



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Factores asociados al fracaso multiorgánico en la sepsis

Jesús Aibar Gallizo

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([deposit.ub.edu](http://deposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([deposit.ub.edu](http://deposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([deposit.ub.edu](http://deposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**U**



**B**

Universitat de Barcelona

**FACTORES ASOCIADOS AL FRACASO  
MULTIORGÁNICO EN LA SEPSIS**

**JESÚS AIBAR GALLIZO**

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

2015



A Ana Amara por su Amor y Paciencia...

...mis logros son tuyos

A mis Padres y Hermana por Todo





# **FACTORES ASOCIADOS AL FRACASO MULTIORGÁNICO EN LA SEPSIS**

TESIS PRESENTADA POR **JESÚS AIBAR GALLIZO** PARA OPTAR AL TÍTULO  
DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**Directores:**

Dr. José María Nicolás Arfelis

Dr. Pedro Castro Rebollo

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE BARCELONA

2015



## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL**

El Dr. José María Nicolás Arfelis, Director del ICMID, jefe de Sección y médico consultor senior del Área de Vigilancia Intensiva del Hospital Clínic de Barcelona y profesor agregado de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título “**FACTORES ASOCIADOS AL FRACASO MULTIORGÁNICO EN LA SEPSIS**”, presentada por Jesús Aibar Gallizo, ha sido realizada bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que quede constancia firmo la presente en Barcelona, Noviembre de 2015.

Dr. José M. Nicolás Arfelis



## **AUTORIZACIÓN DEL CODIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL**

El Dr. Pedro Castro Rebollo, médico especialista sénior del Área de Vigilancia Intensiva del Hospital Clínic de Barcelona y profesor asociado de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título “**FACTORES ASOCIADOS AL FRACASO MULTIORGÁNICO EN LA SEPSIS**”, presentada por Jesús Aibar Gallizo, ha sido realizada bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que quede constancia firmo la presente en Barcelona, Noviembre de 2015.

Dr. Pedro Castro Rebollo



## **ÍNDICE**



	Página
<b>ÍNDICE</b>	<b>9</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
<b>1. Sepsis: Concepto y definiciones</b>	<b>29</b>
<b>2. Epidemiología de la sepsis</b>	<b>32</b>
<b>3. Fisiopatología de la sepsis</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Generalidades</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Respuesta inmune innata y adaptativa en la sepsis</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1. Generalidades</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2. Moléculas de Adhesión en la sepsis</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3. Lectina fijadora de Manosa (MBL) en la sepsis</b>	<b>47</b>
<b>3.2.4. Receptores linfocitarios CD5 y CD6 solubles en la sepsis</b>	<b>50</b>
<b>3.3. Sistema hemostático en la Sepsis</b>	<b>53</b>
<b>3.3.1. Generalidades</b>	<b>53</b>
<b>3.3.2. ADAMTS-13 (<i>A Disintegrin And Metalloprotease with a ThromboSpondin Type 1 motif, member 13</i>) en la sepsis</b>	<b>54</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
<b>Artículo 1: Hipótesis y objetivos</b>	<b>59</b>
<b>Artículo 2: Hipótesis y objetivos</b>	<b>61</b>
<b>Artículo 3: Hipótesis y objetivos</b>	<b>63</b>
<b>Artículo 4: Hipótesis y objetivos</b>	<b>65</b>
<b>PUBLICACIONES ORIGINALES Y RESULTADOS</b>	<b>67</b>

<b>Artículo 1</b>	<b>70</b>
<b>Artículo 2</b>	<b>82</b>
<b>Artículo 3</b>	<b>90</b>
<b>Artículo 4</b>	<b>97</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>135</b>

## **AGRADECIMIENTOS**



Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a muchas personas que de forma directa o indirecta me han ayudado y acompañado durante su realización. Con riesgo de olvidarme de alguien, no puedo evitar destacar a los más importantes:

A Josep Maria Nicolás por brindarme la oportunidad de trabajar con él y por la dedicación y dirección con la Tesis Doctoral.

A Pedro Castro, co-director de esta Tesis Doctoral y sobretodo amigo, por su capacidad de trabajo, su optimismo, sus consejos y revisiones y su motivación. Sin tu apoyo y conocimientos no hubiera sido posible.

A mis compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínic, adjuntos, residentes, enfermeras, auxiliares y administrativas, con vosotros me inicié en esto de la Medicina. En especial a mis coetáneos (co-Rs): Emilio, Germán, Mercè y Sergio con vosotros todo fue más fácil.

A las “chicas” del laboratorio 213 de Medicina Interna del IDIBAPS, muchas ya doctoras, Olga, Rosa, Mónica, Cons, Gemma, Vane y Esther y al chico “Marc” ya doctor también. Gracias por enseñarme de nuevo a pipetejar, centrifugar, nominar: falcon, eppendorf, neubauer... En mi poyata me hicisteis sentir como en casa.

A todo el personal del Área de Vigilancia Intensiva del Hospital Clínic por su paciencia ante mi impaciencia. En especial a Ana Colomé por intentar “apañarme” las guardias y por sus charlas. Ya te echamos de menos.

A la Unidad de Atención Integrada: Carmen Hernández, Núria Seijas, Begoña Ibáñez, Anna Orquín, Mariana Roman, Carmen Grané, Lourdes Llop, Ascen Peláez, Aisha Lozano... lo vuestro es meritorio, aguantarme todos los días. Gracias por hacer más llevadero el día a día, a pesar de la sobrecarga de trabajo, sobretodo estos últimos

meses inmersos en la presente Tesis Doctoral. En especial a Silvia Valls, nuestras peleas eran terapéuticas, se te echa de menos.

A mis amigos, en especial Toni e Iván que han estado conmigo a lo largo de mi vida y me han aceptado como soy, a pesar de las excusas: “tengo guardia”, “estoy post-guardia”, “estoy con la Tesis”...

A mi suegra, Ana M<sup>a</sup> José, por su cariño. Esa canguro impagable, que me ha dado tiempo donde no lo había.

A mis padres y hermana, por hacerme, por inculcarme la cultura del esfuerzo, la humildad y por apoyarme en todas mis decisiones (mamá no llores...).

A Ana Amara por su paciencia ante mis “ausencias” y el apoyo y cariño ofrecido en todo nuestro camino recorrido juntos.

A mis gemelos Carlos y Alejandro que me habéis enseñado a ser padre. Cuando seáis viejos os ganaré a la Play.

A Jesús Jr. por re-enseñarme a ser padre.

A todos, muchas gracias.

## **ABREVIATURAS**



<b>ACCP</b>	<i>American College of Chest Physicians</i>
<b>ADAMTS-13</b>	<i>A Disintegrin And Metalloprotease with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13</i>
<b>ALT</b>	Ácido lipoteicóico
<b>APACHE</b>	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
<b>APS</b>	<i>Acute Physiology Score</i>
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>CE</b>	Células Endoteliales
<b>CID</b>	Coagulación Intravascular Diseminada
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>Cols</b>	Colaboradores
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>ESICM</b>	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
<b>IL-</b>	Interleuquina-
<b>IFN-γ</b>	Interferón Gamma
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte Function associated Antigen-1</i>
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MASP2</b>	<i>MBL-Associated Serine Proteases</i>
<b>MBL2</b>	<i>Mannose-Binding Lectin</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant protein-1</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>

<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<b>PCR</b>	Proteína C Reactiva
<b>PLC</b>	Punción y Ligadura Cecal
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
<b>PTT</b>	Púrpura Trombótica Trombocitopénica
<b>RCB</b>	Receptor de Células B
<b>RCT</b>	Receptor de Células T
<b>SAPS</b>	<i>Simplified Acute Physiologic Score</i>
<b>SCCM</b>	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
<b>SDOM</b>	Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple
<b>SIS</b>	<i>Surgical Infection Society</i>
<b>SRIS</b>	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
<b>SOFA</b>	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
<b>SRCR-SF</b>	<i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich Super Family</i>
<b>TNF-α</b>	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
<b>UCI</b>	Unidad de Cuidados Intensivos
<b>UL-VWF</b>	<i>Unusually Large Von Willebrand Factor</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>VLA-4</b>	<i>Very Late Antigen-4</i>
<b>vWF</b>	<i>von Willebrand Factor</i>

## **RESUMEN**



La sepsis es la respuesta inadecuada del organismo humano a una infección, culminación de interacciones complejas entre el microorganismo infeccioso y la respuesta inmune, inflamatoria y de la coagulación del huésped. Puede evolucionar a sepsis grave y shock séptico, sus formas graves, que son la causa más frecuente de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) no coronarias. Antes de la aparición de las UCI actuales, la sepsis grave y el shock séptico eran letales. En los últimos años se han conseguido avances importantes en el conocimiento de la epidemiología, fisiopatología y tratamiento de la sepsis, habiéndose reducido la mortalidad de forma significativa. Sin embargo, a pesar de los avances, la mortalidad se sitúa todavía entre el 20-30% en muchas series, fundamentalmente debido al síndrome de disfunción multiorgánica (SDOM) secundario. Es por ello necesario mejorar el conocimiento de la fisiopatología de los síndromes sépticos (sepsis, sepsis grave, shock séptico) y el SDOM asociada a los mismos, para así encontrar nuevas potenciales dianas terapéuticas que permitan reducir la mortalidad.

