y sexo son similares a las presentadas por Ricard Ferrer en los resultados del estudio *Abiss Edu Sepsis* (Ferrer R y

col., 2008) y en otros posteriores (Azkárate I y col., 2012). La mediana de días de ingreso de nuestros pacientes en la UCI fue de 7 días [4 -11], cifra similar a la presentada en otros trabajos previos (Esteban A y col., 2007; Ferrer R y col., 2008; Carbajal-Guerrero 2010).

En nuestra muestra, el 56.7 % de los pacientes ingresó en la UCI desde el servicio de urgencias. Estos datos son ligeramente superiores a los presentados por otras UCIs. Probablemente se debe a que en muchas unidades ingresan también pacientes quirúrgicos, cosa que no sucede en nuestra unidad, que es exclusivamente médica. Esta característica tiene influencia en la proporción de pacientes que ingresa con shock séptico, 33 pacientes (49.3 %) que es similar a la que lo hace con sepsis grave, 34 pacientes (50.7%). El porcentaje de pacientes con shock en la UCI según los datos disponibles en la literatura (Finfer y col., 2004; Brun-Buisson C y col., 2004; Blanco J y col., 2008, Azkárate I y col., 2012) suele ser mayor que el de los enfermos con sepsis grave ya que los estudios no incluyen sólo los casos que llegan de urgencias, sino también la sepsis intra-UCI y la sepsis intrahospitalaria. En nuestro estudio, para mantener la homogeneidad del grupo de pacientes, hemos incluido solo aquellos que o bien proceden de urgencias o tienen menos de 24 horas de instauración del cuadro séptico en la sala de hospitalización. Por esta razón, el reconocimiento del cuadro séptico en nuestro caso podría ser más precoz e implicaría más casos de sepsis grave que de shock. Si el paciente con sepsis grave no se reconoce en la sala de hospitalización y evoluciona



sin tratamiento adecuado, tiene más probabilidades de evolucionar a shock séptico antes de ser detectado.

Acerca del origen de la sepsis, en trabajos previos se indica el foco respiratorio seguido del abdominal como los más frecuentes (Brun-Buisson C y col., 2004; Vincent JL y col., 2006; Esteban A y col., 2007; Ferrer R y col., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio el origen predominantemente fue el respiratorio seguido del nefrourológico. Esta discrepancia puede deberse al hecho de que al no ser una UCI con pacientes quirúrgicos de forma habitual, el foco séptico abdominal presente menor incidencia que en otras UCIs donde ingresan pacientes postquirúrgicos. Adicionalmente, el periodo de recogida de muestras coincidió con un brote epidémico de gripe A, lo cual pudo haber influido en el alto porcentaje de pacientes con sepsis de origen pulmonar.

La presencia de bacterias en sangre, detectadas en los hemocultivos que se realizaron al ingreso en UCI, resultó positiva en un 35% de los pacientes, y todas ellas de origen comunitario. Los microorganismos más frecuentemente aislados en nuestros pacientes fueron *E. coli*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* relacionados con los focos infecciosos urinario, pulmonar y las infecciones de origen desconocido. La incidencia de bacteriemia en nuestro caso resulta similar o ligeramente superior a los datos presentados en otros trabajos (Esteban A y col., 2007, Sabatier C y col. 2009, Carbajal-Guerrero 2010) y con una distribución del 50 % de los casos Gram positivos y otro 50 % de Gram negativos. A diferencia de lo que ocurre con la nosocomial, en este tipo de bacteriemia la

incidencia de microorganismos Gram positivos suele ser similar a la de Gram negativos (Vallés J, 2003). Además, tal y como se describe en la bibliografía (Chen H-Ch y col. 2013) existe una mayor incidencia de bacteriemia en los pacientes que fallecieron respecto a los supervivientes.

La media de puntuación de la escala APACHE II al ingreso fue de  $19.6 \pm 6.0$ , un valor similar al observado en otros estudios (Ferrer R y col., 2008, Azkárate I y col., 2012). Sin embargo, la media de puntuación de la escala SOFA al ingreso fue de  $7.9 \pm 3.6$ , valor discretamente inferior a los expuestos en otros estudios epidemiológicos (Blanco J y col., 2008). La comparación entre pacientes que fallecen frente a los que sobreviven muestra como a las 72 horas, en los pacientes que sobreviven el descenso del valor de SOFA ha sido mayor del 50 % con respecto a su valor del ingreso. Sin embargo en los enfermos que fallecen, el descenso que presenta es mucho menor, aproximadamente del 36 %. Estas tendencias coinciden con las presentadas en otros trabajos (Ferreira FL y col., 2001).

La mortalidad del paciente, al mes de ingreso, en nuestro servicio fue de 19.4%. Esta cifra es sensiblemente inferior a la presentada en algunas publicaciones donde oscilan entre el 32,4 y 35,5% (Finfer S y col. 2004; Brun-Buisson C y col., 2004). Una posible explicación es la exclusión del estudio de los pacientes de más de 24 horas de evolución del cuadro séptico en sala de hospitalización que incluyen infecciones nosocomiales de sala, sepsis que ingresan por urgencias inicialmente de poca gravedad y se agravan durante el ingreso en sala de hospitalización o sepsis

intra-UCI. Normalmente este tipo de pacientes presentan mayor gravedad y en ocasiones un retraso en la administración del tratamiento, que es un factor predictor de mortalidad (Kumar A y col., 2006). La aplicación de unos criterios de exclusión estrictos en la selección de los pacientes nos ha permitido obtener un conjunto de pacientes con unas características demográficas y epidemiológicas comparables a otros estudios previos de sepsis en humanos. No obstante, estos criterios de exclusión pueden haber producido cierto sesgo al favorecer la exclusión de un grupo de pacientes considerados muy graves, y por ello tenemos mayor porcentaje de enfermos con sepsis grave en detrimento de pacientes con shock séptico. Esto explica un valor promedio de SOFA y unas cifras de mortalidad inferiores a las presentes en otros estudios previos.

#### **7.2- EL PERFIL METABOLÓMICO DE SUERO Y ORINA COMO UNA HERRAMIENTA PARA LA ESTRATIFICACIÓN DE PACIENTES CON SEPSIS GRAVE VS SHOCK SÉPTICO.**

El desarrollo de terapias eficaces para cualquier enfermedad se basa en la capacidad de poder definir con precisión la población de pacientes que se beneficiarán de estas intervenciones. Los avances en la comprensión de la patogenia de la sepsis han establecido que una definición global y única del concepto de sepsis como enfermedad homogénea es insuficiente. Por tanto, la premisa de que todos los pacientes con sepsis grave responderán positivamente al mismo tratamiento es probablemente demasiado simple para un síndrome tan complejo como éste.

Esta consideración de la sepsis como una entidad única probablemente ha sido la razón fundamental para explicar el aparente fracaso de la mayoría de los ensayos clínicos en sepsis (Marshall JC, 1999; Marshall JC, 2006). Estos ensayos clínicos incluyen a grupos heterogéneos de pacientes, que es poco probable que puedan responder de manera similar a la misma intervención terapéutica (Carlet J y col., 2008). En este contexto, la sepsis ha sido comparada con el cáncer. Por mucho que la sepsis sea una respuesta inflamatoria a una infección, es heterogénea en sus orígenes, objetivos y pronóstico. Al igual que se hace cada vez más en el tratamiento contra el cáncer, los intensivistas en los ensayos clínicos de sepsis deberían tratar de identificar a subgrupos homogéneos de pacientes y las intervenciones eficaces para cada uno de esos subgrupos. En este sentido, los biomarcadores metabólicos obtenidos mediante  $^1\text{H}$ -RMN de muestras de sangre y orina de pacientes sépticos podrían ser utilizados para diferenciar la sepsis grave del shock séptico.

El estudio del perfil metabolómico mediante  $^1\text{H}$ -RMN de muestras, tanto de orina como de sangre, de pacientes sépticos teniendo en cuenta la estratificación clásica de sepsis grave y shock séptico, no ha mostrado una clara diferenciación entre ambos grupos. En este sentido, nuestro estudio no coincide con el concepto clásico de que los estadios clínicos de la progresión de la sepsis reflejan la progresión molecular del hospedador (Hotchkiss RS y col., 2003). Estos datos concuerdan con los descritos por Langley y col. (Langley RJ y col., 2013) en un estudio en el que se intentó desarrollar un modelo predictivo de muerte en

pacientes con sepsis no complicada, sepsis grave y shock séptico integrando datos metabolómicos y proteómicos. El metaboloma y el proteoma de los supervivientes de sepsis parecían representar un continuo molecular, con independencia de la progresión de la sepsis grave o shock séptico o clase de agente infeccioso, desafiando la noción tradicional de una pirámide molecular de la progresión de la sepsis. La ausencia de diferenciación molecular esencial de estos estados clínicos, aunque sorprendente, no niega la importancia de la pronta consecución de concentraciones compartimentales eficaces de antibióticos apropiados o las diferencias conocidas en la mortalidad entre los agentes etiológicos y los sitios de infección (Langley RJ y col., 2013).

A pesar de que con estos datos no podemos construir un modelo predictivo para estratificar a los pacientes en base a las definiciones actuales, sí observamos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de algunos metabolitos en función de la gravedad clínica así como cambios de estos metabolitos a lo largo de la evolución temporal. Estos metabolitos, con un número mayor de pacientes, quizás podrían servir para encontrar agrupaciones desde el punto de vista bioquímico de alteración de rutas metabólicas, que permitiera el estudio de nuevas terapias.

La variabilidad de la sepsis y la falta de síntomas específicos hacen que sea difícil para los médicos hacer un diagnóstico precoz o una estimación del pronóstico, los cuales son necesarios para un tratamiento óptimo. Algunos pacientes tienen sepsis grave (sepsis complicada por una disfunción orgánica)

cuando son vistos por primera vez por un médico y, sin embargo mejoran sin terapia intensiva, mientras que otros con síntomas leves pueden progresar rápidamente a shock séptico (hipotensión refractaria a la reanimación con líquidos o hiperlactatemia) o la muerte (Langley RJ y col., 2013). De todas las disciplinas de biología de sistemas, la metabolómica es la que más cerca está del fenotipo y está profundamente afectada por factores ambientales. Los cambios dinámicos que suceden en la progresión de la enfermedad desde sepsis grave a shock séptico sugieren que la selección de los puntos de tiempo apropiados para la identificación de biomarcadores serán un factor crítico (Dos Santos CC, 2015). Sin embargo, nuestro trabajo es uno de los pocos en incluir la determinación de la composición metabólica de las muestras de orina y de sangre, de cuatro momentos temporales de la evolución del paciente, para poder así valorar cómo evoluciona el perfil metabólico inicial del paciente en función de su gravedad inicial.

