



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA (3139)

PRONÓSTICO A CORTO Y LARGO PLAZO
DE LA SEPSIS ADQUIRIDA EN LA
COMUNIDAD: FACTORES PREDICTIVOS
CLÍNICOS Y EPIGENÉTICOS

Tesis doctoral

PRESENTADA POR:

Ian López Cruz

DIRIGIDA POR:

Dr. Arturo Artero Mora

Dr. José Luis García Giménez

TUTOR:

Dr. Arturo Artero Mora

Valencia, marzo 2024

El doctor D. ARTURO ARTERO MORA, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universitat de València y Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitari Doctor Peset, y

El doctor D. JOSÉ LUIS GARCÍA GIMÉNEZ, Profesor ayudante doctor del Departamento de Fisiología de la Universitat de València e Investigador Post-Doctoral del Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red del Instituto de Salud Carlos III (CIBER-ISCIII) y del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada: **“Pronóstico a corto y largo plazo de la sepsis adquirida en la comunidad: Factores predictivos clínicos y epigenéticos”**, presentada por **D. Ian López Cruz**, licenciado en Medicina, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, ha sido realizada bajo su dirección y asesoramiento, y reúne las condiciones suficientes para su presentación y defensa.

En Valencia, a 12 de marzo de 2024

Fdo: Arturo Artero Mora

Fdo: José Luis García Giménez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Arturo y José Luis, su inestimable ayuda. Han sido los mejores maestros para esta tarea. Sin su experiencia, orientación y estímulo no habría sido posible.

Gracias al Servicio de Medicina Interna del Hospital U. Dr. Peset, excepcionales internistas de quienes sigo aprendiendo cada día la ciencia y el arte de nuestra profesión. Su entusiasmo y dedicación son fuente de inspiración, y ninguno dudó en prestarme su ayuda cuando lo necesité. Especialmente, gracias a Laura y Manel por compartir proyectos y fatigas, apoyándonos mutuamente para poder lograrlos.

También al personal del Hospital que ha participado generosamente de distintas maneras en este proyecto. Particularmente gracias a Amelia, que me acompañó a realizar extracciones, incluso tras su jubilación, cuando hizo falta.

Gracias a mi familia. A mi madre, Virginia, por ayudarme a encontrar mi camino. A mi padre, Luis, por enseñarme con su ejemplo la constancia y la entrega. Y a mi hermano, Christian, por escucharme y compartir conmigo la pasión por cuidar a los demás y los retos que conlleva.

Por último y, sobre todo, gracias a mi mujer y a mi hija. A Jess, por ser la persona que me sostiene y me ilumina en cualquier circunstancia, y por mantener nuestra promesa. A Adriana, por ser el estímulo para ser la mejor versión de mí mismo y enseñarme a conciliar mis pasiones. Y por su risa.

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las Becas y Ayudas de las siguientes entidades:

- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO): "Ayudas para la realización de tesis doctorales, Convocatoria 2020". V Convocatoria de Ayudas para el Fomento de la Actividad Investigadora. Programa de ayudas FISABIO 2018-2022
- Fundación Española de Medicina Interna (FEMI): Beca de ayuda a la investigación 2022

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Definición y criterios de sepsis	17
1.1.1. Contexto histórico: Antecedentes y evolución del concepto de sepsis y sus criterios definitorios.....	17
1.1.2. Contexto actual: Criterios Sepsis-3	23
1.2. Epidemiología, mortalidad y coste económico de la sepsis.....	29
1.3. Fisiopatología de la sepsis.....	32
1.3.1. El sistema inmunitario ante la infección	32
1.3.2. Desregulación inmunitaria: desencadenantes y mecanismos implicados	37
1.3.3. Daño celular y disfunción orgánica	42
1.3.4. De la inflamación excesiva a la inmunosupresión: SIRS, CARS y PICS	50
1.4. Epigenética en la sepsis	54
1.4.1. Introducción. Conceptos generales.....	54
1.4.2. Metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de las histonas y ARN no codificante.....	56
1.4.3. Regulación epigenética del sistema inmunitario	61
1.4.4. Sepsis y metilación del ADN.....	66
1.5. Pronóstico de la sepsis.....	74
1.5.1. Factores relacionados con el pronóstico dependientes del hospedador	77
1.5.2. Factores relacionados con el pronóstico dependientes de la terapéutica	80
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	85
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	85
2.2. OBJETIVOS	86
2.2.1. Objetivos principales.....	86
2.2.2. Objetivos secundarios.....	86
3. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO. ASPECTOS ÉTICOS.....	91
3.1.1. Diseño del estudio.....	91
3.1.2. Aspectos éticos	93

3.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	95
3.2.1. Población y periodo de estudio.....	95
3.2.2. Criterios de inclusión y exclusión	95
3.2.3. Pacientes incluidos en el estudio	97
3.3. RECOGIDA DE INFORMACIÓN	100
3.3.1. Registro de datos y definiciones	100
3.4. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	114
3.4.1. Obtención y uso de muestras de sangre	114
3.4.2. Análisis de la metilación del ADN por <i>arrays</i> de metilación EPIC850k.....	114
3.4.3. Análisis bioinformático de los resultados de los <i>arrays</i> de metilación.	119
3.4.4. Análisis de la metilación del ADN por técnicas de pirosecuenciación	121
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	124
3.6. FINANCIACIÓN DEL PROYECTO	125
4. RESULTADOS.....	129
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	129
4.1.1. Características clínicas y epidemiológicas	129
4.1.2. Síntomas y signos al ingreso. Forma de presentación	134
4.1.3. Parámetros analíticos, escalas de gravedad y criterios de sepsis	136
4.1.4. Etiología de las infecciones. Datos microbiológicos	138
4.1.5. Tratamiento antibiótico y de soporte.....	139
4.2. EVOLUCIÓN A CORTO Y LARGO PLAZO	141
4.2.1. Evolución durante el ingreso hospitalario	141
4.2.2. Evolución tras el alta hospitalaria	142
4.2.3. Cambios en la situación funcional, comorbilidad y calidad de vida	143
4.3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DIFERENCIAL DE ADN.....	144
4.3.1. Evaluación de la calidad del análisis de metilación mediante los <i>arrays</i> EPIC850K v2.0	144
4.3.2. Análisis de metilación diferencial entre los grupos del estudio	148
4.3.3. Análisis de metilación diferencial entre subgrupos identificados de interés .	157
4.3.3.1. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con criterios de SIRS y sin criterios de SIRS (Comparación 1)	160
4.3.3.2. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS (Comparación 2)	160
4.3.3.3. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS (Comparación 3)	170

4.4. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE LA METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS DE ANÁLISIS	178
4.4.1. Selección de los genes con mayor potencial para su validación	178
4.4.2. Validación del análisis de metilación diferencial mediante pirosecuenciación	181
4.4.3. Estudio de correlaciones entre la metilación diferencial y distintas variables clínicas.....	183
4.5. PRONÓSTICO A CORTO Y LARGO PLAZO. NUEVOS BIOMARCADORES ..	185
4.5.1. Factores clínicos predictivos de mal pronóstico a corto y largo plazo	185
4.5.2. Marcas epigenéticas: uso como biomarcadores en la predicción del mal pronóstico	189
4.5.3. Marcas epigenéticas: uso como biomarcadores en el diagnóstico de la sepsis	192
5. DISCUSIÓN	197
5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DESCRIPTIVOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS	198
5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS EPIGENÉTICO	202
5.3. DISCUSIÓN DE LOS FACTORES PREDICTIVOS DE MAL PRONÓSTICO	208
5.4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO. APORTACIONES AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y EXPECTATIVAS DE FUTURO	217
6. CONCLUSIONES	225
7. BIBLIOGRAFÍA	229
8. ANEXOS	247
ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO	247
ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN MUESTRAS.....	251
ANEXO 3: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS.....	255
ANEXO 4: APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO	257
ANEXO 5: MATERIAL SUPLEMENTARIO	260

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), sepsis, sepsis grave y shock séptico. Conferencia de Consenso ACCP/SCCM de 1991	18
Tabla 2. Criterios de diagnóstico de sepsis de la Conferencia de Consenso SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS de 2001 (Sepsis-2)	20
Tabla 3. Sistema PIRO (<i>Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction</i>), propuesto en la Conferencia de Consenso SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS de 2001	22
Tabla 4. Escala SOFA (<i>Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment</i>)	25
Tabla 5. Criterios qSOFA (<i>Quick-SOFA</i>)	25
Tabla 6. Comparación de la terminología y definiciones de los criterios Sepsis-1 y 2 (1991 y 2001) frente a Sepsis-3 (2016)	28
Tabla 7. Estudios en modelos animales (<i>in vivo</i>) y humanos (<i>in vitro</i>) de sepsis que evalúan la metilación del ADN.....	68
Tabla 8. Estudios que evalúan la metilación del ADN en pacientes con sepsis	71
Tabla 9. Criterios utilizados para el diagnóstico de la infección adquirida en la comunidad	96
Tabla 10. Criterios de inclusión y exclusión	97
Tabla 11. Escala de Coma de Glasgow	101
Tabla 12. Sistema de puntuación APACHE II (<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II</i>)	102
Tabla 13. Índice de Comorbilidad de Charlson ajustado por la edad	104
Tabla 14. Escala FRAIL (<i>fatigue, resistance, aerobic capacity, illnesses and loss of weight</i>).....	105
Tabla 15. <i>Mini Nutritional Assessment Short Form</i> (MNA-SF)	106
Tabla 16. Índice de Barthel: Actividades básicas de la vida diaria (ABVD).....	107
Tabla 17. Escala de Lawton y Brody de actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD).....	108
Tabla 18. Set de primers utilizados en los experimentos de pirosecuenciación.....	123
Tabla 19. Características clínico-epidemiológicas individuales de los pacientes al ingreso en el hospital: A) Sepsis; B) Sin sepsis.....	130
Tabla 20. Comorbilidades y estado funcional de los pacientes previo al ingreso en el hospital	133
Tabla 21. Constantes vitales y escala de Glasgow al ingreso	135
Tabla 22. Escalas y criterios utilizados para el diagnóstico de sepsis y la valoración de la gravedad	136
Tabla 23. Parámetros de laboratorio al ingreso	137
Tabla 24. Antibioterapia y fluidoterapia en urgencias	140
Tabla 25. Estancia hospitalaria y mortalidad a corto plazo.....	141
Tabla 26. Nuevas infecciones y reingresos a los 30 días y 12 meses tras el ingreso...	142

Tabla 27. Cambios en las escalas de valoración funcional y de calidad de vida a los 12 meses.....	143
Tabla 28. Resultados brutos del estudio de metilación donde se muestran el número de CpGs detectados del total del <i>array Infinium methylation EPIC850K v2.0</i> para cada una de las muestras.....	145
Tabla 29. <i>Top</i> 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis.....	149
Tabla 30. <i>Top</i> 30 DMRs diferencialmente metiladas significativas (p-valor <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis	153
Tabla 31. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis.....	154
Tabla 32. Reclasificación de las muestras de los pacientes con sepsis (Criterios Sepsis-3) en función de los criterios SIRS (Criterios Sepsis-2).....	158
Tabla 33. Reclasificación de las muestras de los controles con infección sin sepsis (Criterios Sepsis-3) en función de los criterios SIRS (Criterios Sepsis-2).....	158
Tabla 34. Número de posiciones diferencialmente metiladas (DMPs) estadísticamente significativas (FDR <0,05) en las comparaciones realizadas.	159
Tabla 35. <i>Top</i> 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS	161
Tabla 36. <i>Top</i> 30 DMRs significativas (p-valor <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS	166
Tabla 37. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS.	167
Tabla 38. <i>Top</i> 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS	171
Tabla 39. DMRs diferencialmente metiladas significativas (p-valor <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.....	174
Tabla 40. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR <0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS	175

Tabla 41. Genes identificados con mayor metilación diferencial significativa en las principales comparaciones y con implicación en sistemas de control de la respuesta inmunitaria	180
Tabla 42. Distribución de pacientes en las cohortes de descubrimiento y de validación para su análisis de metilación mediante pirosecuenciación.....	182
Tabla 43. Diferencias del grado de metilación en el análisis mediante pirosecuenciación	182
Tabla 44. Factores clínicos asociados al pronóstico a corto plazo: Características basales, escalas clínicas y datos de laboratorio	186
Tabla 45. Factores clínicos asociados al pronóstico a 12 meses: Características basales, escalas clínicas y datos de laboratorio.....	188
Tabla 46. Análisis de la hipometilación de los genes seleccionados y su relación con el pronóstico a corto plazo y largo plazo	189
Tabla 47. Área bajo la curva, sensibilidad y especificidad de las escalas clínicas y la metilación de los genes estudiados para la discriminación del mal pronóstico a corto plazo.....	190
Tabla 48. Área bajo la curva, sensibilidad y especificidad de las escalas clínicas y la metilación de los genes estudiados para el diagnóstico de la sepsis.	192
Tabla S1. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis	260
Tabla S2. DMRs significativas (p-valor <0,05) entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis.....	260
Tabla S3. Términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis	260
Tabla S4. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes sin sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.....	260
Tabla S5. DMRs significativas (p-valor <0,05) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS.....	260
Tabla S6. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS	260
Tabla S7. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.....	260
Tabla S8. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS	260

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre infección, SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), sepsis y shock séptico	19
Figura 2. Algoritmo de aplicación de los criterios clínicos de sepsis y shock séptico basados en los criterios Sepsis-3	26
Figura 3. Distribución global de los casos de sepsis: A) Incidencia mundial de sepsis; B) Muertes debidas a sepsis.....	30
Figura 4. Respuesta inmunitaria ante la infección.	36
Figura 5. Respuesta inmunitaria desregulada.....	41
Figura 6. Mecanismos implicados en el daño celular y la disfunción orgánica.....	45
Figura 7. Lesiones de órganos y sistemas en la sepsis.	49
Figura 8. Esquema simplificado de SIRS (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), CARS (<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>) y PICS (<i>Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome</i>).....	53
Figura 9. Modificaciones epigenéticas durante la infección	56
Figura 10. Metilación del ADN en islas CpG de la región promotora de un gen.....	58
Figura 11. Modificaciones post-traduccionales de las histonas.....	60
Figura 12. Regulación epigenética del sistema inmunitario	65
Figura 13. Pronóstico en la sepsis	76
Figura 14. Diagrama de flujo.....	99
Figura 15. EuroQol-5D: Sistema de evaluación de calidad de vida (EQ-5D-3L)	109
Figura 16. EuroQol-5D: Escala visual analógica de calidad de vida (EQ-EVA)	110
Figura 17. Protocolo de trabajo manual del ensayo de metilación Infinium HD.....	118
Figura 18. Arrays de metilación <i>Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip</i> y cámara de hibridación.....	119
Figura 19. Distribución etaria y por sexos de los pacientes	129
Figura 20. Comorbilidades en el conjunto de la muestra	132
Figura 21. Síntomas de los pacientes al ingreso	134
Figura 22. Tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la primera consulta médica en el hospital	135
Figura 23. Microorganismos aislados en infecciones de foco urinario	138
Figura 24. Antibióticos empíricos utilizados	139
Figura 25. Gráficos de la densidad de beta valor de cada muestra antes y después de normalizar y después de filtrar las sondas.....	146
Figura 26. Gráficas MDS antes y después de filtrar las sondas	147
Figura 27. <i>Heatmap</i> con las DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis	150

Figura 28. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones (DMPs) entre los pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis	151
Figura 30. A) Términos GO – Biological process y B) Términos GO – Cellular component significativos obtenidos en el análisis ORA a partir de las DMPs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis	156
Figura 31. <i>Heatmap</i> con las 9736 DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre los pacientes con sepsis grave/shock séptico y sin criterios de SIRS	163
Figura 32. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones entre los pacientes con sepsis grave/shock séptico y sin criterios de SIRS.....	164
Figura 33. A) Términos GO – <i>Biological process</i> , B) Términos GO – <i>Cellular component</i> y C) rutas KEGG significativas obtenidas en el análisis ORA en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a pacientes sin criterios de SIRS ..	169
Figura 34. <i>Heatmap</i> con las 155 DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.....	172
Figura 35. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS	173
Figura 36. A) Términos GO – <i>Biological process</i> y B) términos GO - <i>Molecular function</i> significativos obtenidos en el análisis ORA en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.....	177
Figura 37. Grado de metilación en porcentaje (%) de las posiciones CpG analizadas de los genes <i>SERPINA1</i> , <i>AZU1</i> , <i>MPO</i> y <i>SLX4</i> , en pacientes con sepsis frente a pacientes sin sepsis.	183
Figura 38. Mapa de calor de representando los coeficientes de correlación de Spearman (-1 a +1) significativos ($p < 0,001$) entre los genes identificados y las principales variables clínicas. El color rojo representa una correlación negativa y el color azul una correlación positiva entre los parámetros.....	184
Figura 39. Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para la discriminación del mal pronóstico a corto plazo: a) grado de metilación de los genes <i>SERPINA1</i> , <i>AZU1</i> , <i>MPO</i> y <i>SLX4</i> ; b) escalas clínicas de gravedad (SOFA, qSOFA, APACHE-II) y PCT	191
Figura 40. Curvas ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para el diagnóstico de la sepsis: a) grado de metilación de los genes <i>SERPINA1</i> , <i>AZU1</i> , <i>MPO</i> y <i>SLX4</i> ; b) Niveles séricos de PCR y PCT	193

ABREVIATURAS

AAT	Alfa-1-antitripsina
ABVD	Actividades básica de la vida diaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIVD	Actividades instrumentales de la vida diaria
ARN	Ácido ribonucleico
ARNnc	ARN no codificante
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
AZU1	Gen de la azurocidina 1
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CEIm	Comité Ético de Investigación con medicamentos
circARN	ARN circular
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DM	Diabetes mellitus
DMPs	<i>Differential methylated positions</i>
DMRs	<i>Differential methylated regions</i>
DNMT	DNA-metiltransferasa
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERC	Enfermedad renal crónica
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FRAIL	<i>fatigue, resistance, aerobic capacity, illnesses and loss of weight</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
HMGB-1	<i>High Mobility Group Box-1</i>
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
IBSP-CV	Investigación Biomédica y Salud Pública de la Comunidad Valenciana
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>

IL	Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
ITU	Infección del tracto urinario
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LODS	<i>Logistic Organ Dysfunction Score</i>
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MDRB	<i>Multidrug-resistant bacteria</i>
miARN	microARN
MNA	<i>Mini Nutritional Assessment</i>
MPO	Mieloperoxidasa. Gen de la mieloperoxidasa
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthetase</i>
ORA	<i>over-representation analysis</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PG	Peptidoglicano
PICS	<i>Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome</i>
PIRO	<i>Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction</i>
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PTMs	<i>Posttranslational modifications</i>
qSOFA	<i>Quick-SOFA (Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment)</i>
RIQ	Rango inter-cuartil
RLR	<i>Retinoic-acid-inducible gene (RIG)-like receptor</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SAM	S-adenosilmetionina

SERPINA1	<i>Serpin family A member 1 (Gen)</i>
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SDRA	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
SLX4	<i>Structure-specific endonuclease subunit (Gen)</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOFA	<i>Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment</i>
TET	<i>Ten-Eleven Translocation proteins</i>
TNF α	<i>Tumoral necrosis factor alfa</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis- Inducing Ligand</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UMCE	Unidad Médica de Corta Estancia
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VSG	Velocidad de sedimentación globular
WGA	<i>Whole Genome Amplification</i>

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y criterios de sepsis

La sepsis es un síndrome clínico secundario a una infección en el que se producen alteraciones fisiopatológicas y bioquímicas debidas a una respuesta inmunológica desregulada del hospedador que puede llevar a un fallo de órganos e incluso a la muerte (1). Hoy en día sigue sin haber un único criterio o exploración que permita identificarla inequívocamente y de forma prematura. Por este motivo se han establecido a lo largo de los años definiciones y criterios clínicos con la finalidad de facilitar su identificación, estudio y tratamiento.

1.1.1. Contexto histórico: Antecedentes y evolución del concepto de sepsis y sus criterios definitorios

El concepto de sepsis como una respuesta del hospedador ante un microorganismo patógeno se desarrolló durante el siglo XX, y ha ido cambiando en las últimas décadas. La Conferencia de Consenso de 1991 promovida por la *American College of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), definió la sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) causado por una infección. El SIRS se definió a su vez como una respuesta generalizada del organismo ante determinados estímulos que puede obedecer a causas infecciosas o no infecciosas; y se establecieron una serie de criterios clínicos, debiendo cumplir al menos dos de ellos para establecer el diagnóstico (ver tabla 1).

Otro aspecto importante fue el concepto de sepsis como un espectro continuo de gravedad en función de la disfunción de órganos, considerando distintos estadios de la sepsis (sepsis, sepsis grave y shock séptico), cada uno de ellos con morbilidad y mortalidad crecientes.

Tabla 1. Criterios de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), sepsis, sepsis grave y shock séptico. Conferencia de Consenso ACCP/SCCM de 1991

Término	Criterios	
SIRS	≥2 de los siguientes criterios:	1) Temperatura >38°C o <36°C
		2) Frecuencia cardíaca >90 lpm
		3) Hiperventilación: frecuencia respiratoria >20 rpm o CO ₂ arterial <32 mmHg.
		4) Recuento de leucocitos >12.000 o <4.000 células/μL
Sepsis	SIRS debido a una infección confirmada o sospechada	
Sepsis grave	Sepsis asociada a disfunción orgánica	
Shock séptico	Sepsis con hipotensión a pesar de adecuada resucitación con fluidos	

SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Fuente: Adaptado de Bone RC et al: *Chest*. 1992 (2).

Este esquema conceptual, a pesar de sus críticas y debilidades, fue ampliamente aceptado y utilizado en numerosos estudios permitiendo conocer mejor la historia natural de la sepsis (2). En la figura 1 se representa la relación entre infección, SIRS, sepsis y shock séptico.

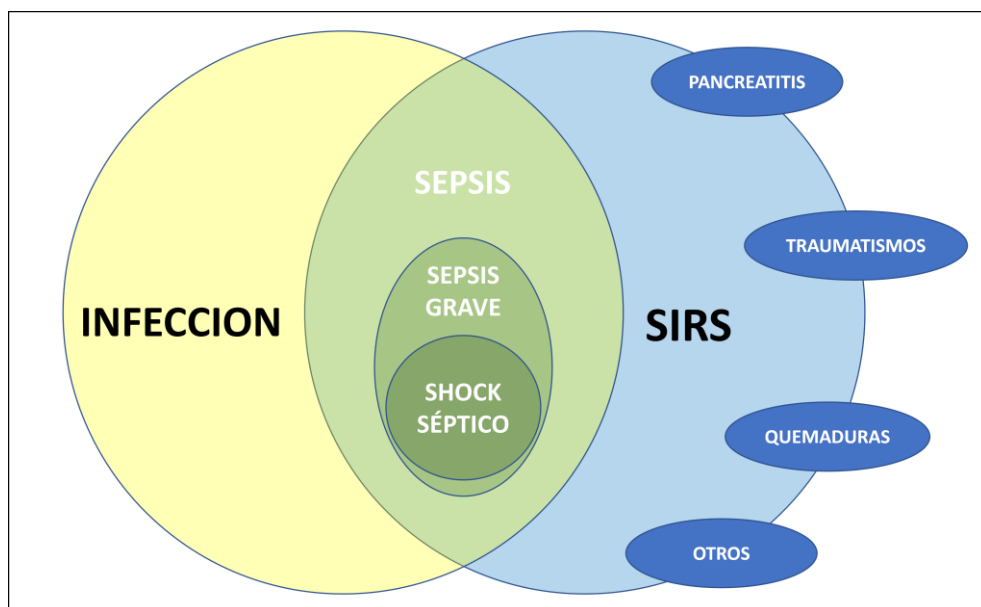


Figura 1. Relación entre infección, SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), sepsis y shock séptico

Fuente: Adaptado de Bone RC et al: Chest. 1992 (2).

En 2001 se llevó a cabo una nueva Conferencia de Consenso por parte de la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), *American College of Chest Physicians* (ACCP), *American Thoracic Society* (ATS), y la *Surgical Infection Society* (SIS). En ella se acordó mantener los criterios previos a pesar de su escasa especificidad y se presentaron los llamados “criterios diagnósticos de sepsis”, conocidos como Criterios Sepsis-2 (ver tabla 2), que resultaron ser una lista ampliada de signos y síntomas de sepsis basados en la experiencia clínica con la finalidad de caracterizar mejor la respuesta clínica a la infección (3).

Tabla 2. Criterios de diagnóstico de sepsis de la Conferencia de Consenso SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS de 2001 (Sepsis-2)

Infección confirmada o sospechada y alguno de los siguientes:	
Parámetros generales	Fiebre (temperatura corporal > 38,3 °C) Hipotermia (temperatura corporal <36 °C) Frecuencia cardíaca >90 lpm Taquipnea (>30 rpm) Estado mental alterado Edema significativo o balance de fluidos positivo (>20 mL/kg en 24h) Hiperglucemia (>110 mg/dL) en ausencia de diabetes
Parámetros inflamatorios	Leucocitosis (> 12.000 células/μL) Leucopenia (< 4.000 células/μL) Recuento leucocitario con >10% de formas inmaduras PCR >2 DE por encima del valor normal PCT >2 DE por encima del valor normal
Parámetros hemo-dinámicos	Hipotensión arterial (TAS < 90 mmHg, TAM <70 mmHg o descenso de TAS > 40 mmHg) SvO ₂ >70% Índice cardíaco >3,5 L/min/m ²
Parámetros de disfunción orgánica (sepsis grave)	Hipoxemia arterial (PaO ₂ /FIO ₂ <300) Oliguria aguda (diuresis <0,5 ml/kg/h) Aumento de creatinina ≥0,5 mg/dl Coagulación alterada (INR >1,5 o TPPa >60 seg) Íleo (ausencia de ruidos intestinales) Trombocitopenia (<100.000 plaquetas/μL) Hiperbilirrubinemia (Bilirrubina total >4 mg/dl)
Parámetros de perfusión tisular	Hiperlactacidemia (Lactato >3) Tiempo de llenado capilar disminuido

DE: desviaciones estándar, FiO₂: fracción inspirada de O₂, INR: *International Normalized Ratio*, PaO₂: Presión arterial de oxígeno, PCR: Proteína C reactiva, PCT: procalcitonina, SvO₂: saturación de oxígeno en sangre venosa mezclada, TAS: Tensión Arterial Sistólica, TAM: Tensión Arterial Media, TPPa: Tiempo de tromboplastina activado.

Fuente: Adaptado de Levy MM et al: *Intensive Care Med.* 2003 (3)

Además, se desarrolló el llamado sistema PIRO (*Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction*), que los propios autores reconocieron como un modelo hipotético de estadificación de la sepsis para favorecer la investigación futura (ver tabla 3). En este sistema el factor "Predisposición" (P) fue añadido al modelo IRO, basado en el sistema TNM utilizado en oncología, para incluir aspectos como la genética, el entorno, los aspectos culturales o las enfermedades preexistentes que pueden predisponer a un mejor o peor pronóstico. El dominio "Infección" (I) incluye aspectos con un impacto significativo en el pronóstico como el foco de la infección, su extensión, el origen (por ejemplo, adquirida en el hospital o en la comunidad) y el tipo de microorganismo causante. La "Respuesta" (R) inmunológica del hospedador es difícil de caracterizar, habiéndose definido para ello criterios clínicos como los del SIRS. Además, se plantea que el uso de biomarcadores específicos puede ayudar a determinar el mecanismo inmunitario implicado en la respuesta y su grado de afectación. El nivel de "disfunción Orgánica" (O) es equiparado en este sistema a la presencia de metástasis en el cáncer. Aunque inicialmente la disfunción orgánica se valoró de forma dicotómica, en la actualidad se utilizan escalas de puntuación que contemplan la afectación de diferentes sistemas orgánicos que reflejan la gravedad del proceso (4).

En 2002 la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) presentó en su congreso anual la llamada *Surviving Sepsis Campaign* que en la Declaración de Barcelona estableció el objetivo de disminuir la mortalidad de la sepsis grave un 25% en los siguientes cinco años (5). Esta campaña desarrolló unas

pautas de actuación clínica para su aplicación en la sepsis grave y el shock séptico, y logró la implantación de medidas terapéuticas efectivas. Posteriormente, estas recomendaciones han continuado actualizándose en forma de guías de práctica clínica (6–10).

Tabla 3. Sistema PIRO (*Predisposition, Infection, Response, Organ dysfunction*), propuesto en la Conferencia de Consenso SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS de 2001

Predisposición	– Enfermedades preexistentes que reducen la probabilidad de supervivencia a corto plazo – Aspectos culturales y económicos – Edad, sexo – Factores genéticos y del entorno
Infección	– Factores de virulencia y sensibilidad a antimicrobianos de los patógenos causantes – Foco de infección, extensión y posibilidad de control
Respuesta	– SIRS y otros signos de sepsis, shock – Biomarcadores: PCR, PCT, interleucinas y otros potenciales marcadores de respuesta inmunitaria deteriorada
Disfunción orgánica	– Número de órganos afectados o escalas compuestas de gravedad: SOFA (<i>Sequential Organ Failure Assesment</i>), MODS (<i>Multiple Organ Dysfunction Score</i>), LODS (<i>Logistic Organ Dysfunction Score</i>), PELOD (<i>Pediatric Logistic Organ Dysfunction</i>), PEMOD (<i>Pediatric Multiple Organ Dysfunction</i>) – Mediciones dinámicas de la respuesta celular (apoptosis, estrés celular, hipoxia citopática...)

PCR: Proteína C reactiva, PCT: procalcitonina.

Fuente: Adaptado de Levy MM et al: *Intensive Care Med.* 2003 (3)

1.1.2. Contexto actual: Criterios Sepsis-3

Las últimas definiciones de sepsis y shock séptico se publicaron en 2016 y permanecen en uso en la actualidad. Estas definiciones se desarrollaron en *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)* y propusieron nuevos criterios clínicos para facilitar su diagnóstico.

Según la definición actual, la sepsis es un trastorno provocado por la desregulación de la respuesta del hospedador a la infección, que resulta en un daño de órganos potencialmente mortal (1). La disfunción orgánica se propone que sea identificada por un aumento agudo de 2 puntos o más en la puntuación de la escala SOFA (*Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*), que se asocia con una mortalidad hospitalaria superior al 10%.

Estos criterios fueron recomendados tras analizar y comparar la capacidad para predecir la mortalidad hospitalaria de la escala SOFA respecto a los criterios SIRS y a la escala LODS (*Logistic Organ Dysfunction Score*). En los pacientes con infección que se encontraban en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) la escala SOFA demostró ser superior a los criterios SIRS y no mostró diferencias respecto a la escala LODS, más compleja. Además, se propuso también una nueva escala abreviada denominada *quick*-SOFA (qSOFA), cuyo valor como predictor de mortalidad en los pacientes hospitalizados con infección fuera de la UCI demostró ser superior a SIRS y SOFA (11). Esto respalda la utilización de la escala SOFA en los criterios clínicos para la

sepsis, mientras que la escala qSOFA se considera útil para identificar a los pacientes con sepsis con mayor riesgo de mala evolución de sepsis si tienen al menos 2 de los 3 criterios clínicos, especialmente en entornos fuera de la UCI como los servicios de urgencias o la sala de hospitalización convencional.

El shock séptico es un subconjunto dentro de la sepsis que incluye trastornos circulatorios y metabólicos asociados con un mayor riesgo de mortalidad. Los pacientes adultos con shock séptico pueden identificarse utilizando los criterios clínicos de hipotensión persistente que requiere terapia con fármacos vasopresores para mantener una tensión arterial media de 65 mmHg o más y tener un nivel de lactato sérico mayor de 2 mmol/L a pesar de una reanimación con fluidoterapia adecuada, ya que esta combinación se asocia con una mortalidad hospitalaria superior al 40% (12).

Las puntuaciones de las escalas SOFA y qSOFA se muestran en las tablas 4 y 5. Además, en el documento de Consenso de los criterios Sepsis-3 se propuso un algoritmo de aplicación de los criterios clínicos para hacer estos más operativos (ver figura 2).

Tabla 4. Escala SOFA (Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment)

Sistema	Puntos				
	0	1	2	3	4
Respiratorio					
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	≥400	<400	<300	<200 con soporte respiratorio	<100 con soporte respiratorio
Coagulación					
Plaquetas (x10 ³ /μL)	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático					
Bilirrubina (mg/dl)	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	≥12
Cardiovascular					
TAM (mmHg)	≥70	<70	-	-	-
Vasopresores, μg/Kg/min (al menos 1h)	-	-	Dopamina <5 Dobutamina (cualquier dosis)	Dopamina 5.1-15 Adrenalina ≤0.1 Noradrenalina ≤0.1	Dopamina >15 Adrenalina >0.1 Noradrenalina >0.1
Neurológico					
Escala de coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina (mg/dL)	<1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9	>5
Diuresis (mL/día)	-	-	-	<500	<200

FiO₂: fracción inspirada de oxígeno, PaO₂: presión parcial de oxígeno, TAM: tensión arterial media.

Fuente: Adaptado de Singer M et al: JAMA. 2016 (1)

Tabla 5. Criterios qSOFA (Quick-SOFA)

Frecuencia respiratoria ≥22 rpm	Si = 1 punto, No = 0 puntos
Estado mental alterado	Si = 1 punto, No = 0 puntos
Tensión arterial sistólica ≤100 mmHg	Si = 1 punto, No = 0 puntos

Fuente: Adaptado de Singer M et al: JAMA. 2016 (1)

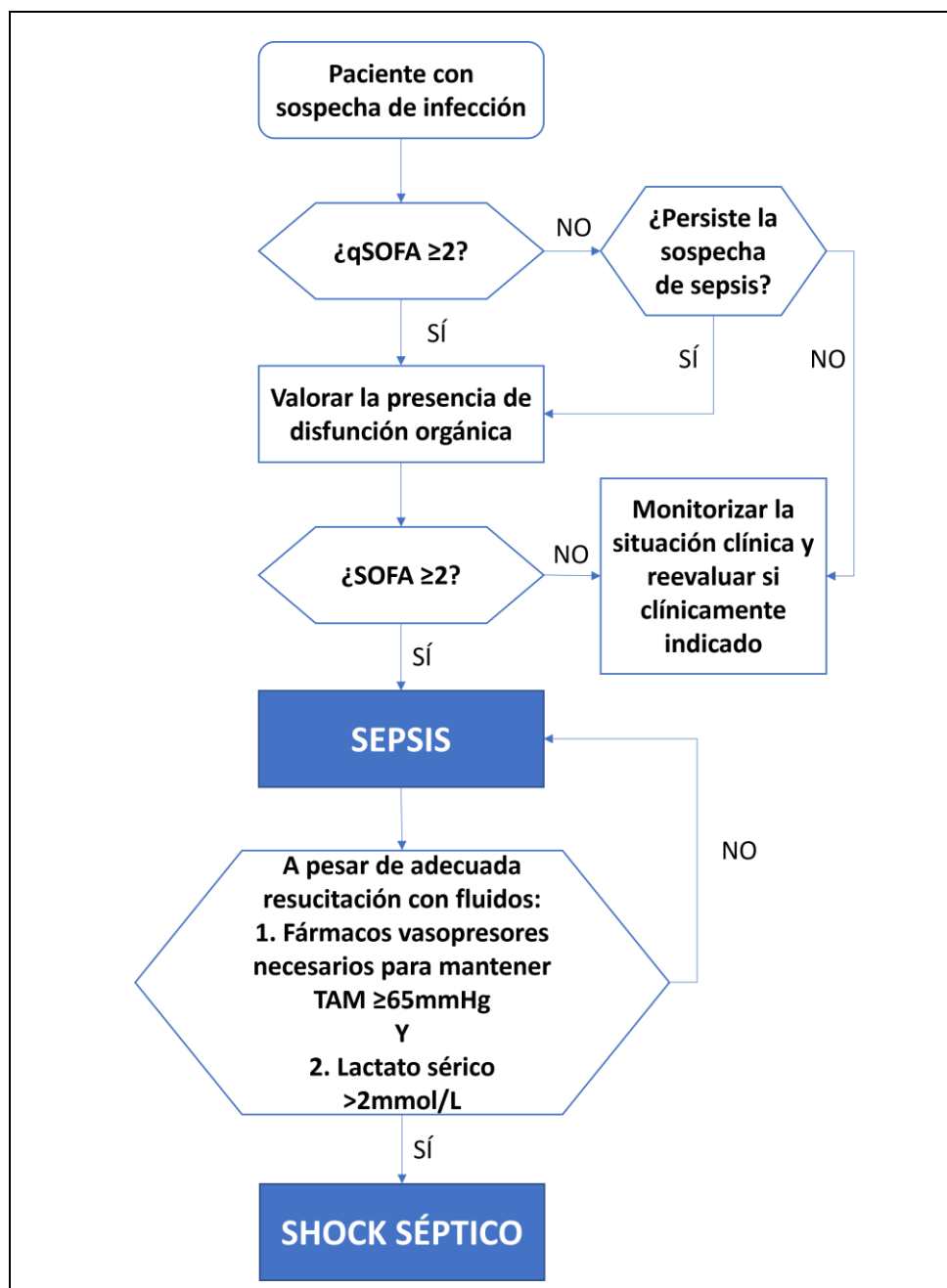


Figura 2. Algoritmo de aplicación de los criterios clínicos de sepsis y shock séptico basados en los criterios Sepsis-3

Fuente: Adaptado de Singer M et al: JAMA. 2016 (1)

De forma concisa, podemos decir que las definiciones actuales de sepsis y shock séptico no se limitan a un exceso de inflamación como ocurría previamente, si no que describen un desequilibrio entre una respuesta pro-inflamatoria, que suele predominar en una fase inicial, y un estado anti-inflamatorio posterior en el que la inmunidad está deteriorada. Estos aspectos, que se desarrollaran más adelante junto a otros mecanismos fisiopatológicos, reflejan de forma más precisa los conocimientos adquiridos en las últimas décadas sobre la patogénesis de la sepsis. Además, sus criterios tratan de ser fácilmente aplicables y basados en datos sólidos respecto al pronóstico vital del cuadro clínico. Esto ha conllevado el abandono del concepto de SIRS en la práctica clínica habitual y en los estudios realizados a partir de entonces.

En la tabla 6 se presenta una comparación de las definiciones y criterios actuales y previos de la sepsis y el shock séptico.

Tabla 6. Comparación de la terminología y definiciones de los criterios Sepsis-1 y 2 (1991 y 2001) frente a Sepsis-3 (2016)

Criterios		SEPSIS	SHOCK SÉPTICO
Sepsis-1 (1991) y Sepsis-2 (2001)	Definición	-Sepsis: SIRS debido a una infección confirmada o sospechada -Sepsis grave: sepsis asociada a disfunción orgánica	Sepsis con hipotensión a pesar de adecuada resucitación con fluidos
	Criterios	Ver tablas 1 y 2	
Sepsis-3 (2016)	Definición	Disfunción orgánica que pone en riesgo la vida debido a una respuesta desregulada del hospedador a una infección	Subgrupo de sepsis en el que las alteraciones circulatorias, celulares y metabólicas subyacentes son suficientemente graves para aumentar la mortalidad significativamente
	Criterios	Infección sospechada o documentada Y aumento agudo de ≥ 2 puntos en la escala SOFA	Sepsis y necesidad de fármacos vasopresores para aumentar la TAM a 65mmHg o más, Y niveles de lactato $>2\text{mmol/L}$ a pesar de adecuada resucitación con fluidos.

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SOFA: *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment*; TAM: Tensión arterial media

Fuente: Adaptado de Singer M et al: JAMA. 2016 (1)

1.2. Epidemiología, mortalidad y coste económico de la sepsis

La sepsis es un importante problema de salud y una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. La disparidad de criterios y de sistemas de notificación entre países ha dificultado conocer con precisión los datos de incidencia o mortalidad global.

Algunas estimaciones reflejan que en la década de 2005 a 2015, la incidencia global acumulada de sepsis fue de 437 casos de sepsis por 100.000 personas-año, lo que equivale a 31,5 millones de casos de sepsis en todo el mundo cada año, con una mortalidad anual de 5,3 millones (13). Estos datos se basaron en la revisión de bases de datos hospitalarias de países con altos ingresos.

En los últimos años el análisis de los datos del proyecto *Global Burden of Disease* mostró que en el año 2017 hubo 48,9 millones de casos de sepsis y 11,0 millones de muertes en todo el mundo, representando el 19,7% de todas las muertes a nivel global. Estos resultados son muy superiores a los estimados previamente, lo que se atribuye a la mayor carga de enfermedad entre las personas que viven en áreas con un índice sociodemográfico más bajo, para las cuales anteriormente no se disponía de datos (14). En la figura 3 se muestran mapas mundiales con las tasas de incidencia y mortalidad de sepsis de acuerdo con dicho estudio.

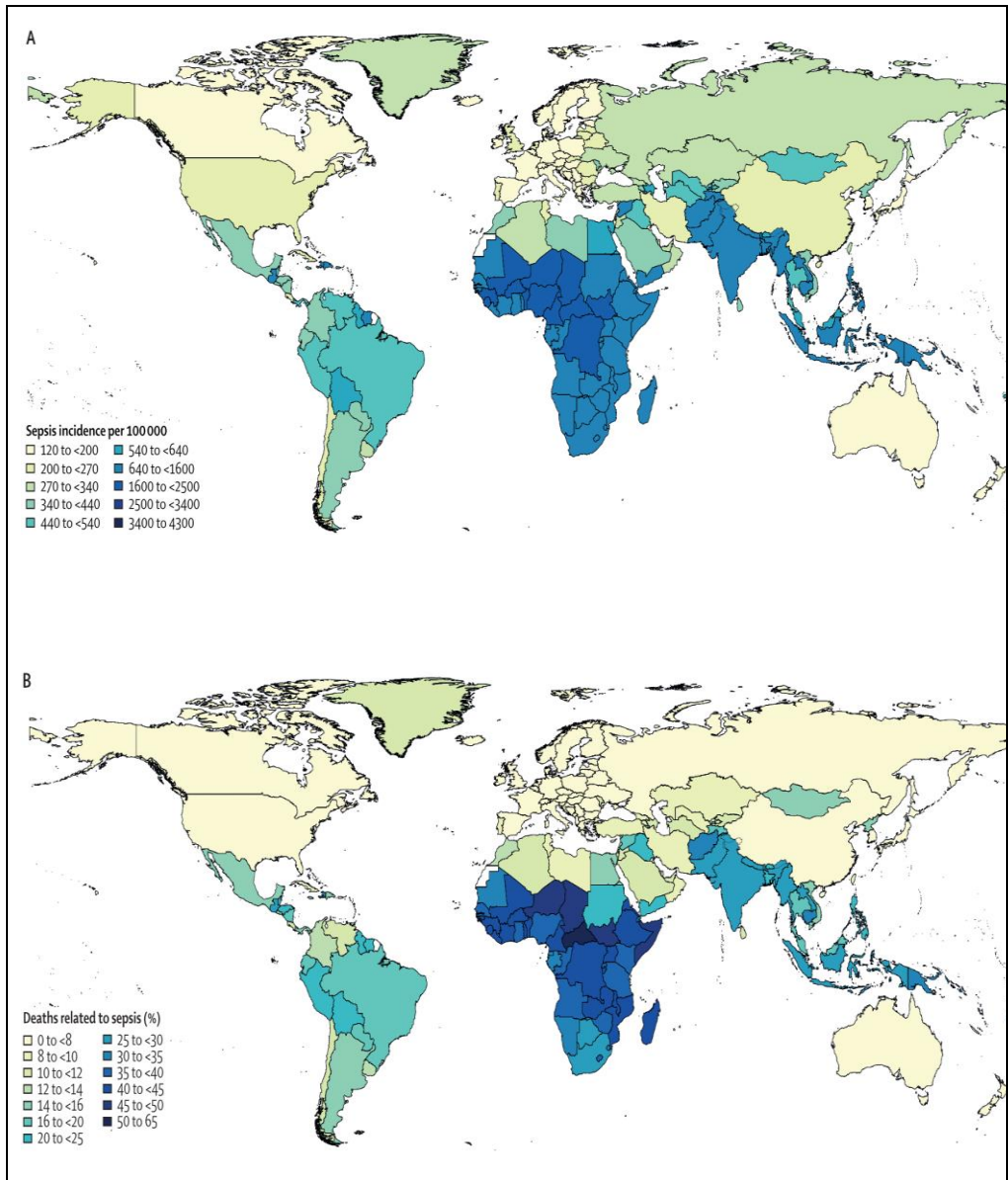


Figura 3. Distribución global de los casos de sepsis: A) Incidencia mundial de sepsis; B) Muertes debidas a sepsis.

Fuente: Tomado de Rudd KE et al: Lancet. 2020 (14)

Además, la sepsis supone una significativa carga económica para los pacientes y la sociedad. Comparando los gastos de distintos países, el gasto medio por caso de sepsis varía desde 27.468€ por paciente en Alemania (lo que equivale a 7.700 millones de euros al año), hasta 11.390\$ por paciente en China o 55.749\$ en Estados Unidos (15), siendo uno de los procesos patológicos más costosos para los sistemas sanitarios. En este sentido, el informe estadístico sobre los costes de estancia hospitalaria de los pacientes hospitalizados en Estados Unidos muestra que en 2017 la sepsis fue la patología más cara de todas las atendidas y representó el 5,8% de las estancias hospitalarias. El coste total fue de 38.238 millones de dólares, lo que supone el 8,8% del gasto sanitario hospitalario (16).

Estos datos socioeconómicos posicionan la sepsis como uno de los problemas de salud prioritarios para las organizaciones sanitarias de todo el mundo. En este sentido, en 2017, la Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (OMS) hicieron de la sepsis una prioridad de salud mundial, al adoptar una resolución con el objetivo de mejorar las medidas para prevenir, diagnosticar y tratar la sepsis (17).

1.3. Fisiopatología de la sepsis

El sistema inmunitario es el elemento clave en la respuesta del hospedador ante una infección. Si la respuesta se produce de forma adecuada, la infección tiende a evolucionar hacia el control de la invasión del microorganismo y la reparación de los tejidos lesionados (18). La sepsis ocurre cuando se produce una respuesta inmunitaria desregulada, en la que hay una liberación excesiva de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios que excede los límites del foco de la infección, llevando a una respuesta generalizada que puede producir lesiones orgánicas.

1.3.1. El sistema inmunitario ante la infección

Durante la infección, la invasión de los tejidos por los microorganismos lleva en primera instancia a la activación de las células de la inmunidad innata. Entre ellas destacan los monocitos y los macrófagos, que son capaces de reconocer distintos componentes del patógeno que forman patrones moleculares asociados a microorganismos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). También son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño tisular (*damage-associated molecular patterns*, DAMP), formados por material liberado de la muerte o daño celular del hospedador y conocidos también como alarminas. Para ello las células inmunitarias, así como otras células como las células endoteliales, disponen de los llamados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), entre los que destacan los receptores de membrana tipo *toll* (*toll-like receptor*,

TLR) o los receptores citoplasmáticos conocidos como *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLR) (19). Otros RRP son los receptores tipo RIG (*retinoic-acid-inducible gene-like receptor*, RLR), presentes en casi todos los tipos celulares y fundamentales para la respuesta a la infección vírica.

La activación de TLR (descritos más de 10 tipos) inicia una cascada de señalización intracelular que conducen a la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), que se traslada al núcleo celular e induce la activación de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (20,21). Se produce así la síntesis y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa (*tumoral necrosis factor alfa*, TNF α), la interleucina-1 (IL-1) y la interleucina-6 (IL-6). También se induce la producción de óxido nítrico a través de la NOS (*nitric oxide synthetase*), y quimiocinas que estimulan la migración de los leucocitos hacia el sitio de infección. Para ello aumentan la expresión de selectinas e integrinas como la ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) y la VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Las células del endotelio vascular también expresan TLR cuya activación, a través de la vía de señalización del NF- κ B, aumenta también estas quimiocinas para facilitar la adhesión de los leucocitos en los territorios próximos al sitio de infección (22).

Entre los principales efectos de las citoquinas pro-inflamatorias destacan (21,23):

- Reclutamiento de más macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN). Estos últimos se activan y se adhieren al endotelio vascular para migrar al sitio de la

infección, liberando mediadores que provocan un aumento de la permeabilidad vascular que conlleva la aparición de los signos clásicos de inflamación local (enrojecimiento, calor y edema). Además, son capaces de destruir a los microorganismos mediante fagocitosis, secreción de péptidos con actividad antimicrobiana (mieloperoxidasa, lisozima, lactoferrina...) y liberación de redes formadas por cromatina y proteínas granulares llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NET). Este último mecanismo se conoce como NETosis.

- Síntesis y liberación de otras citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, factor activador de plaquetas, interferón...) con distintos efectos como la quimiotaxis de neutrófilos y la proliferación linfocitaria.
- Producción de proteínas de fase aguda a nivel hepático (complemento, fibrinógeno, proteína C reactiva...)
- Aumento de la temperatura, que inhibe el crecimiento microbiano y estimula la actividad de fagocitos y linfocitos T.

Otro mecanismo de señalización intracelular es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), producidos por el complejo NADPH-oxidasas (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), y utilizadas como segundos mensajeros por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas.

Las ERO son importantes como mecanismo de defensa, por ejemplo para destruir microorganismos fagocitados (24).

El grado de activación de la respuesta inmunitaria está regulada de forma activa mediante circuitos de retroalimentación positiva y negativa. Las citoquinas anti-inflamatorias (aquellas que inhiben la producción de TNF α e IL-1) tales como la IL-10 son fundamentales en este sentido ya que son liberadas por los macrófagos y linfocitos T en respuesta a otras citoquinas para suprimir al sistema inmunitario y evitar una respuesta excesiva. También se produce una regulación negativa de los TLRs y la muerte celular programada inducida por TLRs (24). Si se mantiene el equilibrio hasta la resolución del proceso infeccioso, la respuesta será proporcionada y se logrará la reparación del tejido junto a la recuperación de la homeostasis.

En la figura 4 se representan los mecanismos de la respuesta inmunitaria que permiten el control de la infección.

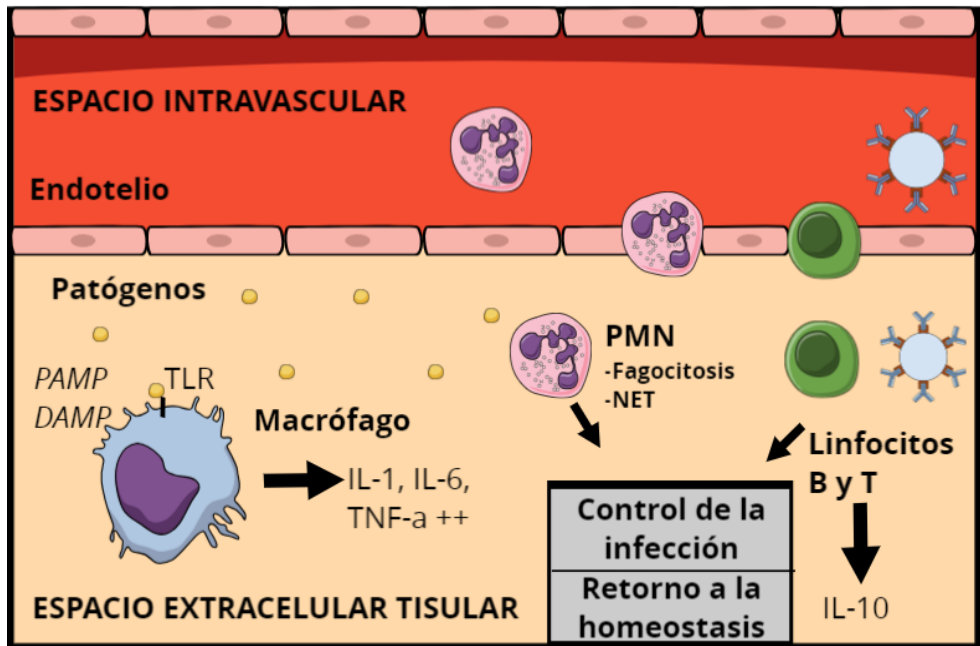


Figura 4. Respuesta inmunitaria ante la infección.