Los factores de riesgo para fallecer por sepsis se asocian tanto con la predisposición del paciente para presentar una infección como con la probabilidad de progresar a sepsis grave/shock séptico y desarrollar SDOM una vez instaurada la infección. Existen varios factores de riesgo conocidos para presentar infecciones que más susceptiblemente desembocarán en sepsis grave o shock séptico, incluyendo las enfermedades crónicas (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neoplasias, etc.) y el uso de fármacos immunosupresores. La edad, el sexo y la raza también influyen en la incidencia de la sepsis grave, pues es mayor en niños y personas de edad avanzada, en hombres que en mujeres, y en pacientes de raza negra que en pacientes de raza blanca. Sin embargo, los factores de riesgo para desarrollar el SDOM en los pacientes con este tipo de infecciones que presentarán sepsis grave o shock

séptico no están bien definidos. Probablemente influyen el microorganismo causal, los factores genéticos del huésped, la función previa del órgano alterado y la precocidad en la instauración del tratamiento óptimo para la infección.

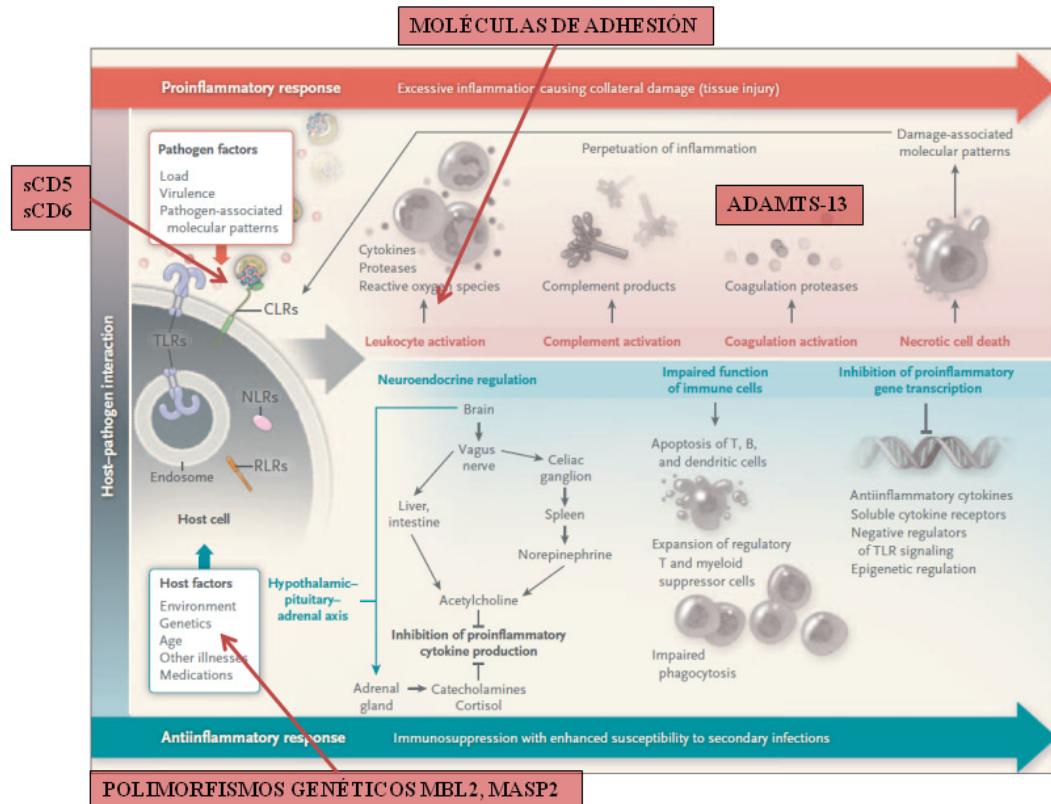
Por este motivo se planteó la realización de la presente Tesis Doctoral. En ella se incluyen **cuatro** trabajos que tienen como principales objetivos evaluar y caracterizar algunos de los factores implicados en la fisiopatología de la sepsis y su relación con el SDOM y el pronóstico. En la **Figura 1** se muestran los aspectos en los que se ha centrado esta Tesis Doctoral.

Diseñamos cuatro estudios de cohorte prospectivos y observacionales de pacientes ingresados en una UCI médica de ocho camas para adultos en un hospital universitario de 700 camas, en los que se analizaron diferentes moléculas con un potencial rol en la fisiopatología de la sepsis o sus genes en pacientes con síndromes sépticos, comparándolos a la vez con pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) de origen no infeccioso y adultos sanos. Y se relacionaron con diferentes variables clínicas de morbilidad y factores de riesgo o pronóstico.

Así, se evaluaron la expresión y función de las moléculas de adhesión en células mononucleares de sangre periférica y los niveles séricos de moléculas solubles de adhesión endotelial, implicadas en la adhesión endotelio-neutrófilo, en pacientes con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad (**Artículo 1**); la existencia y relevancia funcional de los polimorfismos genéticos en el gen de la Lectina fijadora de Manosa (MBL2) y de la MASP2 (por sus siglas en inglés, de *MBL-Associated Serine Proteases*), asociados con la predisposición a presentar infecciones graves (**Artículo 2**); los niveles de CD5 y CD6 soluble, moléculas que actúan como receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern recognition receptor*) y juegan un importante papel en la respuesta inmune innata (**Artículo 3**); y los

niveles de ADAMTS-13, proteasa que escinde los multímeros inusualmente grandes del factor de von Willebrand (UL-vWF), y que se ha hallado deficitario en pacientes sépticos (**Artículo 4**).

**Figura 1. Esquema de la respuesta biológica y celular del huésped a la sepsis. Se muestran los aspectos en los que se ha centrado la presente tesis doctoral.**



Fuente: Angus DC. *N Engl J Med* 2013<sup>1</sup>

Los principales resultados de los estudios demuestran que los niveles de CD5 y CD6 soluble y de ADAMTS-13 de los pacientes críticamente enfermos con Síndromes sépticos se relacionan con la gravedad de la enfermedad y la progresión a SDOM y la mortalidad. Por otro lado, aunque los genotipos de baja expresión de MBL y de la MASP-2 no se asocian con la gravedad ni con la mortalidad de estos pacientes, el genotipo de alta expresión de MBL parece ser un factor de riesgo para desarrollar SRIS

no infeccioso. Finalmente, los pacientes críticamente enfermos con síndromes sépticos secundarios a neumonía adquirida en la comunidad presentan alteraciones en los niveles y en la función de las moléculas de adhesión que parecen estar asociadas con el pronóstico.

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. Sepsis: Concepto y definiciones

Entendemos por sepsis la respuesta inadecuada del organismo frente a una infección. Este concepto “teórico” requería, para que todos los profesionales hablasen del mismo tipo de pacientes cuando se referían a sepsis y así permitir mejorías en su diagnóstico y tratamiento, una definición más “práctica”. En 1991 el *American College of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM)<sup>2</sup> celebraron en Chicago una conferencia de consenso en la que propusieron por primera vez las definiciones de los síndromes sépticos, síndrome de disfunción multiorgánica y otros términos afines, dotando de una herramienta útil, aunque con limitaciones, para la clasificación y estratificación de estos pacientes. En esta conferencia se introdujo un nuevo concepto, el de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS), entendido como la respuesta generalizada del organismo ante determinados estímulos que pueden ser de causa infecciosa o no (**Tabla I**).