La orina es un fluido biológico donde se puede encontrar gran cantidad de metabolitos hidrosolubles que pueden aportar información muy valiosa sobre las rutas metabólicas que se encuentran alteradas en la sepsis. El análisis multivariante de la orina procedente de pacientes con sepsis grave o shock séptico no fue capaz de hacer una clara separación entre los dos grupos en base a su perfil metabólico. A pesar de que el solapamiento entre ambos grupos no permite una discriminación con un buen valor de clasificación, sí que hemos determinado importantes

diferencias en los niveles de metabolitos como la glutamina, fenilalanina, hipurato, formato y metionina.

La glutamina es un metabolito que participa en la síntesis de ácidos grasos y proteínas, y además es una fuente de energía primordial para muchas células tales como las del epitelio intestinal, el sistema inmunológico y las células cardíacas. Nuestros resultados señalan un descenso de los niveles de glutamina en el grupo de pacientes de shock respecto a los pacientes con sepsis grave. Este resultado coincide con lo publicado en otros estudios (Wischmeyer PE, 2007; Poeze M y col., 2008) donde los niveles bajos de glutamina tendrían una relación directa con el aumento de mortalidad. Kao y col (2013) investigó el metabolismo de la glutamina en la sepsis y en concreto su conversión a citrulina en el intestino. Encontraron que las concentraciones de glutamina más bajas en los pacientes sépticos se debían a un aumento del aclaramiento hepático y/o de otras células, mientras que la absorción intestinal se encontraba reducida. Por otra parte, los linfocitos utilizan glutamina a tasas notablemente superiores a lo habitual para la obtención de energía y también sus precursores. Las altas tasas de glutaminólisis proporcionan las condiciones ideales para el suministro de productos intermediarios para vías metabólicas cuando se requieran en condiciones de elevada necesidad (como en la rápida proliferación de células inmunes) a través de la vía de la proteólisis en el músculo (Oudemans-van Straaten HM y col., 2013).

Los niveles de fenilalanina se relacionan típicamente con el incremento del catabolismo muscular. Hemos observado que los niveles de fenilalanina aumentan con el paso del tiempo para los dos grupos. Wannemacher y col. describieron niveles elevados de fenilalanina en suero en estados de inflamación e infección como resultado de una acelerada degradación de proteínas (Wannemacher Jr RW y col., 1976). El aumento de este metabolito estaría asociado con el fallo orgánico y/o con la mayor utilización del compuesto en el shock séptico. Hasta donde sabemos, no hay ningún trabajo publicado que muestre alguna relación entre los niveles de fenilalanina en orina y la sepsis. Sin embargo, se han descrito niveles elevados en plasma y líquido cefalorraquídeo en pacientes con encefalopatía séptica (Green R y col., 2004).

El hipurato se encuentra normalmente en la orina, y se correlaciona con la actividad y composición microbiana intestinal. (Lees HJ y col., 2013). Es el único metabolito en orina que se encuentra más elevado en pacientes con shock séptico frente a los de sepsis grave. Estas diferencias podrían estar relacionadas con una mayor carga bacteriana en los pacientes con shock séptico, ya que en este grupo está aumentado el número de pacientes positivos para bacteriemia.

Nuestros resultados muestran una reducción de los niveles de formato en el grupo de pacientes de shock séptico frente a los de sepsis. El formato es una fuente de carbono que se utiliza para la producción de N<sub>5</sub>, N<sub>10</sub>-metilen-THF necesario para la biosíntesis de nucleótidos, unidades básicas para la formación de los ácidos nucleicos. Estudios en animales de experimentación (Lin ZY y col.,



2009; Izquierdo-García JL y col., 2011b) mostraron una reducción de los niveles de formato en suero de ratas sépticas comparándolo con controles siendo además este descenso mayor en aquellas que presentaban mal pronóstico. Este descenso observado podría explicarse por el mayor consumo de formato debido al aumento significativo en la biosíntesis de nucleótido de purina en el estado séptico (Lin ZY y col., 2009; Izquierdo-García y col., 2011b).

Finalmente, observamos una reducción de los niveles de metionina en los pacientes más graves de shock séptico, lo que concuerda con los resultados expuestos en un trabajo reciente donde comparan los niveles de los aminoácidos en suero entre pacientes con sepsis, shock séptico y controles. Los resultados muestran un descenso de los niveles de metionina en los enfermos sépticos comparado con los otros dos grupos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. (Su L y col. 2015). En este mismo trabajo, presentan una comparación entre pacientes de sepsis y de sepsis grave. Los resultados muestran como el primer día los niveles de metionina para el grupo de sepsis grave son más altos, y como la concentración disminuye con el tiempo hasta invertirse la relación el quinto día.

Con respecto a la evolución de los niveles de metabolitos con el tiempo, podemos observar diferentes tendencias: Existe un grupo de metabolitos (hipurato, glutamina y fenilalanina), que aumentan o disminuyen en el grupo de shock para converger con el valor del grupo de sepsis grave, que adicionalmente permanecen más estables durante el tiempo. Por otro lado, existe

otro grupo que no presenta una tendencia definida, como sería el caso del formato. Finalmente, la metionina presenta una tendencia contraria a los demás, ya que sus valores en el grupo de sepsis grave convergen hacia el grupo de shock que presenta más estabilidad durante todo el tiempo.

Respecto al suero, el análisis multivariable de los datos no ha permitido obtener un sistema que discrimine claramente las muestras de ambos grupos en función de su perfil metabólico de suero. Sin embargo, hemos determinado importantes diferencias de composición del suero entre ambos grupos dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Las principales diferencias radican en los niveles de metabolitos tales como el colesterol, VLDL, leucina, isoleucina, alanina, lípidos, glucosa, lípidos insaturados, histidina y metilhistidina.

En general se reconoce que las concentraciones plasmáticas de la mayoría de los aminoácidos se alteran en gran medida en la sepsis (Druml W y col., 2001). Freund y col. (1979) revelaron que ciertos aminoácidos pueden ser utilizados como marcadores de la gravedad y el pronóstico del proceso de la enfermedad (Freund y col., 1979). Nuestros resultados muestran que los niveles de aminoácidos como la leucina, isoleucina, alanina, histidina y metilhistidina al ingreso se encuentran reducidos en los pacientes con shock frente a los de sepsis grave. Su L y col. (2015) publicaron un trabajo donde comparan un grupo de pacientes de sepsis grave con un grupo de sepsis, y encontraron el primer día niveles más elevados de aminoácidos como la metilhistidina, histidina y alanina, y una reducción de los

niveles de leucina e isoleucina en el grupo de pacientes más graves. Al igual que en estudios previos (Freund HR y col., 1978; Sprung CL y col., 1991; Tapiero y col., 2002; Santangelo F y col., 2002) hemos observado una disminución de los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina). Durante la sepsis, el cuerpo humano trata de compensar el déficit de energía por el aumento de la degradación de proteínas y la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada (O'Donnell TF y col., 1976). Los niveles bajos de aminoácidos ramificados promueven el catabolismo proteico y reducen la síntesis de proteínas del músculo (Su L y col., 2015). Así pues, observamos que los trastornos del metabolismo de los aminoácidos se intensifican a la par que aumenta la gravedad de la enfermedad.

Los lípidos, en general, al igual que los aminoácidos, se encuentran más reducidos en los pacientes con shock al ingreso comparándolo con el grupo de sepsis grave. Estudios publicados hace casi tres décadas demostraron que la infección y la inflamación inducen una elevación de los niveles de ácidos grasos y otros lípidos en sangre (Wolfe RR y col., 1985; Samra JS y col., 1996). Más concretamente, la hipocolesterolemia se ha descrito como una de las anomalías bioquímicas que caracterizan a la sepsis. El trabajo de Chiarla y col. (2004) demostró que el grado de hipocolesterolemia se correlaciona con la severidad de la respuesta de fase aguda y descompensación metabólica séptica. Además, es interesante ver cómo a la par se produce un aumento de los metabolitos que son parte del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos, tales como los cuerpos cetónicos (acetoacetato), en sujetos sépticos. Otro cuerpo cetónico como es el

hidroxibutirato, sin embargo, sorprendentemente se encuentra disminuido. Algunos autores (Wolfe RR y col., 1983; Lin ZY y col., 2009) han sugerido que el aumento de acetoacetato e hidroxibutirato en ratas sépticas puede estar correlacionado con una mayor oxidación de los ácidos grasos. La oxidación de ácidos grasos, como la principal fuente de la energía, aumenta significativamente para satisfacer los requisitos de energía, y los cuerpos cetónicos, que son importantes productos de oxidación de ácidos grasos, aumentan y se acumulan en consecuencia. Recientemente, otros datos sugieren que la lipemia en la sepsis no es solamente una reacción del huésped para obtener energía, sino que forma parte de la inmunidad innata para neutralizar las toxinas bacterianas (Schmerler D y col., 2012).

La glucosa es el único metabolito que aparece más elevado en el grupo de shock desde el primer día. Diferencias en los niveles de glucosa reflejan alteraciones en el metabolismo energético. La denominada hiperglucemia de estrés se asocia generalmente a una lesión, a un proceso inflamatorio o a la presencia de una infección grave. Se produce debido a la glucogenólisis en el músculo y el hígado, la gluconeogénesis hepática y la resistencia a la insulina por los tejidos periféricos. Además, existe evidencia científica de que la hiperglucemia en el enfermo crítico es un predictor pronóstico de mortalidad durante el proceso de la enfermedad (Griesdale DE y col., 2009; Manzanares y col., 2010). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que la sepsis se corresponde con una inflamación sistémica asociada a mecanismos tales como la hipoxia y estrés oxidativo. La sepsis *per se* induce una alteración

de la producción de energía a nivel celular debido al bloqueo del complejo de la piruvato deshidrogenasa, la enzima íntimamente implicada en la producción de lactato y de la cual depende el acceso del piruvato al ciclo de Krebs (Vary TC, 1996). Se ha descrito que durante el shock séptico hay un aumento en el ingreso de glucosa en la ruta de la glucólisis con un aumento de producción anaeróbica de los niveles de lactato (Gore DC y col., 1996). Así pues, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en condiciones agudas críticas se puede ver como una redistribución del consumo de glucosa desde la fosforilación oxidativa de la mitocondria hacia otras rutas metabólicas, tales como la producción de lactato y de la vía de las pentosas fosfato. En nuestro estudio metabólico de suero de pacientes sépticos, esto se confirma por un aumento en los niveles de glucosa y lactato que es mayor en tanto que aumenta la gravedad de la enfermedad.

Con respecto a la evolución de los metabolitos durante la hospitalización, hemos visto como los niveles de aminoácidos, disminuidos en el grupo de shock el primer día, van aumentando progresivamente durante la evolución, hasta confluir con los niveles del grupo de sepsis grave. En el estudio de Su L y col (2015), se aprecian dos tendencias diferentes; algunos aminoácidos como la metilhistidina, histidina y alanina, disminuyen progresivamente hasta el tercer día, y sin embargo, la leucina e isoleucina aumentan progresivamente hasta ese mismo día.