La invasión de patógenos induce una respuesta inflamatoria local. Las células inmunitarias migran a los tejidos para inhibir la replicación y diseminación microbiana, controlando la infección.

DAMP: patrón molecular asociado a daño tisular; IL: interleucina; PAMP: patrón molecular asociado a patógenos; PMN: leucocitos polimorfonucleares; TLR: *Toll-like receptor*; TNFα: factor de crecimiento tumoral alfa.

Fuente: Elaboración propia con la herramienta de diseño científico "Mind the GRAPH" (<https://mindthegraph.com/>)

1.3.2.Desregulación inmunitaria: desencadenantes y mecanismos implicados

La patogénesis de la disfunción inmunitaria de la sepsis sigue sin conocerse completamente. La evidencia actual sugiere que, en determinadas circunstancias, puede producirse una activación inmunitaria excesiva con una pérdida del equilibrio y de la capacidad de auto-regulación de la respuesta, la cual se generaliza y produce manifestaciones sistémicas a distancia del foco de infección. Son varias las causas que pueden actuar como desencadenante, y a menudo se combinan siendo un proceso multifactorial. Determinados factores de los microorganismos junto a condiciones de susceptibilidad del hospedador favorecen que se produzca un exceso de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, junto a una activación excesiva de algunos mecanismos (como el sistema del complemento, la liberación de NET o la cascada de la coagulación) que llegan a producir daño en el organismo. Este fenómeno de desregulación inmunitaria es el que define actualmente a la sepsis (25).

Algunas características propias del hospedador se relacionan con una respuesta inmunitaria desregulada. Varios polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) se han asociado a mayor predisposición a las infecciones y a un peor pronóstico. Destacan SNP de genes que codifican citoquinas, RRP y otros receptores de superficie celular o algunas enzimas (como las caspasas) (26,27). Factores adquiridos como las comorbilidades o el envejecimiento también juegan un papel muy relevante y se detallan más adelante.

Entre los factores de los microorganismos que pueden contribuir a la progresión de una infección local hasta llegar a la sepsis destacan:

- Una carga microbiana elevada que pueda intensificar la respuesta inmunitaria con un marcado incremento de citoquinas pro-inflamatorias.
- PAMPs específicos, como productos bacterianos (exotoxinas) y componentes de la pared celular bacteriana como el lipopolisacárido (LPS) o el peptidoglicano (PG). El LPS actúa como endotoxina y puede inducir daño celular con disrupción del citoesqueleto y alteración de la integridad de endotelio microvascular (en parte a través de la NOS), además de favorecer la hiperactivación de los mediadores pro-inflamatorios (28).

Los mecanismos inmunitarios implicados en la desregulación inmunitaria incluyen tanto aquellos de la inmunidad humoral (entre los que destacan las citoquinas y el sistema del complemento) como de la inmunidad celular. Los TLR, en determinadas condiciones, pueden producir una respuesta desregulada con excesiva activación de las vías de señalización pro-inflamatorias (24). En los pacientes sépticos se ha observado un gran aumento de los niveles de citoquinas en plasma, entre las que destacan el TNF α y la interleucina producida por piroptosis y activación del inflamasoma, la IL-1 β . Ambas pueden generar fiebre, hipotensión y la activación simultánea de la coagulación y

la fibrinólisis, además de aumentar la permeabilidad capilar, el reclutamiento de leucocitos y la liberación de otras citoquinas. Esto se traduce en una hiper-respuesta inflamatoria que se ha denominado “tormenta de citoquinas”, y que puede producir una lesión celular por mecanismos de isquemia tisular, daño citopático o inducción de apoptosis, y consecuentemente llevar a la disfunción orgánica y sus nocivas consecuencias (29). Los inflamasomas son complejos multiproteicos activados por los NLR citoplasmáticos en respuesta a determinados PAMPs y DAMPs, y que resultan fundamentales para el procesamiento de la pro-IL-1 β a su forma activa. Una activación intensa del inflamasoma puede activar la caspasa-1 e inducir la muerte celular programada conocida como piroptosis, liberando el contenido citosólico al medio extracelular, lo que incluye grandes cantidades de IL-1 β , IL-1 α e IL-18 (24).

En este sentido juegan un papel muy relevante algunos DAMPs como las proteínas de alta movilidad (*High Mobility Group Box-1*, HMGB-1) y las histonas extracelulares liberadas tras la NETosis, entre otros (30). Entre los mecanismos descritos destaca la alteración de las vías de muerte celular programada (31,32). Además, se ha demostrado la implicación de las histonas extracelulares en la disfunción endotelial a través de la producción de ERO (33), así como su papel en el daño de órganos que lleva a la muerte (34).

Así pues, otro mecanismo implicado en la desregulación inmunitaria es la producción excesiva de ERO o un déficit en los sistemas antioxidantes, llevando al estrés oxidativo que es un elemento clave en la cascada de procesos perjudiciales en la sepsis. El anión superóxido (O_2^-) es clave en la fisiopatología de la inestabilidad hemodinámica y la disfunción orgánica durante el shock séptico. Otras ERO pueden producir la rotura de las hebras de ADN, y la activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). La PARP activada, además de la reparación del ADN, provoca una disminución de NADPH que conduce a la disfunción celular (24).

El sistema del complemento también juega un papel fundamental en la sepsis. Su función es la opsonización y lisis de los microorganismos invasores, además de activar la respuesta inmune adaptativa. Las tres vías del complemento (clásica, alternativa y vía de la lectina) pueden estar implicadas en la sepsis, activadas por endotoxinas y bacterias (35). En la sepsis, el sistema del complemento excesivamente activo contribuye a la hipotensión mantenida y a la coagulación intravascular diseminada, pero también deteriora la respuesta inmune innata. Esto se observó en estudios en animales donde se demostró una fagocitosis deficiente de los neutrófilos, que podía ser prevenida mediante el bloqueo del componente C5a del complemento (36).

Los mecanismos implicados en la desregulación de la respuesta inmunitaria se representan de forma esquemática en la figura 5.

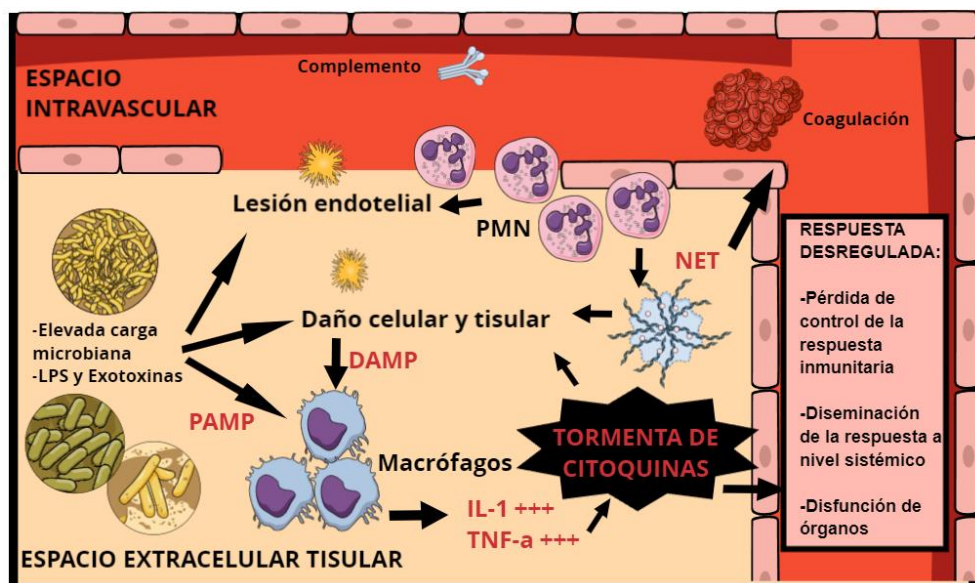


Figura 5. Respuesta inmunitaria desregulada.

Algunos patógenos producen activación inmunitaria intensa y daño local grave, aumentando la respuesta inmune. El elevado reclutamiento de PMN y macrófagos, junto a una gran liberación de citoquinas conllevan daños en los tejidos afectados. La diseminación de microorganismos o la actividad inmunitaria local descontrolada llevan a una respuesta inflamatoria sistémica. El Sistema del Complemento o la cascada de coagulación se ven activados y contribuyen al daño local y a distancia.

DAMP: patrón molecular asociado a daño tisular; IL: interleucina; PAMP: patrón molecular asociado a patógenos; PMN: leucocitos polimorfonucleares; NET: *neutrophil extracellular traps*; TNFα: factor de crecimiento tumoral alfa.

Fuente: Elaboración propia con la herramienta de diseño científico "Mind the GRAPH" (<https://mindthegraph.com/>)

1.3.3.Daño celular y disfunción orgánica

La respuesta inmunitaria excesiva puede provocar una lesión celular generalizada, precursora de la disfunción orgánica. Entre los mecanismos implicados se han propuesto la lesión del endotelio y la microcirculación, la disfunción mitocondrial, el daño citopático y la alteración de las vías de muerte celular programadas.

a) Lesión endotelial y de la microcirculación:

El endotelio vascular ha demostrado tener un papel activo en la respuesta inmunitaria, y su disfunción es clave en el desarrollo de la sepsis. Los principales causantes de su lesión son la liberación de sustancias tóxicas tras la activación de los leucocitos PMN (como ERO, enzimas líticas...), y la activación desequilibrada de los sistemas de coagulación y fibrinólisis. Con la inflamación sistémica, la liberación de IL-6 desencadena la sobreexpresión del factor tisular y el TNF α suprime los factores anticoagulantes y la fibrinólisis. Así se favorece la activación excesiva de la coagulación y la trombosis microvascular, produciendo una disminución de la oxigenación que lleva a la isquemia tisular y a la disfunción orgánica (20). En su forma más grave, puede consumir los factores de coagulación y producir trombopenia con un riesgo aumentado de trombosis y hemorragias, síndrome conocido como Coagulación Intravascular Diseminada (CID) (37). La liberación de NETs juega un papel

clave, siendo las histonas liberadas con el ADN potentes activadores plaquetarios y de la coagulación (38,39).

b) Disfunción mitocondrial y daño citopático:

Se debe a mediadores pro-inflamatorios como TNF α , endotoxinas y estrés oxidativo, que producen daño en el ADN, la membrana y la matriz mitocondriales, llevando a la alteración del metabolismo energético celular, una deficiente utilización de oxígeno y citotoxicidad (24,40). Este proceso tiene una relevancia significativa en la sepsis ya que algunos estudios han observado una relación directa entre el grado de disfunción mitocondrial y la gravedad y el pronóstico en el shock séptico (41).

c) Alteración de las vías de muerte celular programada:

La apoptosis, cuya función es eliminar células senescentes o disfuncionales, se ve retrasada en macrófagos y neutrófilos activados por las citoquinas pro-inflamatorias, pero se encuentra aumentada en linfocitos y células dendríticas (42). Esto limita la capacidad del sistema inmune para lograr la eliminación de los microorganismos invasores. La pérdida de células inmunitarias adaptativas también afecta la respuesta inmunitaria innata debido a la importante interacción entre ambos sistemas.

La piroptosis se desencadena por la activación de la caspasa-1 por los inflamasomas (complejos macro-moleculares formados por NLR ensamblados, como por ejemplo NLRP3). Es un proceso altamente inflamatorio que produce la ruptura de las membranas celulares y una liberación masiva de interleucinas,

demostrando tener un papel importante en el daño orgánico producido en la sepsis (43).

La autofagia sirve como mecanismo de defensa y señal de alarma al ser capaz de destruir sustancias citoplasmáticas, mitocondrias deficientes o patógenos mediante formación de autofagosomas (vesículas de doble membrana que capturan y transportan elementos citoplasmáticos y se fusionan con un lisosoma). La autofagia ha demostrado ser fundamental para mantener la homeostasis durante la respuesta inmunitaria, de manera que su activación podría tener un papel protector en la sepsis mientras que su inhibición puede agravar la lesión tisular (44).

Los distintos procesos que llevan al daño celular y la disfunción orgánica se muestran representados esquemáticamente en la figura 6.

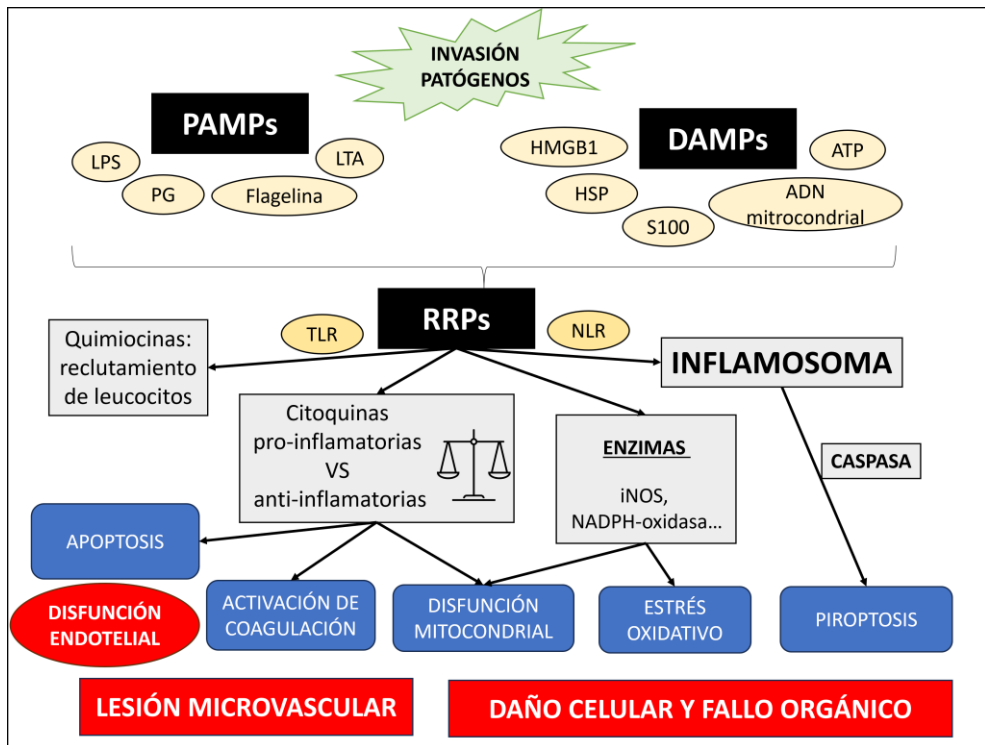


Figura 6. Mecanismos implicados en el daño celular y la disfunción orgánica.

Distintos PAMP y DAMP (algunos de los más relevantes se muestran en la figura) pueden activar una respuesta desregulada por parte de los RRP que puede conllevar un desequilibrio entre las citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, una producción excesiva de vasodilatadores y ERO, favoreciendo el estrés oxidativo y la lesión celular, y una activación intensa del inflammasoma que lleve a la muerte celular. Paralelamente puede producirse una apoptosis inadecuada (reducida en células de la inmunidad innata, pero excesiva en células endoteliales y de la inmunidad adaptativa), una activación excesiva de la coagulación con trombosis microvascular y disfunción mitocondrial con alteración del metabolismo celular. Todo ello se traduce en un daño microvascular, isquemia, y lesión celular y tisular que lleva al fallo multiorgánico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico; ATP: adenosín trifosfato; DAMP: patrón molecular asociado a daño tisular; HMGB-1: *high mobility group box-1*; HSP: *heat shock proteins*; LPS: lipopolisacárido; LTA: ácido lipoteicoico; iNOS: *inducible nitric oxide synthetase*; PAMP: patrón molecular asociado a patógenos; PG: peptidoglicano; RRP: receptores de reconocimiento de patrones; S100: proteína S100.

Fuente: Elaboración propia con la herramienta de diseño científico "Mind the GRAPH" (<https://mindthegraph.com/>)

Todos los órganos y sistemas pueden verse dañados durante la sepsis a través de los mecanismos descritos, llevando a distintas manifestaciones clínicas de la sepsis (20,45,46):

- El sistema cardiovascular es uno de los más frecuentemente afectados y con consecuencias más graves (45). La vasodilatación sistémica se traduce clínicamente en hipotensión arterial, siendo causada por la excesiva liberación de mediadores vasoactivos endoteliales (como la prostaciclina y el óxido nítrico). Esto lleva a la hipoperfusión e hipoxia tisular, alterando el metabolismo de otros órganos (que es el mecanismo subyacente principal del fallo multiorgánico), y siendo su forma más grave el shock distributivo (20). Otros factores que contribuyen a la hipotensión son el aumento de la permeabilidad endotelial con una redistribución del líquido intravascular, así como una alteración en la regulación de la hormona antidiurética (reducida en el shock séptico respecto a otros tipos de shock) (47). La función cardíaca también puede verse afectada debido a una disfunción de los cardiomiocitos, especialmente relacionada con altos niveles de citoquinas circulantes y a disfunción mitocondrial (48).
- En el sistema respiratorio la sepsis causa lesiones en el endotelio vascular y daño sobre la membrana alveolo-capilar por mediadores inflamatorios, lo que lleva a un deterioro del intercambio gaseoso, un aumento de la permeabilidad microvascular y en su forma más grave a

la formación de edema pulmonar. Ello produce un desequilibrio entre la ventilación y la perfusión con hipoxemia grave, y disminuye la distensibilidad (*compliance*) pulmonar. El espectro de manifestaciones clínicas varía desde la taquipnea (el más precoz y principal dato clínico de disfunción respiratoria en la sepsis) hasta la forma más grave que engloba las manifestaciones antes descritas conocido como Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) (20,46).

- La disfunción del hígado es frecuente, a diferencia del fallo hepático agudo que ocurren en <2% de los casos. Su causa exacta es desconocida, aunque se han descrito fenómenos apoptóticos y autofagia aumentada en los hepatocitos, así como necrosis centrolobulillar secundaria a mala perfusión hepática en el shock (46). Su manifestación principal es el aumento de las concentraciones de bilirrubina y transaminasas en el suero. A nivel gastrointestinal, la función de barrera intestinal puede dañarse y permitir la translocación de bacterias y endotoxinas a la circulación sistémica, que podría contribuir a prolongar la sepsis (49,50).
- La insuficiencia renal aguda es frecuente en la sepsis y se asocia con un mayor riesgo de muerte. Sus mecanismos no están completamente comprendidos. La hipoperfusión renal y la necrosis tubular han sido consideradas sus causas principales, pero recientemente se han descrito otros mecanismos involucrados entre los

que destacan: alteraciones en la microcirculación renal, incremento de mediadores inflamatorios y estrés oxidativo, activación de la cascada de coagulación y una parálisis del ciclo celular para prevenir la muerte de las células renales (51,52).

- El sistema nervioso central puede sufrir cambios metabólicos y alteraciones en la señalización celular debido a mediadores inflamatorios durante la sepsis, además de una alteración de la barrera hematoencefálica, pudiendo producir encefalopatía (53,54). En fases más tardías, el sistema nervioso periférico también puede verse afectado, observándose una debilidad neuromuscular de grado variable (55).
- Sistema hematológico: La mayoría de los pacientes con sepsis presentan coagulopatía, pudiendo observarse la alteración de los tiempos de coagulación, un recuento bajo de plaquetas y niveles elevados de dímero-D (56). Su expresión varía desde trastornos subclínicos hasta manifestaciones graves como trombosis y hemorrágicas. Como se ha descrito previamente, la CID es su forma más grave y se asocia con un mal pronóstico, pero presentaciones más leves y frecuentes como la trombocitopenia también se han relacionado con riesgo aumentado de mortalidad (57).

La figura 7 muestra los principales órganos y sistemas que pueden verse afectados en la sepsis.

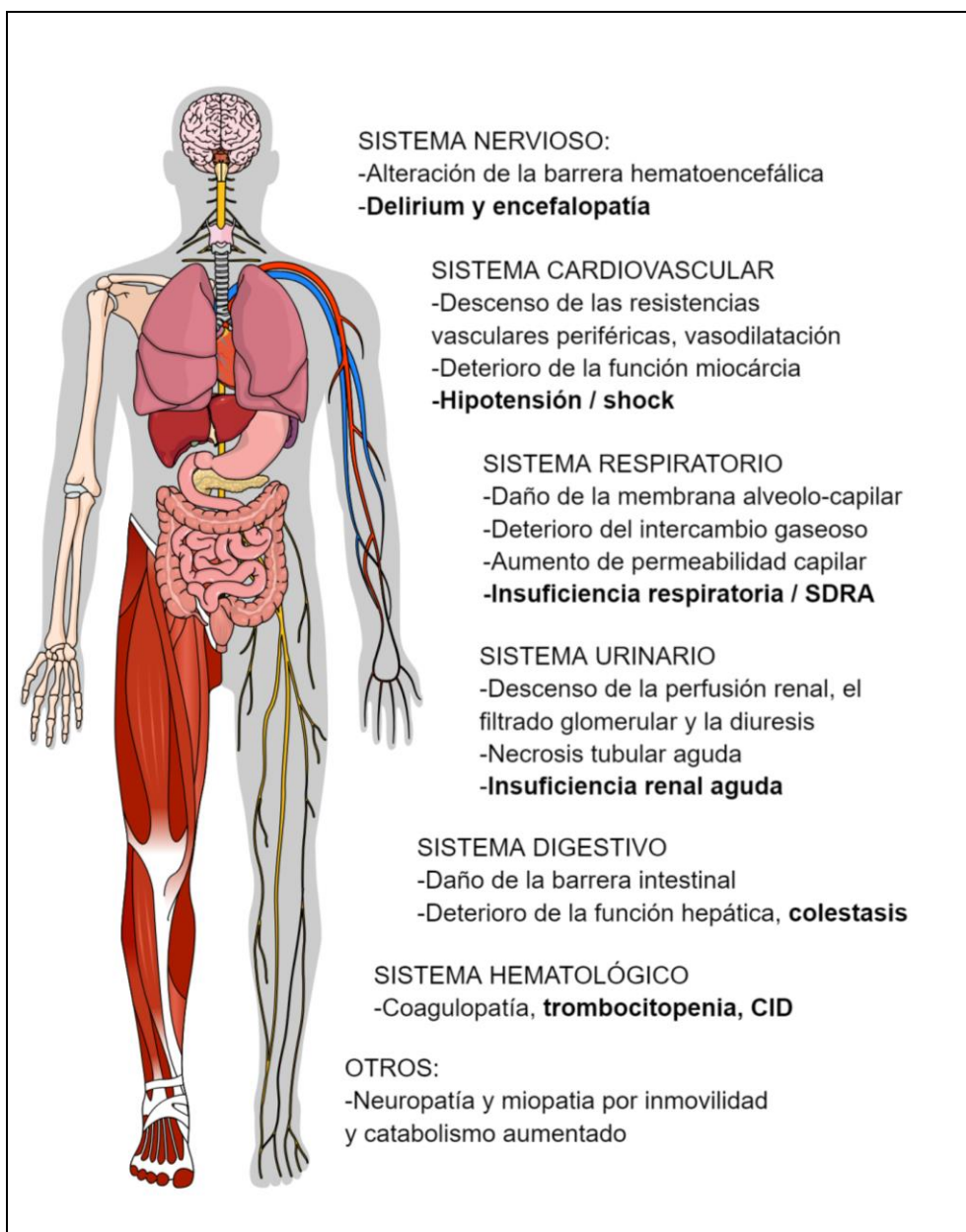


Figura 7. Lesiones de órganos y sistemas en la sepsis.

Fuente: Elaboración propia

1.3.4. De la inflamación excesiva a la inmunosupresión: SIRS, CARS y PICS

Como se ha descrito previamente, la patogénesis de la desregulación inmunológica sigue presentando incertidumbres. Se han establecido varias teorías para tratar de explicar los fenómenos observados en la sepsis. La primera fue propuesta por Bone en 1996 (58), explicando la sepsis como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) producido por un desequilibrio entre los mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Posteriormente se postuló que tras la etapa temprana de respuesta inflamatoria sistémica se produciría una respuesta anti-inflamatoria excesiva (59,60) o síndrome de respuesta anti-inflamatoria compensatoria (CARS, *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*).

El SIRS-CARS se entendería entonces como un fenómeno dual que se iniciaría como una respuesta hiperinflamatoria ante una infección cuyo mecanismo principal sería la llamada tormenta de citoquinas. Posteriormente se produciría una transición gradual desde la sobreactivación inmunológica hacia la inmunosupresión, mediada por disfunción mitocondrial y muerte celular, junto a un predominio de citoquinas anti-inflamatorias, que reduce el número y la actividad de las células de la inmunidad innata y adquirida (25).

Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha observado que desde estadios iniciales puede ocurrir inflamación excesiva e inmunosupresión de forma simultánea (42,60). Actualmente

sabemos que tanto los mediadores pro-inflamatorios como los anti-inflamatorios se liberan en la fase aguda de la sepsis (61,62). Aunque inicialmente hay un desequilibrio hacia una respuesta pro-inflamatoria desproporcionada, la desregulación de la respuesta anti-inflamatoria induce fenómenos de inmunosupresión desde las fases iniciales que pueden persistir en el tiempo (59).

Las mejoras en el diagnóstico y tratamiento precoz de la sepsis han mejorado la supervivencia de las fases iniciales de inflamación, pero a pesar de ello algunos pacientes precisan continuar posteriormente en la UCI durante un tiempo prolongado (63). Así, la mayoría de los pacientes fallecen más tarde de los primeros tres días de infección, a veces varias semanas después, debido a una respuesta inflamatoria persistente con desnutrición y debilidad muscular, que se asocia a inmunosupresión con incompleto control del foco infeccioso o nuevas complicaciones infecciosas nosocomiales (64,65).

Por estos motivos se ha propuesto el concepto de síndrome de inflamación persistente, inmunosupresión y fallo metabólico (PICS, *Persistent inflammation, Immunosupresion and Catabolism Syndrome*) para describir esta situación en la que no se alcanza una homeostasis inmunológica (66) y que explicaría la mayor mortalidad en las fases tardías. Clínicamente, el PICS se ha postulado como la fisiopatología subyacente de la llamada enfermedad crítica crónica (ECC), utilizada para definir la situación de pacientes con una larga estancia en una UCI con una serie de características como la dependencia prolongada de la

ventilación mecánica, disfunción neurológica, debilidad muscular o malnutrición, entre otras (67). Para ayudar a identificar estos pacientes, Gentile et al. (66) propusieron una serie de parámetros clínicos, de manera que un paciente cumpliría los criterios de PICS si además de estar más de 10 días en una UCI presenta: 1) inflamación persistente definida por niveles de PCR $>150\mu\text{g/L}$ y proteína fijadora de retinol (*retinol binding protein*, RBP) $<10\mu\text{g/dL}$; 2) inmunosupresión definida por un recuento de linfocitos totales <800 células/ mm^3 ; y 3) un estado catabólico definido por niveles de albúmina sérica $<3\text{g/dL}$, prealbúmina sérica $<10\text{mg/dL}$, índice creatinina/altura $<80\%$ y pérdida de peso $>10\%$ durante la hospitalización o un índice de masa muscular <18 .

En la actualidad, puede utilizarse el concepto de CARS para referirse a los fenómenos anti-inflamatorios y de inmunosupresión que ocurren en las etapas iniciales de la sepsis; mientras que el concepto de PICS se reserva para los fenómenos más tardíos como la inmunoparálisis y la inflamación crónica que llevan a deterioro progresivo, complicaciones e incluso muerte retardada (ver figura 8).

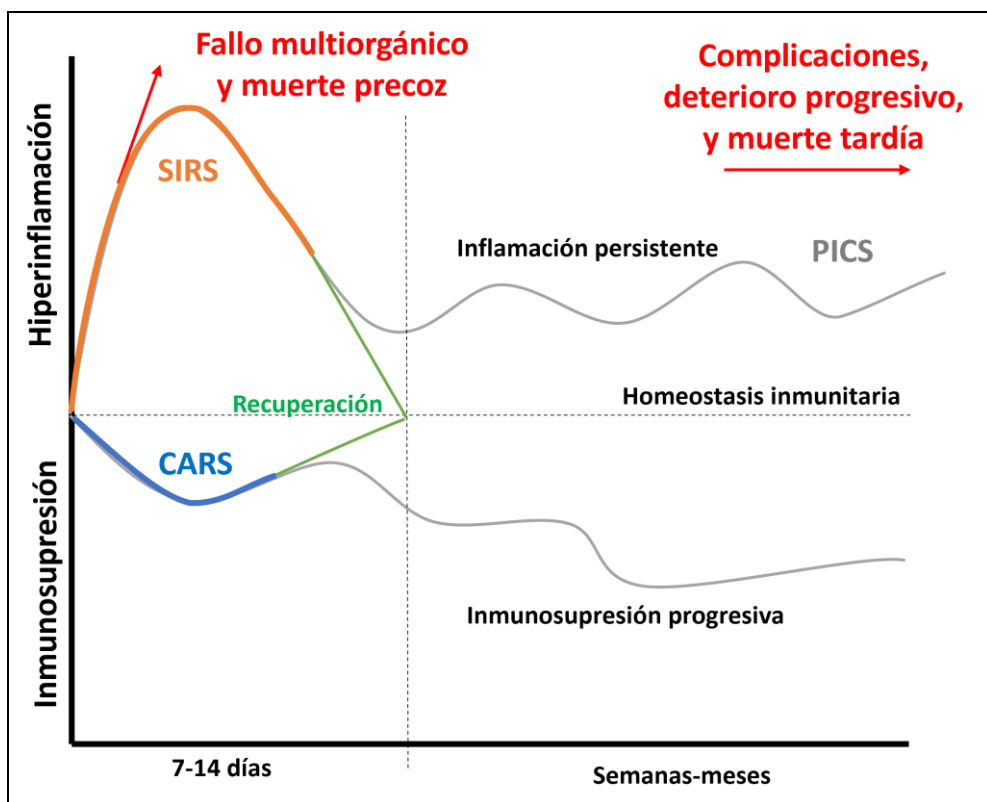


Figura 8. Esquema simplificado de SIRS (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), CARS (*Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) y PICS (*Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome*).

Fuente: Adaptado de Hotchkiss et al: *Nat Rev Dis Primers*. 2016 (46)

1.4. Epigenética en la sepsis

1.4.1. Introducción. Conceptos generales

El término epigenética se refiere a los mecanismos que, en respuesta a factores externos o ambientales, producen cambios que regulan la expresión génica sin implicar cambios en la secuencia del ADN (68). Estas modificaciones, o marcas epigenéticas, conducen a la activación o inhibición de la expresión los genes. Hoy en día se sabe que desempeñan un papel muy relevante en la diferenciación y activación de las células inmunitarias (69). Las modificaciones epigenéticas mejor conocidas son: la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales (*posttranslational modifications*, PTMs) de las histonas y los cambios en la regulación de la transcripción a través de ARN no codificante (ARNnc). En los últimos años se han evidenciado cómo los factores ambientales producen cambios epigenéticos que son claves en el desarrollo de ciertas enfermedades, especialmente en aquellos campos en los que el sistema inmunitario tiene una gran relevancia como son las enfermedades autoinmunes o la oncología. Los avances producidos en los últimos años en el área de la epigenética han permitido que en la actualidad se estén investigando terapias epigenéticas (70,71).

Más recientemente, la regulación epigenética ha comenzado a estudiarse en el campo de las enfermedades infecciosas, mayoritariamente en modelos animales, sugiriendo que puede desempeñar un papel central en la patogénesis de la

sepsis. Para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario se requiere un adecuado proceso de diferenciación de las células hematopoyéticas, en los que están implicados mecanismos epigenéticos específicos. Durante la sepsis, y posteriormente a ella, se producen cambios en algunas marcas epigenéticas que tienen implicaciones tanto en la respuesta inflamatoria precoz, como en la inmunosupresión a corto y largo plazo (72). Las principales modificaciones epigenéticas que ocurren durante la infección se representan de forma simplificada en la figura 9.

Las modificaciones epigenéticas son, por tanto, potenciales biomarcadores para el diagnóstico y para la predicción del pronóstico en la sepsis. Recientemente se ha definido un biomarcador epigenético como cualquier marca epigenética o mecanismo epigenético que a) predice el riesgo de desarrollo futuro de la enfermedad; b) define una enfermedad; c) predice el desenlace de una enfermedad; o d) permite identificar la terapia más adecuada o evaluar la respuesta a ésta (73).

Conocer en mayor profundidad el papel de la epigenética en la patogénesis de la sepsis en el ser humano podría tener importantes aplicaciones clínicas, ayudando a comprender la heterogeneidad de la enfermedad y la distinta evolución de los pacientes. Además, la epigenética puede proporcionar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad, así como posibles dianas terapéuticas que permitan mejorar la supervivencia de los pacientes.

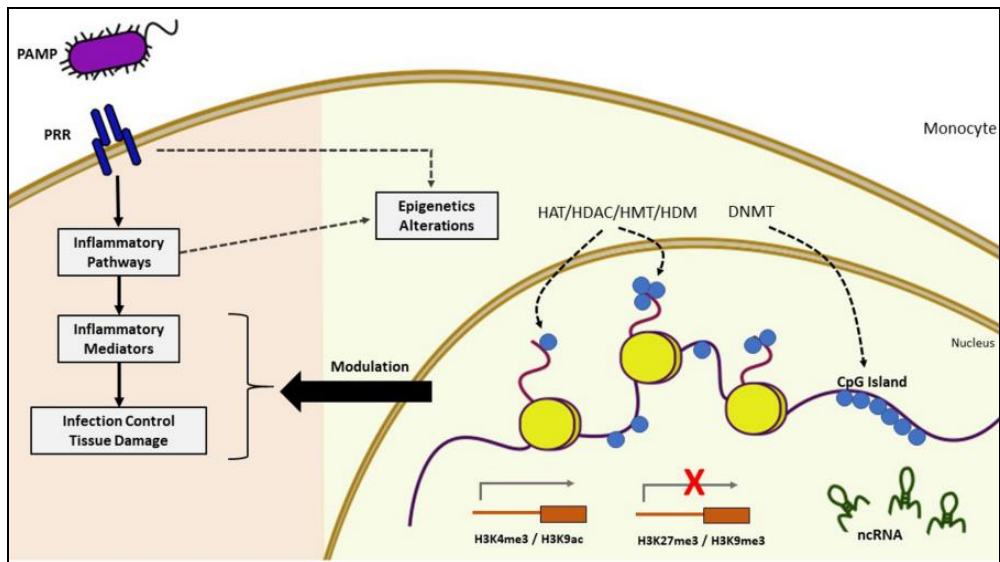


Figura 9. Modificaciones epigenéticas durante la infección

El reconocimiento de PAMP por los RRP desencadena cascadas de señalización que activan mediadores inflamatorios. Estos inducen cambios dinámicos en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria a través de marcas epigenéticas tales como metilación de islas CpG, modificaciones de histonas con efectos en la activación (H3K4me, H3K9ac) y la represión génica (H3K27me3, H3K9me3), y ARN no codificante.

PAMP: patrón molecular asociado al patógeno; RRP: receptor de reconocimiento de patrones; DNMT: DNA-metiltransferasa; HAT: acetiltransferasa de histonas; HDAC: desacetilasa de histonas; HDM: demetilasa de histonas; HMT: metiltransferasas de histonas; ncRNA: ARN no codificante.

Fuente: Tomado de Falcão-Holanda et al. *Frontiers in immunology*, 2021 (74).

1.4.2. Metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de las histonas y ARN no codificante

a) Metilación del ADN:

La adición o eliminación de grupos metilo al ADN produce cambios conformacionales en la cromatina que influyen en su

grado de compactación, así como la unión de proteínas implicadas en la activación transcripcional de los genes. El nivel de actividad de la maquinaria transcripcional depende del grado de compactación (a mayor relajación de la cromatina, mejor acceso y mayor actividad), por lo que la metilación regula la expresión génica. La metilación consiste en la transferencia de un grupo metilo en el carbono-5 (C5) del anillo pirimidínico de una citosina a través de la enzima DNA-metiltransferasa (DNMT) y el sustrato metabólico S-adenosilmetionina (SAM). La desmetilación se produce a través de las proteínas TET (*Ten-Eleven Translocation proteins*) que producen la hidroximetilación del C5 de la citosina como paso previo a la eliminación del grupo metilo (75).

En los mamíferos, la metilación del ADN se produce predominantemente en citosinas que preceden a una guanina (dinucleótidos CpG). Más del 50% de todos los genes poseen concentraciones elevadas de CpGs (conocidas como islas de CpG) en sus regiones promotoras. El aumento de la metilación (hipermetilación) de genes promotores o regiones amplificadoras tiene un efecto “silenciador” o de represión de la expresión génica al aumentar su grado de compactación, impedir la unión de factores de transcripción y atraer proteínas y complejos represores que se unen al grupo metilo, lo que finalmente resulta en la inactivación del gen. Por el contrario, la hipometilación de las regiones promotoras produce una relajación de la cromatina y un estado que favorece la transcripción que se asocia con la activación de la expresión génica. La metilación del ADN y la modificación de las histonas se influyen mutuamente. Mientras las metilaciones de aminoácidos concretos de las histonas son

fácilmente reversibles, la metilación de ADN puede conducir a una represión estable en regiones concretas de nuestro genoma a largo plazo (76). En la figura 10 se representan de forma esquemática estos mecanismos.

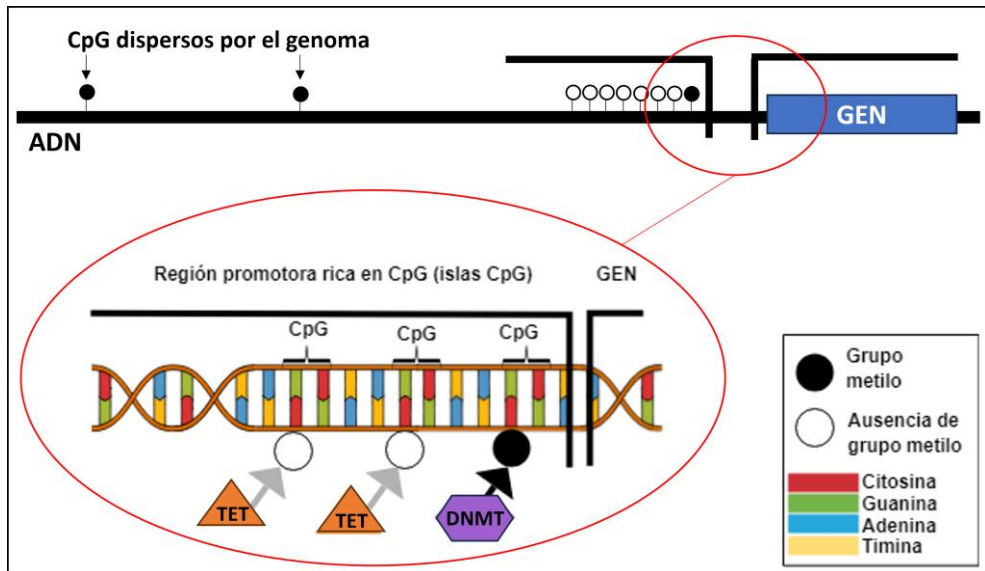


Figura 10. Metilación del ADN en islas CpG de la región promotora de un gen.

La mayoría de dinucleótidos citosina-guanina (CpG) dispersos por el genoma se encuentran metilados. Las secciones del genoma ricas en CpG (islas CpG) se localizan en regiones que requieren un control de la transcripción, como los retrotransposones y los promotores de genes. En estas áreas, la metilación es un proceso dinámico mediado por DNMT y TET, pudiendo predominar CpGs hipometilados (círculos blancos) que contribuyen a facilitar la accesibilidad al promotor y la transcripción de genes, o hipermetilados (círculos negros) con el efecto contrario (75).

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; DNMT: DNA-metiltransferasa; TET: Ten-Eleven Translocation proteins.

Fuente: Elaboración propia con la herramienta de diseño científico "Mind the GRAPH" (<https://mindthegraph.com/>)

b) Modificaciones post-traduccionales (PTMs) de histonas:

Las proteínas “core” de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4) forman el nucleosoma alrededor del cual se enrolla la doble hélice de ADN. Estas proteínas experimentan cambios en distintas posiciones de aminoácidos (como la metilación, acetilación y fosforilación, entre otras) que se producen a través de distintos grupos de enzimas. Entre las PTMs más estudiadas en la sepsis se encuentran la metilación y la acetilación de las histonas, cuyas enzimas catalizadoras se agrupan en: acetiltransferasas de histonas (HAT), desacetilasas de histonas (HDAC), demetilasa de histonas (HDM) y metiltransferasas de histonas (HMT) (77). Distintas PTMs se han asociado con represión o sobreexpresión génica. Ejercen su efecto a través de dos mecanismos: alteran la estructura local de la cromatina alterando la accesibilidad del ADN; y regulan la unión de proteínas efectoras que modulan la transcripción (70).

Las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN son procesos complementarios que a menudo determinan conjuntamente la expresión génica. Por ejemplo, la cola desmetilada de la histona H3 recluta la enzima de DNA-metiltransferasa-3a (DNMT3a), lo que lleva a la metilación del ADN y el silenciamiento génico (78). Esta relación también se produce a la inversa, de manera que la metilación del ADN promueve la desacetilación de la histona H3 mediante el reclutamiento de la proteína de unión a metil-CpG 2, la proteína Sin3A y el posterior reclutamiento de las desacetilasas de histona

(HDACs) (76), lo que resulta en una cromatina más compacta que inhibe la expresión génica.

Algunos ejemplos de PTMs bien estudiadas en la sepsis son la trimetilación de la lisina 4 de H3 (H3K4m3) o la acetilación de la lisina 9 de H3 (H3K9ac). En la figura 11 se representa un esquema de las histonas y algunas de sus PTMs.

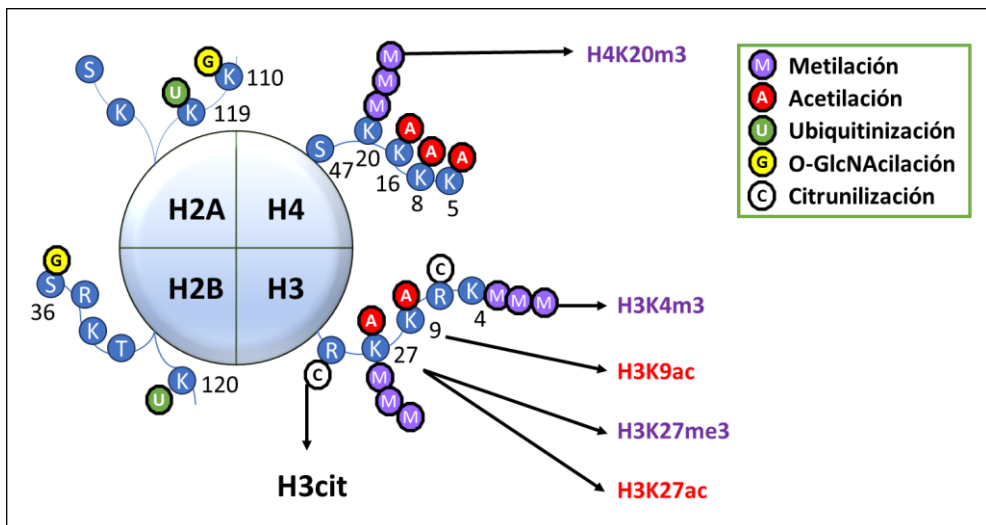


Figura 11. Modificaciones post-traduccionales de las histonas

Las cuatro proteínas "core" de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4), experimentan cambios en diferentes sitios de aminoácidos en respuesta a enzimas específicas (PTMs). Entre los más estudiados en la sepsis se encuentran la metilación e acetilación de histonas.

L-Th1: Linfocitos T helper 1; L-Th2: Linfocitos T helper 2; H4K20m3: trimetilación de la lisina 20 de H4; H3K4m3: trimetilación de la lisina 4 de H3; H3K9ac: acetilación de la lisina 9 de H3; H3K27me3: trimetilación de la lisina 27 de H3; H3K27ac: acetilación de la lisina 27 de H3; PTMs: Modificaciones post-traduccionales de las histonas.

Fuente: Elaboración propia. Basado en Wu et al. Cell Death and Disease, 2023 (77).

c) ARN no codificante (ARNnc):

Los ARN no codificantes (ARNnc) son secuencias transcritas del genoma no codificante que regulan la expresión de otros genes, y que incluyen entre otros los ARNs no codificantes largos, los microARNs, los ARNs circulares (circARNs), entre otros. Los más estudiados son los microARN (miARNs), pequeñas secuencias de 20-24 nucleótidos que inducen el silenciamiento del 60% de los genes codificadores de proteínas a través de la unión de estas secuencias a ARNs mensajeros que producen la inhibición traduccional o facilitan la degradación de sus ARN mensajeros en el citoplasma de la célula.

1.4.3.Regulación epigenética del sistema inmunitario

La funcionalidad del sistema inmunológico se encuentra vinculada a un proceso de especialización de las células hematopoyéticas que requiere una regulación precisa. La diferenciación celular se fundamenta en programas epigenéticos específicos que pueden ser modificados durante episodios infecciosos, como sucede en la sepsis (79).

Como ejemplo de los mecanismos que regulan la diferenciación celular, la desmetilación de las histonas impulsa la polarización de los macrófagos hacia M2, pero no es necesaria para la polarización hacia M1, donde predomina la actividad de DNMTs que lleva a la hipermetilación del ADN, siendo muy relevante el gen *SOCS1* (clave en la regulación negativa de las citoquinas). Igualmente, en los linfocitos NK activados la metilación de *SOCS1* es clave para regular la liberación de IFN- γ .

Las marcas epigenéticas también desempeñan un papel en la maduración y regulación de los linfocitos B. Las células B *naïve* muestran un estado epigenético inactivo con hipermetilación global del ADN y desacetilación de histonas. Después de la presentación antigénica, se produce la diferenciación en células de centro germinal y posteriormente en células plasmáticas o de memoria en las que el aumento de marcas como H3K9ac, H3K4me2 y H3K4me3 en los genes *CD19*, *PAX5*, *EBF1*, *IGH*, *SPIB* y *FOXO1* son factores clave (69).

En los fenómenos proinflamatorios que se producen en la sepsis también se han identificado marcas epigenéticas. Por ejemplo, distintos grados de acetilación y metilación de H3K27, H3K9 y H3K4 son marcas relacionadas con la regulación génica que predominan en los monocitos y macrófagos en los genes involucrados en las respuestas de citoquinas e interferón, especialmente en genes como IL-6 e IL-1 β (70). Así, en la sepsis la desmetilación de H3K27me3 favorece en los macrófagos tipo M2 la producción de citoquinas como IL-10 e IL-13 y la sobreexpresión de genes como *ARG1*, *Ym1* e *IL1RN*. Otra de las PTMs de las histonas más importantes, la citrulinización de H3 (H3cit), activa la liberación de trampas extracelulares en los macrófagos y neutrófilos, conocidas como NETs (69). La metilación del ADN también parece jugar un papel muy relevante, habiéndose observado cambios en los patrones de metilación de los monocitos de pacientes con sepsis, como se describirá en el siguiente apartado en detalle. En las células dendríticas, la reducción en la expresión de la IL-12 y la pérdida de control sobre la regulación negativa de IL-1 β también están vinculada a niveles

bajos de H3K4me3 y elevados de H3K27ac, H4ac y H3K27me3. Este proceso es crucial ya que la IL-12 contribuye a la diferenciación de los linfocitos Th1. Los linfocitos NK participan en la producción de citoquinas y otros mediadores como TNF- α , IL-1 β y TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) durante el desarrollo de la sepsis, habiéndose observado que la marca represiva H3K9me se borra durante la activación de las células NK. Por otro lado, se han encontrado altas concentraciones de histonas circulantes en los pacientes sépticos que se relacionan con puntuaciones en la escala SOFA más altas y con el shock séptico (80).

Los cambios epigenéticos también parecen mediar en la inmunosupresión asociada a la sepsis. Aunque la implicación de las células mieloides supresoras (MDSC, *Myeloid-derived suppressor cell*) durante la sepsis continúa siendo investigada, se relacionan con la inmunosupresión debido a su abundancia durante fases tardías con criterios de PICS. Algunos autores han demostrado que estas células aumentan los niveles de expresión del miR-165 y el miR-21 durante la sepsis. Después de la sepsis, la proporción de linfocitos T reguladores y linfocitos B agotados aumenta. Los mecanismos epigenéticos ejercen un control crucial sobre la función de estas células, habiéndose observado que la hipermetilación de algunos genes o cambios en la expresión de microARN podrían contribuir a la inmunosupresión (69). Los linfocitos Th1 tienen altos niveles de H3K27me3 (trimetilación de la lisina 27 de H3) en el gen del IFN- γ en la sepsis, mientras que las células Th2 muestran altos niveles de H3K9ac y H3K4me3 y bajos niveles de H3K27me3 en los genes de IL4, IL5 e IL13,

incrementando su expresión (81). También se han descrito marcas epigenéticas relacionadas con la tolerancia a las endotoxinas, lo que se asociaría con la inmunosupresión y el mal pronóstico en pacientes sépticos.

También es destacable que estudios *in vivo* han demostrado que los ARNnc juegan un papel importante en la regulación de la inmunidad innata y en la disfunción orgánica de la sepsis (69). Algunos microARN que parecen ser relevantes en la regulación del sistema inmune y en la fisiopatología de la sepsis (como miR-122, miR-146a, miR-150, miR-155 y miR-223) han sido estudiados como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de la sepsis; así como “firmas” de miARNs (definidas como variaciones en los niveles de un conjunto de miARNs), con resultados variables (69,70). En los últimos años se ha descrito un amplio número de microARNs relacionados que podrían ayudar a diferenciar la sepsis de otros procesos críticos no infecciosos, e incluso identificar de forma precoz el shock séptico. Entre los más destacables encontramos miR-133a, cuyos niveles parecen ser mayores en pacientes críticos con sepsis y se ha identificado como factor predictivo de mortalidad. Sin embargo, se demostró menos útil que los biomarcadores utilizados habitualmente como la procalcitonina (PCT) y la proteína C reactiva (PCR) (82).

En la figura 12 se resumen algunos de los mecanismos epigenéticos previamente descritos sobre la regulación del sistema inmunitario y la sepsis, estudiados mayoritariamente a través de modelos de endotoxemia.