### Tabla I. Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS)

Presencia de dos o más de los siguientes:

1. Temperatura mayor de 38 °C o menor de 36 °C
2. Taquicardia (Frecuencia cardíaca superior a 90 lpm)
3. Taquipnea (más de 20 rpm, o PaCO<sub>2</sub> menor de 32 mmHg), o necesidad de ventilación mecánica.
4. Alteración del recuento de los leucocitos (más de 12.000 o menos de 4.000 leucocitos/mm<sup>3</sup>, o más del 10% de bandas).

---

Lpm: latidos por minuto, rpm: respiraciones por minuto, PaCO<sub>2</sub>: Presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial.

Definieron la **sepsis** como el SRIS secundario a infección documentada, clínica y/o microbiológicamente, la **sepsis grave** como la sepsis que se acompaña de disfunción de órganos, hipotensión o hipoperfusión (hiperlactacidemia) y el **shock séptico** como la hipotensión arterial secundaria a sepsis que persiste a pesar de un aporte adecuado de

fluidos, acompañada de alteraciones de la perfusión o disfunción orgánica, o la necesidad de fármacos vasoactivos para mantener la presión arterial. El **Síndrome de disfunción orgánica múltiple** (SDOM) se definió como la disminución potencialmente reversible en la función de uno o más órganos, que son incapaces de mantener la homeostasis sin el apoyo terapéutico.

Posteriormente, en el año 2001 la SCCM, la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), la ACCP, la *American Thoracic Society* (ATS) y la *Surgical Infection Society* (SIS)<sup>3</sup> celebraron una nueva conferencia de consenso para revisar la definición de sepsis (**Tabla II**). Se aumentaron los criterios para definir la sepsis, de forma que la presencia de cualquier signo de respuesta inflamatoria sistémica secundario a una infección puede ser interpretado como un signo de sepsis. La definición de **sepsis grave** permaneció sin cambios respecto a la primera conferencia de consenso, mientras que la de **shock séptico** se modificó por el fallo circulatorio agudo caracterizado por hipotensión arterial persistente inexplicable por otras causas. El **síndrome de disfunción orgánica múltiple** se mantuvo como un cuadro clínico que se caracteriza por disfunción progresiva, y en ocasiones, secuencial, de dos o más órganos, que no pueden mantener la homeostasis sin una intervención terapéutica. El SDOM puede clasificarse como SDOM primario cuando la disfunción ocurre como consecuencia directa de una lesión conocida (por ejemplo, insuficiencia renal aguda debido a rabdomiolisis), o secundario cuando esta disfunción se produce como consecuencia de la respuesta del huésped a la agresión (por ejemplo, síndrome de distrés respiratorio agudo en un paciente con una sepsis de foco abdominal).

Un aspecto importante de estas definiciones es el concepto de los síndromes sépticos como un espectro continuo de gravedad, pudiéndose considerar sepsis, sepsis grave y shock séptico diferentes estadios de la sepsis con una morbilidad y mortalidad progresivamente mayores.

## **Tabla II. Criterios diagnósticos de Sepsis según la conferencia de consenso del 2001 de la SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS**

Infeción, documentada o sospechada y alguno de los siguientes elementos:

### **Variables Generales**

- Fiebre (Temperatura central > 38,3°C)
- Hipotermia (Temperatura central < 36°C)
- Frecuencia cardiaca > 90 latidos por minuto o >2 desviaciones estándar sobre el valor normal para la edad
- Taquipnea
- Alteración del estado mental
- Edema significativo o balance de fluidos positivo (>20 mL/kg en 24 h.)
- Hiperglicemia (Glucosa plasmática > 120mg/dL o 7,7 mmol/L) en ausencia de diabetes

### **Variables Inflamatorias**

- Leucocitosis ( $> 12.000 \mu\text{L}^{-1}$ )
- Leucopenia ( $< 4.000 \mu\text{L}^{-1}$ )
- Recuento leucocitario normal con más de 10% de formas inmaduras.
- Proteína C Reactiva (PCR) más de dos desviaciones estándar por encima del valor normal.
- Procalcitonina plasmática más de dos desviaciones estándar por encima del valor normal.

### **Variables Hemodinámicas**

- Hipotensión arterial (PAS < 90 mm Hg, PAM < 70 mm Hg, o descenso de la PAS > 40 mm Hg en adultos o PAS inferior a dos desviaciones estándar por debajo del valor normal para la edad).
- Índice cardíaco  $> 3,5\text{L/min/m}^2$

### **Variables de Disfunción Orgánica**

- Hipoxemia arterial ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ )
- Oliguria aguda (volumen urinario  $< 0,5 \text{ mL/kg/h}$  durante al menos 2 h pese a la adecuada resuscitación con fluidos)
- Aumento de la creatinina sérica  $> 0,5 \text{ mg/dL}$  o  $44,2 \mu\text{mol/L}$
- Anormalidades de la coagulación (INR  $> 1,5$  o aPTT  $> 60 \text{ s}$ )
- Íleo (ausencia de ruidos intestinales)
- Trombocitopenia (recuento de plaquetas  $< 100.000 \mu\text{L}^{-1}$ )
- Hiperbilirrubinemia (Bilirrubina plasmática total  $> 4 \text{ mg/dL}$  ó  $70 \mu\text{mol/L}$ )

### **Variables de Perfusion Tisular**

- Hiperlactacidemia ( $> 1 \text{ mmol/L}$ )
- Disminución del relleno capilar

*Fuente: Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International SepsisDefinitions Conference. Crit Care Med 2003; 31:1250-1256<sup>3</sup>*

PAS: Presión arterial sistólica, PAM: Presión arterial media, PaO<sub>2</sub>: Presión parcial de oxígeno en sangre arterial, FiO<sub>2</sub>: Concentración de oxígeno en el aire inspirado, INR: *International normalized ratio*.

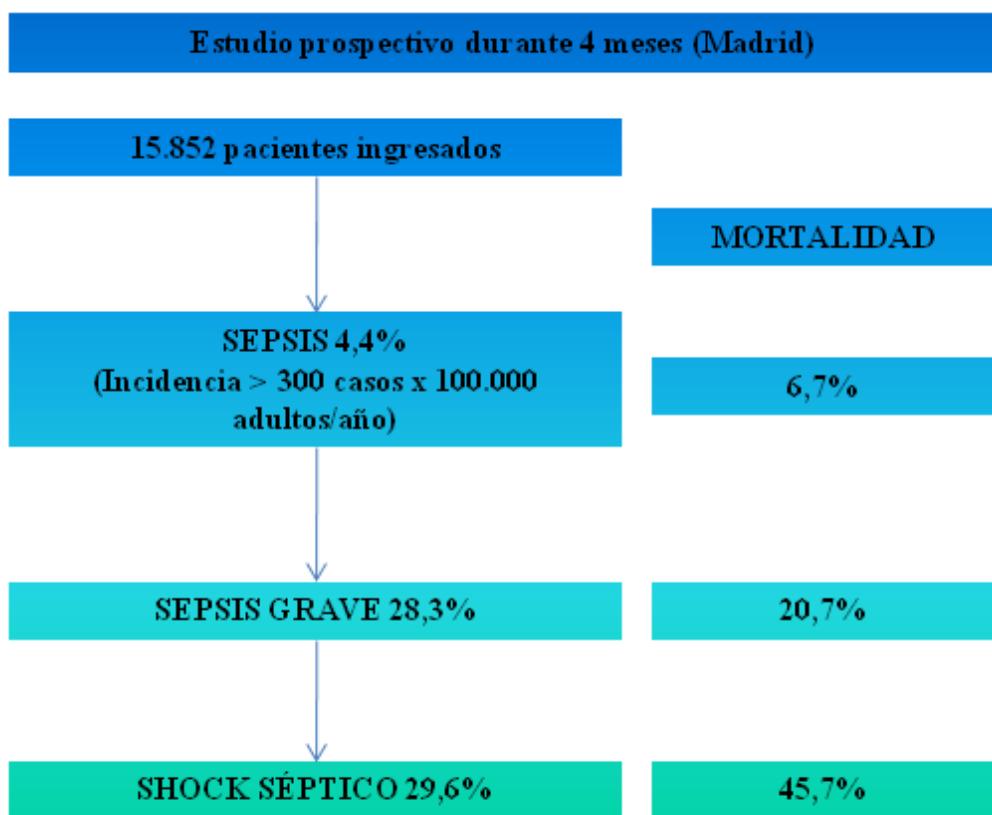
## 2. Epidemiología de la sepsis

Se estima que en Estados Unidos ocurren anualmente 400.000 casos de sepsis y 200.000 casos de shock séptico, responsables de 100.000 muertos al año<sup>4</sup>. Existe además un aumento progresivo, explicado en parte por el mayor número de pacientes inmunodeprimidos y por la creciente longevidad de la población. La sepsis se presenta en un 2% de los pacientes hospitalizados, y entre un 4,5% y un 49% de los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI), según diferentes estudios<sup>4,5</sup>, siendo la enfermedad más prevalente y la causa más frecuente de muerte en las UCI no coronarias<sup>6</sup>.