Con estos resultados podemos intuir que existe una alteración del ciclo de Krebs que implica una alteración en la producción de energía celular. Nuestros resultados concuerdan con las teorías que existen actualmente que hablan de una estrategia adaptativa de la célula para reducir energía que es comparable con un estado de hibernación que provocaría una reducción importante del metabolismo (Baylr H y col., 2008).

Los metabolitos identificados tanto en orina como en suero, en este estudio representan componentes de cambios metabolómicos más amplios, que aunque no son capaces de desarrollar un modelo matemático discriminatorio entre pacientes con shock séptico respecto a pacientes con sepsis grave, con una precisión adecuada, sí pueden ser útiles para profundizar en la fisiopatología de la evolución de la enfermedad y proporcionar herramientas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

### **7.3- EL PERFIL METABOLÓMICO DE SUERO Y ORINA A LAS PRIMERAS 24H DE INGRESO EN LA UCI COMO PREDICTOR DE LA MORTALIDAD A LOS 30 DÍAS.**

Los pacientes que ingresan en la UCI diagnosticados con sepsis suelen evolucionar favorablemente en la mayoría de los casos tras las primeras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, hay un reducido número de pacientes que no evolucionan favorablemente, y para los cuales la elección del tratamiento correcto en las primeras horas de ingreso es crucial para su supervivencia. A día de hoy, la identificación de este paciente

séptico con mal pronóstico de una forma rápida y precisa por parte del médico de UCI resulta un gran desafío. Estrategias tempranas para diagnosticar, gestionar y predecir el resultado de la sepsis son esenciales para mejorar aún más la morbilidad y mortalidad. Mientras que los biomarcadores se han convertido en los pilares de otros campos de la Medicina, su utilidad clínica en la sepsis sigue siendo muy pequeña. Hasta la fecha ninguno de los biomarcadores existentes, clínicos ni biológicos han demostrado ser herramientas pronósticas precisas para predecir una evolución adversa. Probablemente una de las razones de este bajo poder predictivo es la compleja fisiopatología de la sepsis que nos hace pensar que la utilización de un biomarcador individual no es capaz de describirla ni estratificarla adecuadamente. En ese sentido, la metabolómica nos permite obtener perfiles metabólicos de la sepsis que proporcionan mucha información fisiopatológica y que pueden ser útiles como biomarcadores.

El trabajo presentado en esta tesis constituye el primer estudio en adultos que establece un modelo metabólico de predicción de mortalidad en pacientes sépticos utilizando espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN en muestras de orina. Mediante el análisis de componentes principales se identificó una huella metabolómica compuesta por 8 metabolitos (arginina, glutamina, glucosa, hipurato, fenilalanina, etanol, metionina y un metabolito desconocido situado en 1.40 a 1.45 ppm) que se asociaron con la mortalidad relacionada con shock séptico y sepsis grave a 30 días tras el ingreso en UCI. Todos ellos juntos, constituyen un biomarcador de mortalidad con potencial valor pronóstico. Mickiewicz y col. (2013) obtuvieron conjuntos de metabolitos

similar a los nuestros. Sin embargo, en su diseño experimental se favorecía la detección de metabolitos que permanecían alterados tras 24h en la UCI. De esta forma, se podrían haber perdido metabolitos, con potencial biomarcador, que cambian más rápidamente (al inicio del ingreso).

En nuestro estudio, los pacientes que no sobrevivían poseían valores más elevados de etanol, hipurato y glucosa y valores más bajos de metionina, glutamina, arginina y fenilalanina que los que sobrevivían. Estos metabolitos están implicados en alteraciones bioquímicas típicamente descritas en pacientes sépticos como son los niveles de proteínas, la síntesis de ácidos grasos, la desregulación del metabolismo energético e incluso indicadores de alteraciones en la microbiota. La alteración de metabolitos como la glutamina, fenilalanina hipurato, formato y metionina y su implicación fisiopatológica ya se han descrito en el apartado anterior en el que se relacionaban con la gravedad de la enfermedad. Parece lógico pensar que también sean marcadores útiles de predicción de la mortalidad.

La arginina interviene en la síntesis de proteínas de fase aguda en la infección grave y está muy relacionada con la producción de citocinas. Además, se sabe que el proceso inflamatorio esta modulado por el óxido nítrico (NO), que se forma a partir de arginina, y su disponibilidad extracelular es crucial para la síntesis de NO. Por lo tanto, hay una relación muy estrecha entre la concentración de arginina y la formación de NO. Se ha documentado en diversas publicaciones un descenso en sus



niveles en pacientes con sepsis grave (Luiking YC y col., 2005; Luiking YC y col., 2012).

Finalmente, aunque los cambios en los niveles de etanol podrían estar relacionados con diferentes hábitos dietéticos, estas diferencias persistieron 24 horas después del ingreso en el hospital. En ese momento, los pacientes se encuentran en ayuno o se les ha administrado una dieta enteral estandarizada, lo que sugiere un origen endógeno del alcohol probablemente de origen microbiano. De hecho, se ha publicado que los miembros del género *Escherichia* se asocian con altas concentraciones de etanol en sangre, que a su vez se asocia con un aumento de la permeabilidad intestinal y la inflamación (Zhu L y col., 2013). Además, la producción elevada de etanol puede sugerir una interrupción de la glucólisis a un metabolismo fermentativo que se mantiene a través de la actividad de la alcohol deshidrogenasa (LDH). Se ha descrito la importancia de la LDH en la virulencia de los microorganismos fermentativos que causan bacteriemia como el *Streptococcus pneumoniae* (Gaspar P y col., 2014), el *Staphylococcus aureus* (Richardson AR y col., 2008) o el *Enterococcus faecalis* (Rana NF y col., 2013).

A través del estudio de muestras de sangre también hemos podido obtener un perfil metabólico diferencial en pacientes de buen y mal pronóstico. Los pacientes que presentan mal pronóstico presentan niveles elevados de metabolitos como, LDL/VLDL, lactato, glucosa y acetoacetato, y niveles reducidos de aminoácidos proteínogénicos (histidina, tirosina, isoleucina,

leucina), prolina, glutamina, colesterol y formato en relación con los pacientes que sobreviven.

En general, tanto en orina como en suero, las concentraciones de aminoácidos disminuyeron de forma destacada entre los pacientes no supervivientes de sepsis, por contra, se incrementaron los niveles de glucosa, lactato y acetato. Una explicación proporcionada por Langley y col (2013) a este hallazgo es que existe una dicotomía reproducible en las respuestas moleculares de los pacientes (hospedadores) sépticos: una alostasis molecular en los pacientes que sobreviven y una mala adaptación en los que no. Esto es, los supervivientes de sepsis son capaces de movilizar varios sustratos energéticos y éstos se utilizan por completo en el catabolismo aeróbico dando como resultado una disminución de sus concentraciones plasmáticas. Sin embargo, los pacientes con sepsis, que en última instancia fallecen no son capaces de utilizar estos sustratos completamente, y muestran concentraciones elevadas incluso en los puntos temporales más tempranos que se evalúan.

#### **7.4- MODELO PREDICTIVO DE EVOLUCIÓN DEL PACIENTE SÉPTICO EN BASE A SU PERFIL METABOLÓMICO INICIAL DE ORINA. COMPARACIÓN DE LA EXACTITUD DIAGNÓSTICA DEL MODELO PREDICTIVO METABOLÓMICO FRENTE A LA ESCALA SOFA.**

En la actualidad el diagnóstico de sepsis sigue siendo un desafío. Mientras que en otros campos de la medicina ya se han implementado con éxito biomarcadores para el diagnóstico rápido,

como el D-dímeros en el tromboembolismo pulmonar, el péptido natriurético atrial en la insuficiencia cardíaca aguda, y la troponina para el infarto de miocardio, los métodos actuales de detección de sepsis todavía dependen de signos clínicos y datos de laboratorio que no son específicos (Agnelli G y col., 2010; Lee TH y col., 2000). Hemos visto en la introducción que los criterios clínicos de SIRS tienen un valor diagnóstico limitado ya que pueden producirse en muchas circunstancias diferentes a la sepsis (Vicent JL y col., 1997). Por otro lado, los indicadores de laboratorio convencionales como lactato, glucosa en sangre y recuento de trombocitos, son sensibles y fáciles de medir, pero son muy inespecíficos. Adicionalmente, la predicción de la mortalidad en la sepsis presenta dificultades suplementarias porque hay muchos procesos que están asociados con la muerte por sepsis, como la inflamación incontrolada, el estrés oxidativo, la disfunción inmune, la disfunción hemodinámica, la coagulopatía, la disfunción metabólica, y la predisposición genética (Hotchkiss RS y col., 2003).

El desarrollo de un biomarcador que refleje los cambios bioquímicos que se producen como respuesta del huésped a la infección, permitiría identificar los pacientes que podrían beneficiarse de un temprano tratamiento específico. La metabolómica mediante RMN ha demostrado ser una técnica especialmente valiosa en la búsqueda de biomarcadores pues permite la caracterización completa del metaboloma o huella metabólica en una sola medida, de una forma rápida, reproducible y relativamente económica.

Como parte de los objetivos planteados inicialmente, procedimos a evaluar si una aproximación metabolómica basada en la información obtenida de los espectros de RMN podría aplicarse para detectar las variaciones metabólicas entre pacientes de sepsis supervivientes y no supervivientes. A partir de la composición de las muestras de orina recogidas en las primeras 24 h de ingreso del paciente, hemos obtenido el fenotipo metabólico característico de un paciente séptico de mal pronóstico como la combinación de los niveles de ocho metabolitos. Consideramos que construir nuestro biomarcador como la combinación de varias moléculas puede ser más efectivo que utilizar una sola porque de este modo se incluye un rango más amplio de la información fisiopatológica disponible. El modelo predictivo construido muestra una excelente separación entre los supervivientes y no supervivientes con un porcentaje de acierto del 92% en las muestras de orina de las primeras 24 h en los pacientes que presentan mal pronóstico. Sólo indicaría falsos exitus en un 8% de los casos. Los resultados son prometedores e invitan a pensar que la obtención de un perfil metabólico en muestras de orina en las primeras horas de ingreso en la UCI podría utilizarse como herramienta pronóstica complementaria a los predictores convencionales de sepsis.

Actualmente existen varios sistemas de puntuación para la estimación de la gravedad de la sepsis en adultos como el APACHE II y los índices de disfunción orgánica como el SOFA. El SOFA tiene varias ventajas ya que permite ofrece una puntuación individual de cada órgano junto con una puntuación global del paciente y realizar mediciones diarias a modo de marcador

evolutivo Por todo ello es la escala más utilizada para predecir el resultado de forma precoz de pacientes adultos con diagnóstico de sepsis grave o shock séptico (Cabré L y col., 2005).