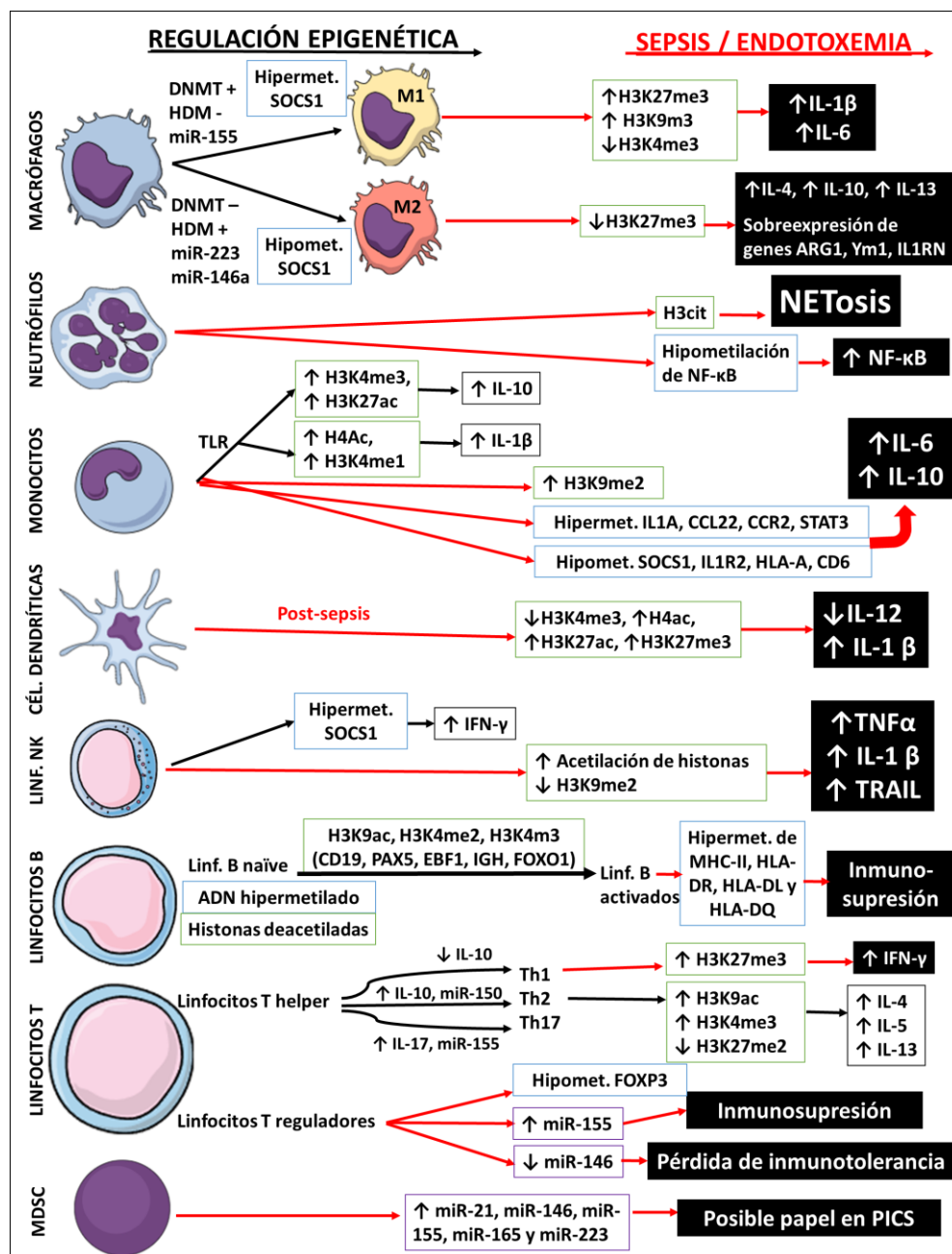


Figura 12. Regulación epigenética del sistema inmunitario

Las líneas negras representan los mecanismos epigenéticos que se han descrito en la regulación de distintas células del sistema inmunitario, mientras que las líneas rojas representan los mecanismos epigenéticos implicados en la sepsis, mayoritariamente descritos en estudios en modelos de endotoxemia, estudios in vitro y en animales. En la

polarización de los macrófagos a M1 o M2 están implicadas algunos micro-ARN (como miR-155; y miR-223 y miR-146a, respectivamente), la desmetilación de las histonas mediante la actividad HDM (predominante en M2) y la metilación del ADN mediante la actividad DNMT, especialmente relevante el gen *SOCS1* (predominante en M1). En la sepsis, la metilación de H3K27 y H3K9, y la desmetilación de H3K4 favorecen la liberación de IL-1 β e IL-6 por parte de macrófagos M1; mientras que la desmetilación de H3K27me3 favorece la liberación de las citoquinas (IL-4, IL-10, IL-13) y la sobreexpresión de genes como *ARG1*, *Ym1* e *IL1RN* por parte de los macrófagos M2. En los neutrófilos se ha descrito la citrulinización de H3 (H3cit) como un elemento clave que activa la liberación de NETs en la sepsis. En los monocitos, distintos grados de metilación y acetilación de H3K27, H3K9 y H3K4 mediada por TLR regulan la liberación de citoquinas como IL-1 β e IL-10, mientras que en pacientes con sepsis los cambios en los patrones de metilación de algunos genes (IL1A, CCL22, SOCS1...) inducen una mayor liberación de IL-6 e IL-10. En las células dendríticas, en estudios animales, se han observado niveles bajos de H3K4me3 y elevados de H3K27ac, H4ac y H3K27me3 tras la sepsis, que se relacionan con un descenso de IL-12 y el descontrol sobre la regulación negativa de IL-1 β . La liberación IFN- γ por parte de los linfocitos NK se activa por la metilación del gen *SOCS1*, y en modelos de sepsis se ha observado un aumento de la acetilación de histonas y un descenso de la marca represiva H3K9me, aumentando producción de TNF- α , IL-1 β y TRAIL. En los linfocitos B *naïve* predomina la hipermetilación del ADN y la desacetilación de histonas hasta que, tras la presentación antigénica, el aumento de H3K9ac, H3K4me2 y H3K4me3 en ciertos genes (como *CD19*, *PAX5*, *EBF1*, *IGH*, *SPIB* y *FOXO1*) produce su diferenciación hacia células de centro germinal, células plasmáticas o de memoria. Durante la sepsis, la hipermetilación de otros genes relacionados con el MHC en linfocitos B se asocian a la inmunosupresión. En los linfocitos T helper la diferenciación a Th1, Th2 o Th17 está regulada por algunos microARN (miR-150, miR-155) y por los niveles de algunas interleucinas (regulados a su vez por otras marcas epigenéticas ya descritas). En la sepsis los distintos niveles de metilación y acetilación de H3K27, H3K9 y H3K4 regulan la liberación de IFN e interleucinas. Las MDSC, que se han relacionado con la inmunosupresión por su abundancia en pacientes con PICS, aumentan los niveles de expresión del miR-165 y el miR-21 durante la sepsis.

DNMT: DNA-metiltransferasa; HDM: demetilasa de histonas; IFN- γ : interferón γ ; IL: interleucina, MDSC: *Myeloid-derived suppressor cell*, MHC: *major histocompatibility complex*; NETs: trampas extracelulares de neutrófilos; PICS: *Persistent inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome*; TNF α : Factor de necrosis tumoral α , TRAIL: *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*.

Fuente: Elaboración propia. Basado en Beltrán-García et al. *Epigenomics*, 2019 (69).

1.4.4.Sepsis y metilación del ADN

Al profundizar en los mecanismos de regulación de la metilación del ADN, encontramos varios estudios en modelos animales o con líneas celulares humanas *in vitro* que han evaluado los cambios que ocurren a nivel epigenético durante la sepsis. Un modelo experimental de lesión pulmonar aguda

inducida por LPS en ratas reveló una alteración de la metilación del ADN en las regiones promotoras de 1.721 genes, muchos de los cuales tienen un papel destacado en la respuesta hiperinflamatoria (83). Otro estudio observó un aumento en los niveles de DNMT1, junto a la infiltración de neutrófilos y la producción de ERO en el tejido pulmonar de ratas sometidas a endotoxemia, que pudo reducirse con un tratamiento con procainamida que inhibió la metilación del ADN y mejoró el fallo multiorgánico (84). De forma similar a este, son varios los estudios en animales que han observado que la inhibición de DNMTs puede minimizar la activación de citoquinas inflamatorias y la progresión de la sepsis (85–87). En una serie de estudios *in vitro* en monocitos humanos, El Gazzar y colaboradores mostraron que la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) resultaba en la hipometilación del promotor del gen codificante para el factor de necrosis tumoral (TNF) con un aumento de su transcripción y en una mayor exposición del sitio de unión para NF- κ B, que en fases posteriores se revertía por las modificaciones de las histonas generando tolerancia al LPS (88,89). En otro modelo de endotoxemia en seres humanos, se observaron alteraciones en la metilación del ADN en diversas áreas del genoma, relacionadas con los mecanismos de tolerancia de los monocitos (90). En la tabla 7 se resumen los estudios descritos.

Tabla 7. Estudios en modelos animales (*in vivo*) y humanos (*in vitro*) de sepsis que evalúan la metilación del ADN

	Modelo	Resultados	Referencia
Estudios en modelos animales <i>in vivo</i>	Lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratas	1721 genes mostraron metilación diferencial en el tejido pulmonar de las ratas con daño inducido por LPS	Zhang et al. 2013 (83)
	Endotoxemia y lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratas	La inhibición de DNMT con procainamida 1 hora tras la infusión de LPS disminuyó la producción de ERO, el daño multiorgánico y la supervivencia a las 6 horas	Shih et al. 2016 (84)
	Endotoxemia y lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratones	La inhibición de DNMT con decitabina* o 5-azacitidina 1h antes de la exposición a LPS redujo los niveles de TNF α e IL-1b, la producción de ERO y el daño pulmonar	Huang et al. 2016 (86)
	Lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratones	El tratamiento con decitabina* 24h tras la exposición de LPS mejoró la recuperación del daño pulmonar a través de la activación de linfocitos T reguladores	Singer et al. 2015 (87)
	Sepsis inducida por ligadura cecal y punción en ratones	La exposición a decitabina* reduce los niveles de DNMTs, la activación NF- κ B, los niveles de citoquinas y la progresión de la sepsis	Cao et al. 2020 (85)
Estudios en modelos humanos <i>in vitro</i>	Línea celular TPH-1 de monocitos humanos, incubados con LPS	La exposición a LPS produjo una hipometilación inicial del promotor del gen del TNF α . Posteriormente, la interacción con histonas metiladas silenció la expresión de TNF α	El Gazzar et al. 2008 y 2010 (88,89)
	Monocitos humanos de donantes sanos, expuestos a LPS	Se observaron cambios en la metilación del ADN en 2700 regiones (predominando la hipometilación) con al menos 4 sitios CpG con metilación diferencial $\geq 30\%$, y generando tolerancia a la exposición	Novakovic et al. 2016 (90)

DNMT: DNA-metiltransferasa; ERO: especies reactivas de oxígeno; IL: interleucina; LPS: lipopolisacárido; NF- κ B: factor nuclear kappa B; TNF α : factor de necrosis tumoral α .

*Decitabina: molécula utilizada como tratamiento de algunos síndromes mielodisplásicos por su capacidad para destruir las células anormales de la médula ósea al reducir la metilación del ADN a través de la inhibición de la actividad de las DNMTs.

Fuente: Elaboración propia

También se han observado diferencias en la metilación de algunos genes en estudios llevados a cabo en distintos escenarios clínicos, tales como sepsis neonatal. Así, un trabajo retrospectivo en neonatos pretérmino que evaluó el uso como biomarcador del patrón de metilación del ADN en el promotor del gen de la procalcitonina mostró diferencias en los pacientes con sepsis y en diferentes tipos de sepsis bacteriana neonatal (91). Otro estudio mostró que un grupo de genes de la protocadherina beta (PCDHB, *protocadherin beta*), importante en la adhesión leucocitaria, estaban hipermetilados en 3 recién nacidos pretérmino con sepsis frente a 3 recién nacidos pretérmino sanos (92). Otro estudio, realizado en España, con muestras de 23 neonatos pretérmino reveló diferencias en los niveles de metilación de algunas regiones genómicas implicadas en la respuesta inflamatoria, además de observar diferencias entre los patrones de la sepsis de inicio precoz y tardío. Los principales promotores hipometilados estaban implicados en la respuesta inmune innata (*EGOT*, *IL10*, *CPT1B*, *PILRA*, *ELANE*, *PRTN3*, *TREM1*, *MIR145*, *S100A8*, *CSTA*, *MS4A3*, *ATP8B4*, *CMYA5*, *CPT1B*, *LRG1* y *CD300LB*), mientras que los principales genes hipermetilados lo estaban en la activación de linfocitos T y la respuesta adaptativa (*CD3G*, *CD3D*, *LTA*, *TXK*, *UBASH3A* y *SIT*) (93). Más recientemente, se ha evidenciado una hipometilación global del ADN y una menor expresión de los niveles de DNMT en pacientes con sepsis neonatal de inicio tardío (94).

En adultos con sepsis, Hopp y colaboradores realizaron un estudio dirigido a analizar el transcriptoma sanguíneo en la sepsis. En él analizaron 180 muestras de 126 pacientes con sepsis debido

a neumonía adquirida en la comunidad e identificaron diferencias en la expresión de las enzimas que intervienen en la metilación del ADN durante la sepsis temprana, y sugiriendo que la desregulación de la transcripción de estas enzimas podría conducir a la reorganización de la cromatina y a una reprogramación generalizada de la transcripción genética (95). Por otro lado, un estudio que incluyó muestras de 14 casos de pacientes con sepsis y 4 pacientes en el postoperatorio inmediato de cirugía cardíaca como controles, encontró perfiles de metilación del ADN distintos que afectaban a genes fundamentales para los monocitos (como la hipermetilación de *IL1A*, *CCL22*, *CCR2* y *STAT3*; y la hipometilación de *HLA-A*, *SOCS1*, *IL1R2* y *CD46*), y que se relacionaron con los niveles de IL-10 e IL-6, con un aumento significativo de los monocitos en la sepsis, y con la puntuación de la escala SOFA (96). Por último, en una cohorte de 66 pacientes sépticos y 68 no sépticos en estado crítico se encontraron 668 regiones de 443 genes con diferencias en su grado de metilación (DMR, *differentially methylated regions*), entre los que se identificaron 56 genes ya relacionados con la sepsis en la literatura previa, incluyendo los genes del componente 3 del complemento, la angiopoyetina 2, la mieloperoxidasa, la lactoperoxidasa y varios isotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II. Un análisis funcional mostró una actividad aumentada de la metiltransferasa, la adhesión celular y la presentación de antígenos; y algunos se asociaron con parámetros clínicos de gravedad o con una estancia hospitalaria mayor (97). En la tabla 8 se muestran los principales estudios realizados en pacientes con sepsis.

Tabla 8. Estudios que evalúan la metilación del ADN en pacientes con sepsis

Situación clínica	Resultados	Referencia
Sepsis neonatal precoz y/o tardía (n=28) vs. neonatos sanos (n=16) o con infección (n=5)	Distintos patrones de metilación del ADN del promotor de la procalcitonina (CALCA) se relacionaron con la presencia o ausencia de sepsis y con su agente causal (bacterias gram-negativas o gram-positivas)	Tendl et al. 2013 (91)
Sepsis neonatal (n=3) vs. neonatos sanos (n=3)	81 regiones diferencialmente metiladas de 64 genes (en las que el análisis de enriquecimiento funcional observó una sobrerrepresentación de los genes de la protocadherina) permitieron distinguir entre pacientes con sepsis y sin sepsis	Dhas et al. 2015 (92)
Sepsis neonatal (n=17) vs. neonatos sanos (n=6)	Patrones de metilación diferencial en la sepsis, en regiones genómicas implicadas en la respuesta inmune innata y adquirida (26 DMR con diferencia $\geq 10\%$). También diferenciaron entre sepsis precoz y tardía	Lorente-Pozo et al. 2021 (93)
Sepsis neonatal tardía vs. neonatos sanos	La hipometilación global del ADN y menor expresión de niveles de DNMT permitieron diferenciar la sepsis de inicio tardío	Sankar et al. 2022 (94)
Sepsis debido a neumonía adquirida en la comunidad en adultos en UCI (n=126)	Se observó una gran desregulación de la transcripción de las enzimas modificadoras de la cromatina (DNMT, TET, HMT, HDM) en pacientes con sepsis, distinguiendo 6 distintos patrones de gravedad	Hopp et al. 2018 (95)
Sepsis en pacientes UCI (n=14) vs. postoperatorio de cirugía cardíaca (n=4)	Metilación diferencial de genes que se relacionó con la respuesta inflamatoria de monocitos, asociada a los niveles de IL-10 e IL-6, y con la disfunción orgánica.	Lorente-Sorolla et al. 2019 (96)
Sepsis en pacientes en UCI (n=66) vs. pacientes críticos en UCI sin sepsis (n=68)	668 regiones y 443 genes con metilación diferencial entre sepsis y enfermedad crítica sin sepsis. El análisis funcional reveló mayor actividad metiltransferasa, de presentación de antígenos y adhesión celular. Destacan los genes C3, ANG2, MPO, LP, HLA-A, HLA-DRB1, HLA-C, y HLA-DQB1	Binnie et al. 2020 (97)

ANG2: angiotensinogen 2; C3: Componente 3 de complemento; DNMT: DNA-metiltransferasa; HLA: *human leukocyte antigen*; HMT: histona-metiltransferasa; HDM: histona-demetilasa; LP: lactoperoxidasa; MPO: mieloperoxidasa; TET: *ten-eleven translocation proteins*.

Fuente: Elaboración propia

Los estudios mencionados respaldan la idea de que los cambios en los patrones de metilación pueden ser útiles en el diagnóstico y la evaluación pronóstica en las etapas iniciales de la enfermedad. Además, se ha observado que los genes que experimentan cambios en su metilación están relacionados con la respuesta inmunitaria, lo que está comenzando a mejorar el conocimiento sobre los eventos fisiopatológicos que ocurren durante la sepsis. Entre otras cosas, los cambios en la metilación del ADN en diferentes modelos celulares expuestos al LPS sugiere que este proceso puede ser clave la desregulación de la respuesta inmunitaria del hospedador (83,88–90). Por ejemplo, los monocitos humanos modifican sus patrones de metilación del ADN al exponerse al LPS, desarrollando tolerancia a las endotoxinas (96). La reprogramación de las células inmunitarias parece ser clave en el desarrollo de algunos pacientes con sepsis de inmunosupresión a largo plazo o PICS.

La metilación del ADN ha demostrado tener un papel como biomarcador en el pronóstico y diagnóstico precoz en varios tipos de cáncer (98,99). Por ejemplo, Castelo-Branco y colaboradores observaron que la hipermetilación de la región promotora del gen que codifica la subunidad catalítica del complejo de la telomerasa (*TERT*, *Telomerase Reverse Transcriptase*) fue un factor de riesgo independiente de progresión de enfermedad y de recurrencia en el cáncer de próstata (99). Aunque en el campo de las enfermedades infecciosas todavía tenemos datos escasos al respecto del uso de la metilación del ADN como marcador pronóstico, algunos trabajos han observado que la identificación de patrones de metilación específicos de ciertos tejidos (como el

miocárdico o el endotelial) mediante el análisis de ADN circulante en sangre puede ser útil. Así, Zemmour y colaboradores detectaron que las altas concentraciones de ADN circulante de cardiomiocitos en sangre (identificado mediante su patrón de metilación específico de ciertos loci genómicos) predecían fuertemente la mortalidad en pacientes con sepsis (100). En 2023, Peretz y colaboradores publicaron un trabajo de investigación en el que observaron que en la sepsis, y en otros procesos de daño vascular, se observaban niveles elevados de ADN circulante de células endoteliales vasculares (101). Otro estudio realizó un análisis bioinformático con los datos de la metilación del ADN de la base de datos pública GEO (*Gene Expresión Omnibus database*) para identificar los genes con valor pronóstico en la sepsis, permitiendo la construcción de una firma pronóstica de 9 genes que reveló una relación entre el conjunto de genes, el fenotipo clínico y la tasa de supervivencia, si bien estos datos deberían ser validados en estudios clínicos (102).

1.5. Pronóstico de la sepsis

Como se ha descrito previamente, la sepsis es un proceso grave y con una alta mortalidad, que se estima que puede variar entre el 10 y el 52% (103–105). Las tasas de mortalidad aumentan linealmente según la gravedad de la sepsis, de forma que la mortalidad de la sepsis es >10%, mientras que la asociada con el shock séptico es >40% (12). En este sentido, un lactato significativamente elevado (>4 mmol/L) refleja una situación de hipoperfusión tisular y también se asocia con mayor riesgo de mortalidad (12). Escalas validadas (como la escala SOFA) permiten valorar la gravedad del episodio y son las herramientas más utilizadas en la práctica clínica para valorar el pronóstico (1). Durante el ingreso hospitalario, la sepsis puede aumentar el riesgo de adquirir una infección nosocomial (106) debido a mecanismos de inmunosupresión ya explicados (46).

Además de la alta mortalidad en la fase aguda, diversos estudios encuentran una mayor mortalidad a medio y largo plazo entre los supervivientes a un episodio de sepsis (107). La mayoría de las muertes ocurren dentro de los primeros seis meses, pero el riesgo sigue siendo elevado a los dos años. También se ha observado un mayor riesgo de nuevos episodios de sepsis y de reingreso hospitalario. Los diagnósticos más comunes asociados con el reingreso a los 90 días incluyen la insuficiencia cardíaca, la neumonía, las exacerbaciones agudas de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las infecciones del tracto urinario (108).

También se ha observado un deterioro físico y funcional de los pacientes supervivientes a una sepsis, que se mantiene a lo largo del tiempo, así como un deterioro de su calidad de vida e incluso una pérdida de capacidades cognitivas (109–111). Además, algunos autores han observado un empeoramiento de las enfermedades crónicas previas o la aparición de nuevas enfermedades crónicas tras un episodio de sepsis (112).

Los fenómenos a los que se atribuye este deterioro son los mismos que explican la evolución de los pacientes con sepsis, variable según distintos factores, de manera que algunos fallecen en los primeros días mientras que otros lo hacen más tarde debido a la inmunosupresión e inflamación persistente en el contexto de PICS. Los mecanismos epigenéticos parecen jugar un papel muy relevante en estos procesos, como se explicó en el apartado previo. En la figura 13 se representa de forma resumida cómo distintos factores inmunitarios, del paciente y terapéuticos llevan a un aumento de la mortalidad tanto en fases precoces como a medio y largo plazo, debido a las consecuencias de la respuesta inmunitaria desregulada.

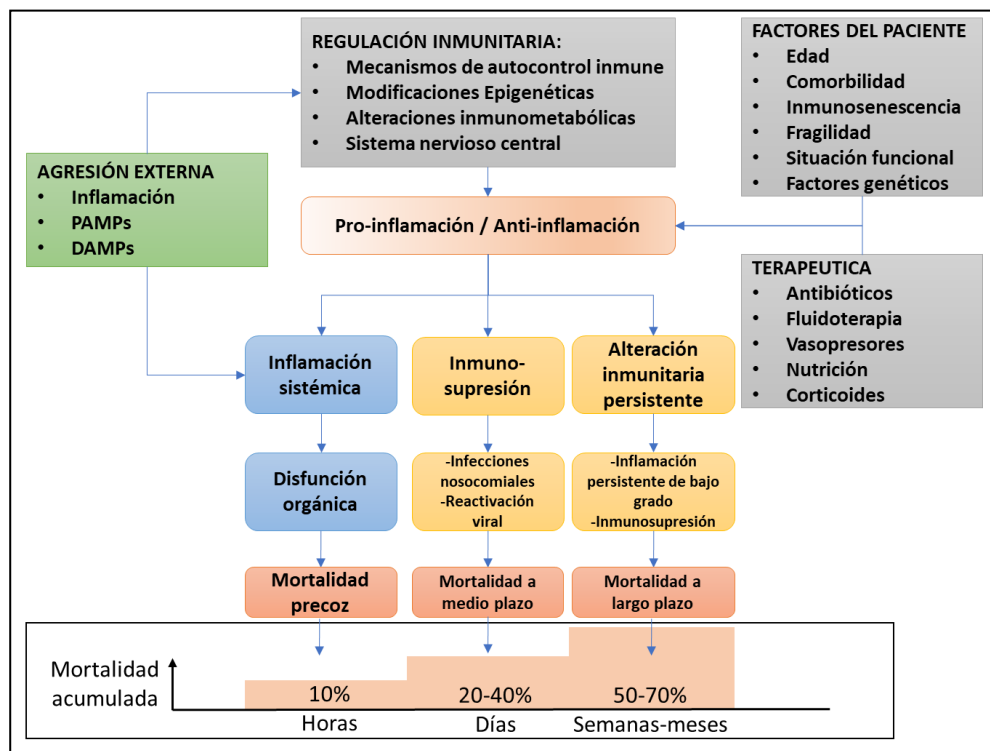


Figura 13. Pronóstico en la sepsis

Las infecciones suponen una agresión al organismo que desencadena una respuesta inmunitaria compleja que comienza por la activación de los mecanismos inflamatorios. La regulación del sistema inmunitario durante la sepsis implica una variedad de procesos (marcas epigenéticas, eje inmunometabólico, sistema nervioso central...). Su alteración puede conllevar la pérdida del equilibrio entre factores proinflamatorios y antiinflamatorios, que también puede verse influida por factores como las características individuales del paciente y los tratamientos aplicados. Esta desregulación inmunitaria puede llevar a una respuesta proinflamatoria excesiva, inmunosupresión y trastornos inmunológicos persistentes que conlleva consecuencias clínicas negativas como la aparición de fallos orgánicos, un mayor riesgo de infecciones secundarias y un incremento de la mortalidad.

DAMP: patrón molecular asociado a daño tisular; PAMP: patrón molecular asociado a patógenos.

Fuente: Adaptado de Venet et al: Nat Rev Neph. 2018 (79)

1.5.1. Factores relacionados con el pronóstico dependientes del hospedador

La incidencia de infecciones y de sepsis aumenta con la edad y de forma desproporcionada en los ancianos, de manera que más de la mitad de los casos de sepsis ocurren a partir de los 65 años (103). Además, la edad también se relaciona con mayor mortalidad en la sepsis. Entre los motivos de este fenómeno se encuentran un deterioro de la inmunidad secundaria al envejecimiento conocido como inmunosenescencia (113).

La inmunosenescencia afecta tanto a la inmunidad innata como a la adquirida (humoral y celular). En pacientes ancianos, tanto la capacidad proliferativa como el número de células precursoras hematopoyéticas se ve reducido. A partir de los 60 años se produce una involución acelerada del timo que causa un descenso de la producción de linfocitos CD4 y CD8, que llevan a una peor respuesta ante la exposición a nuevos antígenos. Se ha descrito también una pérdida de función de la quimiotaxis, fagocitosis, producción de citoquinas y de presentación de antígenos de los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Además, existen alteraciones en los mediadores de la inflamación, de manera que los niveles plasmáticos de IL-10 se encuentra aumentados, inhibiendo la activación inmunitaria (113). Sin embargo, también se han demostrado niveles elevados de IL-6, IL-1 y TNF α en la población de edad avanzada; favoreciendo un estado pro-inflamatorio subclínico y una mayor apoptosis linfocitaria. Por otro lado, las células plasmáticas B disminuyen, con un aumento paradójico de los niveles de inmunoglobulinas

circulantes debido a la producción de anticuerpos poliespecíficos con baja afinidad por antígenos, muchos de los cuales reaccionan como anticuerpos autoinmunitarios (114). El cociente CD4/CD8, que habitualmente se encuentra entre 1 y 2, se ha utilizado como marcador de inmunosenescencia cuando está disminuido. Además, se ha observado un cociente CD4/CD8 más bajo en los pacientes con sepsis que fallecen respecto a los supervivientes. Otros marcadores de inmunosenescencia que pueden utilizarse son la disminución de linfocitos T naïve con un aumento de linfocitos T diferenciados, una reducción de la función de las células NK y una menor la respuesta a la vacunación (79,113).

Los mecanismos epigenéticos también parecen tener un papel relevante en la inmunosenescencia. La evidencia existente sugiere un posible eje metabólico-epigenético que regula la senescencia de las células T, en la que la función mitocondrial juega un papel mediador importante. Algunas marcas epigenéticas conocidas y que están asociadas al envejecimiento son los cambios en los patrones de metilación del ADN global asociados a la edad; un aumento de la acetilación y fosforilación de las histonas con un aumento de la heterocromatina; algunas PTMs específicas asociadas al envejecimiento (como la trimetilación de H4), o un aumento de microARN que interfieren en el desarrollo y la diferenciación linfocitaria T y B, disminuyendo la respuesta inmunitaria a medida que los individuos van envejeciendo (115).

Además, otros factores de riesgo que aumentan la incidencia y empeoran el pronóstico de la sepsis son frecuentes

en ancianos, como una mayor carga de enfermedades crónicas previas, mayor riesgo de desnutrición y peor situación funcional previa (105,116). Entre las comorbilidades que más peso tienen en el desarrollo de la sepsis, se han descrito el cáncer, la obesidad, las inmunodeficiencias y la enfermedad renal crónica avanzada (104). La institucionalización en hospitales o residencias, la instrumentación o cirugías previas, la fragilidad y el deterioro cognitivo también aumentan la incidencia de la sepsis (105). Aunque estos factores son más frecuentes en ancianos, han demostrado tener un efecto independiente de la edad.

La fragilidad es un síndrome clínico común en adultos mayores y ancianos que se ha definido como una situación de vulnerabilidad y menor reserva fisiológica que predispone a un mayor riesgo de pérdida de la independencia para actividades de la vida diaria tras sufrir un proceso agudo (117). Se ha relacionado con un gran número de problemas médicos, incluyendo un mayor riesgo de caídas, hospitalización, infecciones y sepsis (118). Entre las herramientas para su diagnóstico e identificación, el cuestionario FRAIL es breve y fácil de reproducir, con buena correlación con los criterios fenotípicos clásicamente utilizados (119).

Respecto al pronóstico a largo plazo, los estudios que analizan factores predictores de mayor mortalidad o deterioro funcional y de calidad de vida a largo plazo han encontrado como determinantes fundamentales la fragilidad (118), la mayor comorbilidad previa y el peor estado funcional previo (111,120). Sin embargo, todavía no se han descrito biomarcadores precisos

ni otros factores directamente relacionados con la infección que puedan ayudar a identificar los pacientes con mayor riesgo de deterioro posterior.

1.5.2. Factores relacionados con el pronóstico dependientes de la terapéutica

Es bien conocido que la administración temprana de la terapia antibiótica adecuada se asocia con una reducción de la tasa de mortalidad, al igual que restablecer una adecuada perfusión tisular (63). De esta manera se ha preconizado la importancia del diagnóstico e inicio precoz de tratamiento, junto a la reposición de volumen con fluidoterapia adecuada, como medidas fundamentales para mejorar el pronóstico de la fase aguda de la sepsis. Estas medidas generalmente se agrupan en “*bundles*” o conjuntos de intervenciones que deben aplicarse en un periodo de tiempo breve para mejorar la supervivencia (121).

Por el contrario, haber recibido un tratamiento antibiótico en los últimos 90 días se asocia con tasas más altas de resistencia a los antibióticos, haciendo menos probable que se elija la terapia antibiótica empírica adecuada, y pudiendo contribuir a una mayor mortalidad (122) ya que la idoneidad del tratamiento antibiótico escogido inicialmente de forma empírica es también un factor bien establecido (123).

Respecto al pronóstico a largo plazo, no hay medidas terapéuticas con suficiente evidencia para promover su uso generalizado. Algunos autores promueven que, en los meses posteriores al alta hospitalaria por sepsis, debería hacerse un esfuerzo en identificar nuevos problemas físicos, mentales y cognitivos y derivarlos para el tratamiento adecuado (124).

Por todo lo descrito, se pone de manifiesto la necesidad de comprender mejor los mecanismos causantes del deterioro a largo plazo de la sepsis para lo cual puede ser fundamental identificar biomarcadores que ayuden a prever la evolución de los pacientes y guiar su tratamiento, así como identificar potenciales dianas terapéuticas y desarrollar medidas para mejorar el pronóstico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los pacientes que padecen un episodio de sepsis tienen un peor pronóstico a corto y largo plazo que aquellos pacientes que presentan una infección del mismo foco, pero no desarrollan sepsis. Este peor pronóstico puede deberse a la mortalidad causada por la sepsis, principalmente en la fase aguda, o a una pérdida progresiva del estatus funcional o de la calidad de vida de los pacientes respecto a la situación previa al episodio de sepsis en los meses sucesivos.

Existen alteraciones epigenéticas en los pacientes con sepsis que pueden asociarse a un peor pronóstico. La identificación de patrones diferenciales de metilación del ADN entre pacientes con sepsis y pacientes con infección del mismo foco sin sepsis puede ayudar a conocer mejor los mecanismos que regulan los procesos inflamatorios e inmunológicos implicados en la fisiopatología de la sepsis. La persistencia en el tiempo de estos cambios epigenéticos puede estar relacionada con el pronóstico a largo plazo.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivos principales

1. Conocer si los pacientes con sepsis tienen un peor pronóstico vital y funcional a largo plazo que aquellos con infecciones del mismo foco que requieren ser hospitalizados pero que no desarrollan sepsis.
2. Determinar los factores clínicos y epigenéticos relacionados con el pronóstico a corto y largo plazo de los pacientes con sepsis.

2.2.2. Objetivos secundarios

1. Conocer la mortalidad por todas las causas a los 30 días y a los 12 meses de un episodio de sepsis, y compararla con la mortalidad en pacientes sin sepsis.
2. Conocer los reingresos a los 30 días y a los 12 meses de un episodio de sepsis, y compararlo con los de aquellos que ingresaron con infecciones del mismo foco sin sepsis.
3. Establecer si se produce un cambio en el estatus funcional y la calidad de vida de los pacientes a los 12 meses de un episodio de sepsis, en comparación con aquellos pacientes con infección sin sepsis.
4. Identificar posibles factores asociados con el deterioro funcional a los 12 meses de un episodio de sepsis,

particularmente relacionados con la situación nutricional, comorbilidad y criterios de fragilidad preexistentes.

5. Conocer si existe progresión de las enfermedades crónicas preexistentes o si se desarrollan nuevas enfermedades crónicas en los pacientes con sepsis a los 12 meses del episodio, y compararla con aquellos con infecciones sin sepsis.
6. Conocer si los pacientes presentan un aumento de nuevas infecciones en los 12 meses tras un episodio de sepsis, y compararla con aquellos que tuvieron una infección sin desarrollar sepsis.
7. Analizar la variación de parámetros biológicos y las marcas epigenéticas durante la sepsis, a fin de conocer los mecanismos inflamatorios e inmunitarios y su relación con el pronóstico de la sepsis.
8. Identificar los cambios en la metilación del ADN que ocurren durante la sepsis, particularmente en aquellos genes implicados en la respuesta inmunitaria, y analizar su relación con la gravedad de la sepsis y el pronóstico a corto y largo plazo, a fin de conocer si pueden ser utilizados como biomarcadores y su relación con los mecanismos inflamatorios e inmunitarios implicados en la fisiopatología en la sepsis.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO. ASPECTOS ÉTICOS

3.1.1. Diseño del estudio

Estudio de cohortes prospectivo con pacientes mayores de 18 años que ingresaron en un Hospital Universitario por una infección adquirida en la comunidad entre septiembre de 2019 y diciembre de 2023.

Los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión fueron informados adecuadamente del proyecto de estudio y, tras la aceptación de su participación en el estudio mediante la firma de los consentimientos informados (consentimiento específico del estudio y consentimiento de donación de muestras biológicas para investigación), fueron categorizados según tuvieran o no un diagnóstico de sepsis.

Se realizó la extracción de las muestras biológicas de sangre en las primeras 24h desde su ingreso hospitalario, y fueron almacenadas y conservadas en el Biobanco para la Investigación Biomédica y Salud Pública de la Comunidad Valenciana (IBSP-CV), para posteriormente analizar las marcas epigenéticas de ambos grupos.

Se recogieron variables clínicas y epidemiológicas, incluyendo la evaluación de la situación funcional y nutricional mediante escalas validadas. Para valorar el pronóstico a largo plazo entre el grupo de pacientes con sepsis (población de estudio)

y el grupo sin sepsis (controles) se recogieron variables como la mortalidad, los cambios en la situación funcional o en la calidad de vida, el desarrollo o progresión de enfermedades crónicas, la aparición de infecciones posteriores y la necesidad de nuevos ingresos hospitalarios.

Debido a una baja inclusión de pacientes en los primeros 12 meses del estudio, principalmente atribuida a los efectos de la pandemia de COVID-19 declarada en marzo de 2020, se realizó una enmienda del proyecto, aprobada por el Comité Ético, en el que se realizaron las siguientes modificaciones para la selección e inclusión de pacientes:

- Áreas asistenciales revisadas. Inicialmente solo se incluían pacientes del Servicio de Medicina Interna. Posteriormente se añadieron los Servicios de Medicina Digestiva, Neumología, Nefrología y Oncología, así como en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y la Unidad Médica de Corta Estancia (UMCE).
- Edad de participación: se amplió de >65 años a >18 años.
- Foco de infección: inicialmente solo se incluyeron pacientes con sepsis de foco urinario, ampliado a foco respiratorio (neumonía) e intraabdominal.

Posteriormente se realizó el seguimiento de los pacientes durante los siguientes 12 meses desde el alta hospitalaria. Para ello se registró un teléfono con el que se contactó con los pacientes y fueron citados en Consultas Externas. En dichas revisiones se extrajeron nuevas muestras de sangre que fueron almacenadas en el Biobanco para la IBSP-CV y los pacientes fueron evaluados clínicamente para determinar su estado

funcional y las posibles complicaciones desde el ingreso previo. Cuando los pacientes no pudieron acudir a Consultas Externas se les ofreció la posibilidad de realizar la extracción en el domicilio del paciente, donde acudió el investigador para realizar la extracción de muestras biológicas y la evaluación clínica.

3.1.2. Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo en condiciones de práctica clínica habitual. Las pruebas complementarias realizadas y los tratamientos aplicados no difirieron de los procedimientos usuales para la situación clínica del paciente. Por lo tanto, el riesgo para los pacientes no difiere de lo que sería en su atención médica habitual y no interrumpe las prácticas normales del médico a cargo del paciente.

Se obtuvo el consentimiento informado del paciente o de su representante legal en caso de que el paciente no pudiera dar su consentimiento previamente a la participación en el estudio. Se elaboró una hoja de información al paciente, un consentimiento informado específico para el estudio y otro consentimiento informado para la donación y almacenamiento de muestras biológicas en el biobanco, siendo necesaria la firma de ambos documentos (ver Anexo 1 y 2). Para la donación de muestras también se realizó un acuerdo de colaboración y depósito de muestras biológicas con el Biobanco para la IBSP-CV, aprobado por la Dirección del Departamento de Salud Valencia–Dr. Peset,

creándose la Colección “Sepsis” en la que se registraron y custodiaron las muestras.

La información clínica y epidemiológica de los pacientes se recopiló de forma anónima y confidencial en una Hoja de Recogida de Datos (ver Anexo 3). Para ello, cada paciente fue asignado a un código que coincide con su número de reclutamiento, asegurando el anonimato en la base de datos. Toda la información obtenida durante el estudio y los resultados fueron tratados con total confidencialidad. Así, el estudio se ajustó a los principios de la Declaración de Helsinki (versión de Fortaleza de 2013) (125); a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; y al artículo 58.2 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. El proyecto de investigación fue previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEIm) del Hospital Universitario Doctor Peset en una reunión celebrada el 27 de agosto de 2019 (Código CEIm: 73/19). Se realizó una enmienda del proyecto, aprobada por el CEIm en fecha 4 de agosto de 2020 (Ver Anexo 4).

3.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

3.2.1. Población y periodo de estudio

Pacientes mayores de 18 años que ingresan en el hospital con neumonía, infección abdominal o infección del tracto urinario procedentes de la comunidad entre septiembre de 2019 y diciembre de 2022, con seguimiento posterior durante 12 meses (hasta diciembre de 2023).

3.2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Se revisaron los pacientes que ingresaron en el Servicio de Medicina Interna, Medicina Digestiva, Neumología, Nefrología y Oncología, así como en la Unidad de Cuidados Intensivos y la Unidad de Corta Estancia. No se consideraron aquellos pacientes con necesidad de ingreso en servicios quirúrgicos.

Para ser considerados como candidatos a la inclusión en el estudio, los pacientes debían tener diagnóstico de neumonía, infección abdominal o infección del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad. Los criterios utilizados confirmar y establecer el diagnóstico de dichas infecciones se presentan en la tabla 9.

Se incluyeron de forma consecutiva aquellos pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ningún criterio de exclusión. Los criterios de inclusión y exclusión se presentan en la tabla 10.

Tabla 9. Criterios utilizados para el diagnóstico de la infección adquirida en la comunidad

Datos clínicos y exploraciones complementarias requeridas para el diagnóstico		Criterios de origen comunitario de la infección
Neumonía (126,127)	a) Cuadro clínico compatible: tos, fiebre, dolor torácico de características pleuríticas, disnea, expectoración... b) Infiltrado pulmonar visible en una radiografía de tórax.	AUSENCIA de: -Sospecha de infección adquirida durante un ingreso hospitalario reciente (p. ej: en las 1-2 semanas previas) -Cirugía o procedimiento reciente (p. ej: intubación orotraqueal, derivación urinaria...) como causa potencial de la infección.
Infección intra-abdominal (128)	a) Datos clínicos compatibles: dolor abdominal, fiebre, signo de Murphy o signos de irritación peritoneal... b) Datos de laboratorio o imagen radiológica compatible (por ejemplo, en el caso de colangitis: bilirrubina ≥ 2 mg/dl o enzimas hepáticas de citólisis o colestasis elevados $\geq 1,5$ veces el valor normal; e imágenes de dilatación u ocupación de la vía biliar)	
Infección urinaria (129)	a) Síndrome miccional agudo (disuria, polaquiuria, urgencia, tenesmo o molestias en región suprapúbica...) o clínica sugestiva de afectación sistémica (fiebre, deterioro del estado general, náuseas o vómitos, dolor en flanco o en fosa renal...) b) Alteración del sedimento urinario (leucocituria asociada o no a hematuria o detección de nitritos) y cultivo de orina positivo* ($\geq 10^3$ UFC/ml).	

UFC: Unidades formadoras de colonias.

*La presencia de cultivo negativo o contaminado no se consideró excluyente si se sospechó que la recogida de la muestra pudo ser inadecuada para cultivo, siempre que los criterios clínicos y de laboratorio apoyaran fuertemente el diagnóstico de ITU en ausencia de otro proceso que justificara el cuadro.

Tabla 10. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
1. Edad mayor de 18 años. 2. Ingreso hospitalario en un servicio médico de menos de 24h de duración en el momento de la evaluación. 3. Diagnóstico principal al ingreso de neumonía, infección abdominal (infección de la vía biliar, abscesos intra-abdominales y peritonitis secundaria) o ITU adquiridas en la comunidad.	1. Presencia de otro proceso agudo compatible con el cuadro clínico que justifica el ingreso. 2. Negativa a firmar el consentimiento informado. 3. Dependencia grave (Índice de Barthel ≤ 35) o comorbilidad previa con mal pronóstico vital previsible a corto plazo. 4. Pacientes inmunodeprimidos (trasplante de órgano sólido, fármacos inmunosupresores)

ITU: Infección del tracto urinario

3.2.3. Pacientes incluidos en el estudio

En el momento de la evaluación de los pacientes, previo a su inclusión en el estudio, se valoró la presencia de criterios de sepsis de acuerdo con los criterios Sepsis-3 mediante la aplicación de las escalas qSOFA y SOFA categorizando a los pacientes en un grupo con sepsis (población de estudio, con escala SOFA ≥ 2) y otro grupo con infección sin sepsis (controles). Para reducir la influencia del sexo, de la edad y del foco de infección sobre el pronóstico como posibles factores de confusión, se realizó un emparejamiento durante la selección de los casos. Así, todos los casos con sepsis que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión fueron propuestos para el estudio. Sin embargo, para que un paciente sin sepsis fuera incluido en el

estudio y asignado como control de un caso de sepsis, debieron cumplirse los siguientes requisitos:

- Edad similar (± 5 años)
- Mismo sexo
- Mismo foco de infección

En el periodo del estudio se revisaron un total de 789 pacientes, de los cuales 641 cumplían alguno de los criterios de exclusión. De los pacientes restantes, 148 no fueron incluidos por no cumplir criterios de sepsis y no disponer de un caso de sepsis para el emparejamiento. Finalmente se incluyeron 70 pacientes en el estudio. Durante el seguimiento posterior, tras el alta hospitalaria, hubo una pérdida de 13 pacientes debido a abandono del seguimiento o la retirada del consentimiento para la nueva extracción de muestras biológicas. Otro paciente tuvo que ser excluido debido a la pérdida de las muestras de ADN durante la extracción en el laboratorio. El diagrama de flujo se muestra en la figura 14.

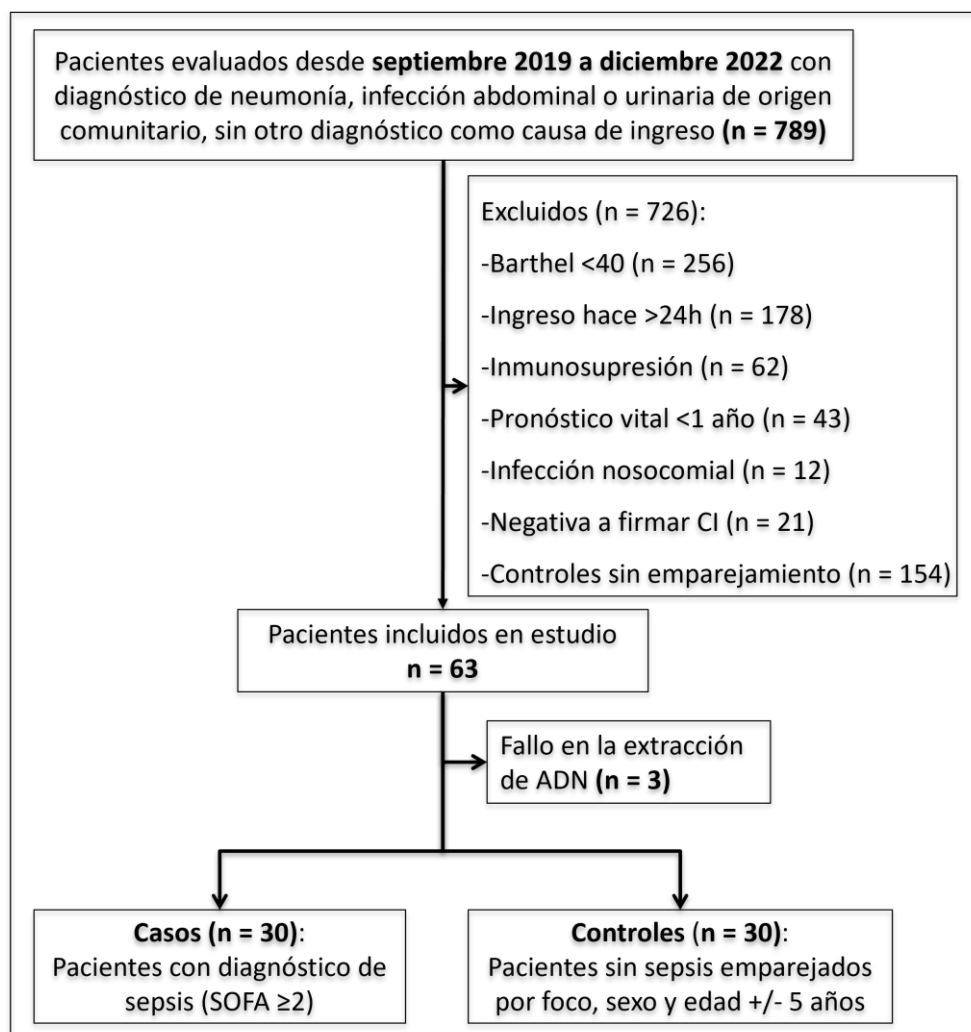


Figura 14. Diagrama de flujo

3.3. RECOGIDA DE INFORMACIÓN

Se recogieron de forma prospectiva los datos epidemiológicos, clínicos, microbiológicos y analíticos de los pacientes, quedando registrados en la hoja de recogida de datos (Anexo 3).

Los datos se obtuvieron directamente de los pacientes y sus familiares a través de la anamnesis, exploración física y realización de escalas, así como a través de la revisión de la historia clínica electrónica hospitalaria (programa informático *Orion Clinic*®) y de atención primaria (programa informático *Abucasis*®).

3.3.1. Registro de datos y definiciones

Durante el ingreso se recogieron los datos de filiación, como el sexo, la edad y el número de historia clínica (codificado mediante una sistemática preestablecida) y variables epidemiológicas tales como el tiempo estimado desde el inicio de los síntomas de infección hasta la atención en el hospital y hasta la primera dosis de antibiótico.

Se registraron las variables clínicas tales como los síntomas y signos del paciente, constantes vitales (tensión arterial, frecuencia cardiaca, temperatura, frecuencia respiratoria y saturación de oxígeno por pulsioximetría) y la escala de coma de Glasgow (130) cuyos ítems se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Escala de Coma de Glasgow

VARIABLE	RESPUESTA	PUNTACIÓN
Apertura ocular	Espontánea	4 puntos
	A la orden	3 puntos
	Ante un estímulo doloroso	2 puntos
	Ausencia de apertura ocular	1 punto
Respuesta verbal	Orientado correctamente	5 puntos
	Paciente confuso	4 puntos
	Lenguaje inapropiado	3 puntos
	Lenguaje incomprensible	2 puntos
	Ausencia de actividad verbal	1 punto
Respuesta motora	Obedece órdenes correctamente	6 puntos
	Localiza estímulos dolorosos	5 puntos
	Responde al estímulo doloroso, pero no localiza	4 puntos
	Respuesta con flexión anormal de los miembros	3 puntos
	Respuesta con extensión anormal de miembros	2 puntos
	Ausencia de respuesta motora	1 punto

Fuente: Adaptado de Teasdale et al: *Lancet Neurol.* 2014 (130)

Se definió la presencia de sepsis de acuerdo con las definiciones actuales del Consenso Sepsis-3, utilizando las escalas Quick-SOFA y SOFA descritas en el apartado de introducción y detalladas en las tablas 4 y 5, y de acuerdo con el algoritmo presentado en la figura 2.