En nuestro entorno, el 28% de los pacientes con sepsis que ingresan en el hospital desarrollarán sepsis grave, y el 30% de éstos, shock séptico, siendo la mortalidad creciente. En la primera década del siglo XXI se describían cifras del 6,7%, 20,7% y 45,7%, de mortalidad para estos pacientes, respectivamente<sup>7</sup> (**Figura 2**).

La sepsis se produce tanto como consecuencia de infecciones adquiridas en la comunidad como de infecciones nosocomiales. La neumonía es la causa más común de sepsis grave y representa la mitad de los casos, seguido de las infecciones intraabdominales y de las infecciones del tracto urinario<sup>5</sup>.

**Figura 2. Epidemiología de la Sepsis en España**



Fuente: Esteban A. Crit Care Med 2007<sup>7</sup>

En los últimos años se han conseguido avances importantes en el reconocimiento y tratamiento precoz de la sepsis, con mejoras significativas en la mortalidad, estimándose alrededor del 20% en los casos de sepsis grave y shock séptico en los últimos estudios<sup>8-10</sup>. Sigue siendo, por tanto, elevada<sup>4,11,12</sup>. Si consideramos que el incremento en la supervivencia debido a mejorías en el diagnóstico precoz y tratamiento antibiótico y de soporte están llegando a su techo, es necesario buscar tratamientos que incidan en la fisiopatología para reducir la mortalidad. Y para ello es necesario conocerla mejor.

### **3. Fisiopatología de la sepsis**

#### **3.1. Generalidades**

La respuesta normal del huésped a la infección es un proceso complejo que intenta localizar y controlar la invasión bacteriana, mientras se inicia la reparación del tejido lesionado. Esta respuesta incluye la activación de las células fagocíticas, así como la generación de mediadores pro y antiinflamatorios. Cuando esta respuesta se generaliza y envuelve tejidos normales lejanos al sitio primario de la infección o de la lesión hablamos de sepsis.

Los factores de riesgo para fallecer por sepsis se asocian tanto con la predisposición del paciente para presentar una infección como con la probabilidad de progresar a sepsis grave/shock séptico y desarrollar SDOM una vez instaurada la infección. Existen varios factores de riesgo conocidos para presentar infecciones que más susceptiblemente desembocarán en sepsis grave o shock séptico, incluyendo las enfermedades crónicas (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neoplasias, etc.) y el uso de fármacos inmunosupresores. La edad, el sexo y la raza o grupo étnico también influyen en la incidencia de la sepsis grave, pues es mayor en niños y personas de edad avanzada, en hombres que en mujeres, y en pacientes de raza negra que en pacientes de raza blanca. Sin embargo, los factores de riesgo para desarrollar el SDOM en los pacientes con este tipo de infecciones que presentarán sepsis grave o shock séptico no están bien definidos. Probablemente influyen el microorganismo causal, los factores genéticos del huésped, la función previa del órgano alterado y la precocidad en la instauración del tratamiento óptimo para la infección<sup>4-6,13</sup>.

La sepsis es la culminación de interacciones complejas entre el microorganismo infeccioso y la respuesta inmune, inflamatoria y de la coagulación del huésped<sup>12,14</sup>. En este sentido, Bone y cols.<sup>15</sup> postularon que, tras una respuesta proinflamatoria inicial, se

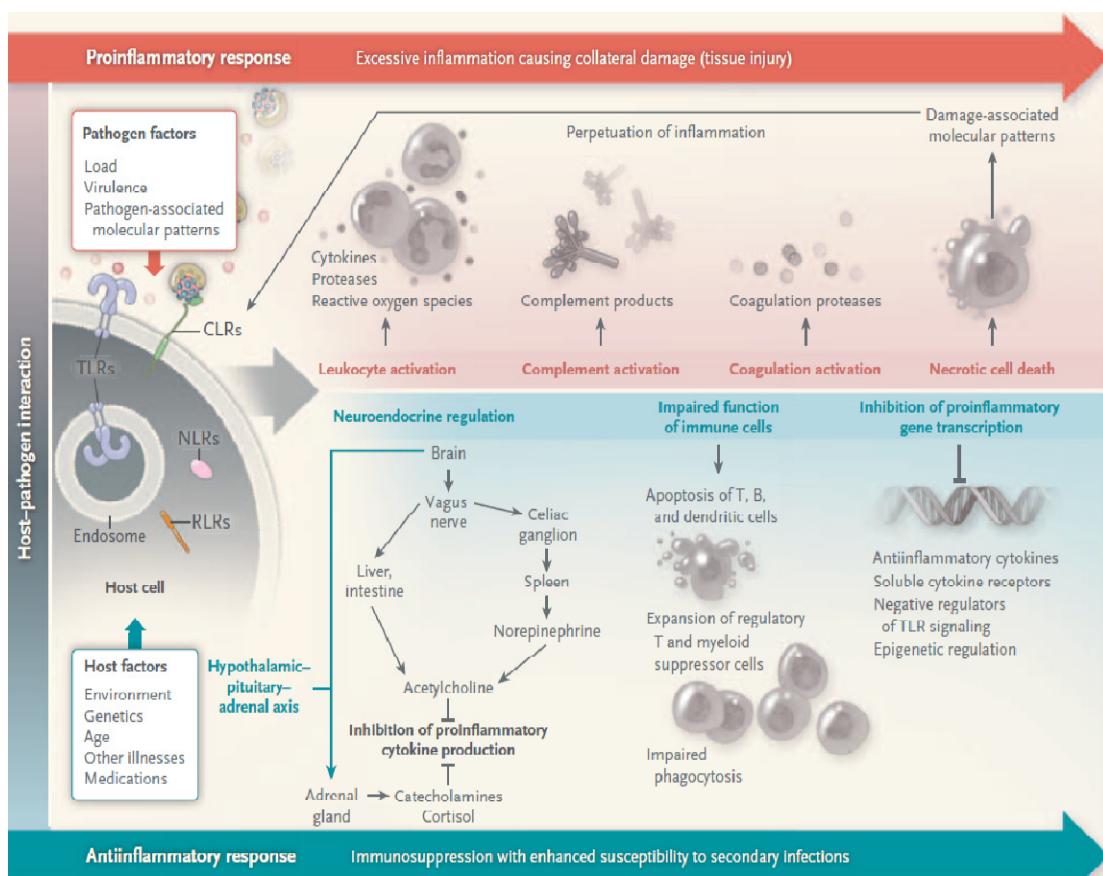
daba paso a un “síndrome de respuesta inflamatoria compensatoria o antiinflamatoria”. Sin embargo, posteriormente se evidenció que la infección desencadena una respuesta del huésped más compleja, variable y prolongada en el tiempo en la cual los mecanismos antiinflamatorios y proinflamatorios podían contribuir, por un lado, a la eliminación de la infección y la recuperación del tejido dañado, o por otro lado, al fracaso multiorgánico y a la aparición de otras infecciones.

La respuesta a la infección en cualquier paciente depende del patógeno causante (inóculo y virulencia) y del huésped (características genéticas, comorbilidad, etc.), con respuestas diferentes a nivel local, regional y sistémico, y con múltiples factores implicados (**Figura 3**). El tipo de respuesta del huésped probablemente cambia con el tiempo en paralelo con el curso clínico. En general, se cree que las respuestas proinflamatorias (dirigidas a la eliminación de los patógenos invasores) son responsables del daño tisular colateral en la sepsis grave, mientras que las respuestas antiinflamatorias (importantes para limitar la lesión tisular local y sistémica) están implicadas en la mayor susceptibilidad a infecciones secundarias.

Entre los diferentes actores y sistemas implicados en la fisiopatología de la sepsis y su evolución a sepsis grave / shock séptico y fracaso multiorgánico, dos especialmente relevantes son el sistema inmunitario, con sus respuestas innata y adaptativa, y el sistema hemostático de la coagulación.