Además de investigar el uso de la metabolómica para el diagnóstico de sepsis grave o shock séptico y su capacidad de predicción de exitus en la UCI, hemos comparado los resultados del análisis de la curva ROC del modelo metabolómico y el de la escala SOFA para nuestros pacientes. Los resultados obtenidos indicaban que el modelo predictivo metabolómico presenta mejores resultados que la escala SOFA. El área bajo la curva ROC para el SOFA fue de 0.78 con un 77% de acierto en la predicción de exitus, mientras que el modelo metabolómico mejoraba esas cifras con un área bajo la curva ROC de 0.85 y un porcentaje de predicción de exitus del 83%. Adicionalmente, evaluamos un nuevo modelo combinación del metabolómico más la escala SOFA y los resultados obtenidos no mejoraban a los del modelo metabolómico valorado individualmente. Estos resultados son similares a los expuestos en un trabajo publicado de pacientes sépticos pediátricos (Mickiewicz B y col., 2013). En este estudio han obtenido suero de pacientes pediátricos sépticos y han construido un modelo predictivo metabolómico de mal pronóstico pero solo han analizado los datos del día de ingreso. El modelo obtenido lo han comparado con la puntuación Pediatric Risk of Mortality III-Acute Physiology Scores (PRIM III-APS), una escala de riesgo de mortalidad utilizada en pediatría. Llegaron a la conclusión de que el modelo metabolómico fue mejor en la identificación precoz del mal pronóstico. El mismo grupo de investigadores realizó un estudio con suero de pacientes adultos

con diagnóstico de shock séptico y lo compararon con el suero de pacientes con SIRS. El modelo metabólico obtenido, al igual que en nuestro caso, les permitió predecir la mortalidad mejor que el APACHE II y la escala SOFA (Mickiewicz B y col., 2014). A diferencia del trabajo de Mickiewicz (2014), nuestro modelo metabólico se ha realizado con dos datos, el de ingreso y el evolutivo pasadas 24 horas del ingreso. Al intentar obtener un modelo similar utilizando dos valores SOFA, los resultados obtenidos de discriminación y calibración han sido muy bajos. Ha sido preciso incluir un tercer valor evolutivo de SOFA para obtener resultados comparables a los del modelo metabólico. Precisamos incluir cuatro días de evolución de la escala SOFA para conseguir un modelo con capacidad predictiva semejante a la del modelo metabólico obtenido en cuarenta y ocho horas. Podríamos afirmar que los cambios metabólicos acontecen antes que los fallos orgánicos que se pueden medir con la escala SOFA. A una conclusión similar llegaron los autores de un estudio con un modelo experimental de sepsis en ratones donde afirman que los cambios en los perfiles metabólicos séricos ocurren antes que la disfunción de órganos (Lin ZY y col., 2009).

En resumen, los resultados obtenidos muestran que la sepsis grave y el shock séptico conducen a alteraciones significativas en la homeostasis bioquímica del paciente, y que contribuyen fuertemente a los cambios en la composición metabólica del cuerpo. A falta de futuras validaciones del modelo utilizando una cohorte más grande de pacientes sépticos de UCI, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la metabólica puede ser utilizada como una herramienta adicional

no invasiva para el diagnóstico y la evaluación pronóstica temprana de pacientes con sepsis grave y shock séptico en la UCI.

#### **7.5- PRINCIPALES LIMITACIONES DEL MODELO PREDICTIVO METABOLÓMICO.**

La recogida de muestras biológicas en los pacientes críticos, no es una tarea sencilla. La gravedad en muchos casos de la sepsis obliga al clínico a tener que realizar muchas actitudes terapéuticas en un corto periodo de tiempo. En este contexto, la recogida añadida de muestras biológicas para estudios clínicos, junto con la obtención del consentimiento por parte de la familia o del propio paciente en momentos de tanto estrés, no es una empresa fácil. A pesar de todas estas complicaciones, se han podido recoger un número elevado de muestras en comparación con otros estudios previos publicados de metabolómica en pacientes sépticos.

La mayoría de los estudios de sepsis se han realizado con muestras de suero y los estudios que utilizan orina para medir metabolitos relacionados con la infección son muy escasos (Slupsky CM y col., 2009). *A priori* la orina podría presentar varios problemas, en comparación con el uso del suero. El perfil metabólico de la orina puede estar más influenciado por otros factores no relacionados con la sepsis (dieta, tiempo de muestreo, algunos medicamentos...). Gracias al uso de potentes técnicas quimiométricas multivariantes se pueden superar estas limitaciones. Por otro lado, en el caso de los pacientes sépticos graves, un alto porcentaje de éstos presentan daño renal y

oligoanuria. Esto podría ser un obstáculo para la obtención de un volumen suficiente de muestra para el análisis metabólico. No obstante, las mediciones de RMN sólo requieren 0.5 ml de orina, y en este estudio, la falta de cantidad suficiente de muestra no ha sido motivo de pérdida de pacientes. Cabría pensar además, en el caso de la sepsis grave, que las diferencias observadas en los metabolitos de muestras de orina podrían atribuirse precisamente a la presencia de daño renal más acusado en un grupo que en otro. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de creatinina y urea entre los grupos de supervivientes y exitus.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la gran cantidad de fármacos excretados en la orina debido a la medicación recibida por el paciente y su influencia en la huella metabólica. Sin embargo, la mayoría de los medicamentos administrados se metabolizan en el hígado y la concentración en la orina de los que se metabolizan en el riñón es muy baja para poder ser detectada mediante RMN (normalmente por debajo de una concentración milimolar). Por otra parte, el principal impacto de la medicación cabría esperarlo en la composición de la muestra de orina obtenida pasadas 24 horas del ingreso. Sin embargo, el uso de un modelo obtenido a las pocas horas después de la admisión del paciente en la UCI garantiza un modelo menos influenciado por este factor.

La utilización de las muestras de orina también aportan ciertas ventajas sobre el uso del suero. Dada la alta prevalencia de la anemia en los pacientes en estado crítico y la influencia



negativa de la frecuencia tan elevada de extracciones de muestras de sangre en la rutina clínica, el realizar estudios con las muestras de orina evitaría estos efectos secundarios indeseados.

#### **7.6- IMPLICACIONES FUTURAS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.**

Nuestro estudio presenta unas implicaciones claras. El diagnóstico de sepsis actualmente utilizando las pruebas disponibles no es ni rápido ni específico, y el pronóstico no se puede establecer sobre bases individuales. Consideramos que la metabolómica mediante espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN de muestras humanas fácilmente accesibles (es decir, suero, orina) puede proporcionar información adicional para el diagnóstico precoz y específico de la sepsis con signos y síntomas de inflamación sistémica pero con una fuente aún no identificada de infección. También se puede prever que ciertos patrones metabólicos pueden asociarse con resultados específicos, lo que ayudará en la toma de decisiones, la asignación de recursos y al pronóstico de la enfermedad. Evidentemente, es necesaria la validación de este modelo en un nuevo y más amplio grupo de pacientes.

La metabolómica mediante espectroscopia de RMN nos proporciona información cuantitativa que permite establecer el fenotipo metabólico de la enfermedad. Además, la RMN es una técnica rápida, robusta, coste efectiva y reproducible que la hace la herramienta analítica ideal para la traslación al ámbito clínico de cualquier modelo de predicción metabólico.

Uno de los puntos fuertes de este estudio es la combinación de datos clínicos y puntuaciones de gravedad con la

metabolómica. Hay que resaltar que los cambios metabólicos han añadido valor a la escala SOFA y otros biomarcadores convencionales, en particular para mejorar la predicción de la evolución final. La mejora en los porcentajes de acierto del modelo metabolómico respecto a los del SOFA justifican el plantearse la inclusión del perfil metabólico como una variable bioquímica más que ayude al diagnóstico.

El metabolismo alterado en la enfermedad crítica se caracteriza por una interrupción severa de una multitud de vías metabólicas. Así la metabolómica puede definir fenotipos específicos que ayuden a comprender la fisiopatología de la sepsis, realizar un diagnóstico precoz, preciso y personalizado que describa mejor la gravedad de la enfermedad y su pronóstico.

Los datos que se desprenden de este estudio sugieren que en un futuro próximo la metabolómica hará posible la identificación de un perfil metabólico temprano de la sepsis y por tanto, permitirá comenzar antes con el tratamiento de una forma más personalizada y eficaz. Además, la recapitulación de las diferencias metabólicas entre sepsis de no supervivientes y supervivientes puede permitir una mayor investigación sobre el desarrollo y la evaluación de terapias clínicas para prevenir la mortalidad en la sepsis. En última instancia, como consecuencia de una hospitalización más corta, los costos pueden reducirse significativamente durante un ciclo completo de atención al paciente.

## **8.- CONCLUSIONES**



Las principales conclusiones del estudio fueron:

PRIMERA: En la UCI del Hospital Clínico de Valencia los pacientes con sepsis grave o shock séptico en la UCI representaron el 14 % del total de ingresos. La mortalidad a los 30 días fue del 19.4 %.

SEGUNDA: Este estudio es una prueba de concepto de que la metabolómica por <sup>1</sup>H RMN puede ser de gran utilidad en la UCI de un hospital para la caracterización metabólica de muestras de orina y suero de pacientes sépticos.

TERCERA: La caracterización metabólica de las muestras de suero y orina no discrimina pacientes diagnosticados de sepsis grave de los de shock séptico. Sin embargo, las asociaciones estadísticas encontradas pueden ser de ayuda para mejorar nuestro conocimiento sobre las vías metabólicas de la fisiopatología de la sepsis.

CUARTA: El modelo metabólico desarrollado con muestras de orina al ingreso del paciente en la UCI predice con un 92% de acierto la mortalidad a los 30 días.

QUINTA: El modelo metabólico tiene mayor capacidad de predicción de la mala evolución del paciente séptico frente a los valores obtenidos mediante la escala SOFA. Esto abre la posibilidad de utilizar la Metabolómica como una herramienta pronóstica complementaria a los predictores convencionales de sepsis.



## **9.- BIBLIOGRAFÍA**





ACCP-SCCM Consensus Conference: definitions of sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864-74.

Afessa B, Gajic O, Keegan MT. Severity of illness and Organ Failure Assessment in adult intensive care unit. *Crit Care Clin* 2007; 23:639-58.

Agnelli G, Becattini C. Acute pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363:266-274.

Alamdari N, Constantin-Teodosiu D, Murton AJ, Gardiner SM, Bennett T, Layfield R, y col. Temporal changes in the involvement of pyruvate dehydrogenase complex in muscle lactate accumulation during lipopolysaccharide infusion in rats. *J Physiol* 2008; 586:1767-75.

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, y col. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28:108-21.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Facing the challenge: decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations. *Crit Care Med* 2005; 33:2555-62.

Amaral FM, Caro MSB. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analysis of Brazil white wine. *Food Chemistry* 2005; 93:507-10.

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.

Angus DC: The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? *JAMA* 2010; 304:1833-4.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63-78.

Arn PH. Newborn screening: current status. *Health Affairs (Project Hope)*. 2007; 26:559-66.

Azevedo LC: Mitochondrial Dysfunction during Sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010; 10:214-23.