También se valoró la gravedad al ingreso mediante la escala APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*) (131) cuya sistemática de evaluación se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Sistema de puntuación APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II)

Acute Physiology Score (APS)									
	VALOR POR ENCIMA DE LA NORMALIDAD				VALOR NORMAL	VALOR POR DEBAJO DE LA NORMALIDA			
PUNTUACIÓN	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
VARIABLES									
Tª rectal (°C)	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	<30
TAM (mmHg)	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		<50
FC (lpm)	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<40
FR (rpm)	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<6
Oxigenación: -Gradiente A-aO2 (FiO2 ≥0,5) -PaO2 (solo si FiO2 <0,5)	≥500	350- 499	200-349		< 200				
					> 70	61-70		55-60	<56
pH arterial (preferido)	≥7,7	7,6- 7,59		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
HCO3 ⁻ (mEq/l)	≥52	41- 51,9		32-40,9	22-31,9		18-21,9	15-17,9	<15
Na ⁺ sérico (mEq/l)	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	<111
K ⁺ sérico (mEq/l)	≥7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		<2,5
Cr sérica (mg/dl)	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hematocrito (%)	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
Leucocitos (cél/mm ³)	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1
Escala de coma de Glasgow	Puntuación: 15 – puntuación actual de escala de coma de Glasgow								

PUNTUACIÓN APACHE II = SUMA DE A+B+C		
A. APS: Suma de la puntuación de las 12 variables individuales	B. Edad (años): <45 = 0 puntos 45-54 = 2 puntos 55-64 = 3 puntos 65-74 = 5 puntos ≥75 = 6 puntos	C. Puntuación por enfermedad orgánica crónica avanzada*: -Pacientes tras cirugía urgente o no quirúrgicos: +5 puntos por comorbilidad -Pacientes postquirúrgicos de cirugía electiva: +2 puntos por comorbilidad
Riesgo de mortalidad: 0-4 puntos = 4%; 5-9 = 8%; 10-14 = 15%; 15-19 = 25%; 20-24 = 40%; 25-29 = 55%; 30-34: 75%; ≥35 = 85%		

Tª: Temperatura; TA: tensión arterial media; FC: frecuencia cardiaca; FR: frecuencia respiratoria, Na⁺: sodio; K⁺: potasio; Cr: creatinina.

*Cirrosis hepática con hipertensión portal o fallo hepático agudo previo; enfermedad cardiovascular con grado IV de la NYHA (*New York Heart Association*); enfermedad pulmonar crónica grave con hipercapnia, necesidad de oxigenoterapia domiciliaria o hipertensión pulmonar, inmunosupresión, enfermedad renal crónica en hemodiálisis.

Fuente: Adaptado de Knaus et al: *Crit. Care Med.* 1987 (131)

Se valoró la presencia de criterios de infección urinaria asociada a cuidados sanitarios, tales como: 1) haber estado ingresado en un hospital en los 3 meses previos, 2) haber recibido antibioterapia los 3 meses previos y 3) vivir habitualmente en una residencia geriátrica (132). No se contemplaron los criterios de neumonía asociada a cuidados sanitarios debido a la recomendación en contra de su uso por parte de las guías clínicas internacionales para el tratamiento de la neumonía (126,133).

Para la valoración de la comorbilidad preexistente se utilizó el índice de Comorbilidad de Charlson ajustado por la edad cuyas variables y puntuaciones se presentan en la tabla 13. Una puntuación total ≥ 3 es considerada como comorbilidad alta al estimarse una predicción de la mortalidad en torno al 52% anual, si bien una ≥ 5 se ha relacionado con una predicción de mortalidad en torno al 85% (134). Se registraron de forma independiente las principales comorbilidades preexistentes:

- Enfermedades cardiovasculares: Cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica.
- Enfermedades del aparato digestivo: Úlcera péptica, hepatopatía crónica.
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- Enfermedad renal crónica (ERC).
- Diabetes mellitus (DM).
- Enfermedades neurológicas: Demencia, enfermedad cerebrovascular.
- Enfermedades del tejido conectivo.

- Neoplasia sólida o hematológica.
- Patología urológica: Hipertrofia benigna de próstata, cáncer de próstata, estenosis uretral, litiasis urinaria, incontinencia urinaria, síntomas del tracto urinario inferior.
- Antecedentes de intervenciones quirúrgicas en los 3 meses previos, presencia de catéter urinario o instrumentalización de la vía urinaria.

Tabla 13. Índice de Comorbilidad de Charlson ajustado por la edad

Cardiopatía isquémica	1 punto
Insuficiencia cardíaca	1 punto
Enfermedad vascular periférica	1 punto
Enfermedad cerebrovascular	1 punto
Demencia	1 punto
Enfermedad pulmonar crónica	1 punto
Enfermedad del tejido conectivo	1 punto
Úlcera péptica	1 punto
Enfermedad hepática	Leve = 1 punto Moderada-Grave = 3 puntos
Diabetes mellitus	Sin daño orgánico = 1 punto Con lesión orgánica = 2 puntos
Hemiplejia o paraplejia	2 puntos
Enfermedad renal moderada-grave	2 puntos
Leucemia aguda o crónica. Linfoma	2 puntos
Tumor sólido	Sin metástasis = 2 puntos Con metástasis = 6 puntos
Infección VIH estadio SIDA	6 puntos
Edad ≥50 años	50-59 años = 1 punto 60-69 años = 2 puntos 70-79 años = 3 puntos 80-89 años = 4 puntos 90-99 años = 5 puntos

Fuente: Adaptado de Charlson et al: *J. Clin. Epidemiol.* 1994 (134)

Como parte de la valoración integral de la situación previa de los pacientes se evaluó la presencia de criterios de fragilidad, para lo cual se seleccionó como herramienta de cribado por su sencillez y precisión la escala FRAIL (*fatigue, resistance, aerobic capacity, illnesses and loss of weight*) (135), que se muestra en la tabla 14. También se realizó una valoración del estado nutricional con la escala de cribado de desnutrición conocida como *Mini Nutritional Assessment Short Form* (MNA-SF) (136) representada en la tabla 15, y se registró el número de fármacos crónicos prescritos a cada paciente para valorar la presencia de polifarmacia, empleando como punto de corte el uso de ≥ 5 fármacos por ser el más frecuentemente utilizado (137).

Tabla 14. Escala FRAIL (*fatigue, resistance, aerobic capacity, illnesses and loss of weight*)

Fatigabilidad	¿Qué parte del tiempo durante las últimas 4 semanas se sintió cansado/a?	Todo o la mayor parte del tiempo = 1 En ocasiones o nunca = 0
Resistencia	¿Su salud le limita para subir 10 escalones (1 piso)?	Sí = 1 No = 0
Deambulaci3n	¿Tiene alguna limitaci3n para caminar medio kil3metro sin ayuda?	Sí = 1 No = 0
Comorbilidad	Número de enfermedades entre las siguientes: hipertensi3n, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar cr3nica, asma, c3ncer, artritis, ictus, enfermedad renal	<4 enfermedades = 0 ≥ 5 enfermedades = 1
Pérdida de peso	¿Ha perdido más del 10% de su peso en los últimos 4 años?	Sí = 1 No = 0
PACIENTE PRE-FRÁGIL = 1-2 PUNTOS; PACIENTE FRÁGIL = 3-5 PUNTOS		

Fuente: Adaptado de Thompson et al: *Australas. J. Ageing*. 2020 (135)

Tabla 15. Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF)

¿Ha comido menos por falta de apetito, problemas digestivos, dificultades de masticación o deglución en los últimos 3 meses?	Ha comido mucho menos	0
	Ha comido menos	1
	Ha comido igual	2
Pérdida de peso en los últimos 3 meses	Pérdida de peso >3kg	0
	No lo sabe	1
	Pérdida de peso entre 1 y 3kg	2
	No ha habido pérdida de peso	3
Movilidad	De la cama al sillón	0
	Autonomía en el interior de casa	1
	Sale del domicilio	2
Enfermedad aguda o situación de estrés psicológico (últimos 3 meses)	Si	0
	No	2
Problemas neuropsicológicos	Deterioro cognitivo grave	0
	Deterioro cognitivo leve	1
	No deterioro cognitivo	2
Índice de masa corporal (IMC)	IMC <19	0
	19 < IMC < 21	1
	21 < IMC <23	2
ESTADO NUTRICIONAL NORMAL ≥12 puntos RIESGO DE MALNUTRICIÓN = 8-11 puntos MALNUTRICIÓN ≤ 7 puntos		

Fuente: Adaptado de Kaiser et al: *J. Nutr. Health Aging*. 2009 (136)

El grado de dependencia para actividades básicas e instrumentales de la vida diaria, así como la valoración subjetiva por parte del paciente de su calidad de vida, fueron evaluados tanto al ingreso como a los 12 meses. Para ello se utilizaron escalas de valoración funcional habitualmente utilizadas en la práctica clínica, como son el Índice de Barthel (138) para la evaluación de las actividades básicas de la vida diaria (ABVD), representada en la tabla 16, y la escala de Lawton y Brody (139) de actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD), representada en la tabla 17. Para la valoración de la calidad de vida se seleccionó la escala EuroQol-5D (EQ-5D), validada en un amplio número de situaciones clínicas y para el seguimiento en cuadros crónicos (140) (ver figuras 15 y 16).

Tabla 16. Índice de Barthel: Actividades básicas de la vida diaria (ABVD)

ACTIVIDAD	SITUACIÓN DEL PACIENTE	PUNTUACIÓN
Comer	Totalmente independiente	10 puntos
	Necesita ayuda para cortar carne, el pan	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Lavarse	Independiente: entra y sale solo del baño	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Vestirse	Independiente: capaz de ponerse y de quitarse la ropa, abotonarse, atarse los zapatos	10 puntos
	Necesita ayuda	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Arreglarse	Independiente para lavarse la cara, las manos, peinarse, afeitarse, maquillarse, etc.	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Deposiciones	Continencia normal	10 puntos
	Ocasionalmente algún episodio de incontinencia (o ayuda para administrarse supositorios...)	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Micción	Continencia normal, o es capaz de cuidarse de la sonda si tiene una puesta	10 puntos
	Un episodio diario como máximo de incontinencia, o necesita ayuda para cuidar de la sonda	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Usar el retrete	Independiente para ir al cuarto de aseo, quitarse y ponerse la ropa...	10 puntos
	Necesita ayuda para ir al retrete, pero se limpia solo	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Trasladarse	Independiente para ir del sillón a la cama	15 puntos
	Mínima ayuda física o supervisión para hacerlo	10 puntos
	Necesita gran ayuda, pero es capaz de mantenerse sentado solo	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Deambular	Independiente, camina solo 50 metros	15 puntos
	Necesita ayuda física o supervisión para caminar 50 metros	10 puntos
	Independiente en silla de ruedas sin ayuda	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
Escalones	Independiente para bajar y subir escaleras	10 puntos
	Necesita ayuda física o supervisión para hacerlo	5 puntos
	Dependiente	0 puntos
GRADO DE DEPENDENCIA	INDEPENDIENTE = 100 puntos DEPENDENCIA LEVE = 60-90 puntos DEPENDENCIA MODERADA = 40-55 puntos DEPENDENCIA GRAVE = 20-35 puntos DEPENDENCIA TOTAL < 20 puntos	

Fuente: Adaptado de Mahoney et al: Md State Med J. 1965 (138)

Tabla 17. Escala de Lawton y Brody de actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD)

ACTIVIDAD Y SITUACIÓN DEL PCIENTE	Puntos
1. CAPACIDAD PARA USAR EL TELÉFONO:	
- Utiliza el teléfono por iniciativa propia	1
- Es capaz de marcar bien algunos números familiares	1
- Es capaz de contestar al teléfono, pero no de marcar	1
- No es capaz de usar el teléfono	0
2. HACER COMPRAS:	
- Realiza todas las compras necesarias independientemente	1
- Realiza independientemente pequeñas compras	0
- Necesita ir acompañado para hacer cualquier compra	0
- Totalmente incapaz de comprar	0
3. USO DE MEDIOS DE TRANSPORTE:	
- Viaja solo en transporte público o conduce su propio coche	1
- Es capaz de coger un taxi, pero no usa otro medio de transporte	1
- Viaja en transporte público cuando va acompañado por otra persona	1
- Sólo utiliza el taxi o el automóvil con ayuda de otros	0
- No viaja	0
4. RESPONSABILIDAD RESPECTO A SU MEDICACIÓN:	
- Es capaz de tomar su medicación a la hora y con la dosis correcta	1
- Toma su medicación si la dosis le es preparada previamente	0
- No es capaz de administrarse su medicación	0
5. MANEJO DE SUS ASUNTOS ECONÓMICOS:	
- Se encarga de sus asuntos económicos por sí solo	1
- Realiza las compras de cada día, pero necesita ayuda en las grandes compras, bancos...	1
- Incapaz de manejar dinero	0
6. PREPARACIÓN DE LA COMIDA	
- Organiza, prepara y sirve las comidas por sí solo adecuadamente	1
- Prepara adecuadamente las comidas si le proporcionan los ingredientes	0
- Prepara, calienta y sirve las comidas, pero no consigue dieta adecuada	0
- Necesita que le sirvan y le preparen las comidas	0
7. LAVADO DE LA ROPA:	
- Lava por sí solo toda su ropa	1
- Lava por sí solo pequeñas prendas	1
- Todo el lavado de ropa debe ser realizado por otro	0
8. CUIDADO DE LA CASA:	
- Mantiene la casa solo o con ayuda ocasional (para trabajos pesados)	1
- Realiza tareas ligeras, como lavar los platos o hacer las camas	1
- Realiza tareas ligeras, pero no puede mantener una adecuada limpieza	1
- Necesita ayuda en todas las labores de la casa	1
- No participa en ninguna labor de la casa	0
AUTONOMÍA PARA ACTIVIDADES INSTRUMENTALES = 8 puntos	
DEPENDENCIA LEVE = 6-7 puntos	
DEPENDENCIA MODERADA = 4-5 puntos	
DEPENDENCIA GRAVE = 2-3 puntos	
DEPENDENCIA TOTAL = 0-1 puntos	

Fuente: Adaptado de Lawton et al: Gerontologist. 1969 (139)

Marque con una cruz la respuesta de cada apartado que mejor describa su estado de salud el día de HOY.

Movilidad

No tengo problemas para caminar ☐

Tengo algunos problemas para caminar ☐

Tengo que estar en la cama ☐

Cuidado Personal

No tengo problemas con el cuidado personal ☐

Tengo algunos problemas para lavarme o vestirme ☐

Soy incapaz de lavarme o vestirme ☐

Actividades Cotidianas *(ej, trabajar, estudiar, hacer las tareas domésticas, actividades familiares o actividades durante el tiempo libre)*

No tengo problemas para realizar mis actividades cotidianas ☐

Tengo algunos problemas para realizar mis actividades cotidianas ☐

Soy incapaz de realizar mis actividades cotidianas ☐

Dolor / Malestar

No tengo dolor ni malestar ☐

Tengo moderado dolor o malestar ☐

Tengo mucho dolor o malestar ☐

Ansiedad / Depresión

No estoy ansioso ni deprimido ☐

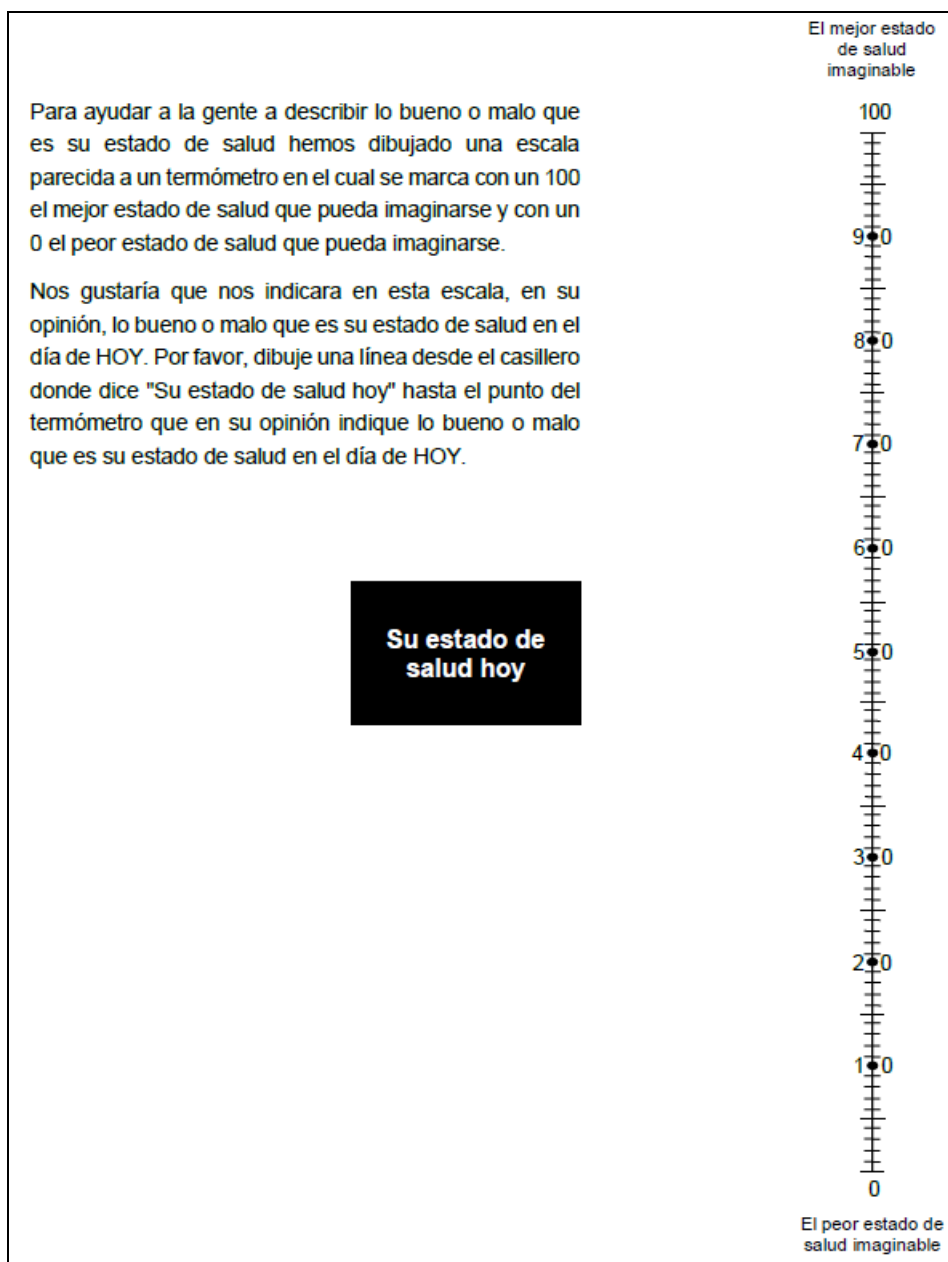
Estoy moderadamente ansioso o deprimido ☐

Estoy muy ansioso o deprimido ☐

Spain (Spanish) © 1992 EuroQol Group EQ-5D™ is a trade mark of the EuroQol Group

Figura 15. EuroQol-5D: Sistema de evaluación de calidad de vida (EQ-5D-3L)

Fuente: Tomado de <https://euroqol.org/eq-5d-instruments/>



Spain (Spanish) © 1992 EuroQol Group EQ-5D™ is a trade mark of the EuroQol Group

Figura 16. EuroQol-5D: Escala visual analógica de calidad de vida (EQ-EVA)

Fuente: Tomado de <https://euroqol.org/eq-5d-instruments/>

Las pruebas de laboratorio registradas incluyeron una analítica general realizada en las primeras 24h con hemograma y citometría de poblaciones linfocitarias, estudio de coagulación completo, bioquímica estándar (con valoración de glucosa, perfil hepático, renal y albúmina), velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT) y gasometría venosa con lactato. Las determinaciones se realizaron según el procedimiento habitual de práctica clínica, mediante uso del equipo *Alinity*TM (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA, EE.UU.) y los kits de reactivos específicos para cada determinación. En los casos de infección de orina también se registraron los resultados del estudio de anormales y sedimento de orina.

Se recogieron datos microbiológicos mediante la obtención y cultivo de muestras de orina, sangre y esputo, y se realizaron pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos cuando se logró aislar microorganismos. Su objetivo fue identificar los patógenos causantes de las infecciones, analizar sus patrones de resistencia, y detectar casos complicados con bacteriemia o infecciones polimicrobianas. Para la identificación de los microorganismos y las pruebas de sensibilidad a antibióticos se emplearon sistemas como *Bruker MALDI Biotyper* y *DxM MicroScan WalkAway* (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), respectivamente, siguiendo las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) y EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Se registró la presencia de bacterias resistentes a múltiples fármacos (*Multidrug-resistant bacteria*, MDRB) definidas como la falta de sensibilidad a al

menos un agente de tres o más categorías de antimicrobianos a los que habitualmente son sensibles (141).

Los tratamientos recibidos por paciente fueron recogidos, incluyendo los antibióticos empíricos y dirigidos y su duración, la fluidoterapia administrada en las primeras 24h y los fármacos vasoactivos. Se definió terapia antimicrobiana empírica inadecuada (TAEI) como la presencia de infección resistente al tratamiento empírico en uso en el momento de obtención de los resultados de antibiograma (si se logró aislamiento). Se recogió el cumplimiento del llamado "*Bundle-1h*", que incluye 5 medidas a aplicar en la primera hora: la medición de los niveles de lactato, la extracción de hemocultivos previo al inicio de antibioterapia, la administración de antibioterapia empírica de amplio espectro, la administración rápida de cristaloides (30 ml/kg) si hay hipotensión o cifras de lactato ≥ 4 mmol/L y la administración de vasopresores si persiste la TAM ≤ 65 mmHg tras la fluidoterapia (142).

Para la valoración del pronóstico se recogieron datos de la evolución del paciente durante el ingreso como el tiempo hasta la estabilización (definido como el número de días hasta la apirexia y estabilidad hemodinámica), la estancia hospitalaria en días, la estancia en UCI (si fue necesario), y la mortalidad durante el ingreso. En el seguimiento posterior se recogieron los eventos ocurridos tras el alta (transcurridos 12 meses desde el ingreso) incluyendo la mortalidad a los 30 días y 12 meses, el número de

reingresos en el hospital, el número de nuevas infecciones (tanto si requirieron ingreso como si fueron tratadas de forma ambulatoria), la aparición de nuevas enfermedades crónicas o progresión de las previas (incluyendo revaloración del Índice de Comorbilidad Charlson) y los cambios en las escalas de valoración funcional y de calidad de vida (Índice de Barthel, Escala de Lawton y EuroQol-5D). Se definieron variables combinadas de mal pronóstico a corto y largo plazo. Se consideró mal pronóstico a corto plazo cuando se cumplía cualquiera de los siguientes sucesos: muerte durante el ingreso o en los primeros 30 días tras el alta, necesidad de ingreso en UCI, o reingreso en los siguientes 30 días tras el alta hospitalaria. Se consideró mal pronóstico a largo plazo cuando se cumplía cualquiera de los siguientes eventos: muerte durante la partición del estudio, pérdida ≥ 10 puntos en el índice de Barthel, pérdida ≥ 2 puntos en la escala de Lawton, o pérdida ≥ 10 puntos en la escala analógica de calidad de vida EuroQol. También se extrajeron muestras de sangre de control para repetir la analítica básica general, los niveles de poblaciones linfocitarias y depositar en el biobanco las muestras de control para repetir el estudio de las marcas epigenéticas en el futuro.

3.4. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.4.1. Obtención y uso de muestras de sangre

Se tomaron 3 muestras de sangre periférica para su almacenamiento en el biobanco en el momento del ingreso hospitalario y a los 12 meses tras el alta. Para ello, en cada una de las ocasiones se realizó la extracción de 6 mL de sangre periférica en un tubo de EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético), 3 mL de sangre en un tubo de heparina de sodio y 10 mL en un tubo de *Serum Gel* para la obtención del ADN, plasma y suero respectivamente. En los casos de pacientes con dificultades significativas para desplazarse al hospital durante el seguimiento, se realizaron las extracciones en su domicilio. Las muestras fueron enviadas al personal del biobanco, encargado de su procesamiento y alicuotado, así como de su conservación y del registro de donantes. Todo el ADN extraído de una fracción de los leucocitos de las muestras fue almacenado por el Biobanco en alícuotas de 500 µl con una concentración normalizada de 50 ng/µl. Posteriormente las muestras de ADN de los pacientes fueron solicitadas al Biobanco IBSP-CV para su envío al centro externo para el análisis de metilación del ADN.

3.4.2. Análisis de la metilación del ADN por *arrays* de metilación EPIC850k v2.0

Para el análisis de las muestras extraídas al ingreso se solicitaron 500-1000 ng de ADN de cada uno de los pacientes con

sepsis y sin sepsis para su análisis, que fue enviado desde el Biobanco IBSP-CV al laboratorio de EpiDisease SL (*Spin-Off* de la Universitat de València, el Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA y el Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red del Instituto de Salud Carlos III), empresa biotecnológica de investigación epigenética, ubicada en el Parque Científico del Campus de Burjassot de la Universitat de València.

En el laboratorio se cuantificó de nuevo el ADN mediante fluorimetría con un equipo *Qubit*TM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para confirmar la adecuada cantidad de muestra.

El procedimiento de análisis del ADN se realizó mediante técnicas de amplificación del genoma completo (WGA, *Whole Genoma Amplification*) e hibridación del ADN en matrices o *arrays* de metilación *Infinium methylation arrays* EPIC850K v2.0 (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) que se llevó a cabo a lo largo de 4 días, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. De forma resumida se presentan los principales pasos del proceso (ver Figuras 17 y 18):

- Conversión del ADN con bisulfito de sodio mediante un kit de metilación EZ DNA (*Zymo Research*, CA, EE.UU.) (Cat No.: D5001). Así los residuos de citosina son convertidos a uracilo pero las citosinas metiladas no se ven afectadas durante el proceso de amplificación. Para ello se utilizaron 500 ng de DNA de cada muestra y se normalizaron a una concentración de 10ng/μL, añadiendo la cantidad de H₂O necesaria para conseguir un volumen final de 50 μL.

- Amplificación del genoma completo. Para ello se requieren 4µl de ADN convertido con bisulfito de cada paciente. Se realizó una desnaturalización de ADN con hidróxido de sodio (NaOH) y posteriormente, tras adición de los cebadores y la polimerasa, se llevó a cabo una amplificación isotérmica incubando el ADN durante 20-24h a 37°.
- Fragmentación enzimática del ADN amplificado mediante endonucleasas que lo cortan de forma aleatoria, seguida de una fase de precipitación y resuspensión del ADN, con la finalidad de preparar las muestras para la hibridación de forma óptima.
- Hibridación del ADN con las matrices o *arrays* de metilación *Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip* (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Estas matrices presentan sondas de oligonucleótidos para más de 925.000 sitios CpG de múltiples genes, potenciadores y regiones promotoras. De esta manera abarca prácticamente la totalidad de los sitios CpG de los genes que poseen regulación por metilación descritos hasta ahora en proyectos como ENCODE y FANTOM5, así como de las islas CpG. El proceso requirió desnaturalizar de nuevo el DNA de las muestras en un bloque térmico a 95° y transferirlo a las matrices, que fueron introducidas en una cámara de hibridación e incubadas a 48°C durante 16-24h.
- Extensión y tinción de las matrices: tras la incubación se realizó un lavado para eliminar el ADN no hibridado o con hibridación no específica. Las matrices se montaron en

unas cámaras de flujo y a continuación se agregaron nucleótidos marcados para extender los cebadores hibridados con la muestra. A continuación, se realizaron varias rondas de tinción con una combinación de anticuerpos capaces de diferenciar los nucleótidos marcados fijándolos con distintos fluoruros. De esta manera pueden distinguirse las regiones metiladas de las no metiladas. Tras el proceso se requiere el secado de la matriz y su envío para su lectura mediante un equipo *Illumina HiScan SQ* (Illumina Inc, San Diego, CA, EE. UU.). Para ello se remitió a la Unidad de Epigenómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, obteniendo imágenes que fueron almacenadas en archivos .IDAT para su análisis bioinformático.



Figura 17. Protocolo de trabajo manual del ensayo de metilación Infinium HD.

Fuente: Infinium HD Methylation Assay Reference Guide. Illumina Inc, 2020.

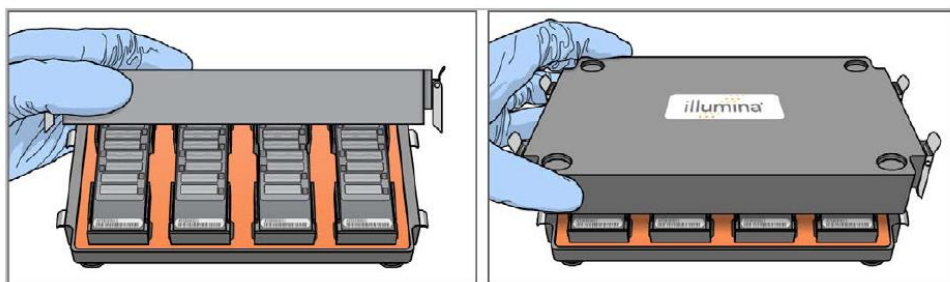


Figura 18. Arrays de metilación *Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip* y cámara de hibridación.

Fuente: Infinium HD Methylation Assay Reference Guide. Illumina Inc, 2020.

3.4.3. Análisis bioinformático de los resultados de los arrays de metilación.

Se utilizó el paquete de análisis estadístico en R, minfi (143), para la lectura de los archivos IDAT procedentes de los arrays de metilación *Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip* de Illumina, así como para evaluar su calidad y ejecutar los procesos de normalización y exclusión de sondas que podrían interferir en los análisis subsecuentes (144). De esta manera, se llevó a cabo un cribado de las sondas de metilación del ADN para eliminar aquellas con valores de detección de p-valor bajos ($< 0,01$) en cualquier muestra, así como aquellas que coincidieran con posiciones específicas de polimorfismos de nucleótido único (SNP), sondas ligadas al sexo (cromosomas X e Y) y aquellas identificadas como reactivas en múltiples sondas (145).

Posteriormente, se realizó un análisis de metilación diferencial para identificar tanto posiciones de metilación diferencial (DMPs) como regiones (DMRs) entre los 2 grupos de

pacientes, para lo que se compararon los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis. También se realizó un subanálisis de 3 comparaciones de muestras seleccionadas consideradas de interés: 1) pacientes con criterios de SIRS frente a pacientes sin criterios de SIRS; 2) pacientes con sepsis grave o shock séptico frente a pacientes sin criterios de SIRS; 3) pacientes con sepsis grave o shock séptico frente a pacientes con criterios de SIRS.

El análisis de metilación a nivel de DMPs se efectuó utilizando el paquete estadístico limma en R (146). Para mitigar los efectos de comparaciones múltiples, se consideraron significativas las sondas CpG con un p-valor ajustado (*False Discovery Rate*, FDR) < 0,05. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de metilación a nivel de regiones utilizando el paquete DMRcate en R (147), para identificar DMRs entre los grupos analizados.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis funcional mediante el paquete clusterProfiler en R (148) por medio de un análisis de sobre-representación (*over-representation analysis*, ORA). Se aplicó el análisis tanto a las DMPs como a las DMRs asociadas a genes y promotores obtenidas con los paquetes limma y DMRcate. Estos conjuntos de DMPs y DMRs se enriquecieron con términos GO (*Gene ontology*) y vías KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*), lo que resultó en la identificación de procesos biológicos y vías metabólicas sobre-representadas.

Se generaron mapas de calor con agrupación jerárquica de características significativas utilizando los paquetes gplots y stats,

empleando las funciones `heatmap.2` y `hclust`, respectivamente. Se realizaron análisis de componentes principales (PCA) con la función `plotMDS` en el paquete `limma`. Se diseñaron gráficos de volcán utilizando el paquete `EnhancedVolcano` en R. Todos los pasos computacionales se llevaron a cabo utilizando scripts R diseñados específicamente para este propósito.

Con el objetivo de identificar genes con potencial utilidad como biomarcadores se seleccionaron aquellos genes con mayor metilación diferencial significativa que pudieran tener implicación en las rutas y sistemas de control de la respuesta inmunitaria. Para ello se tuvo en cuenta: 1) que su identificación se lograra en la mayoría de las comparaciones (tanto en DMPs como en DMRs significativas); 2) que tuvieran una participación significativa en las vías moleculares o celulares identificadas en el análisis de enriquecimiento; y 3) que tuvieran una diferencia del grado de metilación (β -valor) elevada que permitiera su validación mediante un análisis de la metilación por pirosecuenciación.

3.4.4. Análisis de la metilación del ADN por técnicas de pirosecuenciación

Para validar los resultados del análisis de metilación diferencial mediante WGA e hibridación con los *microarrays* de metilación, se realizó un segundo análisis tanto de las muestras ya analizadas como de una cohorte independiente dentro del estudio.

El ADN fue extraído de los leucocitos de los pacientes siguiendo los procedimientos previamente descritos y fue tratado con bisulfito utilizando el Kit de Bisulfito de ADN EpiTect Fast (Qiagen, Hilden, Alemania). Posteriormente, se llevó a cabo una amplificación por PCR de 5mL del ADN tratado con bisulfito, seguido de un análisis de pirosecuenciación para examinar los niveles de metilación de cada citosina en los promotores de los genes específicos seleccionados. Se utilizó el Kit de PCR PyroMark (Qiagen, Hilden, Alemania) para este propósito, para el cual se diseñaron los cebadores de amplificación y pirosecuenciación correspondientes (tabla 18). Luego, se combinaron 10mL del ADN amplificado por PCR con 3mL de perlas magnéticas. Las condiciones estándar de pirosecuenciación proporcionadas por el fabricante del equipo (Pyromark Q48 autoprep) se aplicaron durante el análisis. El diseño de los cebadores se realizó utilizando el software PyroMark Assay Design 2.0, teniendo en cuenta parámetros como el tamaño y la concentración de los cebadores, así como la temperatura de hibridación. Finalmente, el diseño del análisis de pirosecuenciación se efectuó utilizando el software Pyromark Q48 Autoprep.

Tabla 18. Set de primers utilizados en los experimentos de pirosecuenciación

Gen	Tipos de primers	Secuencia
SERPINA1	Primer Forward PCR	[Btñ]TTGGATAGGAAGGAGTTTTGTTTATTGT
	Primer Reverse PCR	ACCCCAAAAACCTACCAATTATT
	Primer pirosecuenciación	AATAATCCTCTAAACAATATAACTA
AZU1	Primer Forward PCR	GGTGGAGGTTTTGGGTAAT
	Primer Reverse PCR	[Btñ]AACCAACCAACAAAACCAAACTAT
	Primer pirosecuenciación	GTTTGTGTATAAGGGTAG
MPO	Primer Forward PCR	TAGTAGTTTTAGTTGGTTGGATATGT
	Primer Reverse PCR	[Btñ]TTACCCYAAAACAACATCACCATCC
	Primer pirosecuenciación	TTTTGGTTAGGGGTTT
SLX4	Primer Forward PCR	GAGGAGGGGTTTTTGGAG
	Primer Reverse PCR	[Btñ]CCTAAACACCACCCCATC
	Primer pirosecuenciación	AGAAAGTTRGGTTTGTATTITTTTA

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico se calculó mediante el paquete estadístico SPSS versión 22 de IBM para Windows. En el análisis descriptivo, para las variables cuantitativas se verificó si seguían una distribución normal mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. En el caso de variables cuantitativas con una distribución normal se calcularon la media y la desviación estándar; mientras que en aquellas con una distribución no normal se calcularon la mediana y el rango intercuartílico. Las variables cualitativas se expresaron mediante números absolutos y porcentajes entre paréntesis.

A partir de los distintos datos obtenidos del análisis de metilación y los datos clínicos asociados a los pacientes, se correlacionaron con el grado de la enfermedad y la evolución de la misma. Para las variables cuantitativas se compararon ambos grupos utilizando la prueba t de *Student* o análisis de la varianza (ANOVA). Los datos no paramétricos se analizaron utilizando la prueba U de *Mann-Whitney*. Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba de *chi* cuadrado y el test exacto de *Fischer*. Se evaluó un cálculo de correlaciones entre variables clínicas y epigenéticas usando el coeficiente de correlación de Spearman tras comprobar una distribución no normal. Se consideró un nivel de significación α de 0.05 para todas las pruebas. Todas las pruebas fueron de dos colas.

3.6. FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

Tras la aprobación del proyecto por el CEIm y por la Dirección del Departamento de Salud, el coste de las exploraciones clínicas necesarias para el análisis de factores clínicos fue asumido por el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, donde se realizó el estudio, al utilizarse únicamente parámetros de uso habitual en la práctica clínica sin necesidad de pruebas complementarias fuera de los exámenes de rutina.

Para el análisis de marcas epigenéticas, el coste de los tubos (3 por extracción) de las muestras fue asumido a cargo del hospital. El coste de transporte de las muestras, almacenamiento, gestión y conservación en el Biobanco IBSP-CV fue asumido por Fisabio, previo acuerdo de depósito aprobado por su Comité Ético y con la conformidad de la Gerencia del Departamento. Para poder sufragar el elevado coste del material fungible (como los *arrays* de metilación) y las subcontrataciones a laboratorios externos necesarias determinaciones epigenéticas, se solicitaron dos ayudas que fueron concedidas por concurrencia competitiva. Las becas concedidas fueron las siguientes:

- Beca de "Ayudas para la realización de tesis doctorales, Convocatoria 2020", con una dotación de 5000€, concedida por la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO)" en el marco de la V Convocatoria de Ayudas para el Fomento de la Actividad Investigadora del PROGRAMA DE AYUDAS FISABIO 2018-2022

- Beca de Ayuda a la Investigación de la Fundación Española de Medicina Interna (FEMI) 2022, dotada con 30.000€, y destinada a promocionar la investigación clínica de equipos de investigación constituidos por internistas.

La gestión de los fondos obtenidos de las ayudas se realizó a través de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

4.1.1. Características clínicas y epidemiológicas

La muestra fue de 60 pacientes. La mediana de edad fue de 78 años con un rango inter-cuartil (RIQ) de 68 a 84 años, y una edad mínima y máxima de 19 y 95 años, respectivamente. El 41,7% fueron hombres y el 58,3% mujeres. La distribución etaria y por sexos se muestra en la figura 19.

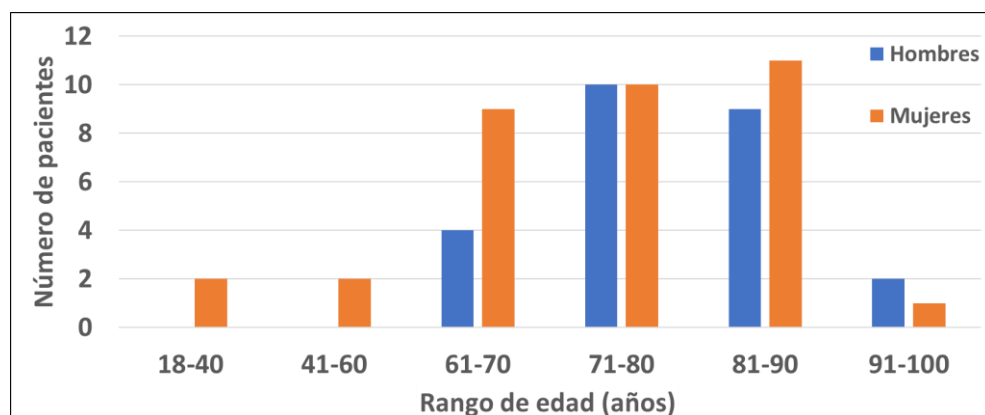


Figura 19. Distribución etaria y por sexos de los pacientes

El foco de la infección fue urinario en 46 pacientes (76,7%), respiratorio (neumonía) en 12 pacientes (20%) y abdominal (colangitis) en 2 pacientes (3,3%). Se realizó un emparejamiento por foco de infección, edad y sexo. El foco de infección fue el mismo en cada pareja caso-control. Hubo una diferencia media de edad entre los casos y los controles de 4 años. Una pareja caso-control tuvo sexo discordante. Las características individuales de los pacientes incluyendo las comorbilidades, la escala SOFA, y la puntuación del índice de Barthel se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Características clínico-epidemiológicas individuales de los pacientes al ingreso en el hospital: A) Sepsis; B) Sin sepsis

A) Pacientes con sepsis (casos)

Casos	Edad (años)	Sexo	Foco de la infección	SOFA	Comorbilidades	Índice Barthel
S1	93	H	Urinario	3	-	95
S2	95	H	Urinario	3	C. próstata	100
S3	85	M	Urinario	4	EC, IC, TC	90
S4	75	M	Urinario	2	Asma, TC	100
S5	87	M	Urinario	4	-	100
S6	65	M	Urinario	4	UP, DM, C. tiroides	100
S7	74	H	Urinario	6	VP, C. próstata	100
S8	64	M	Urinario	6	C. endometrio	100
S9	78	M	Respiratorio	3	-	100
S10	62	M	Urinario	10	-	100
S11	71	M	Urinario	5	DM	85
S12	50	M	Urinario	3	-	100
S13	19	M	Urinario	3	-	100
S14	90	M	Urinario	6	-	100
S15	74	M	Urinario	4	C. vejiga	100
S16	66	M	Respiratorio	3	DM	100
S17	86	M	Respiratorio	5	-	85
S18	82	H	Urinario	3	EPOC, ERC	75
S19	88	H	Urinario	4	IC, EPOC, DM	100
S20	79	H	Respiratorio	4	-	100
S21	79	M	Urinario	4	IC, EPOC, ACV	75
S22	72	M	Urinario	2	DM	90
S23	78	H	Abdominal	5	DM	100
S24	87	H	Urinario	3	IC, ERC, VP	100
S25	93	M	Urinario	5	IC	90
S26	66	H	Urinario	3	HC	100
S27	78	H	Respiratorio	4	DM, Demencia	100
S28	87	M	Urinario	2	IC, DM	55
S29	63	H	Respiratorio	5	EPOC, DM, C. pulmón	100
S30	79	H	Urinario	5	ERC	75

Tabla 19 (Cont.).**B) Pacientes sin sepsis (controles)**

Control	Edad (años)	Sexo	Foco de la infección	SOFA	Comorbilidades	Índice Barthel
C1	90	H	Urinario	0	DM, ACV, ERC, HC	55
C2	79	H	Urinario	0	EPOC	100
C3	79	M	Urinario	0	-	100
C4	81	M	Urinario	0	-	70
C5	82	M	Urinario	1	-	100
C6	65	M	Urinario	0	Asma, DM	100
C7	74	H	Urinario	0	EPOC	100
C8	48	M	Urinario	0	Asma	100
C9	75	M	Respiratorio	1	IC	80
C10	63	M	Urinario	1	DM	100
C11	73	M	Urinario	0	IC, DM, ERC	70
C12	68	M	Urinario	0	Asma	100
C13	21	M	Urinario	0	-	100
C14	90	M	Urinario	0	EPOC, TC, UP	90
C15	81	M	Urinario	2*	EPOC, ERC	100
C16	65	M	Respiratorio	0	EPOC, C. vejiga	100
C17	82	M	Respiratorio	1	Asma, DM	75
C18	75	H	Urinario	1	EC, DM	100
C19	82	H	Urinario	1	EC, ERC	100
C20	85	H	Respiratorio	1	EPOC, UP, DM	100
C21	78	M	Urinario	1	-	100
C22	68	M	Urinario	0	DM, ERC	90
C23	74	H	Abdominal	3*	EPOC	100
C24	82	H	Urinario	0	EC, Asma, ERC	95
C25	87	M	Urinario	0	IC, UP, VP	80
C26	63	H	Urinario	0	EC, HC	100
C27	82	H	Respiratorio	1	EPOC	100
C28	85	M	Urinario	0	Demencia	85
C29	68	H	Respiratorio	0	EPOC, DM	100
C30	73	H	Urinario	1	DM	100

ACV: Accidente cerebrovascular; C: Cáncer; DM: Diabetes mellitus; EC: Enfermedad coronaria, EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC: Enfermedad renal crónica; H: Hombre; HC: hepatopatía crónica; IC: Insuficiencia cardíaca; M: Mujer; TC: enfermedad del tejido conectivo; UP: Úlcera péptica; VP: vasculopatía periférica.

*No atribuido a sepsis

Las comorbilidades más frecuentes fueron la diabetes mellitus (31,7%), la EPOC (21,7%), la enfermedad renal crónica (16,7%) y la insuficiencia cardiaca (15%). La puntuación del índice de Comorbilidad de Charlson tuvo una mediana de 5 puntos (RIQ 4–6). La única comorbilidad con diferencias entre los grupos fue el antecedente de neoplasia (20% vs 1%, en casos y controles respectivamente, $p = 0,035$). El grado de dependencia para actividades básicas de la vida diaria (ABVD, índice de Barthel) fue: independencia en 42 pacientes (70%), dependencia leve en 16 (26,7%) y dependencia moderada en 2 pacientes (3,3%). De acuerdo con la escala FRAIL, hubo 23 (38,3%) sin fragilidad, 19 (31,7%) pre-frágiles y 18 (30) frágiles. Se encontró un mayor riesgo de desnutrición en el grupo con sepsis (43,3 vs 16,7%, $p = 0,024$). Las comorbilidades se muestran en la figura 20 y en la tabla 20. El estado funcional (grado de dependencia, fragilidad y cribado nutricional) se muestra en la tabla 20.

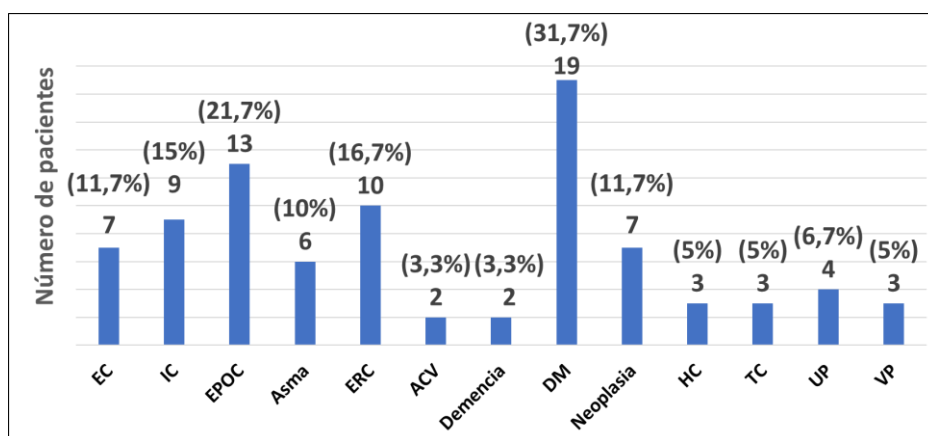


Figura 20. Comorbilidades en el conjunto de la muestra

ACV: Accidente cerebrovascular; DM: Diabetes mellitus; EC: Enfermedad coronaria, EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC: Enfermedad renal crónica; HC: hepatopatía crónica; IC: Insuficiencia cardiaca; M: Mujer; TC: enfermedad del tejido conectivo; UP: Úlcera péptica; VP: vasculopatía periférica.

Tabla 20. Comorbilidades y estado funcional de los pacientes previo al ingreso en el hospital

	Total (n=60)	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p- valor
Comorbilidades, n (%)				
-Accidente cerebrovascular	2 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	1,000
-Asma	6 (10)	1 (3,3)	5 (16,7)	0,073
-Demencia	2 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	0,236
-Diabetes mellitus	19 (31,7)	9 (30)	10 (33,3)	0,781
-Enfermedad coronaria	7 (11,7)	3 (10)	4 (13,3)	0,687
-Enfermedad renal crónica	10 (16,7)	4 (13,3)	6 (20)	0,488
-Enfermedad del tejido conectivo	3 (5)	2 (6,7)	1 (3,3)	0,550
-EPOC	13 (21,7)	4 (13,3)	9 (30)	0,113
-Hepatopatía crónica	3 (5)	1 (3,3)	2 (6,7)	0,550
-Insuficiencia cardiaca	9 (15)	6 (20)	3 (10)	0,274
-Neoplasia	7 (11,7)	6 (20)	1 (3,3)	0,035
-Úlcera péptica	4 (6,7)	1 (3,3)	3 (10)	0,290
-Vasculopatía periférica	3 (5)	2 (6,7)	1 (3,3)	0,550
Índice de Comorbilidad de Charlson, mediana [RIQ]	5 [4-6]	5 [4-6,25]	4,5 [4-6,25]	0,782
Polifarmacia ≥5 fármacos, n (%)	39 (65)	20 (66,7)	19 (63,3)	0,787
Índice de Barthel, n (%)				
-Independencia ABVD: 100 ptos	42 (70)	21 (70)	21 (70)	1,000
-Dependencia leve ABVD: 60-95 ptos	16 (26,7)	8 (26,7)	8 (26,7)	1,000
-Dependencia mod. ABVD: 40-55 ptos	2 (3,3)	1 (3,3)	1 (3,3)	1,000
Escala de Lawton, n (%)				
-Independencia AIVD: 8 ptos	30 (50)	14 (46,7)	16 (53,3)	0,606
-Dependencia leve-mod. AIVD: 4-7 ptos	25 (41,7)	14 (46,7)	11 (36,7)	0,432
-Dependencia grave/total AIVD: 0-2 ptos	5 (8,3)	2 (6,7)	3 (10)	0,640
Escala FRAIL, n (%)				
-No frágil: 0 ptos	23 (38,3)	9 (30)	14 (46,7)	0,184
-Pre-frágil: 1-2 ptos	19 (31,1)	12 (20)	7 (1,7)	0,165
-Frágil: 3-5 ptos	18 (30)	9 (30)	9 (30)	1,000
Escala MNA, n (%)				
-Estado nutricional normal: 12-14 ptos	41 (68,3)	17 (56,7)	24 (80)	0,052
-Riesgo de malnutrición: 8-11 ptos	18 (30)	13 (43,3)	5 (16,7)	0,024
-Malnutrición: ≤ 7 ptos	1 (1,7)	0	1 (3,3)	0,236

ABVD: actividades básicas de la vida diaria; AIVD: actividades instrumentales de la vida diaria; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FRAIL: *fatigue, resistance, aerobic capacity, illnesses and loss of weight*; MNA: *Mini Nutritional Assessment*.

4.1.2. Síntomas y signos al ingreso. Forma de presentación

Entre los síntomas y signos clínicos, el más frecuente entre todos los pacientes fue la fiebre (88%). Por foco, los más frecuentes fueron el síndrome miccional (74%) en los pacientes con infección urinaria; la disnea (100%) en los pacientes con neumonía; y el dolor abdominal en hipocondrio derecho (100%) en los pacientes con colangitis (ver figura 21).

Las constantes o signos vitales, así como la puntuación de la escala de Glasgow al ingreso, se muestran en la tabla 21.

La mediana del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la primera consulta médica en el hospital fue de 2 días con un rango inter-cuartil de 1 a 4 días (ver figura 22).

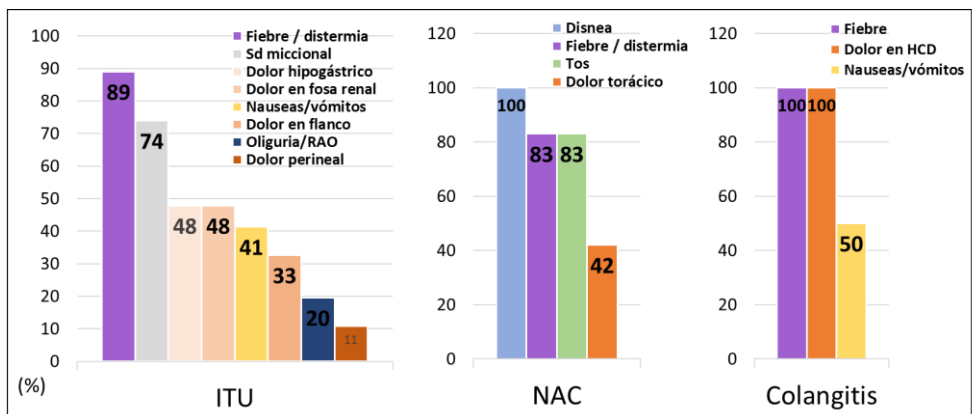


Figura 21. Síntomas de los pacientes al ingreso

HCD: hipocondrio derecho; ITU: infección del tracto urinario; NAC: neumonía adquirida en la comunidad; RAO: retención aguda de orina.