**Figura 3. Respuesta del huésped en la sepsis grave.**

La respuesta del huésped a la sepsis se caracteriza por una respuesta proinflamatoria (parte superior de la figura, en rojo) y una respuesta antiinflamatoria (parte inferior de la figura, en verde). La dirección, la extensión y la duración de estas reacciones se determinan por factores del huésped (por ejemplo, las características genéticas, la edad, las enfermedades coexistentes) y factores del microorganismo (por ejemplo, la carga microbiana y la virulencia). La respuesta inflamatoria se inicia con la interacción entre los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en la superficie de las células inmunes del huésped (por ejemplo, Receptores tipo Toll (TLR, Receptores Scavenger)). Una respuesta inflamatoria exagerada produce daño colateral del tejido y muerte celular por necrosis, que da como resultado la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP) que perpetúan la inflamación actuando sobre los mismos PRR que son activados por los patógenos.



Fuente: Angus DC. *N Engl J Med* 2013<sup>1</sup>

### **3.2. Respuesta inmune innata y adaptativa en la sepsis**

#### **3.2.1. Generalidades**

El sistema inmunitario está formado por los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y los secundarios (ganglios linfáticos y bazo), los cuales producen y activan todo el componente celular de la inmunidad (tanto innata como adaptativa): linfocitos T, linfocitos B, células presentadoras de antígenos (células dendríticas, monocitos y macrófagos) y células *Natural Killer* (NK).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa (tras la piel y mucosas), de acción inmediata frente al agente infeccioso. No posee mecanismos específicos de reconocimiento del antígeno sino que tiene un desarrollo innato ante agentes infecciosos, y no genera memoria inmunológica. Sus principales componentes son células con capacidad de fagocitosis (monocitos-macrófagos, células dendríticas, granulocitos) y células NK, además de moléculas solubles como el complemento, las colectinas, la proteína C reactiva y otras pentraxinas, la proteína fijadora de lipopolisacárido, los péptidos antimicrobianos, las citoquinas y otros mediadores con actividad antiinfecciosa<sup>16</sup>.

La inmunidad adaptativa se caracteriza por una acción más tardía frente al patógeno, y que posee mecanismos de reconocimiento específico del antígeno y desarrolla memoria inmunológica. Dentro de sus principales componentes encontramos los linfocitos B y T, además de moléculas solubles como los anticuerpos<sup>17</sup>.

La clasificación de la inmunidad innata y adaptativa es de carácter académico y útil para la comprensión del proceso de reconocimiento y respuesta inmune, pero en la realidad biológica y clínica, ambos tipos de inmunidad se solapan y comparten mecanismos celulares y moleculares.

La respuesta del huésped a la infección se inicia a través de la inmunidad innata. Las células del sistema inmune innato, particularmente los macrófagos, reconocen y se unen a los componentes de la pared microbiana. Esto puede ocurrir a través de varias vías:

- Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés, *Pattern recognition receptor*), presentes en la superficie de las células inmunes del huésped, pueden reconocer y unirse a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*) de los microorganismos. Existen varios tipos de PRR: los receptores tipo *Toll* (TLRs, *Toll-like receptors*), los receptores NOD (*nucleotide-oligomerization domain*), los RLRs (*retinoic-acid-inducible gene I receptors*)<sup>12</sup> y los receptores *Scavenger* entre los que se incluyen el CD5 y CD6, moléculas de la superfamilia de receptores SRCR (*Scavenger Receptor Cysteine-Rich*). Entre los PAMP se incluyen estructuras microbianas ampliamente distribuidas y conservadas, ausentes en el huésped, y esenciales para la viabilidad del patógeno, como los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas y el ácido lipoteicóico (ALT) y los peptidoglicanos (PGN) de las bacterias Gram positivas.
- La activación del receptor expresado en células mieloídes (TREM-1) y el receptor mieloide DAP12 asociado a leptina (MDL-1) en las células inmunes del huésped, que puede reconocer y unirse a los componentes microbianos<sup>18</sup>.

La unión de los receptores de superficie de las células inmunes del huésped a los componentes microbianos tiene múltiples efectos. Por un lado, estimula la señalización intracelular en diferentes tipos celulares, fundamentalmente leucocitos

polimorfonucleares (PMN) y células endoteliales, incrementando la transcripción de moléculas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o la interleuquina (IL)-1 $\beta$ , quimioquinas y moléculas de adhesión como la ICAM-1 (*Intercellular Adhesión Molecule-1*) o la VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), así como citoquinas antiinflamatorias como la IL-10<sup>19,20</sup>. Las citoquinas proinflamatorias, a su vez, también estimulan a las moléculas de adhesión de los PMN y las células endoteliales<sup>21</sup>. La **Tabla III** muestra los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios comúnmente implicados en la sepsis.

Entonces los PMN se activan y expresan moléculas de adhesión que causan su agregación y marginación al endotelio vascular<sup>22-28</sup>. Esto es facilitado por la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular que atraen más PMN. Tras esta unión al endotelio vascular, los PMN, a través de una serie de etapas (rodadura o *rolling*, adhesión, diapédesis y quimiotaxis), migran al lugar de la lesión (**Figura 4**)<sup>28-33</sup>.

La liberación de mediadores inflamatorios por los PMN en el lugar de la infección es la responsable de los signos cardinales de la inflamación. Aunque esta activación de los PMN elimina a los microorganismos, también lesionan el endotelio a causa de la liberación de mediadores inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular produciendo edema en los pulmones y otros tejidos.

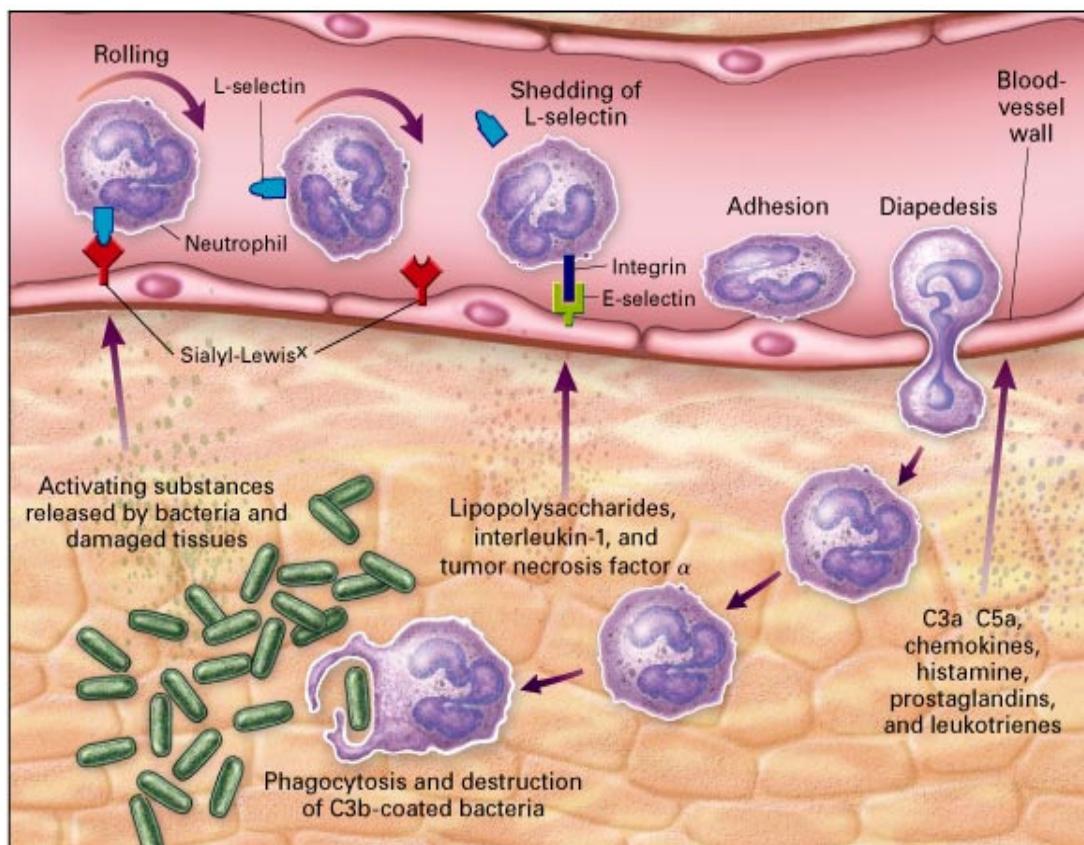
**Tabla III. Principales mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios implicados en la sepsis**