Azkárate I, Sebastián R, Cabarcos E, Choperena G, Pascal M, Salas E. A prospective, observational severe sepsis/septic shock registry in a tertiary hospital in the province of Guipuzcoa (Spain). *Med Intensiva* 2012; 36:250-6.

Baylr H, Kagan V. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis-there is nothing more practical than a good theory. *Critical Care* 2008; 12:206-17.

Becker K, Snider R, Nysten E. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br J Pharmacol* 2010; 159:253-64.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89-95.

Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L y col. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Critical Care* 2008; 12:R158.

Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Br Med J* 2003; 326: 262-6.

Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 1989; 17:389-93.

Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate Blanco JM. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a

nationwide population based analysis (2006-2011). *BMC Infectious Diseases* 2014; 14:717.

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, y col. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360:219-23.

Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, y col. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R491-7.

Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell, HW. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics. *Nature Medicine* 2002; 8:1439-44.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS Study Group: EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:580-8.

Cabré L, Mancebo J, Solsona JF, Saura P, Gich I, Blanch L, y col. Multicenter study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of Sequential Organ Failure Assessment scores in decision making. *Intensive Care Med* 2005; 31:927-33.

Carbajal-Guerrero J, Cayuela-Domínguez A, Fernández-García E, Aldabó-Pallás T, Márquez-Vácaro JA, Ortiz-Leyba C, y col. Epidemiología y pronóstico tardío de la sepsis en ancianos. *Med Intensiva* 2014; 38:21-32.

Carlet J, Cohen J, Calandra T. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 2008; 36:964-6.

Casado J, Blanco A. Procalcitonin. A new marker for bacterial infection. *An Esp Pediatr* 2001; 54:69-73.

Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical Care* 2004; 8:234-42.

Ceriani R, Mazzoni M, Bortone F, Gandini S, Solinas C, Susini G, y col. Application of the sequential organ failure assessment score to cardiac surgical patients. *Chest* 2003; 123:1229-39.

Chan EC, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A y col. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Proteome Research* 2009; 8:352-61.

Charles PE, Ladoire S, Snauwaert A, Prin S, Aho S, Péchinot A, y col. Impact of previous sepsis on the accuracy of procalcitonin for the early diagnosis of blood stream infection in critically ill patients. *BMC Infect Dis* 2008; 8:163.

Chen H-Ch, Lin W-L, Lin Ch-Ch, Hsieh W-H, Hsieh Ch-H, Wu M-H, y col. Outcome of inadequate empirical antibiotic therapy in emergency department patients with community-onset bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 947-53.

Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. The relationship between plasma cholesterol, amino acids and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids* 2004; 27:97-100.

Chirouze C, Schuhmacher H, Rabaud C, Gil H, Khayat N, Estavoyer JM, y col. Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis* 2002; 35:156-61.

Chong S, Samaha GJ, Stevens JM, Casserly B, Levy MM. Biomarkers for sepsis: Where are we? Control del foco en el tratamiento de la sepsis. Capítulo 2. Grupo de trabajo de enfermedades infecciosas (GTEI-SEMICYUC) Noviembre 2011.

Christ-Crain M, Muller B. Biomarkers in respiratory tract infections:

diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J* 2007; 30:556-73.

Cinel I, Opal S. *Molecular Biology of Inflammation and Sepsis: A Primer*. *Crit Care Med* 2009; 37(1):291-304.

Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 4728-33.

Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:9-27.

Cook R, Cook D, Tilley J, Lee K, Marshall J. Multiple organ dysfunction: baseline and serial component scores. *Crit Care Med* 2001; 29:2046-50.

Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets. *Anal Chem* 2006; 78:2262-7.

Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Struck J, Cook CH. Carbamoyl phosphate synthase-1: A marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis. *Crit Care Med* 2006; 34:2439-46.

D'Alessandro A, Zolla L. Metabolomics and cancer drug discovery: let the cells do the talking. *Drug Discovery Today* 2012; 17:3-9.

Dare AJ, Phillips ARJ, Hickey AJR, Mittal A, Loveday B, Thompson N y col. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic.Biol Med* 2009; 47:1517-25.

De Backer D, Orbegozo D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence* 2014; 5: 73-9.

De Gaudio R. (2009). Severe sepsis. En Bersten A y Soni N. Oh's Intensive Care Manual; (730-8). UK: Butterworth-Heinemann Elsevier.

De Miguel-Yanes JM, Andueza-Lillo JA, González-Ramallo VJ, Pastor L, Muñoz J. Failure to implement evidence-based clinical guidelines for sepsis at the ED. Am J Emerg Med 2006; 24:553-9.

Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Metabolite Projection Analysis for Fast Identification of Metabolites in Metabonomics. Application in an Amiodarone Study. Analytical Chemistry 2006; 78:3551-61.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med 2007; 35:1244-50.

Dos Santos CC. Shedding metabo'light' on the search for sepsis biomarkers. Crit Care 2015; 19:R277.

Druml W, Heinzl G, Kleinberger G. Amino acid kinetics in patients with sepsis. The American journal of clinical nutrition 2001; 73(5):908-13.

Duarte IF, Barros A, Belton PS, Righelato R, Spraul M, Humpfer E y col. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. J. Agric. Food Chem 2002; 50:2475-81.

Edward TH: CRP as a mediator of disease. Circulation 2004; 109:11-4.

Erten N, Genc S, Besisik SK, Saka B, Karan MA, Tascioglu C. The predictive and diagnostic values of procalcitonin and C-reactive protein for clinical outcome in febrile neutropenic patients. J Chin Med Assoc 2004; 67:217-21.

Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, y col. Sepsis incidence and outcome: contrasting the

intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med* 2007; 35:1284-9.

Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vicent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001; 286:1754-58.

Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, González-Díaz G, Garnacho-Montero J, y col. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA* 2008; 299:2294-303.

Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48:155-71.

Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PloS One* 2010; 5:e15234.

Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:589-96.

Freund HR, Ryan JA Jr y Fischer JE: Amino acid derangements in patients with sepsis: Treatment with branched chain amino acid rich infusions. *Ann Surg* 1978; 188:423-430.

Freund H, Atamian S, Holroyde J, Fischer JE. Plasma amino acids as predictors of the severity and outcome of sepsis. *Annals of surgery* 1979; 190(5):571-6.

Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit Care Clin* 2009; 25:83-110.

Gaspar P, Al-Bayati FA, Andrew PW, Neves AR, Yesilkaya H. Lactate dehydrogenase is the key enzyme for pneumococcal pyruvate metabolism and pneumococcal survival in blood. *Infect Immun* 2014; 82:5099-109.

Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 2006; 32:2077.

Gibot S, Bene MC, Noel R, Massin F, Guy J, Cravoisy A, y col. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:65-71.

Goldfarb RD, Marton A, Szabo E, Virag L, Salzman AL, Glock D, y col.. Protective effect of a novel, potent inhibitor of Poly (adenosine 5-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30:974-80.

Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB: Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 2004; 22: 245-52.

Gore DC, Jahoor F, Hibbert JM, DeMaria EJ. Lactic acidosis during sepsis is related to increased pyruvate production, not deficits in tissue oxygen availability. *Ann Surg* 1996; 224:97-102.

Green R, Scott LK, Minagar A, Conrad S. Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review. *Front Biosci* 2004; 9:1637-41.

Griesdale DE, de Souza RJ, van Dam RM, Heyland DK, Cook DJ, Malhotra A, y col. Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *CMAJ* 2009; 180: 821-7.

Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: A challenge for patients and hospitals. NCHS data brief, no 62. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2011.

Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983; 148:839-43.



Ho KM, Lee KY, Dobb GJ, Webb SA. C-reactive protein concentration as a predictor of in-hospital mortality after ICU discharge: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 2008; 34:481-7.

Hoffmann JN, Fertmann JM, Jauch KW. Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12:426-30.

Hoffman DL, Brookes PS. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:236-45.

Holmes E, Foxall PJD, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, y col.. Automatic Data Reduction and Pattern Recognition Methods for Analysis of <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Human Urine from Normal and Pathological States. *Analytical Biochemistry* 1994; 220:284-96.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, y col. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230-51.

Hotchkiss RS, I. E. Karl, The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348,138-150.

Íñigo J, Sendra JM, Díaz R, Bouza C, Sarria-Santamera A. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid. Estudio de altas hospitalarias. *Med Intensiva* 2006; 30:197-203.

Izquierdo-García JL: Análisis metabonómico para la identificación de biomarcadores en enfermedades respiratorias. Tesis doctoral. Madrid 2011a.

Izquierdo-García JL, Nin N, Ruíz-Cabello J, Rojas Y, de Paula M, López-Cuenca S, y col. A metabolomic approach for diagnosis of experimental sepsis. *Intensive Care Med.* 2011b; 37: 2023-32.

Junger A, Engel J, Benson M, Böttger S, Grabow C, Hartmann B.

Discriminative power on mortality of a modified Sequential Organ Failure Assessment score for complete automatic computation in an operative intensive care unit. *Crit Care Med* 2002; 30:338-42.

Kajdacsy-Balla A, Andrade FM, Moreno R, Artigas A, Cantraine F, Vincent JL. Use of the sequential organ failure assessment score as a severity score. *Intensive Care Med* 2005; 31:243-49.

Kao C, Hsu J, Bandi V, Jahoor F. Alterations in glutamine metabolism and its conversion to citrulline in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304:E1359–E1364.

Kirschenbaum LA, Astiz ME, Rackow EC. Interpretation of blood lactate concentrations in patients with sepsis. *Lancet* 1998; 352:921-2.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13:818-29.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP. The APACHE II prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalised adults. *Chest* 1991; 100:1619-36.

Kopterides P, Tsangaris I. Procalcitonin and sepsis: recent data on diagnostic utility, prognostic potential and therapeutic implications in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol* 2012; 78:823-35.

Koulman A, Lane GA, Harrison SJ, Volmer DA. From differentiating metabolites to biomarkers. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394:663-7.

Kozlov AV, Bahrami S, Calzia E, Dungen P, Gille L, Kuznetsov AV, y col. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Annals of Intensive Care* 2011; 1:41.

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, y col. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:1589-96.

Lacoma A, Bas A, Tudela P, Giménez M, Mòdol JM, Pérez M, y col. Correlation of inflammatory and cardiovascular biomarkers with pneumo-nia severity scores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:140-46.

Lacy P. Metabolomics of sepsis-induced acute lung injury: a new approach for biomarkers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300:L1-L3.

Lagu T, Rothberg MB, hieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med* 2012; 40:754-61.

Langley RJ, Tsalik EL, van Velkinburgh JC, Glickman SW, Rice BJ, Wang C, y col. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Sci Transl Med* 2013; 5:195ra195.

Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, Saulnier F, Alberti C, Artigas A, y col.. ICUS Scoring Goup. The logistic organ dysfunction system: A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. *JAMA* 1996; 276:802-10.

Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on European / North American multicenter study. *JAMA* 1993; 270:2957-63.