Tabla 21. Constantes vitales y escala de Glasgow al ingreso

	Total (n=60)	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p-valor
Tª, media ±DE (°C),	37,5 (±1,2)	37,7 (±1,2)	37,2 (±1,1)	0,129
TAS, media ±DE (mmHg)	121 (±30)	106 (±29)	136 (±21)	<0,001
TAD, media ±DE (mmHg)	68 (±16)	59 (±13)	77 (±14)	<0,001
TAM, media ±DE (mmHg)	86 (±20)	75 (±18)	97 (±15)	<0,001
FC, media ±DE (lpm)	98 (±22)	108 (±20)	89 (±19)	<0,001
FR, mediana [RIQ] (rpm)	22 [18-24]	24 [22-27]	18 [16-20]	<0,001
SatO2, mediana [RIQ]	94,5 [92-96]	93 [91-96]	96 [94-98]	0,010
SatO2/FiO2, mediana [RIQ]	448 [434-457]	438 [424-457]	457 [448-462]	0,004
Glasgow ≤14, n (%)	15 (25)	14 (46,7)	1 (3,3)	<0,001

Tª: temperatura; °C: grados centígrados; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; TAM: tensión arterial media; mmHg: milímetros de mercurio; FC: frecuencia cardiaca; lpm: latidos por minuto; FR: frecuencia respiratoria; rpm: respiraciones por minuto.

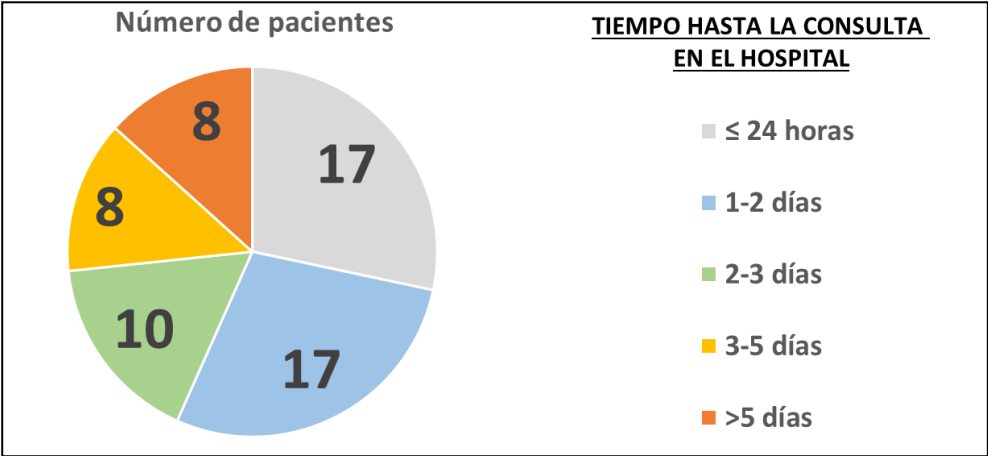


Figura 22. Tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la primera consulta médica en el hospital

El paciente fue quien solicitó asistencia sanitaria en 34 casos (56,7%), y sus familiares en 26 casos (43,4%). Acudieron directamente al servicio de urgencias hospitalarias 36 pacientes (60%), mientras que 24 (40%) contactaron previamente con el servicio de urgencias de atención primaria (33,3%) y con el centro de coordinación de emergencias (6,7%), respectivamente. Recibieron antibioterapia antes de acudir al hospital 9 pacientes (15%). Además, 16 pacientes (26,7%) habían recibido antibioterapia por infecciones en los 3 meses previos al ingreso, y 8 (13,3%) habían estado ingresados en ese periodo de tiempo. De los casos de infección de foco urinario, 5 (10,9%) llevaban una sonda urinaria permanente (infección asociada a catéter urinario).

4.1.3. Parámetros analíticos, escalas de gravedad y criterios de sepsis

Las escalas qSOFA y SOFA (criterios sepsis-3), los criterios de SIRS o sepsis grave (Criterios Sepsis-2), el shock séptico y la puntuación APACHE-II se presentan en la tabla 22. Los parámetros de laboratorio se muestran en la tabla 23.

Tabla 22. Escalas y criterios utilizados para el diagnóstico de sepsis y la valoración de la gravedad

	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p-valor
qSOFA ≥ 2, n (%)	26 (86,7)	0	<0,001
SIRS, n (%)	30 (100)	14 (46,7)	<0,001
Sepsis grave, n (%)	26 (86,7)	1 (3,3)	<0,001
Shock séptico, n (%)	3 (10)	0	0,236
SOFA, mediana [RIQ]	4 [3-5]	0 [0-1]	<0,001
APACHE-II, media $\pm$DE	13,6 ($\pm$2,9)	7,4 ($\pm$3,2)	<0,001

Tabla 23. Parámetros de laboratorio al ingreso

	Total (n=60)	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p-valor
Creatinina (mg/dl), mediana [RIQ]	1,29 [0,9-2,1]	1,75 [1,30-2,92]	0,93 [0,75-1,27]	<0,001
Bilirrubina (mg/dl), mediana [RIQ]	0,7 [0,5-1,1]	0,7 [0,45-1,30]	0,7 [0,5-1]	0,853
Albúmina (mg/dl), media ±DE	3,58 (±0,51)	3,4 (±0,5)	3,8 (±0,4)	0,004
Na ⁺ (mEq/l), media ±DE	137 (±4)	137 (±3)	137 (±4)	0,701
K ⁺ (mEq/l), media ±DE	4,2 (±0,7)	4,2 (±0,8)	4,1 (±0,5)	0,677
Hemoglobina (g/l), mediana [RIQ]	12,6 [11,5-13,7]	12,2 [11,4-12,8]	13 [11,3-14,4]	0,025
Hto (%), media ±DE	37,7 (±5,5)	36 (±5)	39 (±5)	0,024
PaO ₂ /FiO ₂ *, media ±DE	314 (±64)	310 (±72)	326 (±38)	0,659
pH, media ±DE	7,40 (±0,06)	7,39 (±0,07)	7,40 (±0,05)	0,402
HCO₃⁻ (mEq/L), media ±DE	25 (±4)	23 (±4)	27 (±2)	<0,001
Lactato (mmol/L), mediana [RIQ]	1,6 [1,1-2,5]	1,9 [1,1-3,4]	1,35 [1,1-1,9]	0,020
Proteína C reactiva (mg/l), media ±DE	224 (±128)	285 (±118)	163 (±110)	<0,001
Procalcitonina (ng/ml), mediana [RIQ]	5,5 [0,6-19,5]	19,8 [7,1-33,6]	0,6 [0,2-3,3]	<0,001
Leucocitos (cel/mm ³), mediana [RIQ]	13.300 [10.425-18.925]	14.950 [11.825-19.950]	12.450 [9.225-18.400]	0,196
Linfocitos**, mediana [RIQ]				
-Linfocitos CD4	355 [355-656]	268 [167-415]	521 [260-828]	0,017
-Linfocitos CD8	181 [94-264]	136 [84-229]	196 [142-440]	0,063
-Cociente CD4/CD8	1,75 [1,11-3,46]	1,61 [1-2,87]	1,80 [1,39-3,8]	0,521
-Linfocitos CD19	86 [53-140]	91 [43-141]	83,5 [65-147]	0,441
-Linfocitos NK	129 [68-230]	94 [56-202]	177 [95-234]	0,059
Plaquetas (cel/mm³), mediana [RIQ]	176.500 [137.500-232.750]	146.000 [120.000-203.500]	201.500 [171.000-249.000]	0,009

Na: sodio; K: potasio; Hto: Hematocrito; PaO₂: presión arterial de oxígeno; FiO₂: fracción inspiratoria de oxígeno; HCO: bicarbonato.

*n=19; ** n=47

4.1.4. Etiología de las infecciones. Datos microbiológicos

Los microorganismos patógenos fueron aislados en 46 pacientes (76,7%) del total de la muestra del estudio.

En las infecciones de foco urinario se logró aislamiento microbiológico mediante cultivo de orina en 40 pacientes (87%) y mediante hemocultivo en 12 casos (26%). Hubo coincidencia entre los resultados del cultivo de orina y de sangre en 11 pacientes, mientras que hubo un paciente en el que el hemocultivo fue positivo y el urinocultivo negativo. Hubo 7 casos de infecciones multirresistentes entre las infecciones de foco urinario, de los cuales 4 fueron cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los patógenos aislados se muestran en la figura 23.

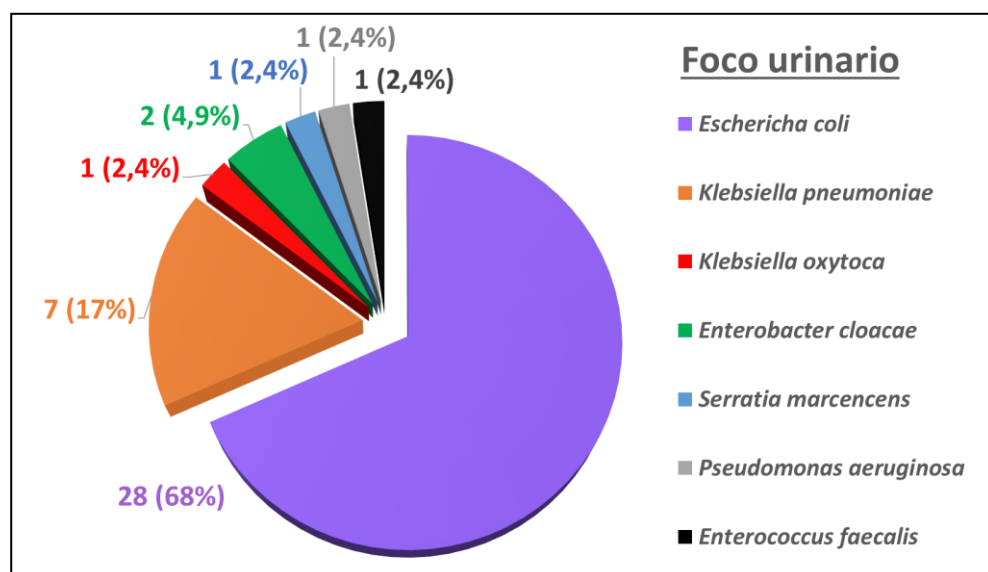


Figura 23. Microorganismos aislados en infecciones de foco urinario

En las infecciones de foco respiratorio, se identificó *Streptococcus pneumoniae* en 2 casos (16,7%), mediante detección antigénica en una muestra de orina, y el virus Influenza tipo A en otros 2 casos (16,7%), mediante una prueba de PCR en exudado nasofaríngeo, en los que se sospechaba sobreinfección bacteriana. En las infecciones de foco abdominal, se aisló *Streptococcus anginosus* mediante hemocultivo en 1 caso (50%).

4.1.5.Tratamiento antibiótico y de soporte

Se administró antibioterapia en la primera hora desde su llegada a urgencias en 10 pacientes (33,3%) con sepsis y 4 (13,3%) sin sepsis. Los antibióticos utilizados se muestran en la figura 24, y los datos sobre su administración en la tabla 24.

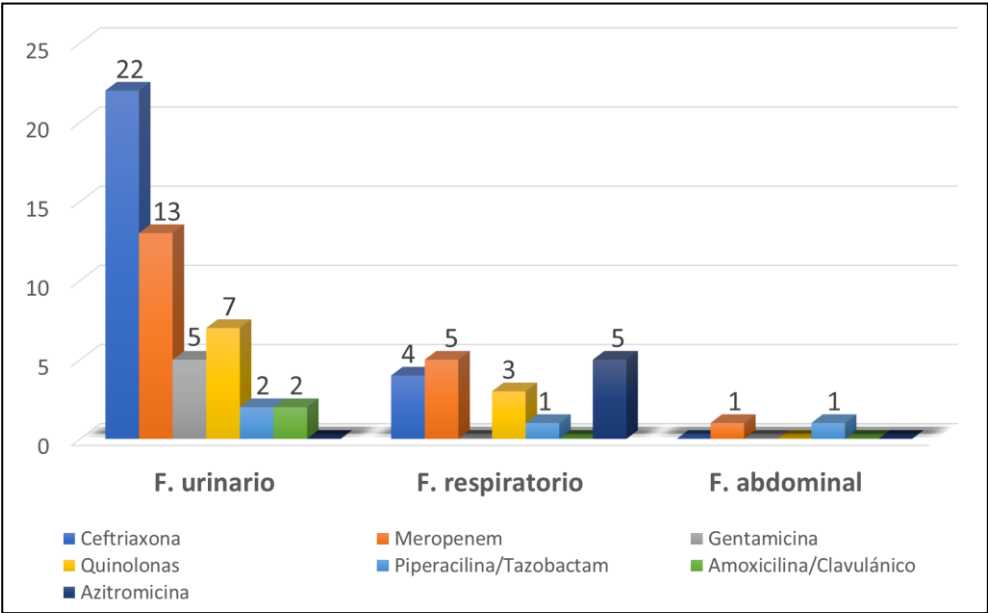


Figura 24. Antibióticos empíricos utilizados

Las combinaciones fueron ceftriaxona con gentamicina en 5 infecciones de foco urinario; y ceftriaxona con azitromicina (4), meropenem con azitromicina (1) y piperacilina/tazobactam con levofloxacin (1) en 6 infecciones de foco respiratorio.

Se administró fluidoterapia en las primeras 3h desde su llegada a urgencias a 20 pacientes con sepsis y 13 sin sepsis (66 vs. 43,3%, p-valor 0,069). La dosis de fluidos se muestra representada en la tabla 23.

Tabla 24. Antibioterapia y fluidoterapia en urgencias

	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p-valor
Antibioterapia <1h, n (%)	10 (33,3)	4 (13,3)	0,067
Antibioterapia <3h, n (%)	21 (70)	14 (46,6)	0,067
Tiempo triaje-antibiótico (h), mediana [RIQ]	2 [1-4]	3,5 [2,5-5]	0,027
Duración total antibiótico (días), mediana [RIQ]	13 [10-15]	10 [7-15]	0,062
Fluidoterapia <3h, n (%)	20 (66)	13 (43,3)	0,069
Fluidoterapia ≥20ml/kg en 3h, n (%)	5 (16,7)	1 (0,16)	0,197
Fluidoterapia ≥20 ml/kg en 24h, n (%)	17 (56,7)	5 (16,7)	0,001
Volumen pautado en 3h (ml/kg), mediana [RIQ]	7,5 [0-14,5]	0 [0-7]	0,005
Volumen pautado en 24h (ml/kg), mediana [RIQ]	24,5 [15-40]	9,5 [0-17]	<0,001

Fueron extraídos hemocultivos precozmente en 23 pacientes con sepsis y 14 sin sepsis (76,7 vs. 46,7%, p-valor 0,017). Se utilizaron fármacos vasopresores en los 3 casos de shock séptico (en todos los casos noradrenalina a dosis ≤0,1 µg/kg/min). Se cumplieron todos los aspectos del "Bundle-1h" en 6 pacientes con sepsis y 2 sin sepsis (20 vs. 6,7%, p-valor 0,255).

4.2. EVOLUCIÓN A CORTO Y LARGO PLAZO

4.2.1. Evolución durante el ingreso hospitalario

La estancia total hospitalaria fue de 4 días [RIQ 2,25-8]. Requirieron ingreso en la UCI 8 pacientes (13,3%), con una mediana de 3 días [RIQ 2-4,75]. Un paciente falleció durante el ingreso hospitalario, perteneciente al grupo sin sepsis, debido a una complicación por neumonía nosocomial con sepsis y fracaso multiorgánico que requirió ingreso en la UCI. Otro paciente falleció en los primeros 15 días tras ser dado de alta con la Unidad de Hospitalización a Domicilio (UHD), debido a empeoramiento del cuadro séptico.

Los datos de mortalidad a corto plazo, de estancia hospitalaria y en UCI se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Estancia hospitalaria y mortalidad a corto plazo

	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p-valor
Estancia hospitalaria (días), mediana [RIQ]	5,5 [4-9,25]	3 [2-5,25]	0,001
Ingreso en UCI, n (%)	7 (23,3)	1 (3,3)	0,052
Estancia en UCI (días), mediana [RIQ]	3 [2-4]	5	0,500
Mortalidad en el ingreso o en los primeros 30 días, n (%)	1 (3,3)	1 (3,3)	1

4.2.2. Evolución tras el alta hospitalaria

Un total de 2 pacientes fallecieron durante el seguimiento, pertenecientes al grupo con sepsis:

- 1 paciente falleció tras un segundo ingreso a los 30 días del alta, falleciendo de forma súbita en domicilio 10 días después.
- 1 paciente falleció a los 3 meses del alta, tras el diagnóstico de una recidiva de un carcinoma endometrial.

No hubo diferencias significativas en el número de infecciones, nuevos episodios de sepsis o reingresos tras el alta hospitalaria (Ver tabla 26).

Tabla 26. Nuevas infecciones y reingresos a los 30 días y 12 meses tras el ingreso

	Sepsis (n=30)	No sepsis (n=30)	p- valor
Pacientes con reinfección <30 días, n (%)	8 (26,7)	5 (16,7)	0,347
Nº reinfecciones <30 días, mediana [RIQ]	1 [1-1]	1 [1-1,5]	0,833
Pacientes con reingreso <30 días, n (%)	4 (13,3)	1 (3,3)	0,350
Nº reingresos <30 días, mediana [RIQ]	1,5 [1-2]	1 [1-1]	0,800
Pacientes con reinfección <12 meses, n (%)	16 (53,3)	17 (56,7)	0,795
Nº reinfecciones <12 meses, mediana [RIQ]	2 [1-2,75]	1 [1-2]	0,179
Pacientes con reingreso <12 meses, n (%)	6 (20)	6 (20)	1
Nº reingresos <12 meses, mediana [RIQ]	1,5 [1-3]	2 [1-2,25]	0,589
Sepsis tras episodio inicial, n (%)	2 (6,7)	2 (6,7)	1

4.2.3. Cambios en la situación funcional, comorbilidad y calidad de vida

Durante el seguimiento hubo una pérdida de 6 pacientes en el grupo con sepsis y 4 pacientes en el grupo sin sepsis.

No se observaron cambios relevantes en las comorbilidades ni el índice de Comorbilidad de Charlson a los 12 meses. Los cambios en la situación funcional y la calidad de vida se presentan en la tabla 27.

Tabla 27. Cambios en las escalas de valoración funcional y de calidad de vida a los 12 meses

	Sepsis (n=24)	No sepsis (n=26)	p-valor
Pérdida ≥ 10 ptos índice Barthel, n (%)	7 (29,1)	3 (11,6)	0,119
Pérdida ≥20 ptos índice Barthel, n (%)	5 (20,8)	1 (3,8)	0,158
Pérdida ≥2 ptos escala Lawton, n (%)	8 (33,3)	2 (7,7)	0,024
Pérdida ≥10 ptos escala EuroQol, n (%)	12 (50,3)	4 (15,4)	0,009
Mejora ≥10 ptos escala EuroQol, n (%)	3 (12,5)	7 (26,9)	0,203
Aumento ≥1 pto índice Charlson, n (%)	4 (16,7)	3 (11,5)	0,909
Desarrollo fragilidad (FRAIL)*, n (%)	6 (33,3)	0	0,019

*Pacientes previamente no frágiles o pre-frágiles que completaron el seguimiento (n=36, 18 con sepsis y 18 sin sepsis)

4.3. ANÁLISIS DE METILACIÓN DIFERENCIAL DE ADN

4.3.1. Evaluación de la calidad del análisis de metilación mediante los arrays EPIC850K v2.0

En una primera fase, se seleccionó una cohorte de 32 pacientes de los 60 incluidos en el estudio, a la que se denominó cohorte de descubrimiento, de la cual se analizaron 32 muestras (correspondientes a 16 casos y 16 controles) extraídas en las primeras 24h del ingreso mediante el uso de ensayos Infinium Methylation array EPIC850K v2.0.

En primer lugar, se realizó el preprocesado de las muestras para realizar el control de calidad de los arrays. Todas las muestras pasaron el control de calidad que corresponde a un porcentaje de CpG detectado ($0.05 \geq 90\%$). Los resultados obtenidos en este estudio de metilación se pueden consultar en la tabla 28.

A continuación, se procedió a la normalización de los resultados que permite posteriormente realizar el estudio de metilación diferencial entre los distintos grupos de estudio. Con este procesado, la normalización aplica cambios a los datos eliminando la variabilidad no deseada entre las muestras. Así, la distribución de los beta-valores de metilación (coeficiente que evalúa la metilación diferencial en cada uno de los sitios CpG) es más uniforme después de la normalización. En la figura 25 se representan unos gráficos de densidad de los valores de metilación en los que se pueden apreciar los efectos de aplicar la normalización funcional y el filtrado con el que se empezó el análisis bioinformático.

Tabla 28. Resultados brutos del estudio de metilación donde se muestran el número de CpGs detectados del total del *array Infinium methylation EPIC850K v2.0* para cada una de las muestras

Paciente	Código*	CpGs detectados (0.01)		CpGs detectados (0.05)	
		n	%	n	%
S1	SEP-0001-T1	924124	98,62	929069	99,15
C1	SEP-0057-T1	925255	98,74	930254	99,27
S3	SEP-0010-T1	923251	98,53	931829	99,44
C3	SEP-0022-T1	920314	98,21	928069	99,04
S5	SEP-0023-T1	922484	98,45	932005	99,46
C5	SEP-0008-T1	915588	97,71	927670	99,00
S7	SEP-0025-T1	919811	98,16	928579	99,10
C7	SEP-0018-T1	886294	94,58	907501	96,85
S9	SEP-0027-T1	921671	98,36	929418	99,18
C9	SEP-0065-T1	921655	98,36	926767	98,90
S10	SEP-0029-T1	921511	98,34	929444	99,19
C10	SEP-0050-T1	922015	98,39	929703	99,22
S11	SEP-0030-T1	906493	96,74	923471	98,55
C11	SEP-0005-T1	918573	98,03	927995	99,03
S12	SEP-0031-T1	918398	98,01	927770	99,01
C12	SEP-0059-T1	915804	97,73	925497	98,77
S13	SEP-0036-T1	909605	97,07	920011	98,18
C13	SEP-0038-T1	917779	97,94	925958	98,82
S14	SEP-0037-T1	915935	97,75	923738	98,58
C14	SEP-0066-T1	909823	97,09	920361	98,22
S16	SEP-0040-T1	897658	95,80	913264	97,46
C16	SEP-0046-T1	901258	96,18	912376	97,37
S17	SEP-0041-T1	898652	95,90	917386	97,90
C17	SEP-0047-T1	894437	95,45	906434	96,73
S19	SEP-0043-T1	923172	98,52	931000	99,35
C19	SEP-0020-T1	877756	93,67	898710	95,91
S21	SEP-0048-T1	904999	96,58	915941	97,75
C21	SEP-0007-T1	896346	95,66	908977	97,00
S27	SEP-0069-T1	899623	96,01	915483	97,70
C27	SEP-0076-T1	888777	94,85	905331	96,61
S29	SEP-0072-T1	900293	96,08	914248	97,57
C29	SEP-0077-T1	878292	93,73	892874	95,29

S: Sepsis; C: Control; CpG: sondas/posiciones con dinucleótidos citosina-guanina

*Código asignado a las muestras para su almacenamiento en el biobanco y para sus posteriores análisis.

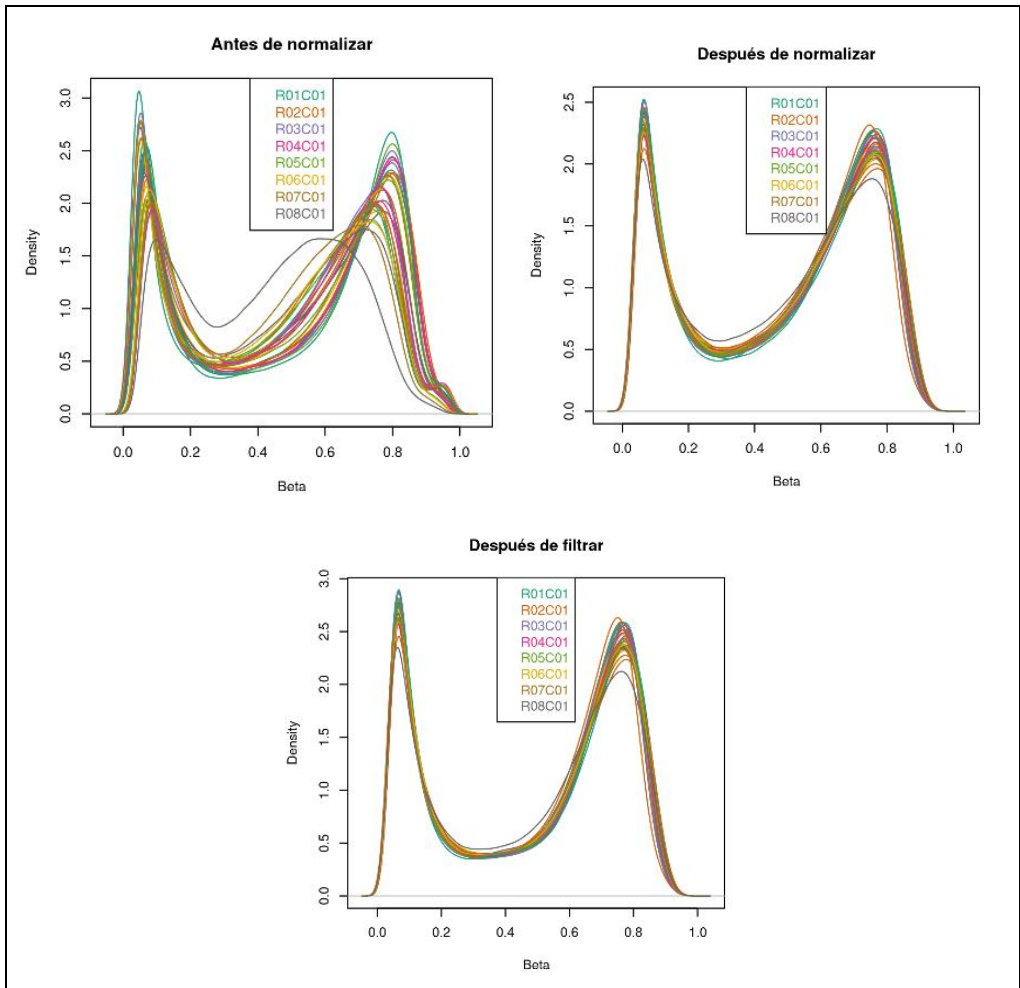


Figura 25. Gráficos de la densidad de beta valor de cada muestra antes y después de normalizar y después de filtrar las sondas

Tras el filtrado, y como consecuencia de la buena calidad del análisis realizado, no se eliminó ninguna muestra por tener una media de *false discovery rate* (FDR) inferior a 0,05.

Los datos presentan un promedio de 936.990 sondas antes del filtrado y 770.171 después. En la gráfica de ordenamiento multidimensional (MDS, Figura 26) se pueden distinguir dos

nubes ligera o completamente superpuestas en todas las comparaciones. Destaca el hecho de que en la gráfica MDS antes de filtrar, en todas las comparaciones, se observan dos claros grupos que desaparecen con el filtrado. Esto se debe a que antes de filtrar aún se tienen en cuenta las sondas situadas en cromosomas sexuales por lo que las muestras se agrupan según su sexo en hombres y mujeres.

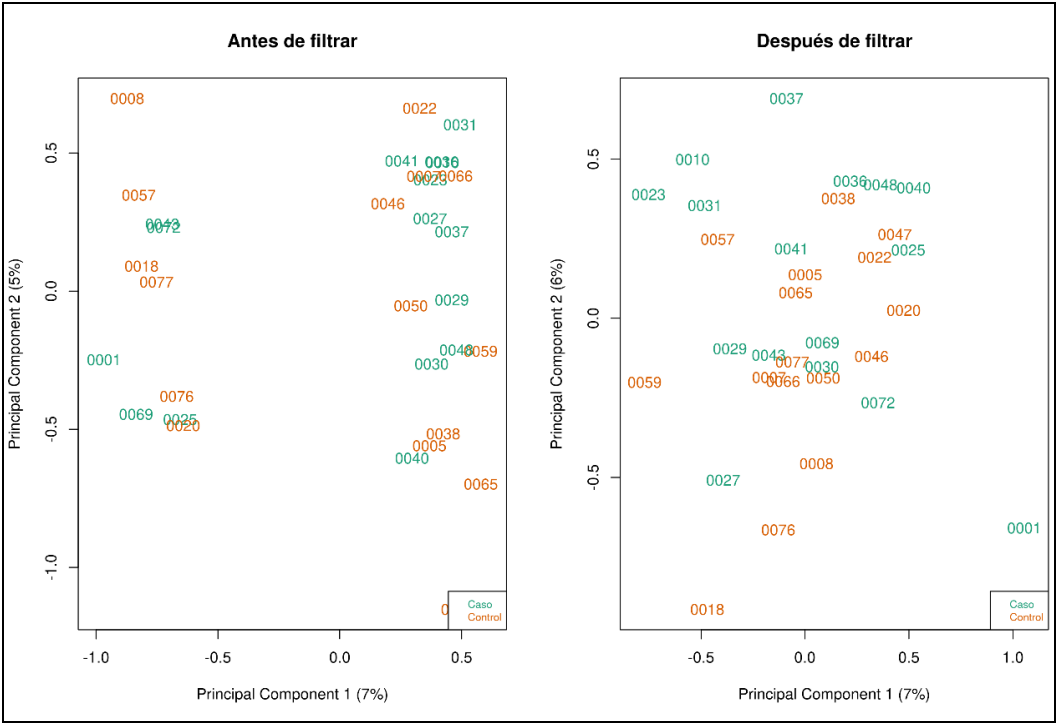


Figura 26. Gráficas MDS antes y después de filtrar las sondas

MDS: *Multidimensional scaling*

Nota: El nombre de las muestras se ha acortado al código numérico para hacer la visualización del gráfico más fácil.

4.3.2. Análisis de metilación diferencial entre los grupos del estudio

Inicialmente se compararon los resultados obtenidos del análisis de metilación de las muestras de los 32 pacientes de la cohorte de descubrimiento, entre los que se encontraban pacientes con sepsis (n=16) y pacientes con infección sin sepsis (n=16), emparejados por edad, sexo y foco de infección. Para ello se analizó la metilación diferencial tanto a nivel de posiciones CpG (DMPs, *differential methylated positions*) como de regiones del genoma (DMRs, *differential methylated regions*), además de un análisis de enriquecimiento funcional, con la finalidad de identificar los genes con las mayores diferencias de metilación significativas que pudieran tener un papel relevante en la sepsis.

A) Estudio de la metilación diferencial a nivel de posiciones CpGs (DMPs) entre pacientes con sepsis frente a pacientes sin sepsis

Se obtuvieron 4.640 DMPs significativas con el criterio de FDR <0,05 (4.323 CpGs hipometilados y 317 CpGs hipermetilados). Posteriormente, se seleccionaron las DMPs significativas que cumplían el criterio de tener una diferencia media de β -valor (valor de metilación diferencial, representado como porcentaje) entre casos y controles mayor al 8,5%, con lo que se obtuvieron 330 DMPs. En la tabla 29 se pueden consultar las 30 DMPs significativas con mayor diferencia media de β -valor entre ambos grupos y el sentido de la alteración (hipermetilación o hipometilación), así como el gen en el que se sitúa.

Tabla 29. Top 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis

Sonda CpG	FDR	β -valor (Dif. media)		CHR	Posición	Genes
		%	Sentido			
cg10833066_TC11	0,012	24,3	HIPERM.	CHR12	111369663	<i>PHETA1</i>
cg13372500_BC21	0,003	20,6	Hipom.	CHR9	5460319	
cg08895113_BC21	0,005	19,8	Hipom.	CHR5	172775938	
cg27307975_TC21	0,032	18,8	Hipom.	CHR15	58505640	
cg18356337_BC21	0,030	18,7	Hipom.	CHR2	144701638	
cg19649900_TC11	0,003	18,3	Hipom.	CHR19	1155031	
cg15658793_TC11	0,044	18,1	Hipom.	CHR19	3398812	
cg20995564_TC21	0,004	17,3	Hipom.	CHR2	144414468	
cg09352518_BC21	0,015	17,1	Hipom.	CHR19	21082615	
cg26715273_BC21	0,008	16,9	Hipom.	CHR17	14738221	
cg07350590_BC21	0,014	16,1	Hipom.	CHR12	106593180	
cg08895429_TC21	0,014	15,9	Hipom.	CHR5	172800142	
cg25459717_TC21	0,010	15,8	HIPERM.	CHR20	57291246	
cg01022219_TC11	0,007	15,8	Hipom.	CHR18	13641736	<i>LDLRAD4</i>
cg00683922_BC21	0,004	15,7	Hipom.	CHR1	207069224	
cg05779786_BC11	0,049	15,5	Hipom.	CHR2	236120205	<i>AGAP1</i>
cg07110356_TC11	0,031	15,0	Hipom.	CHR17	58278070	<i>MPO</i>
cg05101463_BC21	0,030	14,8	Hipom.	CHR5	43191091	<i>NIM1K</i>
cg05710777_BC21	0,046	14,6	Hipom.	CHR2	64862687	
cg04555139_TC21	0,036	14,6	Hipom.	CHR1	198634179	
cg17155018_TC21	0,027	14,3	Hipom.	CHR6	111631863	
cg07252680_TC21	0,002	14,0	Hipom.	CHR14	94390887	<i>SERPINA1</i>
cg13536060_BC11	0,040	13,9	Hipom.	CHR19	50686414	
cg27386241_BC21	0,039	13,5	Hipom.	CHR8	69329856	
cg25103152_BC21	0,050	13,5	Hipom.	CHR5	2151341	
cg02694427_BC11	0,012	13,5	Hipom.	CHR2	176099784	<i>HOXD12</i>
cg07003993_BC21	0,011	13,5	HIPERM.	CHR11	67022607	<i>SYT12</i>
cg15957187_BC21	0,019	13,4	Hipom.	CHR11	4196070	
cg16961793_BC21	0,024	13,3	Hipom.	CHR22	45228598	
cg20916390_TC21	0,019	13,3	Hipom.	CHR15	101616222	
cg06238316_TC21	0,024	13,2	HIPERM.	CHR19	21082558	
cg22699725_TC21	0,005	13,0	Hipom.	CHR1	207069241	

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; FDR: *false discovery rate*; HIPERM: hipermetilación; Hipom: hipometilación;

Todas las DMPs significativas en este análisis se adjuntan en una tabla como material suplementario (Anexo 5, Tabla S1).

Se realizó también un mapa de calor con los valores de metilación diferencial de los 4.640 DMPs significativas (Figura 27).

También se presentan en la figura 28 los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones en forma de gráfico de volcán (volcano plot).

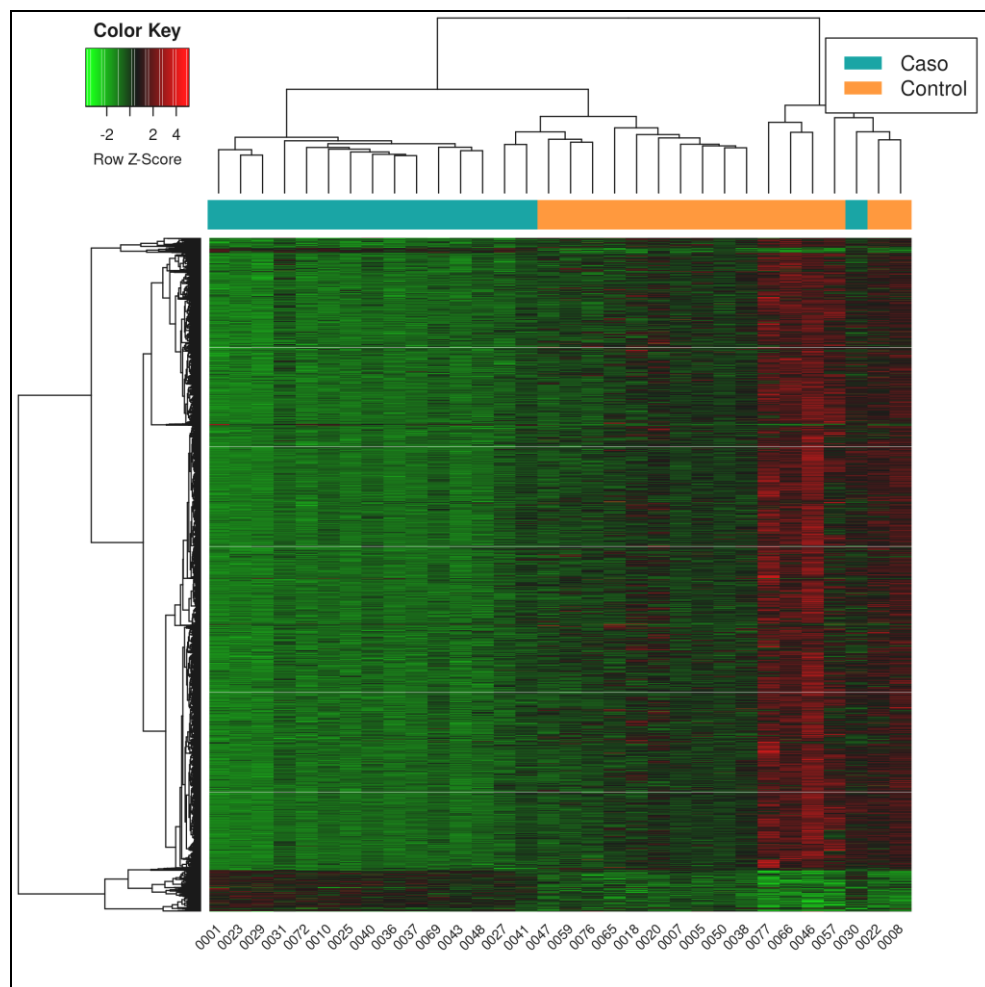


Figura 27. Heatmap con las DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis

DMPs: differential methylated positions

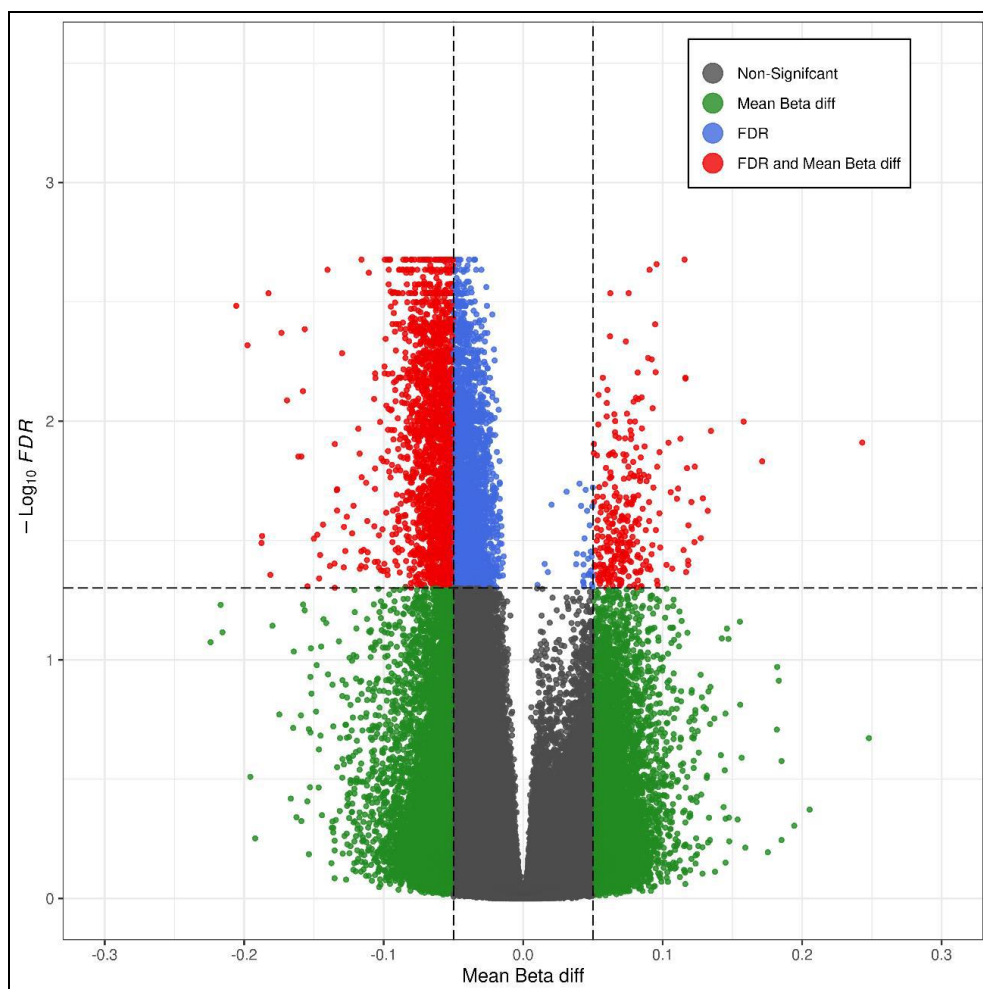


Figura 28. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones (DMPs) entre los pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis

DMPs: differential methylated positions

B) Estudio de la metilación diferencial a nivel de regiones (DMRs) entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis

A continuación, a partir de las DMPs significativas identificadas, se realizó un análisis de metilación diferencial a nivel de regiones en el que se identificaron 85 DMRs estadísticamente significativas (p -valor $<0,05$) con una diferencia media en el valor de metilación de al menos el 5% en valor absoluto), de las que 72 resultaron estar hipometiladas y 13 hipermetiladas.

En la tabla 30 se pueden consultar las 30 regiones diferencialmente metiladas significativas con mayor diferencia media de beta valores entre ambos grupos, el sentido de la alteración (hipermetilado o hipometilado) y el gen en el que se sitúan. Todas las DMRs significativas en este análisis se adjuntan en una tabla como material suplementario (Anexo 5, Tabla S2).

Tabla 30. Top 30 DMRs diferencialmente metiladas significativas (p-valor <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis y pacientes sin sepsis

Cromosoma	Nº posiciones CpG	p-valor	β -valor (Dif. media)		Genes
			%	Sentido	
CHR1	3	0,000	10,6	Hipom.	PFKFB2
CHR17	3	0,002	9,6	Hipom.	MPO
CHR1	4	0,042	9,5	HIPERM.	PPIEL
CHR19	4	0,008	9,1	Hipom.	NFIC
CHR11	3	0,031	8,6	HIPERM.	IFITM2, IFITM1
CHR13	3	0,018	8,3	Hipom.	TFDP1
CHR19	4	0,000	8,2	Hipom.	LINC00664
CHR17	4	0,000	8,1	Hipom.	FOXM2, WDR45B
CHR5	3	0,018	8,1	Hipom.	AC022217.3
CHR16	3	0,002	8,0	Hipom.	MGRN1
CHR11	5	0,001	7,7	HIPERM.	
CHR12	3	0,000	7,4	Hipom.	DYRK4
CHR10	3	0,027	7,4	Hipom.	
CHR16	3	0,000	7,3	Hipom.	
CHR12	3	0,025	7,3	HIPERM.	PITPNM2
CHR16	7	0,000	7,3	Hipom.	SLX4
CHR15	3	0,018	7,2	Hipom.	KLHL25
CHR11	4	0,015	7,2	Hipom.	
CHR10	3	0,002	7,0	Hipom.	COL17A1
CHR14	4	0,048	6,8	Hipom.	WDR20
CHR3	4	0,000	6,8	HIPERM.	LZTFL1
CHR9	3	0,043	6,8	Hipom.	MVB12B
CHR10	4	0,000	6,7	Hipom.	MARCHF8
CHR11	9	0,000	6,6	Hipom.	PIWIL4, FUT4, AP000943.2
CHR11	4	0,000	6,6	Hipom.	OSBPL5
CHR15	3	0,000	6,5	Hipom.	MYO5C
CHR2	3	0,006	6,5	HIPERM.	
CHR17	5	0,006	6,4	Hipom.	KANSL1
CHR19	6	0,002	6,4	Hipom.	SEMA6B
CHR9	3	0,042	6,3	HIPERM.	SEMA4D

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; HIPERM: hipermetilación; Hipom: hipometilación;

C) Estudio de enriquecimiento funcional para la evaluación de las consecuencias moleculares de la alteración del patrón de metilación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis

Finalmente, a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas, se realizó un análisis de sobrerrepresentación (ORA, *over-representation analysis*) para obtener rutas KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*) y términos GO (*Gene ontology*) enriquecidos. En la tabla 31 se presentan los resultados del análisis.

Tabla 31. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis

	Términos significativos a partir de DMPs significativas	Términos significativos a partir de DMRs significativas
KEGG	0	0
GO <i>Biological Process</i>	25	7
GO <i>Molecular Function</i>	0	0
GO <i>Cellular Component</i>	23	1

ORA: *over-representation analysis*; KEGG: *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*; GO: *Gene ontology*

Como se puede observar, el análisis ORA entregó términos significativos para términos GO *Biological Process* y *Cellular component*; pero no para los términos GO *Molecular Function* o rutas KEGG.

Entre los procesos biológicos encontrados destacan algunos muy relevantes en relación con la respuesta inflamatoria y la

inmunidad innata, como la activación y degranulación de neutrófilos o la diferenciación de monocitos. También se encontraron procesos relacionados con la inmunidad adaptativa, como la regulación de la producción de inmunoglobulinas y de la diferenciación de los linfocitos Th2. Por último, se encuentran otros procesos relacionados con la señalización y la proliferación celular, como la vía de señalización del receptor de nucleótidos purinérgicos o la regulación positiva de la proliferación celular de la musculatura lisa vascular.

Respecto a los componentes celulares identificados, es destacable que todos ellos se relacionan con vesículas intracelulares propias de los neutrófilos (también llamados granulocitos): tanto gránulos primarios o azurófilos (lisosomas que contienen las enzimas necesarias para la digestión intracelular y compuestos con actividad bactericida como fosfatasa ácida, lisozima, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas...), como gránulos secundarios o específicos (que contienen lisozima, colagenasa, fosfata alcalina y lactoferrina) y gránulos terciarios o de gelatinasa (liberados sobre todo durante la extravasación, facilitando la migración del neutrófilo al tejido perivascular).

En la figura 29 se representan los términos GO significativos obtenidos en el análisis ORA a partir de las DMPs significativas. Todos los resultados del análisis de enriquecimiento se adjuntan como material suplementario (Anexo 5, Tabla S3).

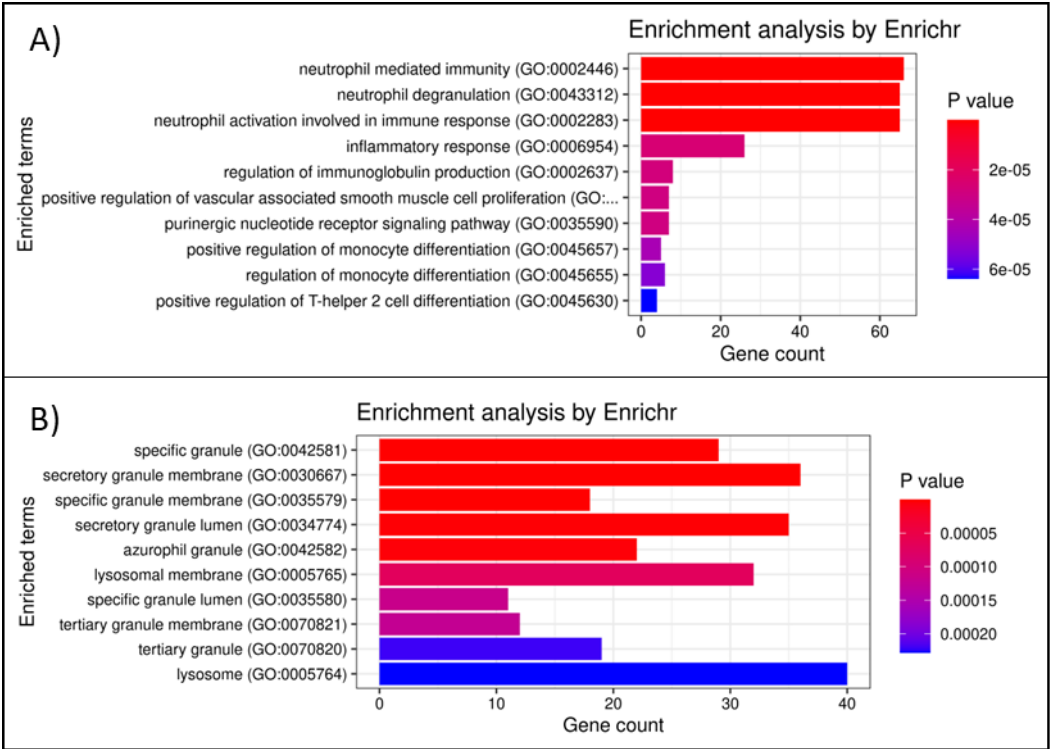


Figura 30. A) Términos GO – Biological process y B) Términos GO – Cellular component significativos obtenidos en el análisis ORA a partir de las DMPs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis

Gene count: número de genes de cada término; *P-value*: p-valor del test realizado

4.3.3. Análisis de metilación diferencial entre subgrupos identificados de interés

Al representar los valores de expresión de las posiciones CpGs con metilación diferencial (DMPs, *differential methylated positions*) más significativas en un gráfico de mapa de calor o *heatmap* (ver figura 27 en el apartado previo), puede observarse que el grado de metilación varía progresivamente, agrupando en un único bloque a los pacientes con sepsis (excepto en un caso), mientras que dentro de los pacientes sin sepsis pueden intuirse dos grupos con distinto grado de metilación.

Atendiendo a esta observación, se revisaron los parámetros inflamatorios y de disfunción orgánica, observando una potencial relación entre los niveles de estos marcadores y la distribución observada de las muestras. Al estratificar a los pacientes de acuerdo con los criterios SIRS (Criterios Sepsis-2), se observó que su distribución se asemejaba a los 3 subgrupos observados en el *heatmap* de metilación diferencial. De acuerdo con estos datos, las muestras se reclasificaron en 4 grupos con niveles crecientes de gravedad:

- Subgrupo 0: Infección sin criterios de SIRS
- Subgrupo 1: Infección con criterios de SIRS
- Subgrupo 2: Infección con criterios de sepsis grave
- Subgrupo 3: Infección con shock séptico

En las tablas 32 y 33 se presenta la relación de las muestras del estudio y el grupo al que pertenecen.