Moléculas proinflamatorias	Moléculas antiinflamatorias
TNF- $\alpha$	Antagonista del receptor de IL-1
Linfotoxina alfa	TNF soluble
IL-1, -2, -8, -12, -18, -22	Receptor tipo II de IL-1
PCR	Receptor soluble de IL-1
IFN $\gamma$	IL-4,-6,-10,-11,-13
CD14, MD2	Prostaglandina E2- $\alpha$
C5a	Factor estimulador de colonias de granulocitos
Lectina	Antioxidantes endógenos
Factor activador de plaquetas	Glutatión
Leucotrienos	Selenio
Bradicininas	Vitamina E
Óxido nítrico	Antitrombina
ERN	Proteína C activada
ERO	Inhibidor de la vía del factor tisular
Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)	Trombomodulina soluble
Factor de inhibición de migración de macrófagos (FMI)	IFN $\alpha$ y $\beta$
Proteína de alta movilidad grupo box1	Glucocorticoides
Histamina	Estrógenos
Trombina	Epinefrina y otras catecolaminas
Factor X	Agonistas colinérgicos
Complejo del factor VII	Células apoptóticas
Receptor de activación expresado en células mieloides (TREM-1)	TGF $\beta$
Células necróticas	

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa, IL-: Interleuquina, PCR: Proteína C Reactiva, IFN- $\gamma$ : Interferón gamma, CD14: *cluster* de diferenciación 14, ERN: Especies reactivas del nitrógeno, ERO: Especies reactivas del oxígeno, TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta.

**Figura 4. Respuesta inflamatoria aguda**

Los neutrófilos son las primeras células en alcanzar el lugar de la infección y contribuyen de forma importante a la respuesta inflamatoria. Ruedan (*rolling*) a lo largo de la pared del endotelio y la L-Selectina de su superficie se une a estructuras del endotelio vascular con hidratos de carbono, tales como el Sialyl Lewis X y detienen su avance. En este momento el neutrófilo se activa reemplazando la L-Selectina por otras moléculas de adhesión como las integrinas, que se unen a la E-Selectina presente en la pared de los vasos sanguíneos como resultado de la influencia de mediadores inflamatorios (lipopolisacáridos bacterianos, IL-1, TNF- $\alpha$ ). Los neutrófilos activados entran en los tejidos donde son atraídos al lugar de la infección por diferentes factores quimiotácticos. Allí pueden fagocitar y destruir al microorganismo.



Fuente: Delves PJ. N Engl J Med 2000<sup>33</sup>

El balance entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios regula el proceso inflamatorio, incluida la adherencia, quimiotaxis y la fagocitosis del microorganismo infeccioso, la eliminación del microorganismo y la fagocitosis de los residuos del tejido lesionado<sup>34</sup>. Si hay un equilibrio entre los mediadores proinflamatorios y los antiinflamatorios, el insulto infeccioso inicial se supera y se logra

recuperar la homeostasis del paciente. El resultado final será la reparación de los tejidos y la curación<sup>14,35</sup>.

Los microorganismos responsables de la infección también estimulan la respuesta inmune adaptativa (humoral y mediada por células) que amplifican la respuesta inmune innata<sup>32,36</sup>.

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: la respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante; y la respuesta inmune celular, donde los linfocitos T son las células más importantes<sup>37</sup>. Estas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos periféricos a través de las células presentadoras de antígeno, que alcanzan estos órganos a través de la circulación linfática, desencadenando las siguientes fases:

- **Fase de reconocimiento:** Consiste en la unión del antígeno extraño a los receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B expresan moléculas de anticuerpos sobre su superficie que se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma soluble. Los linfocitos T expresan los llamados receptores de célula T (TCR), que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigenicos, pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre la célula presentadora de antígeno. Los primeros en efectuar este reconocimiento son los linfocitos T CD4+.
- **Fase de activación:** Secuencia de eventos que se producen en los linfocitos como resultado del reconocimiento antigenico específico. Todos los linfocitos experimentan dos cambios fundamentales:
  - **Proliferación:** Expansión de los clones antígeno-específicos y amplificación de la respuesta protectora, en la que asume una función

preponderante el linfocito T CD4+, capaz de activar a los linfocitos B y T CD8+.

- **Diferenciación:** En esta fase se forman las células efectoras y las de memoria. Las primeras producen diversas sustancias que pueden interactuar con el antígeno, como los anticuerpos y linfocinas; las segundas son linfocitos parcialmente diferenciados, es decir, que no llegan a convertirse en células efectoras, y que sirven para que, en caso de una segunda exposición al antígeno, la respuesta efectora ocurra de forma mucho más rápida y eficiente. Los linfocitos T CD4+, se diferenciarán en 2 clases de células efectoras: linfocitos T helper 1 (Th1) y los linfocitos T helper 2 (Th2). El modo como surgen ambas líneas celulares no ha sido totalmente definido, pero sí está clara la influencia de citoquinas <sup>37</sup>. La IL-12 y el IFN- $\gamma$ , producidos por macrófagos y células NK <sup>38</sup> en fases tempranas de la infección y como respuesta a virus y bacterias intracelulares, suelen desarrollar las células Th1. Por el contrario, si la célula T CD4+ es activada en presencia de IL-4 e IL-6, tiende a diferenciarse en Th2 y se inhibe la elaboración de Th1. Los linfocitos Th1 generalmente secretan citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y los linfocitos Th2 secretan citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10, dependiendo del organismo infectante, la carga de la infección, y otros factores. Además, si los microorganismos agresores estimulan la vía humorral de defensa, la subclase T CD4+ que predomina es la Th2, cuya función será activar a los linfocitos B, que entonces proliferarán y se diferenciarán en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células Th1 pueden también activar a los linfocitos T CD8+, que proliferan y se diferencian en T

CD8+citotóxicos para actuar directamente en la destrucción de las células infectadas por patógenos intracelulares<sup>39</sup>.

- **Fase efectora:** Los linfocitos T diferenciados en células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de eliminación de los patógenos, mientras los linfocitos B las ejecutan en los propios órganos periféricos. Muchas de estas acciones efectoras promueven la participación de células no linfoides y de mecanismos de inmunidad innata, como anticuerpos opsonizantes que favorecen la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos PMN, anticuerpos que activan el sistema del complemento, inmunoglobulinas E que estimulan la degranulación de los mastocitos, citocinas segregadas por los linfocitos T que estimulan la inmunidad natural...

Entre los factores importantes en la activación y regulación de la respuesta inmune en la sepsis encontramos las moléculas de adhesión, la lectina fijadora de manosa y los receptores linfocitarios.

### 3.2.2. Moléculas de adhesión en la sepsis

Como se ha comentado previamente, la secuencia fisiopatológica en la sepsis incluye la liberación de citoquinas y la activación endotelial y de los PMN, iniciando una cascada de interacciones y adhesiones endotelio-PMN<sup>40-44</sup>. Posteriormente se produce la migración transendotelial con la consecuente lesión microvascular y tisular. De hecho, la respuesta inmune innata y adaptativa depende de la migración de los PMN a través de las células endoteliales. Multitud de autores han descrito que el daño endotelial y tisular en la sepsis se correlaciona con la intensidad de la respuesta inflamatoria y con el secuestro de los PMN hacia los tejidos<sup>22-25,45</sup>.

La adhesión de los PMN al endotelio está regulada por las moléculas de adhesión. Estas moléculas de adhesión están presentes en las células mononucleares circulantes y en las células endoteliales. Existen tres familias de moléculas de adhesión especialmente relevantes en la interacción leucocito-endotelio: las selectinas, las integrinas y las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas<sup>26-28</sup>.

Entre las selectinas, la P-selectina participa principalmente en el reclutamiento precoz de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria, mientras que la E-selectina, que se expresa en las células endoteliales estimuladas<sup>27</sup>, juega un papel fundamental en la fase inicial de la adhesión, facilitando la rodadura (*rolling*) de los leucocitos a lo largo de la membrana endotelial como preludio de la adhesión leucocitaria. Esta adhesión está mediada por la interacción con la ICAM-1, presente en la membrana de los neutrófilos, con ligandos de las selectinas tales como el Sialyl Lewis X, que se expresan en las células endoteliales y pueden interactuar con las selectinas bajo situaciones inflamatorias<sup>30,46</sup>. En este sentido, varios estudios han demostrado que los niveles elevados de E- y P-Selectina se relacionaban con una mayor gravedad y mortalidad en la sepsis<sup>27,47,48</sup>, aunque también hay estudios que mostraron un efecto protector de estas moléculas en los síndromes sépticos<sup>23,24,49,50</sup>. Brinkman-van der Linden y cols.<sup>51</sup> mostraron, por otro lado, que pacientes que fallecían con shock séptico de cualquier causa tenían niveles más elevados de Sialyl Lewis X que los que sobrevivían.