Lee KS, Sheen SS, Jung YJ, Park RW, Lee YJ, Chung WY, y col.. Consideration of additional factors in Sequential Organ Failure Assessment score. *Journal of Critical Care* 2014; 29: 185.e9-185.e12.

Lee TH, Goldman L. Evaluation of the patient with acute chest pain. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342:1187-1195

Lees HJ, Swann JR, Wilson ID, Nicholson JK, Holmes E. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J Proteome Res* 2013; 12:1527-46.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, y col.. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-6.

Lin ZY, Xu PB, Yan SK, Meng HB, Yang GJ, Dai WX y col.. A metabolomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by <sup>1</sup>H NMR and pattern recognition. *NMR Biomed* 2009; 22:601-8.

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E: *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Editorial: Elsevier 1a. Amsterdam Edition, 2007.

Lohninger H. *Teach/Me Data Analysis*. Springer-Verlag, Berlin-New York-Tokyo, 1999.

Lorente JA, Vallejo A, Galeiras R, Tomacic V, Zamora J, Cerda E, y col. Organ dysfunction as estimated by the SOFA score is related to outcome in critically ill burned patients. *Shock* 2009; 31:125-31.

Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE. The role of arginine in infection and sepsis. *J Parenter Enteral Nutr* 2005; 29:S70-4.

Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303:E1177-89.

Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of Toxicology* 2011; 85:5-17.

Manna SK, Patterson AD, Yang Q, Krausz KW, Idle JR, Fornace AJ y col. UPLC-MS-based urine metabolomics reveals indole-3-lactic acid and phenyllactic acid as conserved biomarkers for alcohol-induced liver disease in the Ppara-null mouse model. *Journal of Proteome Research* 2011; 10:4120-33.

Manzanares W, Aramendi I. Hiperglucemia de estrés y su control con insulina en el paciente crítico: evidencia actual. *Med Intensiva* 2010; 34:273-81.

Márquez S, Zabala C (2011). *Respiración celular. Introducción a la biología celular*. Recuperado el 20 de enero de 2014 de <http://genomasur.com/index.htm>.

Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald

WJ. Multiple organ dysfunction score: A realible descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995; 23: 1638-52.

Marshall JC. Rethinking sepsis: from concepts to syndromes to diseases. *Sepsis* 1999; 3:5-10.

Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, y col. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003, 31:1560-7.

Marshall JC. Sepsis research: where have we gone wrong? *Crit Care Resusc* 2006; 8:241-3.

Marshall JC, Reinhart K. Biomarkers of sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37:2290-8.

Maruna P, Nedelnikova K, Gurlich R. Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiol Res* 2000; 49(supl 1):S57-S61.

Metnitz PG, Lang T, Valentin A, Steltzer H, Krenn CG, Le Gall JR: Evaluation of the logistic organ dysfunction system for the assessment of organ dysfunction and mortality in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2001; 27:992-8.

Mickiewicz B, Vogel HJ, Wong HR, Winston BW. Metabolomics as a novel approach for early diagnosis of pediatric septic shock and its mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:967-76.

Mickiewicz B, Duggan GE, Winston BW, Doig C, Kubes P, Vogel HJ. Alberta Sepsis Network. Metabolic profiling of serum samples by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. *Crit Care Med* 2014; 42:1140-9.

Minne L, Abu-Hanna A, de Jonge E. Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: a systematic review. *Crit Care* 2008; 12:R161.

Moreno R, Vincent JL, Matos A, de Mendonça A, Cantraine F, Thies J,

y col. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. *Intensive Care Med* 1999; 25:686-96.

Muñoz P, Simarro N, Rivera M, Alonso R, Alcalá L, Bouza E. Evaluation of procalcitonin as a marker of infection in a nonselected sample of febrile hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:237-41.

Nagrath D, Caneba C, Karedath T, Bellance N. Metabolomics for mitochondrial and cancer Studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1807:650-63.

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29:1181-9.

Nicholson JK, Lindon JC: Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008; 455:1054-6.

Nicholson, JK, Wilson ID, Lindon JC. Pharmacometabonomics as an effector for personalized medicine. *Pharmacogenomics* 2011; 12:103-11.

O'Donnel TF, Clowes GH Jr, Blackburn GL, Ryan NT, Benotti PN y Miller JD. Proteolysis associated with a deficit of peripheral energy fuel substrates in septic man. *Surgery* 1976; 80:192-200.

Oudemans-van Straaten, H.M. y A.R. van Zanten, Glutamine supplementation in the critically ill: friend or foe? *Crit Care*, 2014; 18(3).

Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hours in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003; 31:2332-38.

Penttila I, Penttila K, Rantanen T. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:187-97.

Pierrakos Ch, Jean-Louis Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* 2010; 14:R15

Poeze M, Luiking YC, Breedveld P, Manders S, Deutz NE. Decreased plasma glutamate in early phases of Septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin Nutr* 2008; 27:523-530.

Porta F, Takala J, Weikert C, Bracht H, Kolarova A, Lauterburg BH, y col. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care* 2006; 10:R118.

Póvoa P, Coelho L, Almeida E. C-Reactive Protein as a Marker of Infection in Critically ill Patients. *Clinical Microbiology Infect J* 2005; 11:101-8.

Póvoa P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, y col. Early identification of intensive care unit-acquired infections with daily monitoring of C-reactive protein: a prospective observational study. *Critical Care* 2006; 10:R63.

QuickStats: From the national center for health statistics. Percentage of Hospitalizations Ending in Death, by Selected First-Listed Diagnoses-National Hospital Discharge Survey, United States, 2000 and 2010. *JAMA* 2013; 309:26.

Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, y col. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19:45-50.

Radi R, Cassina A, Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002; 383:401-9.

Rana NF, Sauvageot N, Laplace JM, Bao Y, Nes I, Rince A y col. Redox balance via lactate dehydrogenase is important for multiple stress resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun* 2013; 81:2662-8.

Randall DT. An Introduction to Partial Least Squares Regression. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

Regueira T, Andresena M, Djafarzadeh S. Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ). *Med Intensiva* 2009; 33:385-92.

Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin* 2006; 22:503-19.

Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:609-34.

Reny JL, Vuagnat A, Ract C, Benoit MO, Safar M, Fagon JY. Diagnosis and follow-up of infections in intensive care patients: value of C-reactive protein compared with other clinical and biological variables. *Crit Care Med* 2002; 30:529-35.

Rey C, García-Hernández I, Concha A, Martínez-Cambor P, Botrán M, Medina A, y col. Pro-adrenomedullin, pro-endothelin-1, procalcitonin, C-reactive protein and mortality risk in critically ill children: A prospective study. *Critical Care* 2013; 17:R240.25.

Richardson AR, Libby SJ, Fang FC. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* 2008; 319:1672-6.

Ringner M: What is principal component analysis? *Nature Biotechnology* 2008; 26:303-4.

Ross A, Schlotterbeck G, Dieterle F, Senn H: NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam; Boston, 2007; 55-112.

Ruggieri AJ, Levy RJ, Deutschman CS. Mitochondrial Dysfunction and Resuscitation in Sepsis. *Crit Care Clin* 2010; 26:567-75.

Sabatier C, Peredo R, Vallés J. Bacterial bloodstream infections in critical patients. *Med Intensiva* 2009; 33:336-45.



Samra JS, Summers LK, Frayn KN. Sepsis and fat metabolism. *Br J Surg* 1996; 83:1186-96.

Santangelo F. The regulation of sulphurated amino acid junctions: fact or fiction in the field of inflammation? *Amino Acids* 2002; 23:359-65.

Schmerler D, Neugebauer S, Ludewig K, Bremer-Streck S, Brunkhorst FM, Kiehntopf M. Targeted metabolomics for discrimination of systemic inflammatory disorders in critically ill patients. *J Lipid Res* 2012; 53:1369-75.

Schmit X, Vincent JL. The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection* 2008; 36:213-9.

Serkova NJ, Standiford TJ, Stringer KA. The emerging field of quantitative blood metabolomics for biomarker discovery in critical illnesses. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:647-55.

Singh M, Anand L. Bedside procalcitonin and acute care. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2014; 4:233-7.

Skibsted S, Bhasin MK, Aird WC, Shapiro NI. Bench-to bedside review: Future novel diagnostics for sepsis - a systems biology approach. *Crit Care* 2013; 17:231.

Slupsky CM, Rankin KN, Fu H, Chang D, Rowe BH, Charles PG, McGeer A, y col. Pneumococcal Pneumonia: Potential for Diagnosis through a Urinary Metabolic Profile. *J. Proteome Res* 2009; 8:5550-8.

Slupsky CM. NMR-based analysis of metabolites in urine provides rapid diagnosis and etiology of pneumonia. *Biomarkers Med* 2010; 4:195-7.

Sprung CL, Cerra FB, Freund HR, Schein RM, Konstantinides FN, Marcial EH, y col. Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1991; 19:753-7.

Stringer KA, Serkova NJ, Karnovsky A, Guire K, Paine R, Standiford TJ. Metabolic consequences of sepsis-induced acute lung injury revealed by plasma <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance quantitative

metabolomics and computational analysis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300:L4–L11.

Su L, Li H, Xie NA, Liu D, Rao W, Lan L y col. *PLoS ONE* 2015; 10(4):e0121933. doi: 10.1371/journal.pone.0121933.

Suberviola B, Castellanos-Ortega A, González-Castro A, García-Astudillo LA, Fernández-Miret B. Valor pronóstico del aclaramiento de procalcitonina, PCR y leucocitos en el shock séptico. *Med Intensiva* 2012; 36:177-84.

Suberviola B, Castellanos-Ortega A, Ruiz A, Lopez Hoyos M, Santibañez M. Hospital mortality prognostication in sepsis using the new biomarkers suPAR and proADM in a single determination on ICU admission. *Intensive Care Med* 2013; 39:1945-52.

Summer LW, Mendes P, Dixon RA: Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*; 62:817-36.

Tang BL, Kumar R. Biomarkers of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37:406-10.

Tang HR, Wang YL. Metabonomics: a revolution in progress. *Prog Biochem Biophys* 2006; 33:401-7.

Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD II. Glutamine and glutamate. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2002; 56:446-57.

Timsit JF, Fosse JP, Troche G, De Lassence A, Alberti C, Garrouste-Org, y col. Calibration and discrimination by daily Logistic Organ Dysfunction scoring comparatively with daily Sequential Organ Failure Assessment scoring for predicting hospital mortality in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30:2003-13.

Trygg J, Lundstedt T. Chemometrics Techniques for Metabonomics. In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. pp. 171-200. Elsevier, Amsterdam 2007.

Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Braun GG, Radespiel-Troeger M. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis. *J Crit Care* 2010; 26:54-64.

Vallés J, Rello J, Ochagavía A, Garnacho J, Alcalá MA, Spanish Collaborative Group for Infections in Intensive Care Units of Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias. Community-acquired blood stream infection in critically ill adult patients: Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003; 123:1615-24.