Tabla 32. Reclasificación de las muestras de los pacientes con sepsis (Criterios Sepsis-3) en función de los criterios SIRS (Criterios Sepsis-2)

Paciente	Código de la muestra	Grupo	SOFA	Subgrupo SIRS
S1	SEP-0001-T1	Caso	3	2 (Sepsis grave)
S3	SEP-0010-T1	Caso	4	2 (Sepsis grave)
S5	SEP-0023-T1	Caso	4	2 (Sepsis grave)
S7	SEP-0025-T1	Caso	6	2 (Sepsis grave)
S9	SEP-0027-T1	Caso	3	2 (Sepsis grave)
S10	SEP-0029-T1	Caso	10	3 (Shock séptico)
S11	SEP-0030-T1	Caso	5	1 (SIRS)
S12	SEP-0031-T1	Caso	3	2 (Sepsis grave)
S13	SEP-0036-T1	Caso	3	2 (Sepsis grave)
S14	SEP-0037-T1	Caso	6	3 (Shock séptico)
S16	SEP-0040-T1	Caso	3	2 (Sepsis grave)
S17	SEP-0041-T1	Caso	5	2 (Sepsis grave)
S19	SEP-0043-T1	Caso	4	2 (Sepsis grave)
S21	SEP-0048-T1	Caso	4	2 (Sepsis grave)
S27	SEP-0069-T1	Caso	4	2 (Sepsis grave)
S29	SEP-0072-T1	Caso	5	2 (Sepsis grave)

Tabla 33. Reclasificación de las muestras de los controles con infección sin sepsis (Criterios Sepsis-3) en función de los criterios SIRS (Criterios Sepsis-2)

Paciente	Código de la muestra	Grupo	SOFA	Subgrupo SIRS
C1	SEP-0057-T1	Control	0	0 (No SIRS)
C3	SEP-0022-T1	Control	0	0 (No SIRS)
C5	SEP-0008-T1	Control	1	0 (No SIRS)
C7	SEP-0018-T1	Control	0	1 (SIRS)
C9	SEP-0065-T1	Control	1	1 (SIRS)
C10	SEP-0050-T1	Control	1	0 (No SIRS)
C11	SEP-0005-T1	Control	0	1 (SIRS)
C12	SEP-0059-T1	Control	0	1 (SIRS)
C13	SEP-0038-T1	Control	0	0 (No SIRS)
C14	SEP-0066-T1	Control	0	0 (No SIRS)
C16	SEP-0046-T1	Control	0	0 (No SIRS)
C17	SEP-0047-T1	Control	1	1 (SIRS)
C19	SEP-0020-T1	Control	1	1 (SIRS)
C21	SEP-0007-T1	Control	1	1 (SIRS)
C27	SEP-0076-T1	Control	1	0 (No SIRS)
C29	SEP-0077-T1	Control	0	0 (No SIRS)

Con las muestras seleccionadas para el análisis de metilación, se plantearon las siguientes comparaciones de interés:

- Comparación 1: pacientes del subgrupo 1 (n = 8) vs pacientes del subgrupo 0 (n = 9)
- Comparación 2: pacientes del subgrupo 2 o 3 (n = 15) vs pacientes del subgrupo 0 (n = 9)
- Comparación 3: pacientes del subgrupo 2 o 3 (n = 15) vs pacientes del subgrupo 1 (n = 8)

Una vez seleccionados los grupos y asignados los sujetos de estudio a cada uno de los grupos se procedió a identificar el número de DMPs en cada una de las comparaciones, para posteriormente estudiar la metilación diferencial a nivel de regiones (DMRs, *differential methylated regions*). En la tabla 34 se presenta el número de DMPs estadísticamente significativas ($FDR < 0,05$) en las comparaciones realizadas.

Tabla 34. Número de posiciones diferencialmente metiladas (DMPs) estadísticamente significativas ($FDR < 0,05$) en las comparaciones realizadas.

		DMPs totales	DMPs hipometiladas	DMPs hipermetiladas
Comparación 1	Subgrupo 1 vs Subgrupo 0	1	0	1
Comparación 2	Subgrupo 2+3 vs Subgrupo 0	9736	8690	1046
Comparación 3	Subgrupo 2-3 vs Subgrupo 1	155	149	6

DMPs: differential methylated positions; FDR: *false discovery rate*

4.3.3.1. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con criterios de SIRS y sin criterios de SIRS (Comparación 1)

En esta comparación se obtuvo una única posición CpG con metilación diferencial (cg03421212_BC11, FDR=0,047, β -valor = 6%), situada en el gen MRPL3 (*Mammalian mitochondrial ribosomal protein L3*) sugiriendo que entre estos dos grupos de pacientes apenas existen diferencias de metilación.

4.3.3.2. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS (Comparación 2)

A) Estudio de la metilación diferencial a nivel de posiciones CpGs (DMPs) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

En esta comparación se obtuvieron 9736 DMPs significativas con el criterio de FDR <0,05. Posteriormente, se seleccionaron las DMPs significativas que cumplían el criterio de tener una diferencia media de β -valor entre casos y controles mayor al 8'5%, con lo que se obtuvieron 2028 DMPs. En la tabla 35 se pueden consultar las 50 posiciones CpG significativas con mayor diferencia media de β -valor entre ambos grupos y el sentido de la alteración, así como el gen en el que se sitúa.

Tabla 35. Top 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Sonda CpG	FDR	β -valor (Dif. media)		CHR	Posición	Genes
		%	Sentido			
cg10833066_TC11	0,032	24,7	HIPERM.	CHR12	111369663	<i>PHETA1</i>
cg08895113_BC21	0,004	23,9	Hipom.	CHR5	172775938	
cg25806655_TC11	0,008	23,7	Hipom.	CHR19	4543486	<i>SEMA6B</i>
cg19649900_TC11	0,000	23,2	Hipom.	CHR19	1155031	
cg15658793_TC11	0,018	23,1	Hipom.	CHR19	3398812	
cg13372500_BC21	0,001	22,8	Hipom.	CHR9	5460319	
cg18356337_BC21	0,031	22,7	Hipom.	CHR2	144701638	
cg26715273_BC21	0,001	22,1	Hipom.	CHR17	14738221	
cg07110356_TC11	0,001	21,7	Hipom.	CHR17	58278070	<i>MPO</i>
cg04220636_TC11	0,039	20,9	Hipom.	CHR16	88967680	
cg20995564_TC21	0,001	20,2	Hipom.	CHR2	144414468	
cg08895429_TC21	0,008	19,2	Hipom.	CHR5	172800142	
cg18844038_BC21	0,039	19,2	HIPERM.	CHR12	113987657	
cg25835058_BC21	0,006	19,1	Hipom.	CHR1	15081261	
cg05785753_TC21	0,033	19	Hipom.	CHR11	71478444	<i>NADSYN1</i>
cg07252680_TC21	0,000	18,9	Hipom.	CHR14	94390887	<i>SERPINA1</i>
cg14401490_TC21	0,032	18,5	HIPERM.	CHR9	133701652	
cg05352973_TC21	0,029	17,9	Hipom.	CHR3	112293802	
cg00732067_BC21	0,031	17,9	HIPERM.	CHR10	37994437	
cg23159236_TC11	0,025	17,8	HIPERM.	CHR20	58888947	<i>GNAS</i>
cg14785748_BC21	0,030	17,8	Hipom.	CHR10	22563715	
cg07350590_BC21	0,019	17,7	Hipom.	CHR12	106593180	
cg25310867_BC21	0,003	17,5	Hipom.	CHR11	78293663	
cg21593001_BC11	0,016	17,3	Hipom.	CHR12	113093255	
cg03352173_BC21	0,014	17,2	Hipom.	CHR3	112294283	<i>SLC9C1</i>
cg05678584_BC11	0,005	17,1	Hipom.	CHR20	13995237	<i>SEL1L2; MACROD2</i>
cg17009510_TC21	0,002	17	Hipom.	CHR6	150925251	
cg00683922_BC21	0,007	17	Hipom.	CHR1	207069224	
cg01942530_BC21	0,002	16,7	HIPERM.	CHR8	142880098	<i>CYP11B1</i>
cg03884100_TC21	0,001	16,6	Hipom.	CHR17	46171275	<i>KANSL1</i>

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; FDR: *false discovery rate*; HIPERM: hipermetilación; Hipom: hipometilación.

Todas las DMPs significativas en la comparación 2 se adjuntan en una tabla como material suplementario (Anexo 5, Tabla S4).

A continuación, se realizó un mapa de calor con los valores de metilación diferencial de los 9736 DMPs significativas (Figura 31). Se observó una agrupación bastante buena de las muestras en sus respectivos grupos y un patrón de metilación muy similar a la que se podía distinguir en el mapa de calor que se obtuvo en el primer análisis del conjunto total de las muestras (Figura 27). También se presentan en la figura 32 los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones en forma de gráfico de volcán (volcano plot).

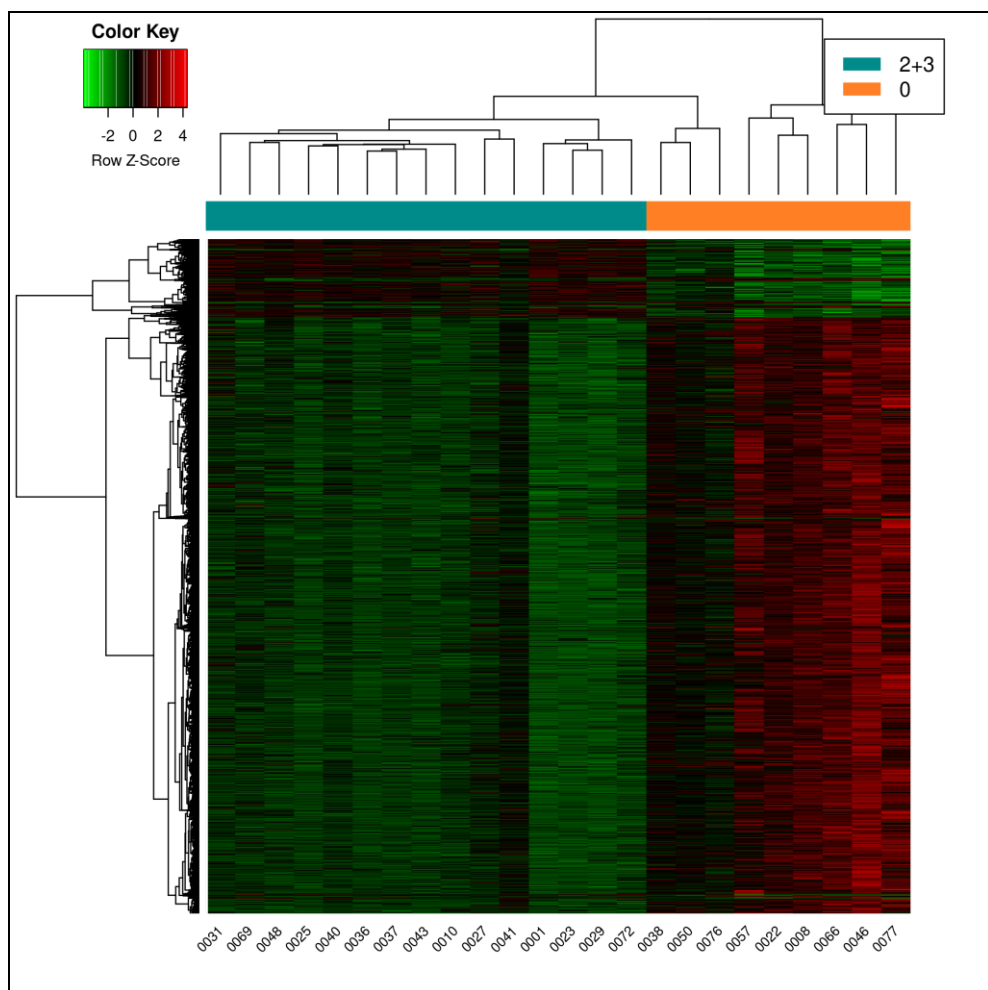


Figura 31. *Heatmap* con las 9736 DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre los pacientes con sepsis grave/shock séptico y sin criterios de SIRS

DMPs: differential methylated positions

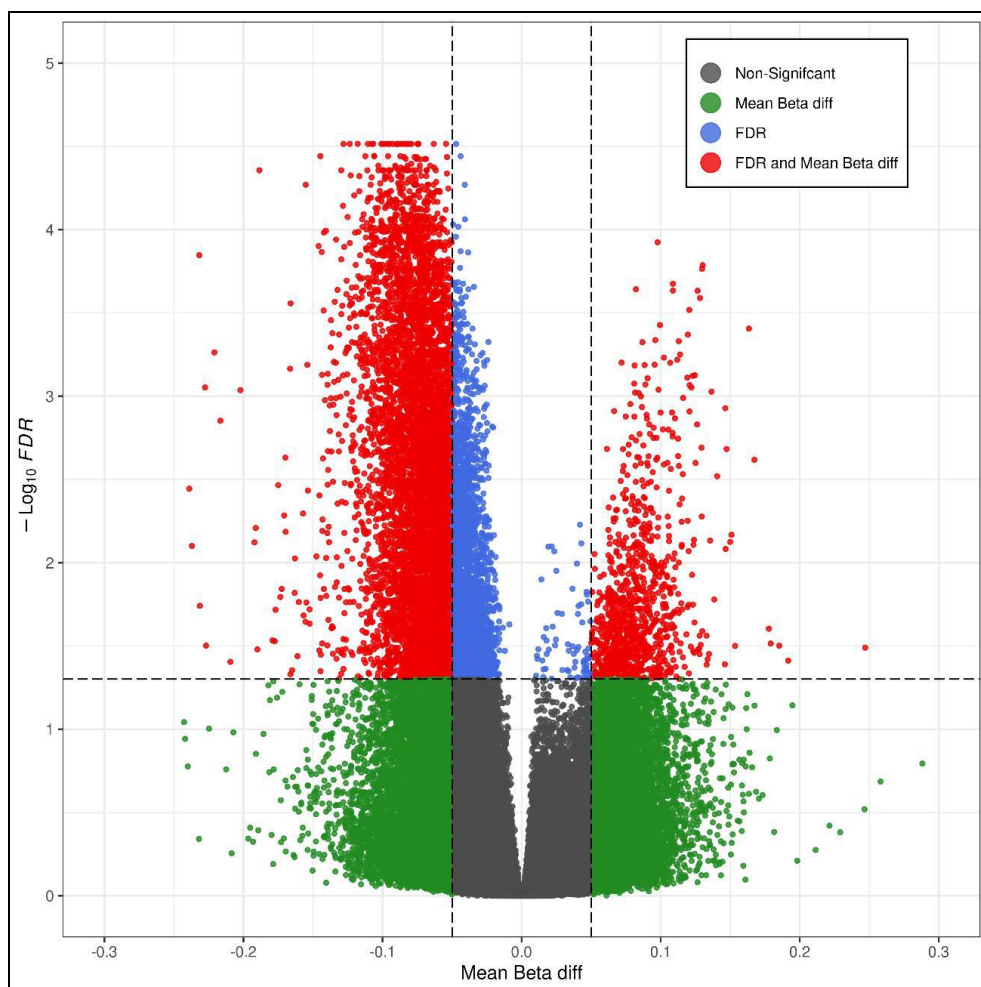


Figura 32. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones entre los pacientes con sepsis grave/shock séptico y sin criterios de SIRS

B) Estudio de la metilación diferencial a nivel de regiones (DMRs) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Posteriormente, a partir de las DMPs significativas identificadas en el análisis de sitios de metilación CpG, se realizó un análisis de metilación diferencial a nivel de regiones. Se identificaron 401 DMRs estadísticamente significativas ($FDR < 0,05$ y diferencia media en el valor de metilación de al menos el 5% en valor absoluto), de las que 345 resultaron estar hipometiladas y 56 hipermetiladas.

En la tabla 36 se pueden consultar las 30 regiones diferencialmente metiladas significativas con mayor diferencia media de β -valor entre ambos grupos, el sentido de la alteración y el gen en el que se sitúan. Todas las DMRs significativas en la comparación 2 se adjuntan en una tabla como material suplementario (Anexo 5, Tabla S5).

Tabla 36. Top 30 DMRs significativas (p-valor <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Cromosoma	Nº posiciones CpG	p-valor	β -valor (Dif. media)		Genes
			%	Sentido	
CHR10	4	0,003	13,9	Hipom.	PIP4K2A
CHR3	5	0,005	13,0	Hipom.	SLC9C1
CHR19	3	0,013	12,2	HIPERM.	PLEKHF1
CHR1	3	0,000	11,7	Hipom.	PFKFB2
CHR17	4	0,000	11,5	Hipom.	MPO
CHR19	4	0,000	11,2	Hipom.	LINC00664
CHR9	9	0,036	11,1	HIPERM.	SARDH
CHR17	4	0,000	10,7	Hipom.	FOXK2, WDR45B
CHR13	3	0,001	10,7	Hipom.	TFDP1
CHR19	4	0,000	10,6	Hipom.	NFIC
CHR16	3	0,000	10,4	Hipom.	MGRN1
CHR14	4	0,000	10,2	Hipom.	WDR20
CHR11	5	0,000	10,1	HIPERM.	
CHR12	3	0,000	10,0	Hipom.	DYRK4
CHR17	5	0,000	10,0	Hipom.	KANSL1
CHR5	4	0,000	9,8	Hipom.	EXOC3
CHR16	3	0,000	9,7	Hipom.	
CHR17	3	0,000	9,6	Hipom.	
CHR11	4	0,009	9,6	HIPERM.	IFITM2, IFITM1
CHR10	4	0,000	9,6	Hipom.	MARCHF8
CHR11	4	0,000	9,5	Hipom.	OSBPL5
CHR12	3	0,000	9,5	HIPERM.	PITPNM2
CHR11	4	0,005	9,5	Hipom.	FLI1
CHR5	4	0,001	9,4	Hipom.	AC022217.3
CHR8	3	0,000	9,2	Hipom.	RAB2A
CHR10	3	0,000	9,2	Hipom.	COL17A1
CHR20	3	0,012	9,2	HIPERM.	PPP1R16B, RN7SL116P
CHR3	4	0,000	9,1	HIPERM.	LZTFL1
CHR11	9	0,000	9,1	Hipom.	PIWIL4, FUT4, AP000943.2
CHR15	3	0,000	9,0	Hipom.	MYO5C
CHR16	8	0,000	8,9	Hipom.	SLX4

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; HIPERM: hipermetilación; Hipom: hipometilación.

C) Estudio de enriquecimiento funcional para la evaluación de las consecuencias moleculares de la alteración del patrón de metilación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Finalmente, a partir de los genes anotados a las DMRs significativas, se realizó un análisis de sobrerrepresentación ORA para obtener rutas KEGG y términos GO enriquecidos. En la tabla 37 se presentan los resultados del análisis.

Tabla 37. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente ($FDR < 0,05$) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS.

	Términos significativos
KEGG	5
GO <i>Biological Process</i>	4
GO <i>Molecular Function</i>	0
GO <i>Cellular Component</i>	16

ORA: *over-representation analysis*; KEGG: *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*; GO: *Gene ontology*

Como se puede observar, el análisis ORA proporcionó varios términos significativos para las rutas KEGG y todos los términos GO analizados excepto para los términos GO *Molecular Function*.

En este análisis encontramos algunos términos GO coincidentes con la comparación inicial entre pacientes con

sepsis y pacientes sin sepsis. Entre ellos destacan procesos biológicos relacionados con la inmunidad innata como la activación y la degranulación de neutrófilos, y los componentes celulares relacionados con gránulos azurófilos y específicos propios de los neutrófilos. Además, encontramos nuevos términos relacionados con procesos biológicos (como la regulación positiva de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular) y componentes celulares como el complejo receptor alfa-beta de los linfocitos T u otros más generales (de la región cortical celular y del espacio intermembrana nuclear).

Entre las rutas KEGG encontramos algunas propias de la regulación y activación de los linfocitos T (la vía de señalización de los receptores de linfocitos T, y la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17) y otras asociadas a la patogénesis del cáncer (como la vía del *checkpoint* PD-1 y la expresión de PD-L1, y la alteración de la regulación transcripcional).

En la Figura 33 se presentan los términos *GO Biological Process* y *Cellular component*, así como las rutas *KEGG* significativas obtenidos en el análisis de enriquecimiento por ORA. Todos los resultados del análisis de enriquecimiento de la comparación 2 se adjuntan como material suplementario (Anexo 5, Tabla S6).

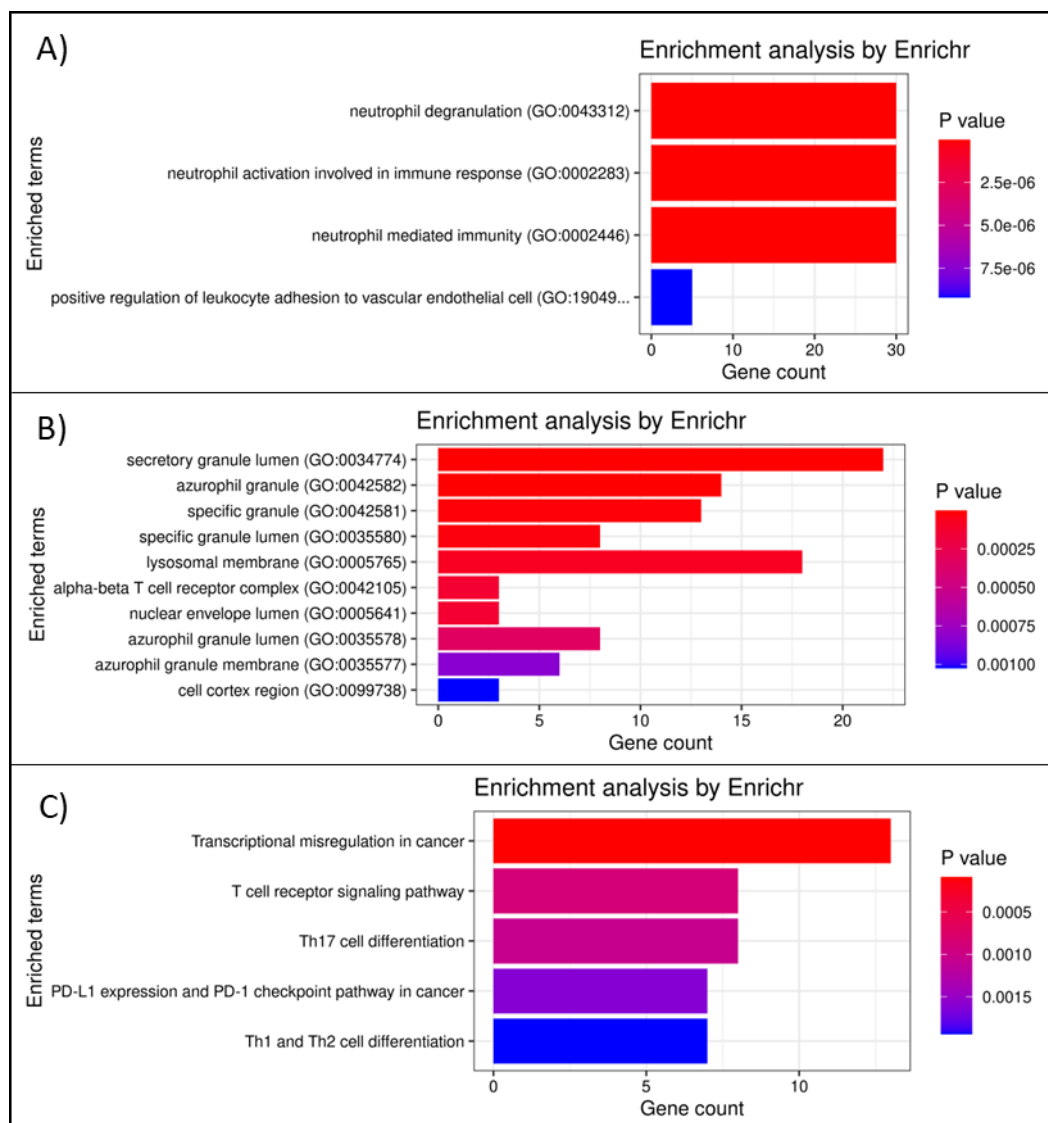


Figura 33. A) Términos GO – Biological process, B) Términos GO – Cellular component y C) rutas KEGG significativas obtenidas en el análisis ORA en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Gene count: número de genes de cada término; *P-value*: p-valor del test realizado

4.3.3.3. Análisis de la metilación diferencial entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS (Comparación 3)

A) Estudio de la metilación diferencial a nivel de CpGs (DMPs) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

En esta última comparación se obtuvieron 155 DMPs significativas con el criterio de $FDR < 0,05$, de las que 149 estaban hipometiladas y 6 hipermetiladas. Posteriormente, se seleccionaron las DMPs significativas que tuvieron una diferencia media de β -valor entre casos y controles mayor al 6%, con lo que se obtuvieron 53 DMPs. En la Tabla 38 se pueden consultar las 30 sondas CpG significativas con mayor diferencia media de β -valor entre ambos grupos y el sentido de la alteración, así como el gen en el que se sitúa. Todas las DMPs significativas en la comparación 3 se adjuntan en una tabla como material suplementario (Anexo 5, Tabla S7).

A continuación, se realizó un nuevo mapa de calor con los valores de metilación diferencial de los 155 DMPs significativas (Figura 34) en la comparación entre pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS. Los resultados del

análisis de metilación diferencial a nivel de DMPs en forma de gráfico de volcán se muestra en la figura 32.

Tabla 38. Top 30 DMPs significativas (FDR <0,05) con la mayor diferencia media de β -valor entre pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Sonda CpG	FDR	β -valor (Dif. media)		CHR	Posición	Genes
		%	Sentido			
cg02447462_TC11	0,048	21,0	HIPERM.	CHR19	861071	
cg08607984_TC21	0,047	13,4	HIPERM.	CHR17	73724202	
cg20780880_TC21	0,044	12,7	Hipom.	CHR6	8102851	EEF1E1; EEF1E1-BLOC1S5
cg07252680_TC21	0,048	11,3	Hipom.	CHR14	94390887	SERPINA1
cg21811196_TC11	0,043	11,1	Hipom.	CHR16	81497995	
cg18497973_TC21	0,044	10,0	Hipom.	CHR3	81741472	
cg03282313_BC21	0,043	9,1	Hipom.	CHR2	112787476	
cg14942799_TC21	0,044	9,1	HIPERM.	CHR10	26944522	
cg17748589_BC21	0,044	8,8	Hipom.	CHR12	65925444	
cg00188241_TC21	0,046	8,7	Hipom.	CHR1	9278327	
cg15610437_TC21	0,043	8,7	Hipom.	CHR19	827821	AZU1
cg07984817_BC21	0,043	8,6	Hipom.	CHR13	29860258	
cg14184749_BC21	0,043	8,6	Hipom.	CHR9	120403620	
cg16282304_BC21	0,043	8,5	Hipom.	CHR11	46009772	
cg18038894_BC21	0,043	8,5	Hipom.	CHR17	50429024	
cg10100194_BC21	0,043	8,4	Hipom.	CHR6	131575980	
cg07511565_BC21	0,043	8,4	HIPERM.	CHR2	37196218	CEBPZOS; SULT6B1
cg20445852_BC21	0,043	8,2	Hipom.	CHR15	58521562	
cg22982464_TC21	0,043	8,2	Hipom.	CHR12	24704290	
cg10487428_BC21	0,043	8,1	Hipom.	CHR5	60263391	
cg15966006_BC21	0,049	8,1	Hipom.	CHR22	37133739	
cg16340869_BC21	0,044	7,9	HIPERM.	CHR16	84766009	
cg17442155_TC21	0,044	7,8	Hipom.	CHR7	100358052	PILRB
cg25104556_BC21	0,043	7,6	Hipom.	CHR10	88878534	
cg18066488_BC21	0,049	7,5	HIPERM.	CHR12	109568233	
cg13413384_BC21	0,049	7,4	Hipom.	CHR9	134410385	
cg21831857_BC21	0,047	7,2	Hipom.	CHR18	44686284	
cg15086439_TC21	0,043	7,2	Hipom.	CHR1	236399770	
cg16023546_BC21	0,044	7,2	Hipom.	CHR5	10582316	
cg26894102_TC21	0,049	7,2	Hipom.	CHR13	75582006	

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; FDR: *false discovery rate*; HIPERM: hipermetilación; Hipom: hipometilación.

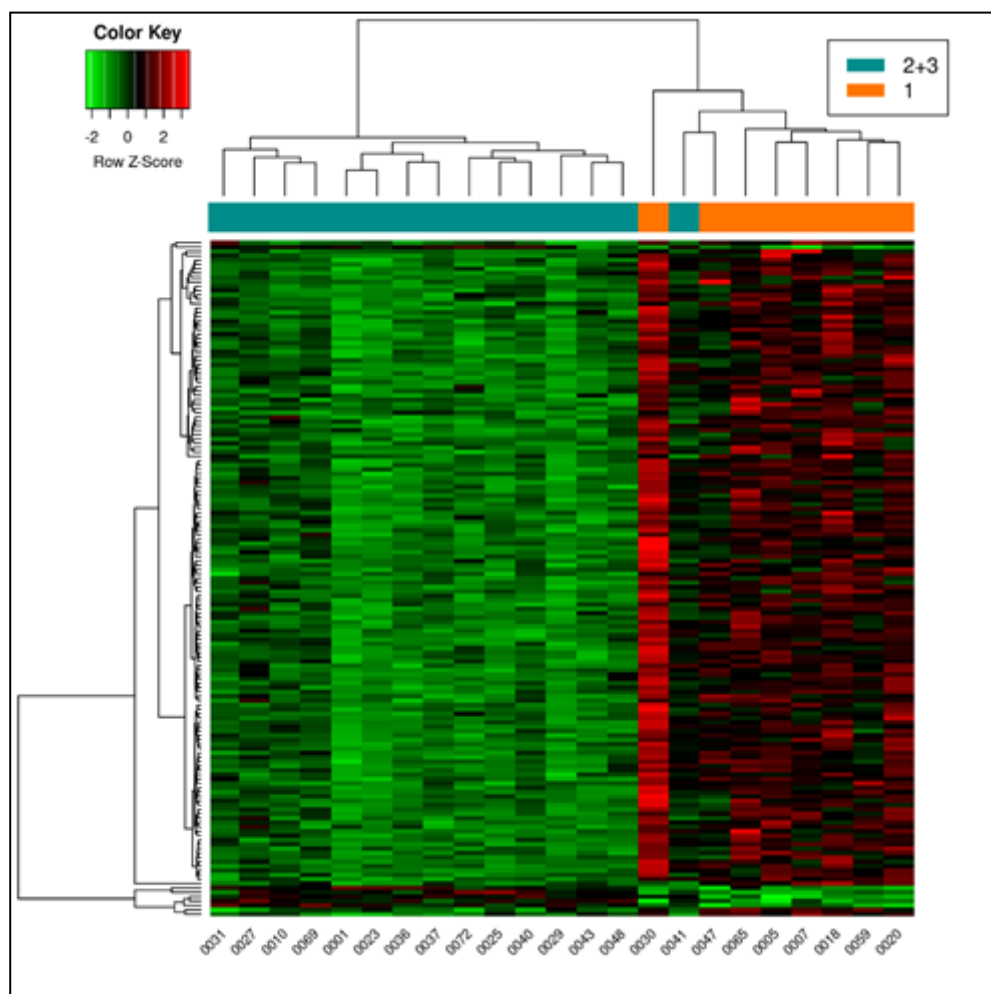


Figura 34. *Heatmap* con las 155 DMPs más significativas en el análisis de metilación diferencial de posiciones entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

DMPs: differential methylated positions

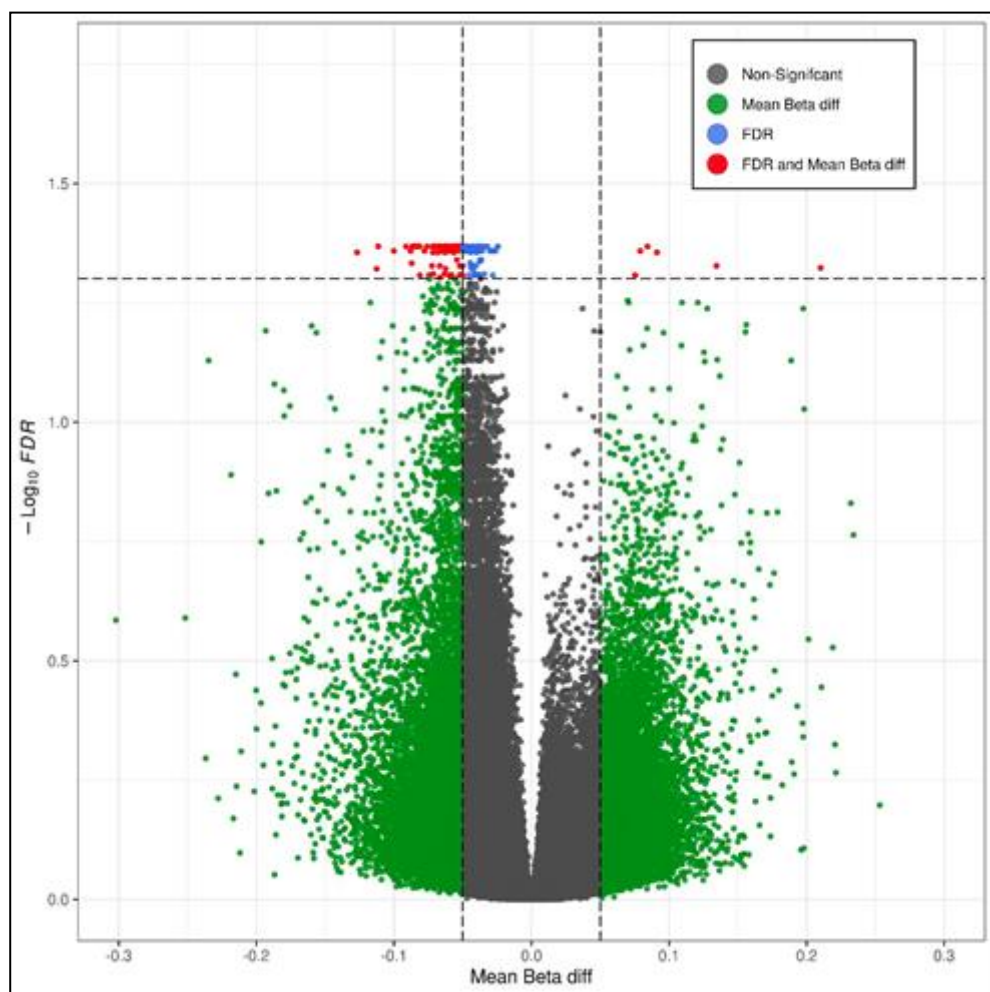


Figura 35. Gráfico de volcán representando los resultados del análisis de metilación diferencial a nivel de posiciones entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

B) Estudio de la metilación diferencial a nivel de regiones (DMRs) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Una vez más, a partir de las DMPs significativas identificadas en esta última comparación, se realizó un análisis de metilación diferencial a nivel de regiones según el criterio de que fueran estadísticamente significativas ($FDR < 0,10$ y diferencia media en el valor de metilación de al menos el 5% en valor absoluto). Con este criterio se consiguieron identificar 2 DMRs hipometiladas y ninguna hipermetilada en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS.

En la Tabla 39 se pueden consultar las 2 regiones diferencialmente metiladas significativas con mayor diferencia media de beta valores entre ambos grupos, el sentido de la alteración y el gen en el que se sitúan.

Tabla 39. DMRs diferencialmente metiladas significativas (p -valor $< 0,05$) con la mayor diferencia media de β -valor entre pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Cromosoma	Nº posiciones CpG	p-valor	β -valor (Dif. media)		Genes
			%	Sentido	
CHR12	3	0,007	6,1	Hipom.	DYRK4
CHR16	7	0,008	5,6	Hipom.	SLX4

CpG: dinucleótidos citosina-guanina; CHR: cromosoma; Hipom: hipometilación.

C) Estudio de enriquecimiento funcional para la evaluación de las consecuencias moleculares de la alteración del patrón de metilación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Finalmente, a partir de los genes anotados a las DMRs significativas, se realizó un nuevo análisis ORA para obtener rutas KEGG y términos GO enriquecidos. En la Tabla 40 se presentan los resultados del análisis.

Tabla 40. Número de rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR <0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

	Términos significativos
KEGG	1
GO <i>Biological Process</i>	29
GO <i>Molecular Function</i>	6
GO <i>Cellular Component</i>	0

ORA: *over-representation analysis*; KEGG: *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*; GO: *Gene ontology*

Como se puede observar, en esta ocasión el análisis ORA entregó términos significativos para las rutas KEGG y todos los términos GO analizados excepto para los términos *GO Cellular Component*.

Esta vez, los procesos biológicos identificados no fueron tan específicos del sistema inmunitario, si no que se relacionaron con la regulación del ADN celular: respuesta al

daño del ADN, la reparación del ADN, el mantenimiento de telómeros y la formación de ADN extracromosómico circular. En la misma línea, se identificaron términos GO relacionados con funciones moleculares propias de la regulación del ADN (actividad endorribonucleasa y endonucleasa) y la fosforilación proteica (actividad proteína quinasa de serina/treonina).

La ruta KEGG identificada fue la vía de la anemia de Fanconi, relacionada con mecanismos de protección frente a la inestabilidad del genoma.

En la Figura 36 se presentan los términos GO *Biological Process* y *Molecular Function* significativos obtenidos en el análisis de enriquecimiento ORA. Todos los resultados del análisis de enriquecimiento de la comparación 3 se adjuntan como material suplementario (Anexo 5, Tabla S8).

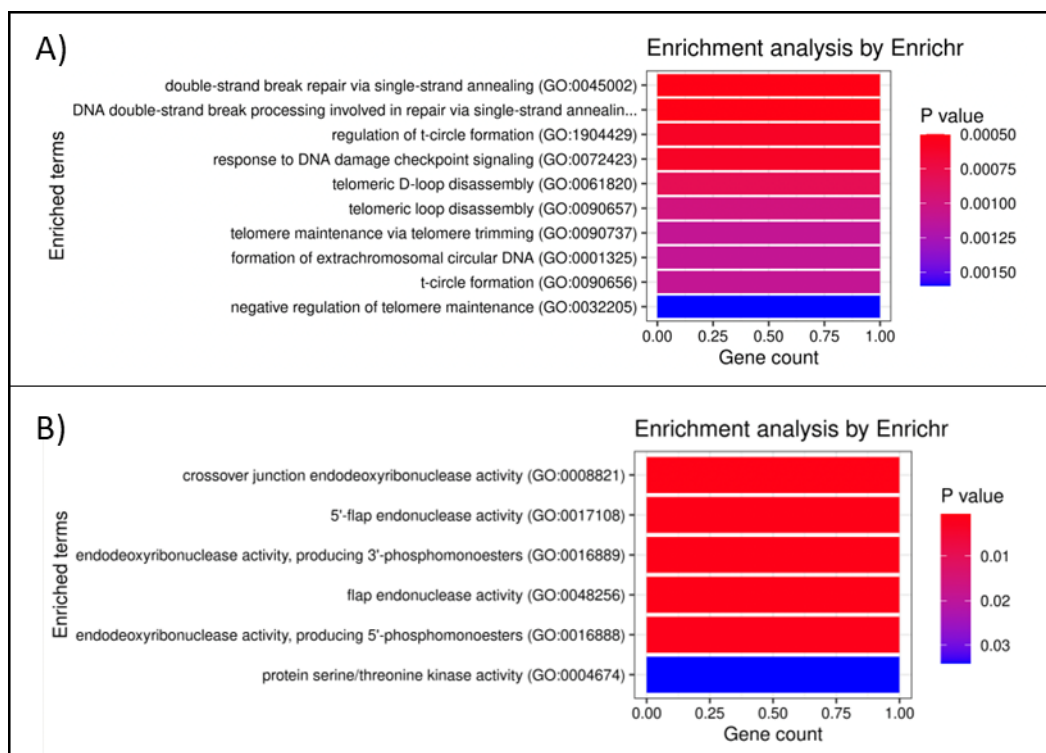


Figura 36. A) Términos GO – *Biological process* y B) términos GO – *Molecular function* significativos obtenidos en el análisis ORA en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Gene count: número de genes de cada término; *P-value*: p-valor del test realizado

4.4. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE LA METILACIÓN DIFERENCIAL ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS DE ANÁLISIS

4.4.1. Selección de los genes con mayor potencial para su validación

Se revisaron y seleccionaron aquellos genes con mayor metilación diferencial que tuvieran una participación significativa en vías moleculares o celulares implicadas en la respuesta inmunitaria identificadas en el análisis de enriquecimiento y cuya identificación se lograra en la mayoría de las comparaciones. Los genes seleccionados fueron investigados en términos de su relevancia biológica en la sepsis, basándonos en los diferentes procesos biológicos en los que estaban involucrados y en los hallazgos previos reportados por otros autores. Con esta primera aproximación se identificaron 4 genes como posibles candidatos para su validación mediante pirosecuenciación:

- *SERPINA1* (*serpin family A member 1*) Y *AZU1* (*azurocidin 1*): estos genes, que codifican para una proteína inhibidora de serina proteasa y de la azurocidina 1, respectivamente; mostraron diferencias de metilación significativas en el estudio de DMPs en todas las comparaciones, así como en el estudio de DMRs en la comparación 2. Entre las rutas biológicas identificadas en los términos GO, se observan las rutas de control de los gránulos azurófilos (*AZU1*) y de la actividad de los neutrófilos (*SERPINA1*), que destacan como rutas altamente reguladas por los DMRs identificados.

- *MPO (myeloperoxidase)*: se encontraron entre las DMPs y DMRs con mayor metilación diferencial tanto en la comparación inicial como en la comparación 2. Además, entre las rutas biológicas identificadas destacó por su relación con múltiples procesos biológicos y componentes celulares de las rutas de control de actividad de los neutrófilos (degranulación y activación inmunitaria) y de los gránulos azurófilos, entre otros procesos.
- *SLX4 (Structure-Specific Endonuclease Subunit)*: se encontraron diferencias en la metilación tanto en la comparación inicial como las comparaciones 2 y 3, destacando especialmente por ser los únicos el único gen detectado entre las DMRs significativas en la comparación 3, junto al gen *DYRK4*. El gen *SLX4*, que codifica para la proteína *Structure-Specific Endonuclease Subunit*, destacó por su relación con múltiples términos GO significativos en el análisis ORA, tanto de procesos biológicos como de funciones moleculares implicadas en la reparación o procesamiento del ADN, y en la ruta de la anemia de Fanconi.

Los cuatro genes mostraron un estado de hipometilación en los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis por criterios Sepsis-3 (SOFA score, comparación inicial). Igualmente se observó hipometilación de los citados genes en los pacientes con shock séptico y sepsis grave frente a los pacientes con SIRS (comparación 2) y sin SIRS (comparación 3). En la tabla 41 se

muestran dichos genes, la diferencia media de su grado de metilación (β -valor) entre los grupos de las principales comparaciones realizadas, y las comparaciones en las que el análisis ORA fue significativo.

Tabla 41. Genes identificados con mayor metilación diferencial significativa en las principales comparaciones y con implicación en sistemas de control de la respuesta inmunitaria

GEN	Comparación inicial (Sepsis VS No sepsis)		Comparación 2 (Sepsis grave y shock VS no SIRS)		Comparación 3 (Sepsis grave y shock VS SIRS)		ORA significativo
	DMPs (n=4640)	DMRs (n=85)	DMPs (n=9736)	DMRs (n=401)	DMPs (n=155)	DMRs (n=2)	
SERPINA1 (β -valor)	-14%	X	-18,9%	-6,1%	-11,3%	X	Comparación inicial y 2
AZU1 (β -valor)	-9,5%	X	-8,8%	-7%	-8,7%	X	Comparación inicial y 2
MPO (β -valor)	-15%	-9,6%	-21,7%	-11,5%	X	X	Comparación inicial y 2
SLX4 (β -valor)	-9,1%	-7,2%	-8,8%	-8,9%	-6,3%	-5,6%	Comparación inicial y 3

DMPs: *differential methylated positions*; DMRs: *differential methylated regions*; ORA: *over-representation analysis*;

β -valor: grado de metilación. Se representa la diferencia media entre ambos grupos, en porcentaje. El valor negativo indica hipometilación.

4.4.2. Validación del análisis de metilación diferencial mediante pirosecuenciación

Como se describe en la sección previa, se seleccionaron 4 genes como potencialmente relevantes. A continuación, llevamos a cabo un análisis del grado de metilación de dichos genes mediante pirosecuenciación para confirmar los patrones de metilación. Se realizaron 2 análisis simultáneos, el primero con 30 muestras de los pacientes de la cohorte de descubrimiento, y un segundo análisis con los 28 pacientes restantes del estudio que conformaron una cohorte independiente de validación. Las muestras analizadas fueron las extraídas en el momento del ingreso en todos los casos. Hubo 2 muestras de la cohorte de descubrimiento que no pudieron analizarse por haber consumido todo el ADN disponible en el análisis inicial. Las cohortes analizadas se representan en la tabla 42.

Los resultados obtenidos en los experimentos de pirosecuenciación nos permitieron confirmar las diferencias en el grado de metilación para todas las posiciones CpG analizadas. Específicamente, observamos diferencias estadísticamente significativas en todos los análisis del grado de metilación, con un estado de hipometilación en los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis, en los 4 genes y en ambas cohortes. El gen *SERPINA1* se observó un 14% hipometilado en el grupo con sepsis frente al grupo sin sepsis. De forma similar, los genes *AZU1*, *MPO* y *SLX4* aparecieron hipometilados en torno al 5% en los pacientes con sepsis respecto al grupo sin sepsis. Los datos se muestran de forma desglosada en la tabla 43 y en la figura 37.

Tabla 42. Distribución de pacientes en las cohortes de descubrimiento y de validación para su análisis de metilación mediante pirosecuenciación.

Cohorte de descubrimiento (n = 30)				Cohorte de validación (n = 28)			
Casos / Sepsis (n = 16)		Controles / No sepsis (n = 14)		Casos / Sepsis (n = 14)		Controles / No sepsis (n = 14)	
Paciente	Muestra	Paciente	Muestra	Paciente	Muestra	Paciente	Muestra
S1	SEP-0001-T1	C1	SEP-0057-T1	S2	SEP-0009-T1	C2	SEP-0032-T1
S3	SEP-0010-T1	C3	SEP-0022-T1	S4	SEP-0014-T1	C4	SEP-0016-T1
S5	SEP-0023-T1	C5	SEP-0008-T1	S6	SEP-0024-T1	C6	SEP-0067-T1
S7	SEP-0025-T1	C7	X	S8	SEP-0026-T1	C8	SEP-0045-T1
S9	SEP-0027-T1	C9	SEP-0065-T1	S15	SEP-0039-T1	C15	SEP-0058-T1
S10	SEP-0029-T1	C10	SEP-0050-T1	S18	SEP-0042-T1	C18	SEP-0053-T1
S11	SEP-0030-T1	C11	SEP-0005-T1	S20	SEP-0044-T1	C20	SEP-0071-T1
S12	SEP-0031-T1	C12	SEP-0059-T1	S22	SEP-0049-T1	C22	SEP-0052-T1
S13	SEP-0036-T1	C13	SEP-0038-T1	S23	SEP-0051-T1	C23	SEP-0063-T1
S14	SEP-0037-T1	C14	SEP-0066-T1	S24	SEP-0054-T1	C24	SEP-0056-T1
S16	SEP-0040-T1	C16	SEP-0046-T1	S25	SEP-0061-T1	C25	SEP-0060-T1
S17	SEP-0041-T1	C17	SEP-0047-T1	S26	SEP-0062-T1	C26	SEP-0064-T1
S19	SEP-0043-T1	C19	X	S28	SEP-0070-T1	C28	SEP-0068-T1
S21	SEP-0048-T1	C21	SEP-0007-T1	S30	SEP-0075-T1	C30	SEP-0003-T1
S27	SEP-0069-T1	C27	SEP-0076-T1				
S29	SEP-0072-T1	C29	SEP-0077-T1				

X: 2 muestras de la cohorte de descubrimiento no pudieron ser analizadas mediante pirosecuenciación por haberse agotado el ADN disponible en el análisis inicial.

Tabla 43. Diferencias del grado de metilación en el análisis mediante pirosecuenciación

Gen	Cohorte de descubrimiento (n = 30)		Cohorte Validación (n = 28)		Total (n = 58)	
	Met. (%)	p-valor	Met. (%)	p-valor	Met. (%)	p-valor
<i>SERPINA1</i> CpG1	-19,2	0,002	-11,74	0,025	-14,3	<0,0001
<i>AZU1</i> CpG1	-7,65	0,001	-2,96	0,049	-5,3	<0,0001
<i>AZU1</i> CpG2	-9,55	0,002	-3,34	0,042	-5,4	<0,0001
<i>MPO</i> CpG1	-6,44	0,007	-3,17	<0,001	-4,5	<0,0001
<i>MPO</i> CpG2	-6,75	0,011	-3,04	0,025	-4,5	<0,0001
<i>SLX4</i> CpG1	-9,83	0,003	-5,28	0,025	-5,6	0,0002
<i>SLX4</i> CpG2	-10,64	0,002	-4,25	0,034	-5,3	<0,0001
<i>SLX4</i> CpG3	-8,56	0,005	-3,14	0,033	-4,1	<0,0001

Met: diferencia de medianas entre ambos grupos. El valor negativo indica hipometilación

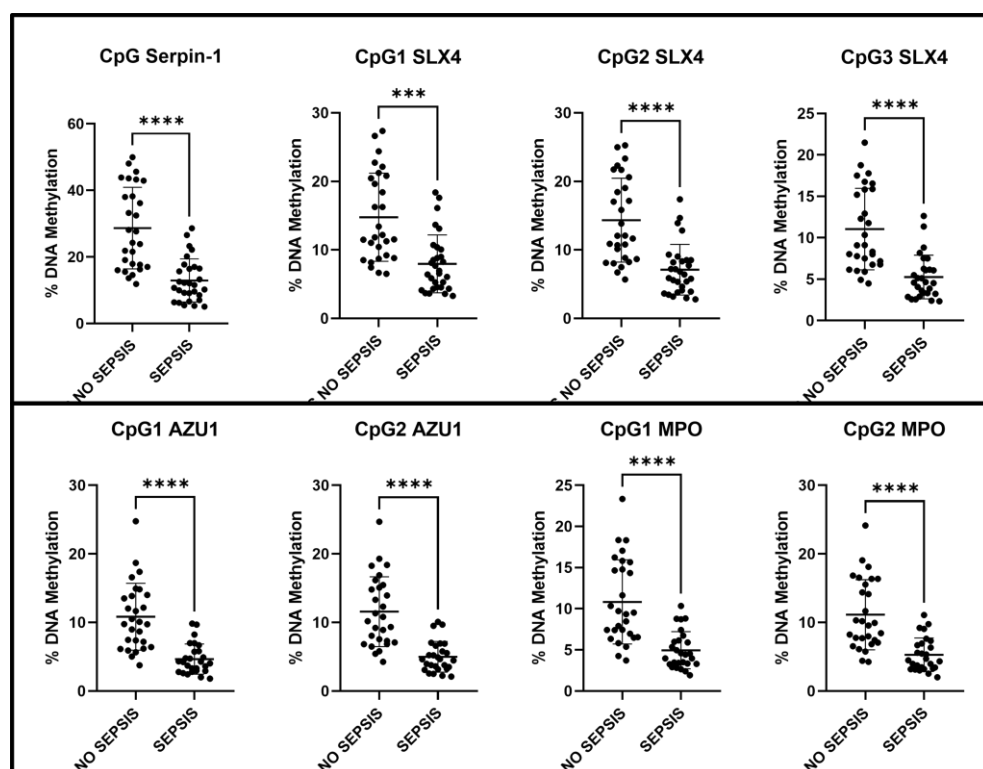


Figura 37. Grado de metilación en porcentaje (%) de las posiciones CpG analizadas de los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO* y *SLX4*, en pacientes con sepsis frente a pacientes sin sepsis.