Las integrinas son responsables de la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. El VLA-4 (*very late antigen-4*) es una integrina expresada en los eosinófilos, linfocitos y monocitos que se une a la VCAM-1 y es importante para la acumulación de estos tipos de células en los sitios de infección<sup>31</sup>. El LFA-1 (*Lymphocyte function associated antigen-1*), Mac-1 y gp 150/95 son otras integrinas responsables de la adhesión y transmigración de los leucocitos a través de las células endoteliales<sup>32,52</sup>. Prince y cols.<sup>53</sup> describieron que los ratones con deficiencia de LFA-1

que desarrollan sepsis tienen mayor mortalidad. De forma similar y también en modelos experimentales de sepsis en ratones Kadiogly y cols.<sup>54</sup> hallaron que la deficiencia de Mac-1 y VLA-4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés *Peripheral blood mononuclear cells*) se asocia a una mayor carga bacteriana pulmonar y sanguínea.

Respecto a las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas, en las que se incluyen la VCAM-1 y la ICAM-1, son moléculas expresadas en las células endoteliales que interactúan con las integrinas de los leucocitos y están implicadas en la adhesión firme y la transmigración de los leucocitos<sup>29,50</sup>. Diversos estudios han demostrado niveles sanguíneos elevados de las formas solubles de VCAM-1 e ICAM-1 en sepsis y asociados a la disfunción orgánica en estos pacientes<sup>27,55,56</sup>. Sin embargo, existen estudios en modelos murinos de sepsis que ofrecen resultados contradictorios, como los de Hildebrand y cols.<sup>57</sup> o los de Steeber y cols.<sup>50</sup>, en los que ratones sépticos con deficiencia de ICAM-1 (ICAM-1<sup>-/-</sup>) son más resistentes a desarrollar shock séptico y presentan una mayor tasa de supervivencia.

Finalmente, el reclutamiento de leucocitos se rige por quimioquinas<sup>58</sup>. El MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) es una quimioquina que regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T y células NK, y parece influir en la inmunidad celular mediada por los linfocitos T<sup>58,59</sup>. En modelos murinos de sepsis, la administración de MCP-1 produce un efecto beneficioso mediante la obtención de diferentes subpoblaciones de leucocitos necesarias para contener localmente el insulto inicial y eliminar los patógenos<sup>58</sup>.

Por tanto, la expresión de las moléculas de adhesión en pacientes sépticos en general se ha asociado con la gravedad, el desarrollo SDOM y la mortalidad. Sin embargo, no existen datos sobre la función y expresión de las moléculas de adhesión en los síndromes sépticos secundarios a una causa específica como la neumonía adquirida

en la comunidad, y hay pocos datos sobre la función de los leucocitos en relación a estas moléculas.

### 3.2.3. Lectina Fijadora de Manosa (MBL) en la sepsis

La Lectina fijadora de Manosa (MBL por sus siglas en inglés *Mannose-binding lectin*) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las lectinas tipo C que constituye un elemento importante del sistema inmunológico innato del huésped. Tiene una estructura oligomérica (400-700 kDa) constituida por subunidades que contienen tres cadenas peptídicas presumiblemente idénticas de aproximadamente 30 kDa cada una<sup>60-62</sup>. Sintetizada principalmente por el hígado<sup>63</sup>, la MBL se une a los carbohidratos presentes en la superficie de los microorganismos patógenos, mediando la opsonización directamente o por medio de la activación del complemento por la vía de las lectinas<sup>64</sup>. En el suero está presente principalmente en forma de oligómeros (principalmente trímeros o tetrámeros) unidos a las proteínas asociadas con la Serina (MASP y MASP2 por sus siglas en inglés, de *MBL-Associated Serine Proteases*) que son también sintetizadas principalmente en el hígado<sup>64-67</sup>. Una vez unidas a los residuos de carbohidratos, el complejo MBL/MASP2 actúa como una opsonina para favorecer la fagocitosis de numerosos patógenos y activar el complemento<sup>66</sup>. Pero la MBL no sólo está implicada en la activación del complemento, sino que también es un potente modulador de la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>68</sup>. Adicionalmente, la MBL es capaz de aumentar el aclaramiento de endotoxinas a través de las células de Kupffer<sup>69</sup> y el aumento del recambio del fibrinógeno por escisión de la protrombina, generando trombina<sup>70</sup>.

Se han reportado tres mutaciones que implican un cambio funcional en estas proteínas, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, de las siglas en inglés *single*

*nucleotide polymorphisms*) en el exón 1 del gen MBL2, consistentes en la introducción de sustituciones de aminoácidos en el codón 52 (alelo D), 54 (alelo B), ó 57 (alelo C), que causan una reducción de los niveles de MBL debido a problemas de montaje de monómeros de MBL en oligómeros funcionales<sup>62</sup>. Además de estas variantes estructurales de alelos, otros tres SNP en la región promotora del gen de la MBL2 en las posiciones -550 (H/L), +4 (P/Q) y sobre todo -221 (Y/X), influyen en la tasa de transcripción y también se asocian a concentraciones bajas en suero de MBL<sup>71-74</sup>. La deficiencia genética de MBL es frecuente y parece predisponer a infecciones graves<sup>75</sup>, fundamentalmente en la primera infancia<sup>76-78</sup>, en pacientes bajo tratamiento con quimioterapia<sup>79</sup> y en adultos con otras enfermedades concomitantes<sup>80,81</sup>. En las unidades de cuidados intensivos, aunque varios estudios han sugerido la existencia de una relación entre los niveles séricos bajos de MBL y un mayor riesgo de infecciones, la asociación con la mortalidad ha presentado resultados contradictorios<sup>82-85</sup>.

La MBL no sólo forma parte del sistema inmune innato participando en el reconocimiento de patógenos invasores, sino que también modula la producción de citoquinas por parte de los macrófagos durante la fagocitosis. Este efecto sobre la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  fue demostrado en un modelo *ex vivo* de infección por *Neisseria meningitidis*<sup>68</sup>. Por ello el déficit de MBL puede estar asociado con una alteración de la respuesta proinflamatoria tanto en respuesta a desencadenantes infecciosos como no infecciosos. Fidler y cols.<sup>86</sup> describieron en pacientes críticos pediátricos que niveles de MBL menores de 1.000ng/mL, en relación a polimorfismos en el exón 1 del gen de la MBL-2, aumentaron significativamente el riesgo de desarrollar SRIS y de progresión de sepsis a sepsis grave/shock séptico. Además, el grado de déficit de MBL de acuerdo con el perfil genético se correlacionó con la gravedad de la infección en pacientes con SRIS<sup>82</sup>. Esta asociación entre el déficit de MBL y el peor pronóstico durante las infecciones graves (por ejemplo: evolución a shock séptico refractario) puede estar

también relacionado con la interacción existente con la activación del complemento, las citoquinas inflamatorias y la cascada de la coagulación. La influencia de la activación del complemento en el desarrollo de shock séptico ha sido ampliamente estudiada, habiéndose demostrado cómo la vía clásica y alternativa del complemento se activan durante el shock séptico y están involucradas en los mecanismos destinados a eliminar las endotoxinas de los patógenos. Más recientemente, este papel ha sido evaluado también para la activación del complemento por la vía de las lectinas y la MBL<sup>87,88</sup>.

Por otro lado datos recientes sugieren que el déficit de MBL puede ser un factor de riesgo para el desarrollo precoz de coagulación intravascular diseminada (CID) y fallo orgánico durante las infecciones graves<sup>89,90</sup>. Por el contrario, una expresión excesiva de MBL puede ser perjudicial, dado que la MBL puede contribuir a un exceso de respuesta inflamatoria induciendo daño endotelial y fallo orgánico tal y como se observó en pacientes con trasplante de órgano sólido<sup>91</sup>.

Por lo tanto la MBL, debido a su papel fundamental en la implicación en la activación del complemento, la cascada de la coagulación y la respuesta inflamatoria sistémica, puede representar un punto clave para la comprensión del desarrollo de la sepsis tal y como se ha demostrado en estudios en modelos animales y en estudios clínicos con pacientes con sepsis grave o shock séptico<sup>82,85,88,92-100</sup>.