Van Rossum AM, Wulkan RW, Oudesluys-Murphy AM. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:620-30.

Vary TC. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. *Shock* 1996; 6:89-94.

Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TMD, Crockford D, Volynkin VV, Holmes E, y col. Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological H-1 NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery. *Anal Chem* 2009; 81:56-66.

Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1351-7.

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, y col. The SOFA (Sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22:707-10.

Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit. Care Med.* 1997; 25:372-374.

Vincent JL, De Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, y col. 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: 1793-1800.

Vincent JL, Ferreira F, Moreno R. Scoring systems for assessing organ dysfunction and survival. *Crit Care clinics* 2000; 16:353-64.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, y col. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP Study. *Crit Care Med* 2006; 34:344-53.

Vincent JL, Ocampos Martinez E, Silva E. Evolving Concepts in Sepsis Definition. *Crit Care Clin* 2009; 25:665-75.

Vosylius S, Sipylaite J, Ivaskevicius J. Sequential organ failure assessment score as the determinant of outcome for patients with severe sepsis. *Croat Med J* 2004; 45:715-20.

Wannemacher Jr RW, Klainer AS, Dinterman RE, Beisel WR. The significance and mechanism of an increased serum phenylalanine-tyrosine ratio during infection. *Am J Clin Nutr* 1976; 29:997-1006.

Weber M, Lambeck S, Ding N, Henken S, Kohl M, Deigner HP, y col. Hepatic induction of cholesterol biosynthesis reflects a remote adaptive response to pneumococcal pneumonia. *FASEB J* 2012; 26:2424-36.

Westerhuis J, Hoefsloot H, Smit S, Vis D, Smilde A, Velzen E y col. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics* 2008; 4:81-9.

Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clinical Chemistry* 2007; 53:2169-76.

Winning H, Larsen FH, Bro R, Engelsen SB. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *J Magn Reson* 2008; 190:6-32.

- Wischmeyer PE. Glutamine: mode of action in critical illness. *Crit Care Med* 2007; 35:S541-4.
- Wise BM, Gallagher NB, Bro R, Shaver JM, Windig W, Scott Koch R. PLS\_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB™. Eigenvector Research, Inc. 2006.
- Wishart DS. Metabolomics in humans and other mammals. In: Villa-Boas S, Roessner U, Hansen M, Smedsgaard J, Nielsen J, editors. *Metabolome analysis: An introduction*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc.; 2007.p.253-88.
- Wolfe RR, Shaw JH, Durkot MJ. Energy metabolism in trauma and sepsis: the role of fat. *Prog Clin Biol Res* 1983; 111:89-109.
- Wolfe RR, Shaw JH y Durkot MJ. Effect of sepsis on VLDL kinetics: responses in basal state and during glucose infusion. *Am. J. Physiol* 1985; 248: E732-E740.
- Wüthrich K: NMR Studies of structure and function of biological macromolecule. *Nobel Lecture 2002*: 235-67.
- Xi Y and Rocke DM. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics* 2008; 9:324.
- Xu EY, Schaefer WH, Xu Q. Metabolomics in pharmaceutical research and development: metabolites, mechanisms and pathways. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; 12:40-52.
- Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Gil SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 2013; 57:601-9.
- Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, Salzman AL, Szabo C. The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br J Pharmacol* 1997; 120:259-67.



## **ANEXOS**





**ANEXO I: Sistema de valoración de la gravedad APACHE II  
(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation)**

Puntuación APACHE II									
APS	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Tª rectal (°C)	> 40,9	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	< 30
Pres. arterial media	> 159	130-159	110-129		70-109		50-69		< 50
Frec. cardíaca	> 179	140-179	110-129		70-109		55-69	40-54	< 40
Frec. respiratoria	> 49	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		< 6
Oxigenación: Si FIO2 ≥ 0.5 (AaDO2) Si FIO2 ≤ 0.5 (paO2)	> 499	350-499	200-349		< 200				
					> 70	61-70		56-60	< 56
pH arterial	> 7,69	7,60-7,69		7,50-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Na plasmático (mmol/l)	> 179	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	< 111
K plasmático (mmol/l)	> 6,9	6,0-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Creatinina * (mg/dl)	> 3,4	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6		
Hematocrito (%)	> 59,9		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		< 20
Leucocitos (x 1000)	> 39,9		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		< 1
<b>Suma de puntos APS</b>									
<b>Total APS</b>									
<b>15 - GCS</b>									
<b>EDAD</b>	<b>Puntuación</b>	<b>ENFERMEDAD CRÓNICA</b>		<b>Puntos APS (A)</b>	<b>Puntos GCS (B)</b>	<b>Puntos Edad (C)</b>	<b>Puntos enfermedad previa (D)</b>		
≤ 44	0	Postoperatorio programado							
45 - 54	2	Postoperatorio urgente o Médico							
55 - 64	3								
65 - 74	5								
≥ 75	6								
				<b>Total Puntos APACHE II (A+B+C+D)</b>					
				<b>Enfermedad crónica:</b>					
				Hepática: cirrosis (biopsia) o hipertensión portal o episodio previo de fallo hepático					
				Cardiovascular: Disnea o angina de reposo (clase IV de la NYHA)					
				Respiratoria: EPOC grave, con hipercapnia, policitemia o hipertensión pulmonar					
				Renal: diálisis crónica					
				Inmunocomprometido: tratamiento inmunosupresor inmunodeficiencia crónicas					

\* Creatinina: Doble puntuación si FRA

**ANEXO II: Sistema de valoración de la disfunción orgánica SOFA  
(Sepsis-related Organ Failure Assessment)**

<b>Puntuación SOFA</b>					
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Respiratorio:</b> Po <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub>	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200*	≤ 100*
<b>Renal:</b> Creatinina/Diuresis	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9 < 500 ml/día	≥ 5 < 200 ml/día
<b>Hepático:</b> Bilirrubina	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	≥ 12
<b>Cardiovascular</b> PAM o Fármacos	No hipotensión	PAM < 70	Dopa ≤ 5 ó Dobutamina	Dopa > 5 ó NA ≤ 0,1	Dopa > 15 ó NA > 0.1
<b>Hematológico:</b> Plaquetas	> 150.000	≤ 150.000	≤ 100.000	≤ 50.000	≤ 20.000
<b>Neurológico:</b> GCS	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6

Respiratorio: pO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> en mmHg. Puntos 3-4 solo se valoran si precisa ventilación mecánica.

Renal: Creatinina en mg/dl. Puntos 3-4 en caso de fracaso renal funcional u oligoanuria.

Hepático: Bilirrubina en mg/dl.

Cardiovascular: PAM (presión arterial media) en mmHg. Fármacos vasoactivos administrados durante más de 1 hora. Dopa = Dopamina. NA = Noradrenalina o Adrenalina (dosis en mcg/kg/min).

Neurológico: GCS = Glasgow Coma Score

### **ANEXO III: INTRODUCCIÓN A LA RMN**

En 1945, dos grupos de físicos de manera independiente - Purcell, Torrey y Pound en Harvard y Bloch, Hansen y Packard en Stanford- observaron por primera vez el fenómeno de la resonancia magnética nuclear (RMN). En 1952 obtuvieron el premio Nobel de Física por sus descubrimientos en este campo. Desde entonces la RMN no ha dejado de desarrollarse y se ha convertido en una técnica indispensable para el campo de la química, la bioquímica, la física y más recientemente para la medicina.

#### **A- EL FENÓMENO DE LA RESONANCIA**

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos.

El átomo consta de un núcleo rodeado por electrones. Los electrones presentan dos movimientos, el orbital (movimiento alrededor del núcleo) y el intrínseco o giro sobre sí mismo (espín). Estos dos movimientos forman los componentes del momento angular (P).

$$P = \sqrt{I(I + 1)} \frac{h}{2\pi}$$

Donde h es la constante de Planck y I es el espín nuclear.

El núcleo se compone de protones y neutrones, ambos denominados nucleones. Los protones tienen carga positiva, mientras que los neutrones carecen de carga. El movimiento orbital de las cargas dentro del núcleo es equivalente a una pequeña corriente eléctrica que viaja a través de un diminuto aro de alambre que genera

un pequeño campo magnético que se asemeja a una barra imantada (dipolo magnético). A este efecto se adiciona el aporte del espín de las partículas constituyentes del núcleo (Figura III-1).

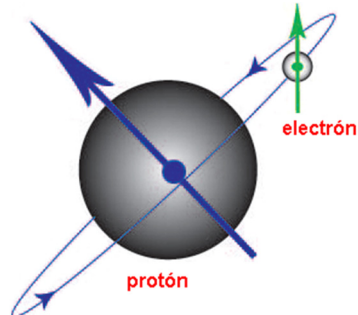


Figura III-1: Protón girando sobre su propio eje en el núcleo del átomo y electrón girando sobre su propio eje y alrededor del núcleo. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

La dirección del campo magnético producido por los nucleones se expresa en términos de momento magnético.

El momento magnético del espín de un núcleo se define como:

$$B_0 \mu = \gamma \cdot P$$

donde  $\gamma$  es la constante giromagnética y  $P$  es el momento nuclear angular.

Todos los núcleos que poseen un número impar de protones o neutrones o lo que es lo mismo un espín distinto de cero, tienen un momento magnético neto debido a su movimiento de giro llamado  $\mu$ . Cuando estos núcleos se colocan en un campo magnético externo,  $B_0$ , la rotación se convierte en una precesión (movimiento que describe un cono de giro) alrededor del eje del campo magnético externo (Figura III-2). La frecuencia de esta precesión es característica

del tipo de núcleo y se denomina frecuencia de Larmor ( $V_0$ ), que depende de la intensidad del campo que la origina,  $B_0$ , y de una constante característica de cada núcleo, la constante giromagnética  $\gamma$ . Para el hidrógeno  $\gamma$  es 42.577 MHz/T.

$$V_0 = \gamma \cdot B_0 / 2\pi$$

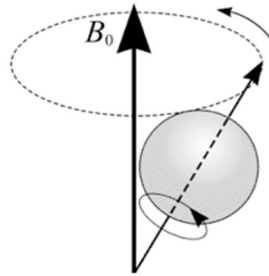


Figura III-2: Movimiento precesional de un protón al aplicar un campo magnético externo. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>.

Además el propio campo magnético del núcleo se puede orientar con el campo magnético externo o en contra de él. La orientación llamada paralela es la orientación alineada con el campo externo, que va a ser de baja energía. La orientación antiparalela, más energética, se va a alinear en sentido opuesto al campo magnético (Figura III-3).

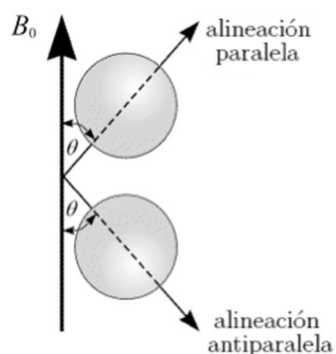


Figura III-3: Alineación del espín en el sentido de la dirección del campo magnético. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

La distancia de energía entre los protones cuyos espines están en la orientación paralela y los protones cuyos espines están en la orientación antiparalela, depende de la intensidad del campo magnético aplicado (Figura III-4).