*** p-valor <0,001 **** p-valor < 0,0001

4.4.3. Estudio de correlaciones entre la metilación diferencial y distintas variables clínicas

Se realizó un cálculo de correlaciones usando el coeficiente de correlación de Spearman, con el que se obtuvo un valor de correlación y un p-valor para cada variable y grado de metilación de cada gen analizado según el apartado previo. Se obtuvieron

correlaciones significativas para todas las variables relacionadas con escalas de gravedad, constantes vitales y resultados analíticos relacionados con la inflamación y fracaso orgánico.

Las variables con mayor grado de asociación para todos los genes fueron la escala SOFA al ingreso y los niveles de procalcitonina en las primeras 24h. No se encontró correlación significativa con la temperatura, la puntuación de la escala Glasgow, los niveles de hemoglobina o bilirrubina, las cifras de plaquetas, pH o lactato. Todos los resultados de las correlaciones significativas (p -valor $< 0,01$) se muestran en la figura 38.

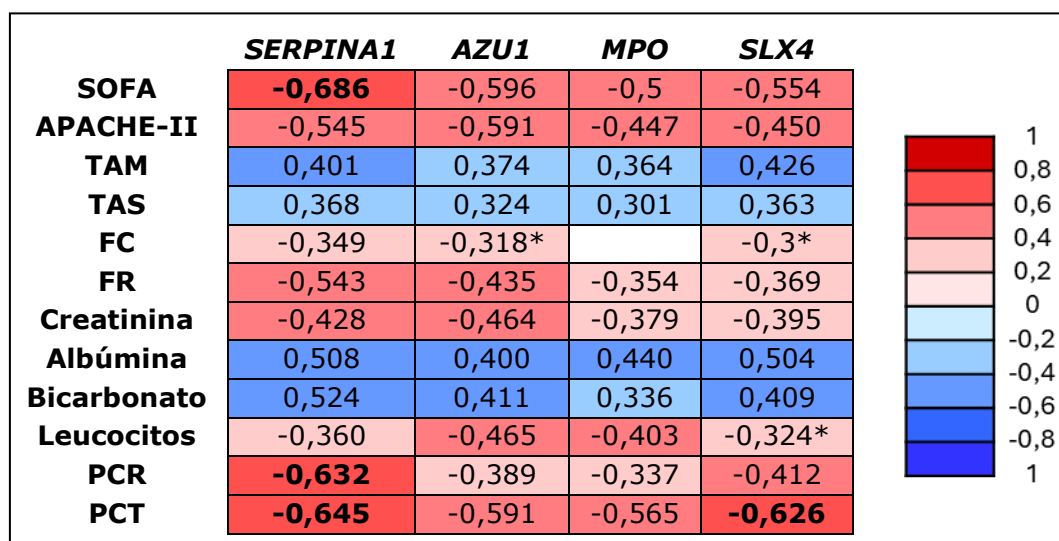


Figura 38. Mapa de calor de representando los coeficientes de correlación de Spearman (-1 a +1) significativos ($p < 0,001$) entre los genes identificados y las principales variables clínicas. El color rojo representa una correlación negativa y el color azul una correlación positiva entre los parámetros

*Correlación significativa p -valor $< 0,05$.

4.5. PRONÓSTICO A CORTO Y LARGO PLAZO. NUEVOS BIOMARCADORES

4.5.1. Factores clínicos predictivos de mal pronóstico a corto y largo plazo

Se analizaron los factores basales de los pacientes y los factores clínicos relacionados con la gravedad de la infección con el mal pronóstico a corto plazo y largo plazo.

Se consideró mal pronóstico a corto plazo la presencia de uno de los siguientes sucesos: muerte intrahospitalaria o en los primeros 30 días tras el alta, necesidad de ingreso en UCI o necesidad de reingreso en los primeros 30 días tras el alta. Se encontraron diferencias significativas en los pacientes con mal pronóstico a corto plazo en la presencia de una baja puntuación en la escala MNA de cribado nutricional en el momento del ingreso (57,1 vs 23,9%, $p = 0,019$), en las puntuaciones de las escalas qSOFA ≥ 2 (71,4 vs 30,4%, $p = 0,006$), SOFA ≥ 2 (85,7 vs 39,1%, $p = 0,006$) y APACHE-II ≥ 10 (85,7 vs 47,8%, $p = 0,012$), así como en la presencia de Shock séptico (21,4 vs 0%, $p = 0,012$). En cuanto a los parámetros de laboratorio, los niveles más elevados de creatinina y procalcitonina, así como los niveles más bajos de albúmina, hemoglobina, linfocitos CD4 y NK se asociaron con significativamente con mal pronóstico a corto plazo. Los resultados se muestran en la tabla 44.

Tabla 44. Factores clínicos asociados al pronóstico a corto plazo: Características basales, escalas clínicas y datos de laboratorio

	Mal pronóstico corto plazo* (n=14)	Buen pronóstico corto plazo* (n=46)	p- valor
Edad ≥80 años, n (%)	5 (35,7)	18 (39,1)	0,818
Sexo femenino, n (%)	9 (64,3)	26 (56,5)	0,594
Dependiente ABVD: Barthel <100, n (%)	5 (35,7)	13 (28,3)	0,594
Frágil (FRAIL ≥3)	5 (35,7)	13 (28,3)	0,325
Riesgo desnutrición (MNA ≤11), n (%)	8 (57,1)	11 (23,9)	0,019
Comorbilidad grave (Charlson ≥5), n (%)	9 (64,3)	24 (52,2)	0,425
Polifarmacia (≥5 fármacos crónicos)	7 (50)	32 (69,6)	0,179
qSOFA ≥2, n (%)	10 (71,4)	14 (30,4)	0,006
SOFA ≥2, n (%)	12 (85,7)	18 (39,1)	0,002
Shock séptico, n (%)	3 (21,4)	0 (0)	0,012
APACHE ≥10, n (%)	12 (85,7)	22 (47,8)	0,012
Creat. (mg/dl), mediana [RIQ]	2 [1,2-3]	1,25 [0,8-1,7]	0,028
Albúmina (mg/dl), media ±DE	3,23 (±0,47)	3,68 (±0,48)	0,003
Bilirrubina (mg/dl), media ±DE	0,7 (±0,48)	1,0 (±0,19)	0,358
Hb (g/l), mediana [RIQ]	11,3 [10,1-12,3]	12,75 [11,9-14,3]	0,001
Bicarbonato (mEq/L), media ±DE	22,6 (±5,4)	25,7 (±3,3)	0,061
Lactato (mmol/L), mediana [RIQ]	1,9 [1,1-2,4]	1,5 [1,1-2,35]	0,262
PCR (mg/l), media ±DE	262 (±137)	212 (±124)	0,209
PCT (ng/ml), mediana [RIQ]	24,88 [5-56,3]	3,1 [0,6-13,3]	0,007
Leucocitos (cel/mm ³), mediana [RIQ]	14.100 [11.823-19.400]	12.950 [10.100-19.025]	0,576
Linfocitos**, mediana [RIQ]			
-Linfocitos CD4	177 [108-273]	415 [257-682]	0,003
-Linfocitos CD8	111 [74-187,5]	192 [106-298]	0,099
-Linfocitos CD19	83 [30-169,5]	86 [56-134]	0,627
-Linfocitos NK	65 [49-109]	149 [90-230]	0,013

Creat.: Creatinina; Hb: Hemoglobina; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina.

*Según una variable combinada de mal pronóstico a corto plazo: muerte al ingreso o en los primeros 30 días tras el alta, necesidad de ingreso en UCI, o necesidad de reingreso en los primeros 30 días tras el alta.

**N = 47

Se consideró mal pronóstico a largo plazo cuando durante el seguimiento a los 12 meses del alta se cumplió al menos uno de los siguientes: muerte durante el seguimiento, pérdida ≥ 10 ptos en el índice Barthel, pérdida ≥ 2 ptos en la escala de Lawton o pérdida ≥ 10 ptos en la escala EuroQol. La presencia de criterios de fragilidad (45,8 vs 13,3%, $p = 0,008$, dependencia para ABVD (41,7 vs 16,7%, $p = 0,042$) y una baja puntuación en la escala MNA de cribado nutricional en el momento del ingreso (66,7 vs 6,7%, $p < 0,001$) se asociaron a mal pronóstico a los 12 meses, al igual que las puntuaciones en la escala qSOFA ≥ 2 (58,3 vs 23,3%, $p = 0,009$) y SOFA ≥ 2 (70,8 vs 33,3%, $p = 0,006$). No se observaron diferencias en otros factores como la edad ≥ 80 años, el sexo, la comorbilidad grave, la polifarmacia, otras escalas de gravedad (como APACHE-II) o parámetros de laboratorio. Los resultados se muestran en la tabla 45.

Tabla 45. Factores clínicos asociados al pronóstico a 12 meses: Características basales, escalas clínicas y datos de laboratorio

	Mal pronóstico* 12 meses (n=24)	Buen pronóstico* 12 meses (n=30)	p-valor
Edad ≥80 años, n (%)	10 (41,7)	10 (33,3)	0,529
Sexo femenino, n (%)	17 (70,8)	16 (53,3)	0,190
Dependiente ABVD: Barthel <100, n (%)	10 (41,7)	5 (16,7)	0,042
Frágil (FRAIL ≥3)	11 (45,8)	4 (13,3)	0,008
Riesgo desnutrición (MNA ≤11), n (%)	16 (66,7)	2 (6,7)	<0,001
Comorbilidad grave (Charlson ≥5), n (%)	13 (54,2)	16 (53,3)	0,951
Polifarmacia (≥5 fármacos crónicos)	17 (70,8)	16 (53,3)	0,190
qSOFA ≥2, n (%)	14 (58,3)	7 (23,3)	0,009
SOFA ≥2, n (%)	17 (70,8)	10 (33,3)	0,006
Shock séptico, n (%)	2 (8,3)	1 (3,3)	0,690
APACHE ≥10, n (%)	16 (66,7)	14 (46,7)	0,142
Creat. (mg/dl), mediana [RIQ]	1,30 [0,99-1,74]	1,29 [0,85-1,93]	0,821
Albúmina (mg/dl), media ±DE	3,48 (±0,52)	3,62 (±0,47)	0,267
Bilirrubina (mg/dl), media ±DE	0,70 (±0,36)	1,17 (±0,47)	0,134
Hb (g/l), mediana [RIQ]	12,5 [10,5-13]	12,7 [11,9-14,6]	0,054
Bicarbonato (mEq/L), media ±DE	23,85 (±5,16)	25,38 (±2,87)	0,196
Lactato (mmol/L), mediana [RIQ]	1,6 [1,1-1,9]	1,7 [1,1-2,8]	0,360
PCR (mg/l), media ±DE	252,32 (±132)	210 (±126)	0,240
PCT (ng/ml), mediana [RIQ]	14,6 [1,03-26,4]	3,3 [0,56-8]	0,200
Leucocitos (cel/mm ³), mediana [RIQ]	12.050 [8.850-15.900]	15.900 [10.100-19.025]	0,083
Linfocitos**, mediana [RIQ]			
-Linfocitos CD4	268 [141-745]	355 [236-630]	0,483
-Linfocitos CD8	140 [60-237]	196 [133-417]	0,090
-Linfocitos CD19	73 [44-133]	108 [70-183]	0,101
-Linfocitos NK	178 [56-228]	136 [80-231]	0,652

Creat.: Creatinina; Hb: Hemoglobina; PCR: Proteína C Reactiva; PCT: Procalcitonina.

*Según una variable combinada de mal pronóstico a largo plazo: muerte, pérdida ≥10ptos índice Barthel, pérdida ≥2ptos escala Lawton o pérdida ≥10ptos escala EuroQol.

**N = 41

4.5.2. Marcas epigenéticas: uso como biomarcadores en la predicción del mal pronóstico

Se analizó la presencia de hipometilación de los genes identificados con respecto al mal pronóstico a corto plazo. Se establecieron como puntos de corte para considerar presencia de hipometilación un porcentaje de metilación inferior a la mediana de la muestra. Se encontró una asociación entre los pacientes con mal pronóstico a corto plazo y la presencia de hipometilación en los genes *SERPINA1* (71,4 vs 40,9%, $p = 0,047$), *MPO* (78,6 vs 40,9%, $p = 0,014$) y *SLX4* (85,7 vs 38,6%, $p = 0,002$). La hipometilación de ninguno de los genes mostró asociación con el pronóstico a largo plazo. Los resultados se muestran en la tabla 46.

Tabla 46. Análisis de la hipometilación de los genes seleccionados y su relación con el pronóstico a corto plazo y largo plazo

	Pronóstico a corto plazo*			Pronóstico a largo plazo*		
	Mal pronóstico (n=14)	Buen pronóstico (n=44**)	p-valor	Mal pronóstico (n=24)	Buen pronóstico (n=28**)	p-valor
Hipometilación <i>SERPINA1</i>	10 (71,4)	18 (40,9)	0,047	12 (50)	15 (53,6)	0,797
Hipometilación <i>AZU1</i>	10 (71,4)	19 (43,2)	0,066	13 (54,2)	14 (50)	0,764
Hipometilación <i>MPO</i>	11 (78,6)	18 (40,9)	0,014	15 (62,6)	12 (42,9)	0,158
Hipometilación <i>SLX4</i>	12 (85,7)	17 (38,6)	0,002	15 (62,5)	13 (46,4)	0,246

*Según las variables combinadas de mal pronóstico (ver tabla 44 y 45)

** En 2 pacientes estos datos no pudieron ser analizados por falta de ADN.

Para valorar su posible uso como biomarcador en la sepsis se analizó el área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) del grado de metilación de los 4 genes estudiados para el mal pronóstico a corto plazo. Los resultados fueron significativos para los cuatro genes, siendo *SLX4* el que mostró mejores resultados (AUC 0,821; IC: 0,678-0,964). Se analizó también el AUC de las escalas de gravedad que mostraron diferencias en el pronóstico a corto plazo (escala SOFA, escala qSOFA y APACHE-II) y de la PCT, encontrándose los mejores resultados para APACHE-II (AUC 0,796; IC: 0,671-0,921). Así, los marcadores clínicos y epigenéticos que mostraron mayor utilidad para la discriminación del mal pronóstico fueron la puntuación de la escala APACHE-II y la hipometilación del gen *SLX4*, respectivamente, siendo este último quien obtuvo el valor más alto de AUC. Los resultados se muestran en la tabla 47 y en la figura 39b.

Tabla 47. Área bajo la curva, sensibilidad y especificidad de las escalas clínicas y la metilación de los genes estudiados para la discriminación del mal pronóstico a corto plazo.

	<i>SERPINA1</i>	<i>AZU1</i>	<i>MPO</i>	<i>SLX4</i>	SOFA	qSOFA	APACHE II	PCT
Mejor punto de corte	12,39	5,03	5,31	7,18	3	2	12	6,15
Sens.	64,3%	71,4%	78,6%	85,7%	71,4%	71,4%	78,6%	78,6%
Especif.	79,5%	81,8%	81,8%	79,5%	67%	69,6%	77,4%	63,3%
AUC	0,688	0,752	0,801	0,821	0,756	0,786	0,796	0,742
(IC 95%)	(0,515-0,861)	(0,589-0,914)	(0,655-0,947)	(0,678-0,964)	(0,611-0,902)	(0,672-0,900)	(0,671-0,921)	(0,574-0,910)
p-valor	0,035	0,005	0,001	< 0,001	0,004	0,001	0,001	0,007

Sens: Sensibilidad; Especif: Especificidad. PCT: Procalcitonina

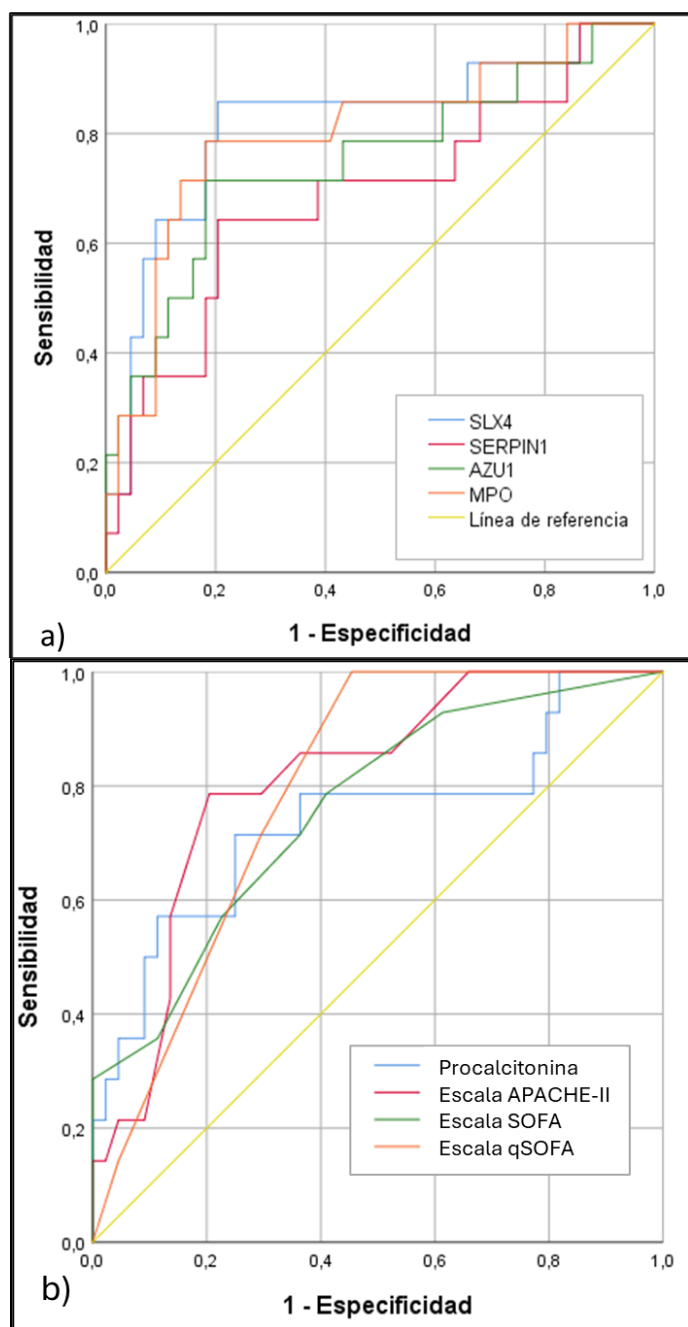


Figura 39. Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para la discriminación del mal pronóstico a corto plazo: a) grado de metilación de los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO* y *SLX4*; b) escalas clínicas de gravedad (SOFA, qSOFA, APACHE-II) y PCT

4.5.3. Marcas epigenéticas: uso como biomarcadores en el diagnóstico de la sepsis

Se estudió la utilidad del grado de hipometilación de los genes identificados para el diagnóstico de la sepsis mediante el análisis de su AUC. Los resultados fueron significativos para los 4 genes, siendo *SERPINA1* el que mostró mejores resultados (AUC 0,858; IC: 0,766-0,951). Se compararon con los valores de los niveles séricos de PCR y PCT, mostrándose todos los genes superiores a la PCR. No obstante, la PCT fue el marcador que mostró mejores resultados en nuestra muestra (AUC 0,925; IC: 0,859-0,991). Los resultados se muestran en la tabla 48.

Tabla 48. Área bajo la curva, sensibilidad y especificidad de las escalas clínicas y la metilación de los genes estudiados para el diagnóstico de la sepsis.

	<i>SERPINA1</i>	<i>AZU1</i>	<i>MPO</i>	<i>SLX4</i>	PCR	PCT
Mejor punto de corte	17,01	7,14	7,37	9,38	226	3,62
Sens.	77%	80%	77%	83%	79%	89,3%
Especif.	79%	75%	71%	71%	77%	80%
AUC (IC 95%)	0,858 (0,766-0,951)	0,832 (0,726-0,938)	0,813 (0,704-0,923)	0,839 (0,739-0,939)	0,793 (0,739-0,939)	0,925 (0,859-0,991)
p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Sens: Sensibilidad; Especif: Especificidad; PCR: Proteína C reactiva; PCT: Procalcitonina

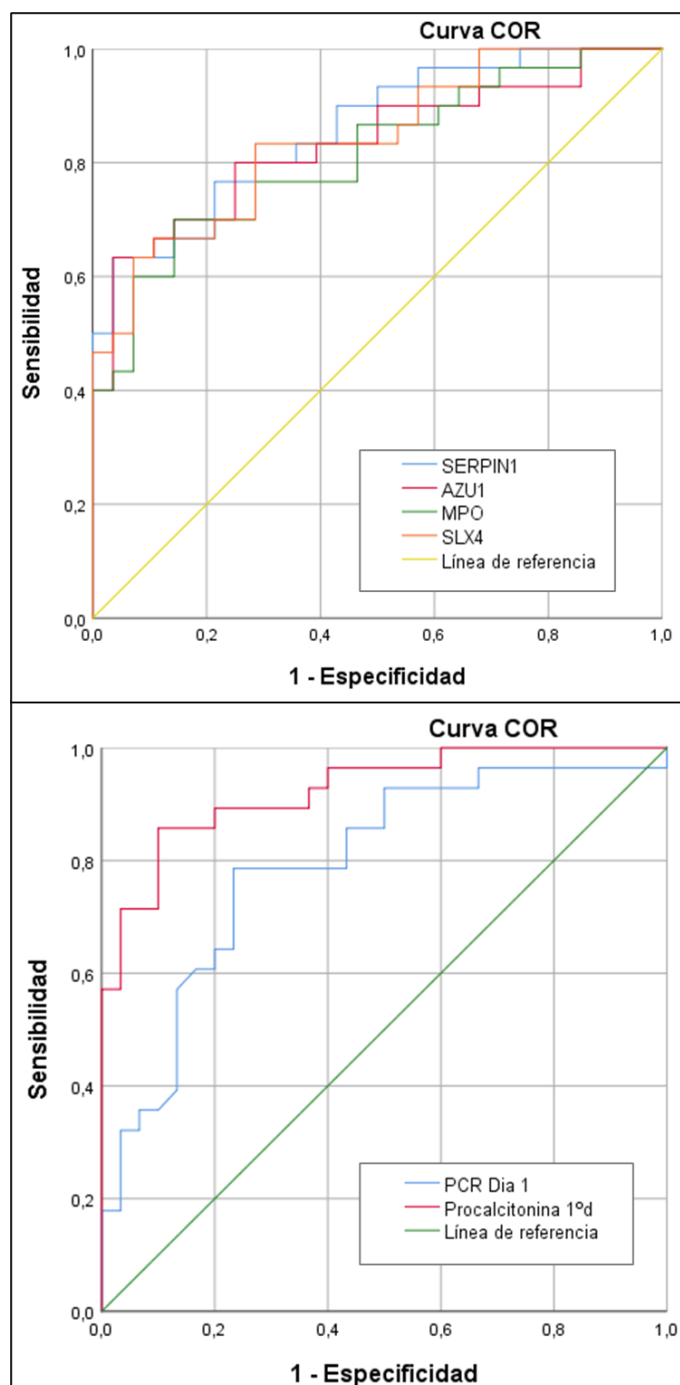


Figura 40. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para el diagnóstico de la sepsis: a) grado de metilación de los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO* y *SLX4*; b) Niveles séricos de PCR y PCT

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En este estudio analizamos de forma prospectiva los cambios que se producen en la metilación del ADN durante la sepsis para tratar de identificar si existen marcas epigenéticas con implicación en el pronóstico a corto y largo plazo de la sepsis, así como compararlas con los parámetros clínicos de uso habitual para analizar su potencial uso como biomarcador. Para ello estudiamos una muestra de pacientes que ingresaron en el hospital por una infección adquirida en la comunidad, seleccionándolos de forma rigurosa para que tuvieran características basales similares, a fin de comparar las diferencias entre aquellos que desarrollaron sepsis frente a los que no. El conjunto de la serie ha tenido que ser limitado a un número reducido de pacientes para poder realizar los análisis epigenéticos. Además, se realizó un seguimiento de los pacientes durante 12 meses, analizando las diferencias en la mortalidad, en la pérdida de independencia para ABVD y AIVD, en el deterioro de la calidad de vida y en el desarrollo de fragilidad, con la finalidad de conocer la repercusión de la sepsis sobre el estado funcional a largo plazo.

De los resultados obtenidos se puede deducir que la sepsis se asocia a un peor pronóstico a corto y largo plazo, y que existen diferencias en la metilación de ADN respecto a los pacientes sin sepsis que pueden tener utilidad en la práctica clínica.

5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DESCRIPTIVOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

En nuestra muestra encontramos que la mediana de la edad de los pacientes fue de 78 años. Es destacable que 51 (85%) de los pacientes tuvo una edad ≥ 65 años, lo que es congruente con la relación entre la edad y el riesgo de sepsis, que aumenta de forma desproporcionada a partir de los 65 años (103). La proporción de mujeres fue algo mayor (58,3% vs. 41,7%), predominando especialmente entre los pacientes más jóvenes. Esto puede deberse a que hubo una mayoría de infecciones de foco urinario, en las que el sexo femenino supone un factor predisponente durante la juventud (4). La comorbilidad fue elevada, con una mediana de 5 puntos en el índice de Comorbilidad de Charlson. También hubo una proporción elevada de pacientes frágiles y pre-frágiles de acuerdo con la escala FRAIL (30% y 31,1%, respectivamente), y de pacientes con algún grado de dependencia tanto para AIVD (50%) como para ABVD (30%). Estos resultados son similares a los otros estudios realizados en pacientes con sepsis en los que se analiza la influencia de los factores basales de los pacientes en el pronóstico, en los que se observa una población de edad avanzada (149–151) y porcentajes elevados de fragilidad y dependencia (151–154).

Como consecuencia del diseño del estudio, no hubo diferencias significativas entre las características basales de los pacientes con y sin sepsis, excepto por una mayor proporción de pacientes con historia de neoplasia previa en el grupo con sepsis (20% vs 3,3%) y un mayor número de pacientes con sepsis con

riesgo de desnutrición de acuerdo con la escala MNA de cribado nutricional (43,3% vs. 16,7%).

Hemos encontrado que la mortalidad ha sido baja a corto y largo plazo. En el grupo con sepsis fallecieron 3 pacientes (10%): 1 paciente (3,3%) falleció en los primeros 30 días debido a un empeoramiento de cuadro séptico; y 2 pacientes (6,7%) fallecieron durante el seguimiento de 12 meses, el primero de ellos de forma súbita y el segundo debido a la recidiva de un carcinoma endometrial. En el grupo sin sepsis falleció un único paciente (3,3%) como consecuencia de una complicación intrahospitalaria (neumonía nosocomial) que requirió su ingreso en la UCI. Estos datos son algo menores que los recogidos en la literatura, en los que la mortalidad se estima entre el 10% y el 52% a corto plazo (104,105) y entre el 7% y 43% a largo plazo (107). Entre los posibles motivos encontramos que los criterios de exclusión utilizados descartaban a los pacientes con dependencia grave para las ABVD o con enfermedades crónicas graves en fases avanzadas que hicieran previsible un deterioro funcional o una baja supervivencia a medio o largo plazo independientemente del cuadro infeccioso, con la finalidad de evitar un sesgo en la valoración del pronóstico a largo plazo. Dado que la sepsis es más frecuente en pacientes ancianos y con comorbilidad (103), lo que a su vez se asocia a una mayor mortalidad de la sepsis (113), estos criterios de selección podrían explicar el bajo porcentaje de fallecimientos.

El número pacientes que reingresaron en los primeros 30 días fue de 4 pacientes del grupo con sepsis (13,3%) frente a 1

en el grupo sin sepsis (3,3%), mientras que el número de pacientes que padeció al menos un segundo episodio de infección fue de 8 en el grupo con sepsis (26,7%) frente a 5 en el grupo sin sepsis (16,7%), en ambos casos sin diferencias estadísticamente significativas. Durante el seguimiento a largo plazo encontramos que el porcentaje de reingresos a los 12 meses fue el mismo en ambos grupos (6 pacientes, 20%), y que hubo 16 pacientes en el grupo con sepsis (53,3%) y 17 en el grupo sin sepsis (56,7%) con nuevos episodios de infección. En ambos grupos hubo 2 pacientes (6,7%) con un episodio de sepsis posterior al ingreso inicial. Si bien el pequeño tamaño muestral de nuestro estudio puede hacer difícil la interpretación de los resultados, estos datos podrían sugerir una mayor repercusión de la sepsis sobre el riesgo de reingreso o nuevas infecciones de forma precoz, mientras que los ingresos e infecciones tardías podrían relacionarse con las características basales de los pacientes, que como se ha mostrado previamente fueron muy similares entre ambos grupos.

En los cambios en el estado funcional encontramos diferencias significativas entre los pacientes de ambos grupos que completaron el seguimiento a los 12 meses del episodio infeccioso. Principalmente destaca una pérdida de independencia para AIVD con un descenso de 2 o más puntos en la escala de Lawton y Brody en 8 pacientes del grupo con sepsis frente a 2 pacientes del grupo sin sepsis (33,3% vs. 7,7%, $p = 0,024$). El porcentaje de pacientes con pérdida de ≥ 10 y ≥ 20 puntos en el índice de Barthel de ABVD fue mayor en el grupo con sepsis (29,1% vs. 11,6% y 20,8% vs. 3,8%, respectivamente), pero no alcanzó

diferencias estadísticamente significativas. Además, entre los pacientes que previamente no eran frágiles, 6 cumplieron los criterios de fragilidad según la escala FRAIL a los 12 meses del alta, todos ellos en el grupo con sepsis (33,3% vs. 0%, $p = 0,019$). Estos datos concuerdan que los resultados obtenidos en otros estudios como el de Iwashyna y colaboradores (110), en el que se compararon los datos de una cohorte prospectiva de pacientes que ingresaron en el hospital por sepsis frente a pacientes que ingresaron por otros motivos, con un seguimiento bianual durante un máximo de 8 años, observando una tasa de nuevas limitaciones funcionales significativamente mayor en el grupo con sepsis (1,50 vs 0,49 nuevas limitaciones entre ambos grupos, $p < 0,001$). En dicho estudio también se analizaron de forma individualizada los cambios en cada una de las ABVD, tanto entre los pacientes sin limitación previa como en aquellos con limitaciones leve-moderadas o graves. Los resultados mostraron que ninguna actividad tenía diferencias significativas por sí misma, con una amplia variedad de nuevas dificultades para los pacientes, y que los pacientes con mayores limitaciones basales mostraban menos variaciones. De acuerdo con estos datos, encontrar variaciones pequeñas en la situación funcional puede requerir un amplio tamaño muestral y un mayor seguimiento a largo plazo, lo que podría explicar nuestros resultados. Aunque diversos estudios analizan el efecto de la fragilidad preexistente como factor pronóstico en la sepsis, no hemos encontrado estudios que analicen la aparición de criterios de fragilidad tras un episodio de sepsis.

En la variación en la calidad de vida también se observaron diferencias, de manera que 12 pacientes del grupo con sepsis perdieron 10 o más puntos en la escala EuroQol, frente a 4 pacientes del grupo sin sepsis (50,3% vs. 15,4%, $p = 0,009$). Concordante con nuestros resultados, una revisión sistemática de la literatura (107) que seleccionó 30 artículos con datos de mortalidad y calidad de vida con un seguimiento durante 3 a 24 meses mostró una menor puntuación en la calidad de vida de los pacientes con sepsis al final del seguimiento en comparación con la población de control.

Por el contrario, no observamos diferencias en la progresión de las enfermedades crónicas o en la aparición de nuevas comorbilidades. En este sentido, la variación de la puntuación de Charlson a los 12 meses fue similar en ambos grupos, con un aumento de 1 o más puntos en 4 de pacientes (16,5%) en el grupo con sepsis frente a 3 (11,5%) en el grupo sin sepsis. Aunque algunos autores proponen este mecanismo como posible causa del deterioro de los pacientes a largo plazo (112), no hemos encontrado otros estudios en la literatura que lo analicen específicamente.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS EPIGENÉTICO

El presente trabajo incluye una parte de investigación básica y traslacional, dado que se ha realizado un estudio de exploración de los cambios que ocurren en la metilación del ADN

durante la sepsis y se han identificado marcas epigenéticas para su análisis como potenciales biomarcadores.

En este estudio se han encontrado diferencias muy significativas entre los patrones de metilación del ADN de los pacientes en el grupo con sepsis frente a los pacientes sin sepsis, con 4640 posiciones diferencialmente metiladas (DMPs) y 85 regiones diferencialmente metiladas (DMRs) de forma significativa. Estas diferencias fueron mayores al comparar los pacientes con criterios de sepsis grave o shock séptico frente a los pacientes sin sepsis que no cumplían criterios de SIRS, en los que se encontraron 9763 DMPs y 401 DMRs significativas. Los cambios más marcados se identificaron en genes implicados en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, destacando especialmente las rutas reguladoras de la inmunidad mediada por los neutrófilos como los procesos de activación y su degranulación; así como los elementos celulares implicados en la actividad bactericida de los gránulos propios de neutrófilos (azurófilos y específicos). Por otro lado, se compararon pacientes con características más similares. Por un lado, se compararon los pacientes con y sin criterios de SIRS, encontrando únicamente una DMP significativa, lo que sugiere que apenas existen diferencias entre estos grupos. Por otro lado, los pacientes con sepsis grave o shock (todos pacientes del grupo con sepsis) frente a pacientes con SIRS que no cumplían dichos criterios (la mayor parte pacientes sin sepsis), encontrando 155 DMPs y 2 DMRs significativas. Aunque las diferencias fueron menores, esta comparación sirvió para identificar genes anotados en las regiones genéticas donde se ubican dichas DMPs y DMRs que

podrían servir para diferenciar los pacientes más graves y con mayor inflamación de aquellos con una gravedad o inflamación moderadas. Los genes identificados se asociaron principalmente con funciones moleculares relacionadas con la reparación del ADN. Estos resultados sugieren una relación directa entre los patrones de metilación del ADN y los distintos fenotipos y grados de inflamación de los pacientes dentro del espectro de la patología infecciosa aguda y la sepsis, tal y como se ha observado en estudios previos que incluían comparaciones entre pacientes con sepsis con distinta gravedad (95,155). Otros estudios han observado patrones de metilación distintos entre pacientes con sepsis y pacientes con patología grave no infecciosa (93,94,96,97).

Dentro del listado de genes identificados en las comparaciones anteriores, se seleccionaron aquellos con mayor metilación diferencial y que tuvieran relación con los procesos y componentes inmunitarios identificados en el estudio de enriquecimiento funcional. Así se identificaron y seleccionaron los genes que posteriormente fueron propuestos para validación: *AZU1*, *MPO*, *SERPINA1*, y *SLX4*.

El gen *AZU1* codifica para la azurocidina, proteína antimicrobiana catiónica también llamada CAP37 o proteína fijadora de heparina (HBP, *Heparin-Binding Protein*). Los niveles de esta proteína han sido estudiados en el diagnóstico de la sepsis con resultados variables. Un metaanálisis reciente que incluyó 26 estudios con 3668 pacientes encontró que la expresión de la azurocidina tuvo una sensibilidad combinada de 0,85 (IC

95% 0,79-0,90) y una especificidad de 0,91 (IC 95% 0,82-0,96), siendo superior a la procalcitonina y la proteína C reactiva. Además, se observó un incremento significativo de niveles plasmáticos al menos 24h antes del diagnóstico de sepsis (156).

El gen *MPO* codifica para la enzima mieloperoxidasa (MPO), presente en los lisosomas de neutrófilos, monocitos y macrófagos. La expresión de la MPO se ha propuesto como un biomarcador potencialmente novedoso para la sepsis en el entorno de la UCI que podría ayudar a su diagnóstico y a la predicción de la mortalidad. En el estudio de Schrijver y colaboradores, se observaron niveles más altos de MPO en pacientes con sepsis y shock séptico en comparación con pacientes sin sepsis y pacientes con SIRS no infeccioso (60 ng/ml vs. 43 ng/ml, $P = 0,002$). Además, los niveles de MPO se relacionaron con la mortalidad a los 30 días ($p = 0,032$), y los niveles más elevados se relacionaron con mayor mortalidad y con puntuaciones más altas en las escalas SOFA y APACHE-IV (157).

Como ya se ha comentado, entre las rutas biológicas identificadas en los términos GO se pueden identificar, como rutas altamente reguladas por las DMRs identificadas, aquellas relacionadas con el control de los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Los gránulos azurófilos contienen una gran cantidad de proteínas antimicrobianas, incluidas MPO, serina proteasas (elastasa, proteinasa 3, catepsina G y azurocidina), α -defensinas, lisozima y Cap57 (proteína bactericida/aumentadora de la permeabilidad). En este sentido, los genes *MPO* y *AZU1* son esenciales en la respuesta innata a la infección (158,159).

El gen *SERPINA1* codifica para una proteína inhibidora de serina proteasa conocida como alfa-1 antitripsina (AAT). El gen se expresa principalmente en los hepatocitos desde donde se libera AAT a la circulación sanguínea, siendo la proteína más ubicua de su superfamilia. Los niveles de AAT se incrementan de 2 a 5 veces en procesos inflamatorios, tumorales e infecciosos (160). Su función más conocida es la evitar el daño proteolítico de la enzima elastasa de neutrófilos, así como neutralizar las α -defensinas y la IL-8 que favorece la quimiotaxis de neutrófilos (161,162), sugiriendo un papel importante en la regulación de la inmunidad mediada por neutrófilos, especialmente en la resolución de la inflamación. Algunos estudios han analizado la expresión de *SERPINA1* como potencial biomarcador en la sepsis. Zhou y colaboradores encontraron una estrecha relación con la sepsis en pacientes pediátricos (163), pero no fue incluido en la selección final como prueba diagnóstica. Por otro lado, Yang y colaboradores, tras un preprocesamiento de datos del perfil de expresión de ARNm en 70 muestras de pacientes adultos, seleccionaron varios genes con un potencial uso como biomarcador entre los que se encontraba *SERPINA1* (164).

Por último, el gen *SLX4* codifica una proteína que funciona como componente de ensamblaje de múltiples endonucleasas específicas de estructura (*Structure-Specific Endonuclease Subunit*) y que se requiere para la reparación del ADN. En un estudio para descubrir péptidos plasmáticos específicos de la sepsis, esta proteína se encontró elevada de forma significativa en los pacientes con sepsis (165).

Los cuatro genes seleccionados mostraron un estado de hipometilación en los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis, indicando un aumento de la transcripción de las proteínas que codifican. Los resultados de nuestro estudio sugieren que las rutas relacionadas con la degranulación de neutrófilos, el control de la inmunidad mediada por neutrófilos y la reparación del ADN pueden estar alteradas. De hecho, si bien los cuatro genes seleccionados fueron los que tenían un mayor potencial de uso como biomarcadores, el análisis de enriquecimiento de DMRs identificó diferencias en la metilación de otros genes implicados en estos procesos, que finalmente no fueron estudiados.

A nivel clínico, en este estudio encontramos que el grado de hipometilación de los genes seleccionados se corresponde con el grado de inflamación y la gravedad medida por escalas clínicas. Así, todos los genes mostraron una buena correlación con los niveles séricos de PCT y con las puntuaciones de la escala SOFA, así como una correlación moderada con la puntuación de la escala APACHE-II y los niveles de albúmina. El gen que mostró un mayor número de correlaciones fue *SERPINA1*, tanto con marcadores inflamatorios como con la PCR y PCT, con escalas de gravedad como SOFA y APACHE-II, y de forma moderada con constantes vitales como la tensión arterial media y la frecuencia respiratoria y marcadores de fallo orgánico como los niveles de creatinina. Estos resultados son congruentes con la literatura clásica, ya que sabemos que la AAT (proteína resultante de la activación del gen *SERPINA1*) se regula positivamente durante la fase aguda de procesos inflamatorios (166). Además, en un pequeño estudio de

7 pacientes esta proteína fue identificada como una proteína potencialmente útil para diferenciar pacientes con sepsis, especialmente aquellos con cuadros graves con coagulopatía por consumo (167).

5.3. DISCUSIÓN DE LOS FACTORES PREDICTIVOS DE MAL PRONÓSTICO

El análisis para identificar los factores clínicos y epigenéticos asociados con el mal pronóstico mostró resultados distintos en el corto y largo plazo.

Entre las características basales de los pacientes, encontramos una asociación entre el riesgo de desnutrición al ingreso y el mal pronóstico tanto a corto como a largo plazo. La asociación entre el pronóstico de la sepsis y la desnutrición en pacientes geriátricos fue estudiada en un amplio estudio retrospectivo de una base de datos nacional de EEUU que mostró un riesgo aumentado de mortalidad (OR 1,20) y shock séptico (OR 1,50) (153). Más recientemente, en un estudio retrospectivo de 425 pacientes con sepsis se analizaron escalas de cribado nutricional, encontrando una asociación entre las puntuaciones con alto riesgo nutricional y una mayor mortalidad acumulativa respecto a los pacientes con bajo riesgo nutricional (168).

Por otro lado, la dependencia para ABVD o la fragilidad fueron factores asociados únicamente al mal pronóstico a largo plazo. El interés en el estudio de la fragilidad y sus implicaciones

en distintas patologías ha ido en aumento en los últimos años. De esta manera encontramos algunos estudios recientes que analizan la relación entre la fragilidad y el pronóstico de la sepsis en pacientes geriátricos, que mostraron una asociación con un mayor riesgo de mortalidad intrahospitalaria, a los 6 meses (169,170) y a los 12 meses (171). En estos estudios también se observó una alta tasa de pacientes con riesgo de desnutrición y con dependencia para ABVD, pero no se analizó su efecto sobre el pronóstico.

Nuestros resultados muestran que los niveles bajos de albúmina y hemoglobina se asociaron con un peor pronóstico a corto plazo. Aunque estos datos podrían estar en relación con el peor estado nutricional al ingreso tal y como se ha observado previamente, la hipoalbuminemia ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de mortalidad asociada a la sepsis (168).

La edad avanzada, el sexo de los pacientes, la comorbilidad grave y la polifarmacia no tuvieron influencia en el pronóstico a corto y largo plazo. Aunque algunos de los estudios previamente mencionados han encontrado una asociación de la edad con el pronóstico de la sepsis (168,169), otros estudios no encontraron diferencias con la edad pero sí con la comorbilidad (170). Hay que tener en cuenta que la sepsis es más frecuente en pacientes de edad avanzada y que estos a su vez tienen frecuentemente más factores que pueden influir en el pronóstico (como comorbilidad, fragilidad, dependencia o desnutrición). En este sentido, nuestro estudio realizó una selección de los pacientes emparejados por

edad y sexo que probablemente permitió disminuir el sesgo de la influencia de estos factores en el pronóstico.

Las escalas clínicas utilizadas para valorar la gravedad fueron SOFA y APACHE-II. Los resultados mostraron una buena asociación con el mal pronóstico a corto y largo plazo en el caso de la escala SOFA. Estos datos coinciden con los estudios en los que se apoyaron los criterios Sepsis-3 para la recomendación de esta escala de forma general en la sepsis (11,12). La escala APACHE-II, sin embargo, solo fue útil en el pronóstico a corto plazo. Esta escala ha sido de especial utilidad en pacientes críticos ingresados en una UCI con enfermedades diversas, y ha mostrado una buena correlación con la mortalidad intrahospitalaria en la sepsis (131,172,173). También se ha encontrado una asociación de APACHE-II con un mayor riesgo de evolución de la sepsis abdominal hacia la enfermedad crítica crónica (150). La puntuación de la escala qSOFA también mostró una buena relación con el mal pronóstico a corto y largo plazo. La utilidad principal de qSOFA se encuentra en su alta sensibilidad y mayor sencillez frente a la escala SOFA, siendo muy útil para la detección precoz de los pacientes con riesgo de mala evolución (11,174). Sin embargo, la relación de APACHE-II y qSOFA con el pronóstico a largo plazo ha sido menos estudiada.

Se analizaron parámetros relacionados con la disfunción orgánica y marcadores de inflamación. El fracaso renal agudo se ha asociado con un mayor riesgo de mortalidad en la sepsis y también con mayor riesgo de eventos adversos a largo plazo, especialmente por un mayor riesgo de enfermedad renal crónica

(175). Como cabría esperar, en nuestro estudio encontramos una asociación de las cifras de creatinina con el pronóstico a corto plazo, aunque no observamos este efecto sobre el pronóstico a largo plazo en el que analizamos principalmente la pérdida de capacidad funcional y de calidad de vida. La PCT y la PCR son biomarcadores ampliamente estudiados en la sepsis que han mostrado buenos datos de sensibilidad y especificidad (176). Aunque en nuestro estudio ambas se mostraron significativamente más elevadas en los pacientes con sepsis, solo la PCT fue útil para identificar los pacientes con mal pronóstico a corto plazo. Estos datos son congruentes con los que encontramos en la literatura, habiéndose mostrado superior la PCT frente a la PCR para el diagnóstico de la sepsis, y con un alto valor predictivo positivo de mortalidad a 28 días (únicamente por debajo de los niveles de lactato $>3\text{mmol/L}$, pero superior a APACHE-II y PCR) (177). En este sentido, es destacable que en nuestro estudio los niveles de lactato no mostraron asociación con el pronóstico y que el shock séptico se asoció a mal pronóstico a corto plazo, pero no a largo plazo. La mayoría de la muestra de nuestro estudio no requirió ingreso en UCI, representando principalmente una población de pacientes con sepsis de una gravedad moderada que generalmente pueden ser tratados en sala de hospitalización convencional, con menores tasas de shock séptico y cifras de lactato más bajas. Esto puede implicar una limitación para identificar los efectos de dichos factores en el pronóstico.

Otro marcador estudiado, con el fin de obtener información sobre el estado inmunitario, fueron las subpoblaciones

linfocitarias. En nuestro estudio las cifras de linfocitos CD4 fueron más bajas en pacientes con sepsis comparado con los pacientes sin sepsis, y a su vez mostraron una asociación con el pronóstico a corto plazo, al igual que las cifras más bajas de células NK. El resto de las subpoblaciones linfocitarias no mostró diferencias. Los recuentos de linfocitos son fáciles de medir clínicamente, y una gran cantidad de investigaciones clínicas y en animales han demostrado que están estrechamente relacionados con la incidencia y el pronóstico de la sepsis. Sin embargo, las comparaciones aisladas de recuentos absolutos de linfocitos por sí solos no parece aportar gran información. Una revisión amplia de la literatura publicada en enero de 2024 recoge múltiples estudios en los que se observó que los linfocitos T CD4 muestran una disminución significativa durante las primeras etapas de la sepsis, incluso antes de que ocurran las manifestaciones clínicas, y que los pacientes con sepsis que fallecen tienen recuentos más bajos de linfocitos T, proporcionando un potencial indicador para predecir la sepsis y su pronóstico (178). También se ha observado que la variación de los niveles de CD4 y CD8 durante el episodio de sepsis puede predecir la mortalidad, al producirse un descenso pronunciado en estos pacientes (179). Los datos publicados sobre células NK son, sin embargo, contradictorios. Mientras algunos estudios han observado que cifras elevadas de NK el primer día de ingreso pueden asociarse a mortalidad precoz, otros sugieren que podrían tener un efecto protector, siendo las cifras bajas las que podrían asociarse a resultados adversos, especialmente por su asociación con infecciones nosocomiales secundarias (178).

En cuanto al valor de las marcas epigenéticas identificadas en nuestro estudio, se exploró su utilidad como biomarcadores en el diagnóstico de la sepsis. Para ello, comparamos la capacidad discriminativa de la hipometilación de los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO* y *SLX4* frente a marcadores inflamatorios de uso habitual, particularmente PCR y PCT. Los resultados de nuestro estudio reflejaron una buena capacidad diagnóstica de sepsis de todas las marcas epigenéticas, mostrándose superiores a los de la PCR. El mejor biomarcador para el diagnóstico de sepsis, no obstante, fue PCT (AUC 0,925) seguido de *SERPINA1* (AUC 0,858), *SLX4* (0,839), *AZU1* (AUC 0,832), *MPO* (0,813) y en último lugar PCR (0,793). Los resultados de PCR y PCT son concordantes con estudios previos (176,177), lo cual sugiere que los resultados de nuestro estudio podrían ser extrapolables, siendo necesario validar estos biomarcadores en otras poblaciones de distintos perfiles y características clínicas.

Finalmente, se analizó la utilidad de las marcas epigenéticas para la predicción del mal pronóstico a corto y largo plazo. En nuestro estudio encontramos una asociación con el mal pronóstico a corto plazo en la hipometilación de los genes *SERPINA1*, *MPO* y *SLX4*. Sin embargo, estos resultados no se observaron a largo plazo. Dado que se trata de marcas epigenéticas no descritas previamente, el punto de corte para uso como biomarcador no es conocido. Decidimos por tanto analizar el AUC para la discriminación de mal pronóstico a corto plazo de los 4 genes junto a la PCT y las escalas qSOFA, SOFA y APACHE-II. La PCT y las 3 escalas clínicas utilizadas mostraron buenos resultados, siendo APACHE-II la que obtuvo el mejor resultado

(AUC 0,796), seguida de qSOFA (AUC 0,786), SOFA (0,756) y la PCT (AUC 0,742). De entre los 4 genes, fueron *MPO* y *SLX4* los que mostraron una ligera mejoría en la discriminación de mal pronóstico respecto a las escalas clínicas (AUC 0,801 y 0,821, respectivamente) mientras que *AZU1* fue similar a SOFA (AUC 0,752) y *SERPINA1* algo inferior (AUC 0,688).

Nuestro estudio supone una nueva aproximación para el análisis de metilación diferencial del ADN completo obtenido de muestras de sangre total extraídas el primer día de ingreso a pacientes adultos con sepsis frente a pacientes con una infección del mismo foco sin sepsis. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, solo se han publicado 2 estudios similares. El primero de ellos fue publicado por Binnie y colaboradores en 2020 (97), aunque en este caso se compararon 66 pacientes con sepsis frente a 68 pacientes con enfermedades diversas que estaban ingresados en la UCI, emparejados por gravedad y mortalidad. En dicho estudio, se identificaron 56 genes con metilación diferencial que se habían asociado a sepsis en bases de datos previas, entre los que se encontraba *MPO*, aunque no se analizó su utilidad para el diagnóstico o el pronóstico. En su lugar, se realizó un análisis de coexpresión génica ponderada para identificar grupos de CpGs altamente relacionados (módulos de cometilación) que se asociaron con rasgos clínicos como la gravedad de la enfermedad, necesidad de vasopresores y duración de la estancia. También se realizó un análisis de enriquecimiento funcional que mostró asociación los genes identificados con la presentación de antígenos, la actividad de la metiltransferasa, y la adhesión celular como principales procesos biológicos con diferencias entre

ambos grupos de estudio. El segundo fue publicado en enero de 2024 (155) y analizó la metilación diferencial del ADN de los leucocitos entre 5 pacientes con shock séptico frente a pacientes ingresados en la UCI por sepsis y por hemorragia intracraneal espontánea (3 y 4 pacientes, respectivamente). De forma similar a nuestro estudio, se seleccionaron 10 de los genes con mayor metilación diferencial para su validación mediante en una segunda cohorte de 30 pacientes mediante pirosecuenciación. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los pacientes shock séptico y hemorragia intracraneal en los genes *IL10*, *S100A8* y *TREM1*; mientras que los genes *IL1B* y *TNFAIP8* mostraron diferencias tanto entre los pacientes con shock séptico y sepsis como entre los pacientes con sepsis y hemorragia intracraneal. Además, se encontró una fuerte asociación entre la disfunción orgánica y los niveles de lactato con los cambios globales en la metilación del ADN.