Habrán más núcleos en la orientación de baja energía, que en la orientación antiparalela en una situación de equilibrio termodinámico.

Cuando un núcleo es irradiado con energía electromagnética de la frecuencia correcta ( $V_0$ ), cambiará desde la orientación de baja energía hacia la de alta energía. Al mismo tiempo, un núcleo del nivel de alta energía, cambiará su orientación para ubicarse en la dirección de baja energía. Este proceso se denomina resonancia. Es importante notar que sólo la energía suministrada a la frecuencia  $V_0$  estimulará las transiciones entre los estados de alta y baja energía. Esta

frecuencia se conoce como frecuencia de resonancia y se muestra de acuerdo con la siguiente expresión:

$$E = h \cdot \nu_0 \text{ (Ley de Planck)}$$

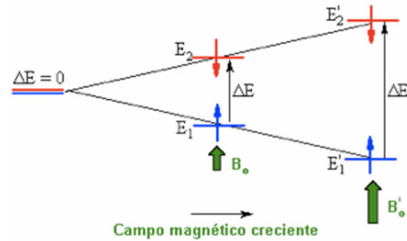


Figura III-4: Desdoblamiento del espín al aplicar un campo magnético externo creciente. Una población de espines apunta en dirección del campo magnético y otra en dirección contraria. Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

Las ondas de radiofrecuencia (RF) necesarias para conseguir la transición de un nivel de energía fundamental a un nivel excitado, son de baja intensidad. Esta es una de las principales ventajas de la RMN ya que la hace inocua para su utilización con organismos vivos.

Al cesar el pulso de RF, los protones previamente excitados tienden a regresar a su situación original, liberando la energía previamente absorbida en forma de RF. La señal emitida es la señal de RMN.

Si representamos el campo magnético y los núcleos, con un sistema de coordenadas en el que el eje Z se encuentra en la misma dirección que el campo externo  $B_0$ , dicha perturbación se traduce en que la magnetización inducida en la muestra y dirigida en la dirección de  $B_0$  se aleja de esa dirección llamada longitudinal (componente en el

plano Z), a la vez que aparece un componente transversal de magnetización (componente en el plano XY) (Figura III-5). La aparición del componente transversal de magnetización es el resultado de una coherencia de fase en el movimiento precesional de los diferentes momentos magnéticos individuales. Este desplazamiento se mantendrá mientras precesen exactamente a la misma velocidad y a medida que se vayan recuperando, irán tomando múltiples direcciones, porque cada núcleo se encontrará en un momento diferente de su precesión.

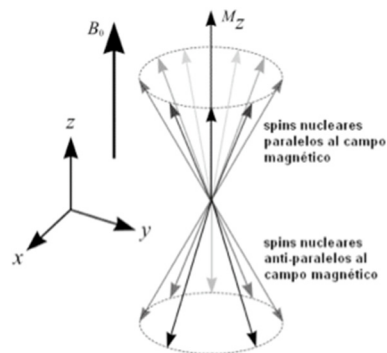


Figura III-5: Asimetría del número de espines en equilibrio térmico. La dirección de las flechas nos indica la dirección del componente transversal de magnetización (XY). Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

Para los componentes longitudinales sólo serán posibles dos situaciones: componentes positivas (orientaciones paralelas, estado de energía fundamental) y negativas (orientaciones antiparalelas, estado de energía excitado).

Si el pulso de RF se da con un ángulo de  $90^\circ$ , el vector neto rota ese ángulo respecto al eje Z y el pulso se denomina pulso de  $90^\circ$



(Figura III-6). La rotación sobre otros  $90^\circ$  hasta  $180^\circ$  invertirá la diferencia de población.

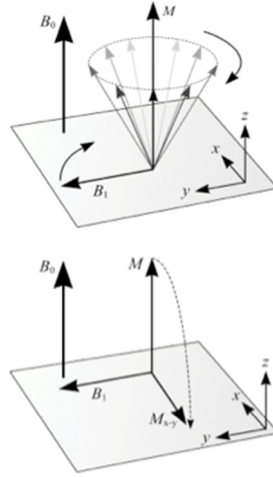


Figura III-6: Dirección que tomará el vector neto al aplicar un pulso de RF  $B_1$  de  $90^\circ$ . Adaptado de <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com>

## ANEXO IV: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Estudio metabonómico en pacientes diagnosticados de sepsis grave y shock séptico**” que está siendo realizado por el **Dr. José Blanquer** en colaboración con la **Dra. Mónica García-Simón** de la **Unidad de Cuidados Intensivos** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

#### **Antecedentes:**

La sepsis es una **infección** muy grave que en ocasiones asocia el fallo de múltiples órganos vitales. En España cada año se diagnostican alrededor de 50.000 casos nuevos de sepsis grave y su mortalidad supone aproximadamente 17.000 casos al año. A pesar de los avances en las terapias antibióticas y en los tratamientos de resucitación de la sepsis estas cifras están aumentando cada año de forma importante. Unido a esto, los pacientes que sobreviven a una sepsis, presentan un deterioro importante de su estado físico y cognitivo y un riesgo de muerte más del doble en los 5 años siguientes a su alta hospitalaria. Todo esto conlleva un elevado gasto sanitario.

El desarrollo de biomarcadores moleculares sepsis-específico para evaluar de forma precoz su gravedad, ayudaría a mejorar su manejo y el pronóstico de los pacientes que padecen un sepsis.

#### **¿Cuál es el objetivo de este estudio?**

La construcción de un modelo predictivo de gravedad, al ingreso del paciente en la UCI, contribuiría a identificar anticipadamente al paciente con un riesgo mayor de mortalidad y mejorar su tratamiento.

#### **¿Por qué se le ha pedido que participe?**

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de sepsis.

#### **¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?**

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos parte del material biológico que se le extraerá durante su estancia hospitalaria. Fundamentalmente utilizaremos parte de la sangre y orina procedente de las extracciones que se realicen rutinariamente para el control de la enfermedad.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

**¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?**

El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

**¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?**

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

**¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?**

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

**¿A quién puedo preguntar en caso de duda?**

Podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto o con la Dra. Mónica García-Simón en el teléfono 963862600 (ext. 51212).

**Confidencialidad:**

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

**¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?**

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de sangre y orina. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

## ANEXO V: CONSENTIMIENTO INFORMADO

### Formulario de consentimiento informado del paciente o representante.

**Título del estudio: Estudio metabonómico en sepsis grave y shock séptico.**

Yo (Paciente).....

Yo (Familiar).....en calidad de .....  
Nombre y dos apellidos relación con el paciente

De .....  
Nombre y dos apellidos del paciente

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con.....  
Nombre del investigador

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

-cuando quiera

-sin tener que dar explicaciones

-sin que influya en mis cuidados médicos

Expreso mi conformidad para participar/mi familiar participe en este estudio

Firma del paciente /Familiar.....

Firma del investigador.....

Fecha y hora

**ANEXO IV: HOJA RECOGIDA DE DATOS**

**ESTUDIO METABOLONOMIC EN SEPSIS.**

DEMOGRÁFICOS		NUMERO DE CASO ( )		ESTUDIO METABOLONOMIC EN SEPSIS.	
NH <sup>a</sup>	EDAD	FECHA INGRESO ___/___/___		EXITUS S / N	FECHA EXITUS ___/___/___
NOM	V H	FECHA INGRESO UCI ___/___/___		DIAS DE INGRESO	DIAS EN EXITUS
FECHA ALTA HOSPITAL ___/___/___		FECHA ALTA UCI ___/___/___		EXITUS relacionado con SEPSIS: S / N	
Procedencia: Urgencias ( ) Sala ( ) Otro Hospital ( )					

MOTIVO DE INGRESO			SHOK SEPTICO		
SEPSIS GRAVE			SHOK SEPTICO		
ABDOMINAL	PULMONAR	URINARIA	P.BLANDAS	SNC	BACTERIEMIA

ANTECEDENTES PATOLOGICOS	
Diabetes mellitus	VIH
•Hepatopatía crónica	Neutropenia (<500 por microlitro)
EPOC	Trasplante de órganos
Insuficiencia cardíaca severa clase (III - IV de NYHA)	Neoplasia sólida
Corticoides >40mg/día o inmunosupresores	Neoplasia hematológica
Alcoholismo (> de 80 gr/día)	Trasplante de médula ósea

PRIMERA MUESTRA (INGRESO) ___/___/___		
VENTILACIÓN MECÁNICA	VENTILACIÓN NO INVASIVA	HEMODIAFILTRACION VENOVENOSA CONTINUA

ANALITICA													
F:	PH	BIC	HB	PLA	L	PCT	PCR	GLU	CRE	URE	GPT	GOT	BT

ESCALAS DE GRAVEDAD	
Puntuación APACHE II	
Puntos SOFA de disfunción respiratoria	
Puntos SOFA de disfunción hematológica	
Puntos SOFA de disfunción hepática	
Puntos SOFA de disfunción cardiovascular	
Puntos SOFA de disfunción neurológica	
Puntos SOFA de disfunción renal	
Puntos SOFA total	

SEGUNDA MUESTRA (DÍA 2) FECHA ___/___/___														
ANALITICA														
F:	PH	PCO2	PO2	BIC	L	ntPbnp	PCT	PCR	GLU	CRE	URE	GPT	GOT	BT

ESCALAS DE GRAVEDAD	
Puntos SOFA de disfunción respiratoria	
Puntos SOFA de disfunción hematológica	
Puntos SOFA de disfunción hepática	
Puntos SOFA de disfunción cardiovascular	
Puntos SOFA de disfunción neurológica	
Puntos SOFA de disfunción renal	
Puntos SOFA total	

**TERCERA MUESTRA (DÍA 4) FECHA** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**ANALITICA**

F:	PH	HB	PLA	BIC	L	PCT	PCR	GLU	CRE	URE	GPT	GOT	BT
----	----	----	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

**ESCALAS DE GRAVEDAD**

Puntos SOFA de disfunción respiratoria	
Puntos SOFA de disfunción hematológica	
Puntos SOFA de disfunción hepática	
Puntos SOFA de disfunción cardiovascular	
Puntos SOFA de disfunción neurológica	
Puntos SOFA de disfunción renal	
Puntos SOFA total	

**MICROBIOLOGIA**

Muestra	Fecha	Germen 1	Germen 2	Germen 3	Germen 4
	___/___/___				
	___/___/___				
	___/___/___				
	___/___/___				
	___/___/___				
	___/___/___				
	___/___/___				

**AL ALTA/EXITUS**

**ANALITICA**

F:	PH	PCO2	PO2	BIC	L	PCT	PCR	GLU	CRE	URE	GPT	GOT	BT
----	----	------	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----