Otro estudio que analizó la metilación diferencial del ADN completo de pacientes con sepsis fue el realizado por Lorente-Sorolla y colaboradores en 2019 (180). En este estudio se analizó únicamente el genoma de los monocitos con el objetivo de identificar los cambios que ocurren en estos, y los mecanismos por lo que desarrollan tolerancia durante la sepsis. Para ello se compararon 14 pacientes con sepsis frente a 4 pacientes con SIRS de origen no infeccioso (post-cirugía cardíaca) y a 11 pacientes sanos. Los resultados mostraron que los cambios en la metilación del ADN de los monocitos en la sepsis se correlacionaron con el aumento de los niveles de IL-10 e IL-6 y con la puntuación de la escala SOFA. Además, se realizó un

estudio *in vitro* mediante exposición de los monocitos a LPS confirmando una inducción de tolerancia y cambios en la metilación del ADN similares a los observados en la sepsis. Aunque se identificaron varios genes con diferencias significativas, no se analizó su utilidad en el diagnóstico de la sepsis o el pronóstico.

Hemos encontrado un cuarto estudio, realizado mediante recopilación de conjuntos de datos relacionados con la sepsis de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO), que identificó 125 genes con metilación diferencial entre pacientes con sepsis y sanos con mayor potencial usó como marcador pronóstico, entre los que se encontraban *AZU1* y *MPO*. Posteriormente, se construyó una firma de 9 genes y se realizó un análisis de supervivencia que falló en distinguir el pronóstico entre pacientes con sepsis clasificada como de alto y bajo riesgo, aunque sí lo logró al realizar subgrupos por características clínicas, siendo necesario validar dichos resultados en estudios clínicos (102). Entre estos 9 genes no se incluyeron ninguno de los analizados en nuestro estudio.

Por tanto, la escasez de estudios previos que analicen las marcas epigenéticas analizadas en nuestro trabajo dificulta la comparación de los resultados. No obstante, podemos afirmar que los resultados obtenidos aportan nueva información no publicada previamente respecto a los cambios en la metilación del ADN en la sepsis y su potencial uso como biomarcador en el diagnóstico y pronóstico de la sepsis.

5.4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO. APORTACIONES AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO Y EXPECTATIVAS DE FUTURO

La principal limitación de este trabajo es el tamaño muestral. La inclusión prospectiva de pacientes de acuerdo con unos estrictos criterios que permitieran obtener un grupo de estudio cuya característica diferencial más relevante fuera la presencia o no de sepsis y que, además, pudieran ser seguidos y evaluados durante 12 meses para conocer el pronóstico a largo plazo, hizo que el ritmo de inclusión de pacientes fuera menor de lo estimado inicialmente. Otra dificultad a la que nos enfrentamos durante la realización del estudio fue la pandemia de COVID-19 que limitó la inclusión de nuevos pacientes durante el año 2020. Por otro lado, para la ejecución de este estudio ha sido necesaria la solicitud de varias becas que permitieran sufragar el elevado coste de los análisis de metilación diferencial. Por este motivo, se decidió no ampliar la duración del estudio para seguir aumentando el tamaño de la muestra. Así pues, el número relativamente reducido de la muestra podría ser una limitación a la hora de identificar diferencias clínicas que pudieran ser relevantes. Sin embargo, consideramos que el tamaño es adecuado para la obtención de resultados a nivel del análisis epigenético.

Algunos aspectos del diseño del estudio, como la exclusión de pacientes con situación de dependencia total o comorbilidades muy graves con una corta expectativa vital, pueden haber influido en que la mortalidad haya sido reducida. Así, el pronóstico a corto

plazo tuvo que analizarse teniendo en cuenta otros eventos que actuaran como marcadores subrogados de mal pronóstico, tales como la necesidad de ingreso en UCI o la estancia hospitalaria prolongada.

En nuestra muestra existe una mayoría de infecciones de foco urinario, con un número moderado de infecciones respiratorias y un número escaso de infecciones de foco abdominal. Por este motivo, es posible que algunas de las diferencias encontradas se puedan ver influidas por el foco de la infección. Además, la realización del estudio en un único centro hospitalario también hace conveniente corroborar nuestros resultados en otros estudios similares en distintas poblaciones.

Una fortaleza de nuestro estudio es la rigurosa selección de los pacientes incluidos. Nuestro trabajo tiene un enfoque eminentemente clínico, partiendo de la identificación adecuada del paciente, para obtener las muestras más adecuadas y enfocar los objetivos del estudio a la obtención de resultados con aplicación práctica.

Creemos que es de gran interés comparar pacientes con sepsis frente a pacientes con infección del mismo foco sin sepsis, ya que sus diferencias pueden ser clave para la identificación precoz de los pacientes con sepsis y para desgranar los mecanismos por lo que la infección lleva a algunos pacientes a la desregulación inmunitaria y el riesgo de muerte. Hasta donde

hemos podido encontrar, ningún estudio ha realizado previamente estas comparaciones para la identificación de marcas epigenéticas.

Otra fortaleza es el seguimiento directo de los pacientes durante 12 meses, que fueron citados para la evaluación clínica y una nueva toma de muestras que puede ser utilizada para conocer la persistencia de los cambios epigenéticos tras el evento inicial. Esto permitió evitar la obtención de los datos de forma indirecta, con los sesgos que puede conllevar.

El uso de muestras de sangre completa para el análisis epigenético es una fortaleza y a su vez una limitación de nuestro estudio. El análisis de poblaciones de células mixtas tiene mayor poder para detectar cambios comunes a distintos tipos de células inmunitarias, pero menos poder para detectar pequeños cambios dentro de subtipos de células menos numerosos. Para los estudios de biomarcadores, en los que la cuestión de la causalidad no es la principal preocupación, este diseño sencillo se considera adecuado. Además, su fácil obtención permite una mayor implementación de los resultados en la práctica clínica.

Nuestro estudio incluye la validación de los resultados de los análisis epigenéticos en una segunda cohorte dentro del estudio, lo que aumenta la confianza en los resultados obtenidos.

La ausencia de pruebas diagnósticas con valor patognomónico para el diagnóstico de la sepsis ha promovido el interés por el estudio de nuevos biomarcadores en la última

década, habiendo sido objeto de estudio múltiples marcadores inflamatorios, citoquinas, receptores solubles de superficie celular y factores de coagulación (173,181,182). Aunque muchos se han demostrado útiles, ninguno ha logrado una superioridad significativa respecto al resto que favorezca su papel como *gold-standard*. Más recientemente, han aumentado de forma significativa las publicaciones relacionadas con la identificación de nuevas marcas o firmas epigenéticas que permitan apoyar el diagnóstico o identificar el pronóstico de la sepsis, tales como microARN, histonas circulantes y cambios en la metilación del ADN (69). El estudio de estas marcas epigenéticas aporta un valor adicional al ahondar en los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis, lo que podría ayudar a su mejor comprensión y a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (59).

Nuestro estudio aporta al conocimiento científico, por primera vez, los resultados de un análisis de metilación diferencial de los principales sitios de metilación del genoma de pacientes adultos con sepsis frente a pacientes sin sepsis con una infección del mismo foco. Esto puede favorecer el desarrollo de nuevos estudios que, partiendo de los resultados obtenidos, permitan profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis o ampliar la investigación a pacientes con distintas características, niveles de gravedad y orígenes de la infección, con la finalidad de conocer si existen diferencias en este sentido. Como ya hemos comentado, las marcas epigenéticas ofrecen la posibilidad de comprender mejor los mecanismos que llevan a la desregulación inmunitaria, el daño orgánico y la inmunosupresión por lo que los cambios en la metilación del ADN de los genes

identificados en este estudio podrían aportar nuevo conocimiento científico en distintos estudios enfocados a analizar estos aspectos.

Además, se ha realizado un estudio clínico de seguimiento a largo plazo en el que se han identificado cambios relevantes en el estado funcional y la calidad de vida de los pacientes, apoyando los resultados obtenidos en estudios previos, y aportando nuevos detalles al respecto.

Para profundizar en el conocimiento del pronóstico de la sepsis a largo plazo, podría ser útil estudiar si los cambios epigenéticos que ocurren en la sepsis persisten en el tiempo y si tienen implicaciones en el estado de los pacientes. Dado que durante el desarrollo del estudio se han extraído y conservado muestras de los pacientes, esto se propone como proyecto a realizar en un futuro próximo.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido cumplir con los objetivos planteados y extraer las siguientes conclusiones:

- 1º. Tras un cuadro de sepsis, los pacientes tienen un peor pronóstico a corto y largo plazo que aquellos con una infección del mismo foco que no desarrollan sepsis.
- 2º. Existen diferencias en la metilación del ADN entre los pacientes con sepsis y aquellos con una infección del mismo foco que no desarrollan sepsis.
- 3º. Las diferencias en la metilación del ADN aumentan conforme lo hace el nivel de inflamación o la gravedad del cuadro infeccioso.
- 4º. Los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO*, y *SLX4* tienen implicaciones en la regulación del sistema inmunitario y están hipometilados durante la sepsis, por lo que podrían tener utilidad en el diagnóstico de la sepsis.
- 5º. En los primeros 30 días tras un episodio de sepsis, los pacientes tienen mayor riesgo de fallecer, ingresar en la UCI o requerir un nuevo ingreso en el hospital.
- 6º. El grado de hipometilación de los genes *SERPINA1*, *AZU1*, *MPO*, y *SLX4* se asocia con el mal pronóstico a corto plazo en los pacientes con sepsis.

- 7º. Los factores clínicos que se han relacionado con el mal pronóstico a corto plazo son una mala situación nutricional previa, puntuaciones más altas en las escalas clínicas (SOFA, qSOFA y APACHE-II), cifras más elevadas de creatinina o PCT, y niveles bajos de albúmina, hemoglobina, linfocitos CD4 y células NK.
- 8º. A los 12 meses tras un cuadro de sepsis, los pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar fragilidad, perder capacidad funcional o ver deteriorada su calidad de vida.
- 9º. Los factores clínicos que se han relacionado con el mal pronóstico a largo plazo son una mala situación nutricional, la fragilidad y la dependencia para las ABVD previas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–10.
2. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992;101(6):1481–3.
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530–8.
4. Artero A, Zaragoza R, Nogueira JM. Epidemiology of Severe Sepsis and Septic Shock. In: Fernandez R, editor. *Severe Sepsis and Septic Shock – Understanding a Serious Killer.* 2012.
5. Slade E, Tamber PS, Vincent JL. The surviving sepsis campaign: Raising awareness to reduce mortality. *Crit Care.* 2003;7(1):1–2.
6. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 2004;30(4):536–55.
7. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34(1):17–60.
8. Dellinger RP, Levy M, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* 2013;39(2):165–228.
9. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Vol. 43, *Intensive Care Medicine.* Springer Berlin Heidelberg; 2017. 304–377 p.
10. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021

Nov 1;47(11):1181.

11. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):762–74.
12. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for Septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc.* 2016;315(8):775–87.
13. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(3):259–72.
14. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200–11.
15. Tillmann B, Wunsch H. Sepsis. *Epidemiology and Outcomes. Crit Care Clin.* 2018;34(1):15–27.
16. L Liang, B Moore AS. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2017. Healthcare cost and utilization project Statistical Brief #261. Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. July 2020.
17. Asamblea Mundial de la Salud. Mejora de la prevención, el diagnóstico y la atención clínica de la septicemia. Proyecto de resolución con enmiendas de los Estados Miembros. Novena sesión plenaria, 29 mayo 2017 A70/VR/9. :<https://www.global-sepsis-alliance.org/news/2017/5>.
18. Paul WE. *Fundamental Immunology.* Wolters Kluwer Health; 2012. (Fundamental Immunology).
19. Creagh EM, O'Neill LAJ. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 2006 Aug;27(8):352–7.

20. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* 2019;7.
21. Aagaard, K., Abdallah, M., Abrahamian, F. M., Agnihotri, S., Ahmed, S. S., Allos, B. M., . . . Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 9th ed. 2020.
22. Martín-Fernández M, Tamayo-Velasco Á, Aller R, Gonzalo-Benito H, Martínez-Paz P, Tamayo E. Endothelial dysfunction and neutrophil degranulation as central events in sepsis physiopathology. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
23. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354(6):610–21.
24. Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):345–52.
25. Chen J, Wei H. Immune Intervention in Sepsis. *Front Pharmacol.* 2021 Jul 14;12.
26. Giacconi R, Costarelli L, Malavolta M, Piacenza F, Galeazzi R, Gasparini N, et al. Association among 1267 A/G HSP70-2, -308 G/A TNF- α polymorphisms and pro-inflammatory plasma mediators in old ZincAge population. *Biogerontology.* 2014;15(1):65–79.
27. Giamarellos-Bourboulis EJ, Opal SM. The role of genetics and antibodies in sepsis. *Ann Transl Med.* 2016;4(17).
28. Van Der Poll T, Van De Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):407–20.
29. Gierlikowska B, Stachura A, Gierlikowski W, Demkow U. The Impact of Cytokines on Neutrophils' Phagocytosis and NET Formation during Sepsis—A Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9).
30. Denning N-L, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol.* 2019 Oct 30;10.
31. Xu J, Jiang Y, Wang J, Shi X, Liu Q, Liu Z, et al. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death Differ.* 2014 Aug 25;21(8):1229–39.

32. Ibañez-Cabellos JS, Aguado C, Pérez-Cremades D, García-Giménez JL, Bueno-Betí C, García-López EM, et al. Extracellular histones activate autophagy and apoptosis via mTOR signaling in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018 Oct;1864(10):3234–46.
33. Pérez-Cremades D, Bueno-Betí C, García-Giménez JL, Ibañez-Cabellos JS, Hermenegildo C, Pallardó F V., et al. Extracellular histones disarrange vasoactive mediators release through a COX-NOS interaction in human endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2017 Aug;21(8):1584–92.
34. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009;15(11):1318–21.
35. Charchafieh J, Wei J, Labaze G, Hou YJ, Babarsh B, Stutz H, et al. The role of complement system in septic shock. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
36. Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, et al. Complement-Induced Impairment of Innate Immunity During Sepsis. *J Immunol.* 2002;169(6):3223–31.
37. Iba T, Levy JH. Sepsis-induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Anesthesiology.* 2020;1(212):1238–45.
38. Iba T, Connors JM, Nagaoka I, Levy JH. Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC. *Int J Hematol.* 2021;113(1):24–33.
39. García-Giménez JL, García-López E, Mena-Mollá S, Beltrán-García J, Osca-Verdegel R, Nacher-Sendra E, et al. Validation of circulating histone detection by mass spectrometry for early diagnosis, prognosis, and management of critically ill septic patients. *J Transl Med.* 2023 May 23;21(1):344.
40. Harrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009 Apr;22(2):143–9.
41. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002 Jul;360(9328):219–23.
42. Hotchkiss RS. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular

- dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862–74.
43. Danielski LG, Giustina A Della, Bonfante S, Barichello T, Petronilho F. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. *Inflammation*. 2020;43(1):24–31.
 44. Yin X, Xin H, Mao S, Wu G, Guo L. The Role of Autophagy in Sepsis: Protection and Injury to Organs. *Front Physiol*. 2019;10(August).
 45. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016;353.
 46. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(June).
 47. Tsuneyoshi I, Yamada H, Kakihana Y, Nakamura M, Nakano Y, Boyle WA. Hemodynamic and metabolic effects of low-dose vasopressin infusions in vasodilatory septic shock. *Crit Care Med*. 2001 Mar;29(3):487–93.
 48. Nong Y, Wei X, Yu D. Inflammatory mechanisms and intervention strategies for sepsis-induced myocardial dysfunction. *Immunity, Inflamm Dis*. 2023;11(5):e860.
 49. Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. POST-INJURY MULTIPLE ORGAN FAILURE: THE ROLE OF THE GUT. *Shock*. 2001 Jan;15(1):1–10.
 50. Zhang X, Liu H, Hashimoto K, Yuan S, Zhang J. The gut–liver axis in sepsis: interaction mechanisms and therapeutic potential. *Crit Care*. 2022;26(1):1–14.
 51. Alobaidi R, Basu RK, Goldstein SL, Bagshaw SM. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2015 Jan;35(1):2–11.
 52. Shum H-P, Yan W-W, Chan TM. Recent knowledge on the pathophysiology of septic acute kidney injury: A narrative review. *J Crit Care*. 2016 Feb;31(1):82–9.
 53. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med*. 2009 Oct;37:S331–6.
 54. Osca-Verdegel R, Beltrán-García J, Pallardó F V., García-Giménez JL. Role of microRNAs As Biomarkers in Sepsis-Associated Encephalopathy. *Mol*

- Neurobiol. 2021 Jun 23;
55. Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, Grand'Maison F, Wells G, Young GB, et al. Peripheral Nerve Function in Sepsis and Multiple Organ Failure. *Chest*. 1991 Jan;99(1):176–84.
 56. Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(7):417–27.
 57. Claushuis TAM, Van Vught LA, Scicluna BP, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PMC, Hoogendijk AJ, et al. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood*. 2016;127(24):3062–72.
 58. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*. 1996 Jan;24(1):163–72.
 59. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(3):260–8.
 60. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jun 15;187(12):1287–93.
 61. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep*. 2018 Sep 18;8(1):13995.
 62. Beltrán-García J, Osca-Verdegel R, Jávega B, Herrera G, O'Connor J-E, García-López E, et al. Characterization of Early Peripheral Immune Responses in Patients with Sepsis and Septic Shock. *Biomedicines*. 2022 Feb 23;10(3).
 63. Barochia A V., Cui X, Vitberg D, Suffredini AF, O'Grady NP, Banks SM, et al. Bundled care for septic shock: An analysis of clinical trials*. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2):668–78.
 64. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*. 2011 Jul 28;15(4):R183.

65. Kethireddy S, Kumar A. Mortality due to septic shock following early, appropriate antibiotic therapy. *Crit Care Med.* 2012 Jul;40(7):2228–9.
66. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Jun;72(6):1491–501.
67. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS. Chronic critical illness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Aug 15;182(4):446–54.
68. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol.* 2009 May;219(2):243–50.
69. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Romá-Mateo C, Carbonell N, Ferreres J, Rodríguez M, et al. Epigenetic biomarkers for human sepsis and septic shock: Insights from immunosuppression. Vol. 12, *Epigenomics*. 2020. p. 617–46.
70. Binnie A, Tsang JLY, Hu P, Carrasqueiro G, Castelo-Branco P, Dos Santos CC. Epigenetics of Sepsis. *Crit Care Med.* 2020;745–56.
71. Esteller M. *Epigenetics in BIOLOGY and MEDICINE*. CRC Press Taylor & Francis Group; 2009.
72. Vachharajani V, McCall CE. Epigenetic and metabolic programming of innate immunity in sepsis. *Innate Immun.* 2019;25(5):267–79.
73. García Giménez JL, Romá Mateo C, Seco Cervera M, Ibañez Cabellos JS, Pallardó F V. Circulating Histones and Nucleosomes as Biomarkers in Sepsis and Septic Shock. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Elsevier Inc.; 2016. 497–517 p.
74. Falcão-Holanda RB, Brunialti MKC, Jasiulionis MG, Salomão R. Epigenetic Regulation in Sepsis, Role in Pathophysiology and Therapeutic Perspective. *Front Med.* 2021;8(July):1–11.
75. Cross D, Drury R, Hill J, Pollard AJ. Epigenetics in sepsis: Understanding its role in endothelial dysfunction, immunosuppression, and potential therapeutics. *Front Immunol.* 2019;10(JUN):1–12.
76. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009 May;10(5):295–304.
77. Wu D, Shi Y, Zhang H, Miao C. Epigenetic mechanisms of Immune

- remodeling in sepsis: targeting histone modification. *Cell Death Dis.* 2023;14(2):1–13.
78. Zhang Y, Jurkowska R, Soeroes S, Rajavelu A, Dhayalan A, Bock I, et al. Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul;38(13):4246–53.
 79. Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(2):121–37.
 80. Tian Y, Russo RM, Li Y, Karmakar M, Liu B, Puskarich MA, et al. Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic versus non-septic shock and correlate with disease severity. *Infection.* 2020;(0123456789).
 81. Carson IV WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics.* 2011;6(3):273–83.
 82. Tacke F, Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Luedde M, Hippe HJ, et al. Levels of circulating mir-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2014;42(5):1096–104.
 83. ZHANG X-Q, LV C-J, LIU X-Y, HAO D, QIN J, TIAN H-H, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in rat lungs with lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Mol Med Rep.* 2013 May;7(5):1417–24.
 84. Shih C-C, Liao M-H, Hsiao T-S, Hii H-P, Shen C-H, Chen S-J, et al. Procainamide Inhibits DNA Methylation and Alleviates Multiple Organ Dysfunction in Rats with Endotoxic Shock. Bader M, editor. *PLoS One.* 2016 Sep 23;11(9):e0163690.
 85. Cao L, Zhu T, Lang X, Jia S, Yang Y, Zhu C, et al. Inhibiting DNA Methylation Improves Survival in Severe Sepsis by Regulating NF-κB Pathway. *Front Immunol.* 2020 Jul 2;11.
 86. Huang X, Kong G, Li Y, Zhu W, Xu H, Zhang X, et al. Decitabine and 5-azacitidine both alleviate LPS induced ARDS through anti-inflammatory/antioxidant activity and protection of glycocalyx and inhibition of MAPK pathways in mice. *Biomed Pharmacother.* 2016

- Dec;84:447–53.
87. Singer BD, Mock JR, Aggarwal NR, Garibaldi BT, Sidhaye VK, Florez MA, et al. Regulatory T Cell DNA Methyltransferase Inhibition Accelerates Resolution of Lung Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 May;52(5):641–52.
 88. El Gazzar M, Liu T, Yoza BK, McCall CE. Dynamic and Selective Nucleosome Repositioning during Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem*. 2010 Jan;285(2):1259–71.
 89. Gazzar M El, Yoza BK, Chen X, Hu J, Hawkins GA, McCall CE. G9a and HP1 Couple Histone and DNA Methylation to TNF α Transcription Silencing during Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem*. 2008 Nov;283(47):32198–208.
 90. Novakovic B, Habibi E, Wang S-Y, Arts RJW, Davar R, Megchelenbrink W, et al. β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*. 2016 Nov;167(5):1354–1368.e14.
 91. Tendl KA, Schulz SM, Mechtler TP, Bohn A, Metz T, Greber-Platzer S, et al. DNA methylation pattern of CALCA in preterm neonates with bacterial sepsis as a putative epigenetic biomarker. *Epigenetics*. 2013 Dec 27;8(12):1261–7.
 92. Dhas DBB, Ashmi AH, Bhat BV, Kalaivani S, Parija SC. Comparison of genomic DNA methylation pattern among septic and non-septic newborns — An epigenome wide association study. *Genomics Data*. 2015 Mar;3:36–40.
 93. Lorente-Pozo S, Navarrete P, Garzón MJ, Lara-Cantón I, Beltrán-García J, Osca-Verdegel R, et al. DNA Methylation Analysis to Unravel Altered Genetic Pathways Underlying Early Onset and Late Onset Neonatal Sepsis. A Pilot Study. *Front Immunol*. 2021 Feb 15;12.
 94. Sankar S, Maruthai K, Zachariah B, Bethou A. Global DNA hypomethylation and the expression profile of DNA methyltransferase genes in late-onset neonatal sepsis. *Epigenomics*. 2022 Jun;14(11):671–82.
 95. Hopp L, Loeffler-Wirth H, Nersisyan L, Arakelyan A, Binder H. Footprints of Sepsis Framed Within Community Acquired Pneumonia in the Blood Transcriptome. *Front Immunol*. 2018 Jul 17;9.

96. Lorente-Sorolla C, Garcia-Gomez A, Català-Moll F, Toledano V, Ciudad L, Avendaño-Ortiz J, et al. Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylome of monocytes in sepsis. *Genome Med.* 2019 Oct 29;11(1):66.
97. Binnie A, Walsh CJ, Hu P, Dwivedi DJ, Fox-Robichaud A, Liaw PC, et al. Epigenetic Profiling in Severe Sepsis. *Crit Care Med.* 2020 Feb;48(2):142–50.
98. Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, Gallagher D, Zhang C, Lipman T, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):534–42.
99. Castelo-Branco P, Leão R, Lipman T, Campbell B, Lee D, Price A, et al. A cancer specific hypermethylation signature of the TERT promoter predicts biochemical relapse in prostate cancer: a retrospective cohort study. *Oncotarget.* 2016 Sep 6;7(36):57726–36.
100. Zemmour H, Planer D, Magenheimer J, Moss J, Neiman D, Gilon D, et al. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. *Nat Commun.* 2018 Apr 24;9(1):1443.
101. Peretz A, Loyfer N, Piyanzin S, Ochana BL, Neiman D, Magenheimer J, et al. The DNA methylome of human vascular endothelium and its use in liquid biopsies. *Med.* 2023 Apr;4(4):263-281.e4.
102. Yang K, Gao L, Hao H, Yu L. Identification of a novel gene signature for the prognosis of sepsis. *Comput Biol Med.* 2023 Jun;159:106958.
103. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):4–11.
104. Vardi M, Ghanem-Zoubi NO, Bitterman H, Abo-Helo N, Yurin V, Weber G, et al. Sepsis in nonagenarians admitted to internal medicine departments: a comparative study of outcomes. *QJM.* 2013;106(3):261–6.
105. Rowe TA, McKoy JM. Sepsis in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am.* 2017;31(4):731–42.
106. Van Vught LAV, Klouwenberg PMCK, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis.

- JAMA - J Am Med Assoc. 2016;315(14):1469–79.
107. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: A systematic review. *Crit Care Med*. 2010;38(5):1276–83.
 108. Prescott HC. Readmission Diagnoses after Severe Sepsis and Other Acute Medical Conditions. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2015;
 109. Leibovici L. Long-term consequences of severe infections. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(6):510–2.
 110. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2010;304(16):1787–94.
 111. Odden AJ, Rohde JM, Bonham C, Kuhn L, Malani PN, Chen LM, et al. Functional outcomes of general medical patients with severe sepsis. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):14–6.
 112. Yende S, Iwashyna TJ, Angus DC. Interplay between sepsis and chronic health. *Trends Mol Med*. 2014;20(4):234–8.
 113. Martín S, Pérez A, Aldecoa C. Sepsis and immunosenescence in the elderly patient: A review. *Front Med*. 2017;4(FEB).
 114. Jeong SJ, Yoon SS, Han SH, Yong DE, Kim CO, Kim JM. Evaluation of humoral immune response to nosocomial pathogen and functional status in elderly patients with sepsis. *Arch Gerontol Geriatr*. 2014;58(1):10–4.
 115. Liu Z, Liang Q, Ren Y, Guo C, Ge X, Wang L, et al. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 May 13;8(1):200.
 116. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):15–21.
 117. Hoogendijk EO, Afilalo J, Ensrud KE, Kowal P, Onder G, Fried LP. Frailty: implications for clinical practice and public health. *Lancet*. 2019;394(10206):1365–75.
 118. Nakajima H, Nishikimi M, Shimizu M, Hayashi K, Inoue T, Nishida K, et al. Clinical Frailty Scale Score Before ICU Admission Is Associated With Mobility Disability in Septic Patients Receiving Early Rehabilitation. *Crit*

- Care Explor. 2019;1(12):e0066.
119. Aprahamian I, Cezar NO de C, Izbicki R, Lin SM, Paulo DLV, Fattori A, et al. Screening for Frailty With the FRAIL Scale: A Comparison With the Phenotype Criteria. *J Am Med Dir Assoc.* 2017;18(7):592–6.
 120. Al Khalaf MS, Al Ehnidi FH, Al-Dorzi HM, Tamim HM, Abd-Aziz N, Tangiisuran B, et al. Determinants of functional status among survivors of severe sepsis and septic shock: One-year follow-up. *Ann Thorac Med.* 2015;10(2):132–6.
 121. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med.* 2018;44(6):925–8.
 122. Madrazo M, López-Cruz I, Piles L, Viñola S, Alberola J, Eiros JM, et al. Risk Factors and the Impact of Multidrug-Resistant Bacteria on Community-Acquired Urinary Sepsis. *Microorganisms.* 2023;11(5):1–13.
 123. Esparcia A, Artero A, Eiros JM, Balaguer M, Madrazo M, Alberola J, et al. Influence of inadequate antimicrobial therapy on prognosis in elderly patients with severe urinary tract infections. *Eur J Intern Med.* 2014;25(6):523–7.
 124. Walker W, Wright J, Danjoux G, Howell SJ, Martin D, Bonner S. Project Post Intensive Care eXercise (PIX): A qualitative exploration of intensive care unit survivors' perceptions of quality of life post-discharge and experience of exercise rehabilitation. *J Intensive Care Soc.* 2015;16(1):37–44.
 125. Association WM. World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. Vol. 310, *JAMA - Journal of the American Medical Association.* American Medical Association; 2013. p. 2191–4.
 126. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 2017;50(3).
 127. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):E45–67.

128. Mosler P. Diagnosis and management of acute cholangitis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(2):166–72.
129. Bonkat G, Bartoletti R, Bruyère F, Geerling S, Koves B, Schubert S. EAU Guidelines on Urological Infections. *Eur Assoc Urol.* 2022;
130. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: Standing the test of time. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):844–54.
131. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985 Oct 1;13(10):818–29.
132. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002;137(10):791–7.
133. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis.* 2016;63(5):e61–111.
134. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol.* 1994;47(11):1245–51.
135. Thompson MQ, Theou O, Tucker GR, Adams RJ, Visvanathan R. FRAIL scale: Predictive validity and diagnostic test accuracy. *Australas J Ageing.* 2020;39(4):e529–36.
136. Kaiser MJ., Bauer J., Ramsch C, Ute W, Guigoz Y, Cederholm T, et al. Validation of The MiniNutritional Assessment Short-Form. *J Nutr Health Aging.* 2009;13(9):782–8.
137. Masnoon N, Shakib S, Kalisch-Ellett L, Caughey GE. What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatr.* 2017;17(1):1–10.
138. MAHONEY FI, BARTHEL DW. FUNCTIONAL EVALUATION: THE BARTHEL INDEX. *Md State Med J.* 1965 Feb 1;14:61–5.

139. Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969;9(3):179–86.
140. Herdman M, Badia X, Berra S. El EuroQol-5D: una alternativa sencilla para la medición de la calidad de vida relacionada con la salud en atención primaria. *Atención Primaria*. 2001;28(6):425–9.
141. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
142. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181–247.
143. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014 May 15;30(10):1363–9.
144. Fortin J-P, Triche TJ, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. Hancock J, editor. *Bioinformatics*. 2017 Feb 15;33(4):558–60.
145. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 2016 Dec 7;17(1):208.
146. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47–e47.
147. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V Lord R, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2015 Dec 27;8(1):6.
148. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi A J Integr Biol*.

- 2012 May;16(5):284–7.
149. Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. *BMJ*. 2016;353:1–8.
 150. Cox MC, Brakenridge SC, Stortz JA, Hawkins RB, Darden DB, Ghita GL, et al. Abdominal sepsis patients have a high incidence of chronic critical illness with dismal long-term outcomes. *Am J Surg*. 2020 Dec 1;220(6):1467–74.
 151. Li Q, Shang N, Yang T, Gao Q, Guo S. Predictive nomogram for in-hospital mortality among older patients with intra-abdominal sepsis incorporating skeletal muscle mass. *Aging Clin Exp Res*. 2023 Sep 5;35(11):2593–601.
 152. Kopczynska M, Sharif B, Cleaver S, Spencer N, Kurani A, Lee C, et al. Sepsis-related deaths in the at-risk population on the wards: attributable fraction of mortality in a large point-prevalence study. *BMC Res Notes*. 2018 Dec 11;11(1):720.
 153. Abugroun A, Nayyar A, Abdel-Rahman M, Patel P. Impact of Malnutrition on Hospitalization Outcomes for Older Adults Admitted for Sepsis. *Am J Med*. 2021 Feb;134(2):221-226.e1.
 154. Lee HY, Lee J, Jung YS, Kwon WY, Oh DK, Park MH, et al. Preexisting Clinical Frailty Is Associated With Worse Clinical Outcomes in Patients With Sepsis*. *Crit Care Med*. 2022 May 6;50(5):780–90.
 155. Beltrán-García J, Casabó-Vallés G, Osca-Verdegel R, Navarrete-López P, Rodríguez-Gimillo M, Nacher-Sendra E, et al. Alterations in leukocyte DNA methylome are associated to immunosuppression in severe clinical phenotypes of septic patients. *Front Immunol*. 2024 Jan 3;14.
 156. Wu Y-L, Yo C-H, Hsu W-T, Qian F, Wu B-S, Dou Q-L, et al. Accuracy of Heparin-Binding Protein in Diagnosing Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med*. 2021 Jan 16;49(1):e80–90.
 157. Schrijver IT, Kemperman H, Roest M, Kesecioglu J, de Lange DW. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive Care Med Exp*. 2017 Dec 15;5(1):43.

158. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb 2;77(5):598–625.
159. Othman A, Sekheri M, Filep JG. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *FEBS J.* 2022 Jul 18;289(14):3932–53.
160. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M. Guidelines for the Diagnosis and Management of α 1-Antitrypsin Deficiency. *Arch Bronconeumol* ((English Ed. 2006 Dec;42(12):645–59.
161. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans.* 2002 Apr;30(2):93–8.
162. van Pel M, van Os R, Velders GA, Hagoort H, Heegaard PMH, Lindley IJD, et al. Serpina1 is a potent inhibitor of IL-8-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Jan 31;103(5):1469–74.
163. Zhou X, Wang Y, Chen J, Pan J. Constructing a 10-core genes panel for diagnosis of pediatric sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2021 Mar 3;35(3).
164. Yang Y-X, Li L. Identification of potential biomarkers of sepsis using bioinformatics analysis. *Exp Ther Med.* 2017 May;13(5):1689–96.
165. Thavarajah T, dos Santos CC, Slutsky AS, Marshall JC, Bowden P, Romaschin A, et al. The plasma peptides of sepsis. *Clin Proteomics.* 2020 Dec 2;17(1):26.
166. Lisowska-Myjak B. AAT as a diagnostic tool. *Clin Chim Acta.* 2005 Feb;352(1–2):1–13.
167. He T, Hu J, Han J, Zhang D, Jiang X, Chen B, et al. Identification of differentially expressed serum proteins in infectious purpura fulminans. *Dis Markers.* 2014;2014:698383.
168. Qiqing G, Yao C, Zhuohong L, Qingyun T, Rong Q, Shaohang C, et al. Association Between Nutritional Risk Screening Score and Prognosis of Patients with Sepsis. *Infect Drug Resist.* 2021 Sep;14:3817–25.
169. Patrizio E, Zambon A, Mazzola P, Massariello F, Galeazzi M, Cavalieri d'Oro L, et al. Assessing the mortality risk in older patients hospitalized with a diagnosis of sepsis: the role of frailty and acute organ dysfunction.

- Aging Clin Exp Res. 2022 Jul 7;34(10):2335–43.
170. Haas LEM, Boumendil A, Flaatten H, Guidet B, Ibarz M, Jung C, et al. Frailty is associated with long-term outcome in patients with sepsis who are over 80 years old: results from an observational study in 241 European ICUs. *Age Ageing*. 2021 Sep 11;50(5):1719–27.
 171. Dong J, Chen R, Song X, Guo Z, Sun W. Quality of life and mortality in older adults with sepsis after one-year follow up: A prospective cohort study demonstrating the significant impact of frailty. *Hear Lung*. 2023 Jul;60:74–80.
 172. Park DW, Chunx BC, Kim JM, Sohn JW, Peck KR, Kim YS, et al. Epidemiological and clinical characteristics of community-acquired severe sepsis and septic shock: A prospective observational study in 12 university hospitals in Korea. *J Korean Med Sci*. 2012 Nov 1;27(11):1308–14.
 173. Ríos-Toro JJ, Márquez-Coello M, García-Álvarez JM, Martín-Aspas A, Rivera-Fernández R, De Benito AS, et al. Soluble membrane receptors, interleukin 6, procalcitonin and C reactive protein as prognostic markers in patients with severe sepsis and septic shock. *PLoS One*. 2017;12(4):1–18.
 174. Madrazo M, López-Cruz I, Zaragoza R, Piles L, Eiros JM, Alberola J, et al. Prognostic accuracy of Quick SOFA in older adults hospitalized with community acquired urinary tract infection. *Int J Clin Pract*. 2021 Jul 9;e14620.
 175. Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ*. 2019 Jan 9;k4891.
 176. Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Biochem*. 2019 Apr 11;120(4):5852–9.
 177. Mustafić S, Brkić S, Prnjavorac B, Sinanović A, Porobić Jahić H, Salkić S. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with sepsis. *Med Glas (Zenica)*. 2018 Aug 1;15(2):93–100.
 178. Yang J, Zhu X, Feng J. The Changes in the Quantity of Lymphocyte Subpopulations during the Process of Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb

- 5;25(3):1902.
179. Lu X, Song C-Y, Wang P, Li L, Lin L-Y, Jiang S, et al. The clinical trajectory of peripheral blood immune cell subsets, T-cell activation, and cytokines in septic patients. *Inflamm Res*. 2024 Jan 12;73(1):145–55.
 180. Lorente-Sorolla C, Garcia-Gomez A, Català-Moll F, Toledano V, Ciudad L, Avendaño-Ortiz J, et al. Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylome of monocytes in sepsis. *Genome Med*. 2019 Dec 29;11(1):66.
 181. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):609–34.
 182. Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. *Crit Care*. 2022 Dec 6;26(1):14.

8. ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título	Pronóstico a Corto y Largo Plazo de la Sepsis Urinaria: Factores Predictivos Clínicos y Epigenéticos
Investigador principal	Arturo Artero Mora
Centro	HOSPITAL UNIVERSITARI DR. PESET DE VALÈNCIA
Teléfono de contacto	961622385

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un *estudio de investigación* en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitari Dr. Peset de València, de acuerdo a la legislación vigente y las normas de buena práctica clínica.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además puede consultar con las personas que considere oportuno.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

3. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Se pretende analizar la respuesta de su organismo ante una infección urinaria, sin modificar su tratamiento, y la evolución en el tiempo tras la curación de la misma.

4. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Este estudio se realizará con pacientes mayores de 65 años que ingresan en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, por infección urinaria. El número de total de pacientes que se prevé incluir es de 200 pacientes, con diferentes niveles de gravedad, algunos de ellos con las formas más graves de presentación clínica, como son la sepsis y el shock séptico.

El diagnóstico y tratamiento de los pacientes que se participen en el estudio será el mismo que el de los pacientes que no participen, si bien una parte de las muestras de sangre y orina será reservada para la realización de análisis de laboratorio para conocer mejor el pronóstico de su enfermedad. Además aquellos pacientes que participen en el estudio serán objeto de un seguimiento a los 6 y 12 meses para valorar su estado de salud tras haber sufrido una infección urinaria que requirió ingreso en el hospital. En estas visitas se realizará una revisión médica que incluirá un análisis de sangre.

5. ACTIVIDADES DEL ESTUDIO

- Su participación en el estudio será durante su ingreso y hasta un año.
- Se realizarán dos visitas tras el alta: a los 6 meses y al año.
- Durante su ingreso se realizará una valoración médica con cuestionarios para conocer la gravedad de su infección y estado de salud, y dos extracciones de sangre y una de orina para la realización de análisis pronósticos específicos, coincidiendo con las extracciones de rutina habituales.
- En las 2 revisiones tras el alta se realizará igualmente un valoración médica con cuestionarios y una extracción de sangre.
- Las muestras de sangre y orina obtenidas serán almacenadas en el Biobanco de Investigación Biomédica y Salud Pública de la Comunidad Valenciana, para su posterior análisis epigenéticos.

6. RIESGOS Y MOLESTIAS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN

No se prevé ningún riesgo añadido para su salud por participar en el estudio ya que no afecta al correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. La toma de muestras de sangre y orina tampoco supone un riesgo adicional puesto que se trata de muestra sobrante de las extracciones habituales. Dado que no hay ninguna modificación del tratamiento habitual, no se prevé ningún riesgo para usted por participar en este estudio.

7. POSIBLES BENEFICIOS

Si acepta participar en el estudio, usted contribuirá al mayor conocimiento sobre el tema objeto de investigación, lo que podrá beneficiar a futuros pacientes que padezcan esta enfermedad.

No se obtendrán beneficios económicos. Ni usted ni el investigador principal recibirán ninguna remuneración por la realización de este estudio.

8. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Además de los derechos anteriormente citados, y en aplicación del Reglamento (UE) 2016/679 de Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos, ahora también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio.

Si deja de participar en el estudio, los datos obtenidos no se pueden eliminar para así garantizar la validez de la investigación. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro como el Biobanco son responsables del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación y los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

9. COMPENSACIÓN ECONÓMICA

No se contempla ningún tipo de compensación económica para los sujetos participantes en el estudio, ni para el equipo de investigación y el centro.

10. DATOS DE CONTACTO

Si durante su participación tiene alguna duda o necesita obtener más información, póngase en contacto con el Dr. Artero Mora, en la Secretaría del Servicio de Medicina Interna (3ª planta del edificio de hospitalización) o mediante llamada al teléfono 961622385.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título	Pronóstico a Corto y Largo Plazo de la Sepsis Urinaria: Factores Predictivos Clínicos y Epigenéticos
---------------	---

Yo,

- ☐ He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.
- ☐ He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- ☐ He recibido suficiente información sobre el estudio.
- ☐ He hablado con
- ☐ Comprendo que mi participación es voluntaria.
- ☐ Comprendo que puedo retirarme del estudio:
- Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio. Firma del participante.

Firma del participante
Fecha: ____/____/____

Firma del investigador
Fecha: ____/____/____

(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el paciente)

*Cuando se obtenga el CI en personas con capacidad modificada para dar su CI.

Firma del representante
legal, familiar o persona
vinculada de hecho
Fecha: ____/____/____

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el paciente)

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN MUESTRAS



Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación obtenidas en el curso de procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos Biobanco IBSP-CV (Hospital Universitario Doctor Peset) (1 de 6)



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

1. Identificación y descripción del procedimiento

Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de sus tejidos, sangre, así como fluidos (orina, esputo, saliva, etc) o microorganismos. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido a un biobanco de muestras biológicas, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas excedentes podrán ser utilizados en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2. Objetivo

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

3. Condiciones de la donación

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran. Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

En caso de producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a disposición en el registro nacional de biobancos para investigación biomédica, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto de las muestras.

4. Consecuencias previsibles de su realización

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud.

La información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares biológicos. Es decisión suya informarles – algo que nosotros le aconsejamos – con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es el riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

Cuando esta información, según criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio a la salud de sus familiares biológicos, previa consulta del comité asistencial, se les informará de ello.

5. Derecho de revocación del consentimiento

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

6. Riesgos

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestra sobrante de la intervención.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7. Protección de datos personales y confidencialidad

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.



Declaración de consentimiento

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

D./D^a de años de edad, con domicilio en Valencia

DNI y nº de SIP

D./D^a de años de edad, con domicilio en

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)

del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de sangre y orina (varias tomas)

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a

DNI:

A completar por el profesional de salud:

Fdo.: D./D^a Ian López Cruz

DNI: 33567877k

Colegiado Nº: 4623197

En condición de: Médico

En Valencia a de de 2020



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

Revocación del consentimiento

Revoco el consentimiento prestado en fecha de de
y no deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a
DNI:

A completar por el profesional de salud:

Fdo.: D./D^a
DNI:
Colegiado N^o:

En condición de:

En a de de 20



ANEXO 3: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Página 1 de 2

NHC (cod):	Fecha ingreso:	Estancia:	Edad: años
Donación: SEP-	Fecha alta:	días	Sexo: ♂ / ♀
ATB prev 3m: SI/NO (Nº: →)		Ingreso previo 3m: SI / NO	Residencia: SI / NO
SV prev SI / NO → Tº sem	SV prev <2s / 2-4s / 1-2m / >2m	SV últ recambio (SEM):	
Toma UC: Micción espont / Sonda/ Urostomía/ Punción	Cambio SV previo a UC: øSonda / SI / NO	Cambio SV: øSonda / Urg / Sala / No realizado	
Fiebre / distermia: SI / NO	S. miccional (polaq, disuria, urgencia, tenesmo) : SI / NO	Dolor suprapúbico: SI/ NO	
Tº mayor domicilio:		Dolor fosa renal: SI/ NO	
Oliguria: SI / NO	Nauseas o vómitos: SI / NO	Dolor flancos: SI/ NO	
RAO: SI / NO	Deterioro gral aislado*: SI/NO	Dolor perineal/genital : SI/ NO	
Peritonismo SI/ NO ()	Signo de Murphy: SI/ NO	Dolor HCD: SI/ NO	
Disnea: SI / NO	Dolor torácico: SI / NO	Tos-expectoración: SI / NO	
DIAGNÓSTICO: ITU, NAC, INF INTRABD (colecistitis, colangitis, absceso, peritonitis)			
Tº inicio sint a urg: h	Tº Triaje a 1º ATB: h	Tº dsd inicio a 1ºATB: h	
1º Sint: MEG/ Dolor/ Fiebre/ Sd micc / Otros		1ª Consult: Urgencias hosp / At primaria / 112	
Aviso: Paciente / Familia		Tto prev al hospital: No / ATB / Analgesia / Otro	
Tº: °C	FR: rpm	TA:	Glasgow:
FC: lpm	SatO2: %	TAM:	Sosp. clínica sepsis: SI/ NO
Cr: mg/dl	PaO2:	DVA y dosis:	qSOFA ≥2: SI / NO ()
Br: mg/dl	FiO2:		SOFA basal:
Alb: mg/dl	PaO2/FiO2:	Fluidos <3h:	SOFA ingreso:
Na:	SatO2/FiO2:		SOFA estabilización:
K:	pH: (Art/Ven)	Fluidos <24h:	SIRS: SI / NO
Hb: gr/l	HCO3: (Art/Ven)		Sepsis grave: SI / NO
Hto: %	Lactato:	McCabe:	Shock septico: SI / NO
Leuc: /mm³	Leucocituria:	Nitritos: SI / NO	APACHE II:
PlaQ: /mm³	PCR DÍA 0-1:	PCR día 2-3:	PCR día 4-5:
PSA:	PCT DÍA 0-1:	PCT día 2-3:	PCT día 4-5:
IL6	CD4	CD8	NK
RX:		ECO:	
Estabilidad clínica (Hemodinámica = TA y FC normal + Apirexia): DÍA 1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7			
Hemocultivos: REALIZADOS SI / NO → RESULTADO:			
Gram de orina: REALIZADO SI / NO → RESULTADO:			
Urocultivo: REALIZADO SI / NO → RESULTADO:			
ATB empírico Urgencias:		Ingreso UCI: SI / NO	
ATB empírico Ingreso:		Estancia UCI (días)	
TAEI: SI / NO		Mortalidad intra-hospitalaria: SI / NO	
ATB dirigido:		Mortalidad 30 días: SI / NO	
ATB alta:		Mortalidad 6 meses: SI / NO	
Nº DIAS ATB: () IV + () VO = TOTAL		Mortalidad 12 meses: SI / NO	

SEPSIS tras alta: SI / NO		No sepsis	SEPSIS	REINGRESO SI / NO: N° de reingresos:		
N° de episodios de infecciones tras el alta	30d =			<30d:	<6m:	<12m:
	6m =			SEPSIS previa a ingreso: SI / NO		
	12m =			<30d:	<6m:	<12m:

*Solo o asociado a fiebre/distermia (no dolor ni síntomas urológicos)

Página 2 de 2

Comorbilidad	Ingreso	6 meses	12 meses
Cardiopatía isq.	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Insuf. cardíaca	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Enf. vascular periférica	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Demencia	SI / NO	SI / NO	SI / NO
EPOC	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Enf. tejido conectivo	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Úlcus péptico	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Diabetes*	NO / sin daño órg / LOD	NO / sin daño órg / LOD	NO / sin daño órg / LOD
Enfermedad cerebrovascular	NO / sin hemiplejia / hemiplejia	NO / sin hemiplejia / hemiplejia	NO / sin hemiplejia / hemiplejia
Enf. hepática	No / Leve / Mod-Grave	No / Leve / Mod-Grave	No / Leve / Mod-Grave
ERC mod-grave	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Tumor hematológ.	SI / NO	SI / NO	SI / NO
Tumor sólido	NO / Sin MX / Con MX	NO / Sin MX / Con MX	NO / Sin MX / Con MX
VIH estadio SIDA	SI / NO	SI / NO	SI / NO
I. CHARLSON:			
N° fármacos crónicos			

*LOD = retinopatía, nefropatía (microalbuminuria), hipertrofia VI, Aumento grosor íntima/media

Patología Urológica	Ingreso	6 meses	12 meses
HBP	SI / NO		
Sínt de prostatismo	SI / NO		
Litiasis urinaria	SI / NO		
Instrumentación vía urinaria**	SI / NO		
Incontinencia Urinaria	SI / NO		

**Nefrostomía, catéter doble J, derivación urinaria, RTU o cistoscopia reciente (<30d)...

Escalas	Ingreso	6 meses	12 meses
BARTHEL			
LAWTON			
FRAIL (si independiente)			
EuroQol PREGUNTAS	X		
EuroQol ANALÓGICA	X		
MNA – SF			
→ PESO			
→ TALLA			

ANEXO 4: APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO



A/A.: Dr. Arturo Artero
Medicina Interna

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 24 de julio de 2019 ha evaluado y **ha aprobado** el estudio titulado: Pronóstico a corto y largo plazo de la sepsis urinaria: Factores predictivos clínicos y epigenéticos.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados la Hoja de información al paciente, el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto.

Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio

Proyecto de investigación
Código CEIm: 73/19

Valencia 27 de agosto de 2019



Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

Departament de Salut de València - Doctor Peset

A/A.: Dr. Arturo Artero
Medicina Interna

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 29 de julio de 2020 ha evaluado y ha aprobado la enmienda al proyecto del estudio titulado: Pronóstico a corto y largo plazo de la sepsis urinaria: Factores predictivos clínicos y epigenéticos.

Proyecto de investigación AD_201907

Código CEIm: 73/19

Enmienda del proyecto

Valencia 4 de Agosto de 2020



Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Doctor Peset de 1
Valencia.

C/ San Lázaro s/n. Edificio CIPS 1ª Planta. Valencia 46017. Teléfono 96.3131652

Correo electrónico ceic_peset@gva.es.

ANEXO 5: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis

Tabla S2. DMRs significativas (p-valor <0,05) entre los pacientes con sepsis y los pacientes sin sepsis

Tabla S3. Términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis frente a los pacientes sin sepsis

Tabla S4. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes sin sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Tabla S5. DMRs significativas (p-valor <0,05) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Tabla S6. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes sin criterios de SIRS

Tabla S7. DMPs significativas (FDR <0,05) entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Tabla S8. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos significativamente (FDR < 0,05) en el análisis ORA realizado a partir de los genes anotados a las DMPs y DMRs significativas en la comparación entre los pacientes con sepsis grave y shock séptico frente a los pacientes con criterios de SIRS

Las tablas del material suplementario pueden descargarse y revisarse en el siguiente enlace:

<https://roderic.uv.es/workflowitems/40485/view>