Además de los polimorfismos MBL2, también se ha descrito una deficiencia hereditaria de MASP2. Esta deficiencia se debe a una mutación homocigota en el exón 3 del gen MASP2, resultando en un cambio de ácido aspártico a glicina en la posición 105 (Asp105Gly) de la proteína de dominio CUB1, que es una región esencial para la formación del complejo funcional MBL/MASP2. Esta mutación hace que las MASP2 sean incapaces de unirse a la MBL y por lo tanto interrumpe la activación del complemento a través de la vía de la MBL y también disminuyen los niveles plasmáticos de MASP2<sup>101,102</sup>. Los pacientes heterocigotos para la MASP2 Asp105Gly,

por el contrario, no tienen ningún impedimento para la activación del complemento a través de la vía de la lectina<sup>101,103,104</sup>.

Se han identificado otras variantes adicionales en el exón 3 del gen de la MASP2 que no producen una disminución de los niveles plasmáticos de MASP2 ni una disminución de la actividad<sup>105,106</sup>.

La posible asociación entre el déficit de MASP2 y la susceptibilidad a las infecciones sigue siendo motivo de controversia. Diversos autores han demostrado que la deficiencia de MASP2 aumenta el riesgo de neutropenia febril en pacientes pediátricos con neoplasias<sup>107</sup> y aumenta el riesgo de aspergilosis invasiva en pacientes con trasplante alogénico de médula ósea<sup>108</sup>. Por otro lado, otros autores no han demostrado un aumento de la frecuencia de la mutación Asp105Gly SNP en pacientes adultos con neumonía adquirida en la comunidad, ni un aumento en pacientes con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) con bacteriemias por neumococo, ni entre pacientes transplantados renales con complicaciones infecciosas<sup>104,109,110</sup>.

Sin embargo no hay estudios que evalúen la implicación de los polimorfismos de la MBL2 y de la MASP2 en el pronóstico de pacientes críticos con SRIS.

### **3.2.4. Receptores linfocitarios CD5 y CD6 solubles en la Sepsis**

Como se ha comentado con anterioridad, el reconocimiento de los microbios por el sistema inmunitario es esencial para la defensa del huésped, ya que desencadena respuestas efectoras, tales como la fagocitosis y la inflamación para promover el aclaramiento del patógeno, su eliminación, la reparación del tejido lesionado y la inducción de la respuesta inmune adaptativa<sup>14</sup>. Para ello, entre otras cosas, es necesario el reconocimiento de los PAMP por los PRR, ya sean solubles y/o unidos a la

membrana de la superficie de las células inmunes innatas<sup>12</sup>. Entre los PRR se incluyen los receptores *Scavenger*, un número relativamente pequeño de receptores no polimórficos codificados de línea germinal que pertenecen a diferentes familias de proteínas funcionales y estructurales, siendo una de ellas la superfamilia de receptores *scavenger* ricos en cisteína (SRCR-SF)<sup>111</sup>. Esta superfamilia actualmente incluye más de 30 miembros que se encuentran en todos los animales. En los mamíferos, los miembros de la SRCR-SF se encuentran expresados en células mieloides (SR-AI, MARCO, CD163, Spα), linfoides (CD5, CD6), y en las células epiteliales (SCARA5, DMBT1, S5D-SRCRB), donde presentan múltiples capacidades funcionales incluyendo el reconocimiento de las PAMP de origen bacteriano, fúngico, viral y/o parasitario<sup>112,113</sup>. Estas proteínas pueden estar expresadas en la superficie celular o como moléculas solubles. Los receptores de CD5 y CD6 son los únicos 2 miembros de la SRCR-SF que se expresan en los linfocitos T convencionales y en los linfocitos B1a<sup>114,115</sup>.

El CD6 es una glicoproteína transmembrana de 105-130 kDa expresada principalmente en los linfocitos (células T, B1a), células NK, precursores hematopoyéticos y ciertas regiones cerebrales<sup>113,116</sup>. El CD6 ha estado implicado clásicamente en la adhesión celular relevante para la activación y diferenciación de los linfocitos, mediante la interacción con la molécula de adhesión celular activada de leucocitos CD166/ALCAM<sup>117</sup>. El CD6 se une con el receptor de células T (TCR) y el complejo CD3 y, junto a ellos, se localiza en el centro de la sinapsis inmunológica, donde su interacción con CD166/ALCAM resulta crítica para la maduración y la estabilización de esta estructura de señalización<sup>118</sup>. Como se ha descrito para otros receptores de los linfocitos, se han hallado formas solubles de CD6 (sCD6) en el suero humano<sup>114,115,119,120</sup>. La función exacta del sCD6 es desconocida pero podría funcionar como un receptor de reclamo, evitando así la unión del CD6 de membrana a ligandos

endógenos como el CD166/ALCAM o a ligandos exógenos como los PAMPs. De hecho, el CD6 de membrana puede detectar y señalar la presencia de PAMPs bacterianos y el sCD6 recombinante (rsCD6) se une tanto a bacilos Gram negativos (*Escherichia coli*) como bacilos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*), un hecho que concurre a través del LPS y ALT, respectivamente<sup>118,121,122</sup>.

El CD5 es una glicoproteína transmembrana de 67 kDa que se encuentra en los timocitos, en los linfocitos T maduros, en los linfocitos B1a normales y en el subconjunto de células B de la leucemia linfocítica crónica B (LLC-B)<sup>120,123</sup>. Los estudios funcionales implican al CD5 en la activación linfocitaria, el desarrollo de los linfocitos T, y en las interacciones de los linfocitos T con las células presentadoras de antígeno<sup>124</sup>. El CD5 se asocia físicamente con el antígeno específico del receptor de los linfocitos T (RCT) como de los linfocitos B (RCB), y tal como se ha descrito para el CD6, se han hallado formas solubles de CD5 (sCD5) en el suero humano<sup>125-127</sup>.

Recientemente se ha descrito que tanto el sCD5 como el sCD6 podrían tener un papel relevante en la fisiopatología de la sepsis<sup>114,115,128</sup>. La administración intraperitoneal de formas recombinantes de sCD5 y sCD6 (rsCD5 y rsCD6) se ha asociado con mejores tasas de supervivencia en modelos experimentales murinos de sepsis, tanto de origen fúngico en el caso de sCD5, como bacteriano en el caso de sCD6. Se ha demostrado que el rsCD6 se une con una relativa alta afinidad a los componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas como el LPS o de bacterias Gram positivas como el ALT, mientras que el rsCD5 lo hace a componentes de la pared celular de hongos saprófitos o patógenos, como los β-glucanos lineales. Esta unión induce la agregación bacteriana o fúngica respectivamente, facilitando la fagocitosis y su aclaramiento de la circulación por las células fagocíticas y reduciendo los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias inducidas por el patógeno o por los componentes aislados de la pared celular del patógeno<sup>114,115,128</sup>.

Sin embargo, a pesar de estos resultados en modelos animales, actualmente no hay estudios en humanos que evalúen el papel del sCD5 y sCD6 en los síndromes sépticos.

### **3.3. Sistema hemostático en la Sepsis**

#### **3.3.1. Generalidades**

Un aspecto importante de la sepsis y su evolución a fracaso multiorgánico es la alteración en el equilibrio entre el balance procoagulante y anticoagulante, básicamente con un incremento en los factores procoagulantes y una disminución de los factores anticoagulantes<sup>14</sup>.

En condiciones normales las células endoteliales inhiben la coagulación y evitan la agregación plaquetaria, así como la adhesión y la migración de las células sanguíneas, y regulan el tono y la permeabilidad vascular. Los lipopolisacáridos bacterianos y la liberación de citoquinas y de otros mediadores inflamatorios inducidos en la sepsis estimulan a las células endoteliales que activan la vía del factor tisular, activando la cascada de la coagulación y generando un estado procoagulante, que provoca la formación de trombos en la microvasculatura agravando y, amplificando la lesión<sup>129,129,130</sup>.

Entre los diferentes agentes involucrados de alguna manera en la activación y desarrollo del sistema hemostático encontramos las ya mencionadas moléculas de adhesión, asociadas a la activación endotelial, la MBL, y el ADAMTS-13.

### **3.3.2. ADAMTS-13 (*A Disintegrin And Metalloprotease with a ThromboSpondin Type 1 motif, member 13*) en la sepsis**

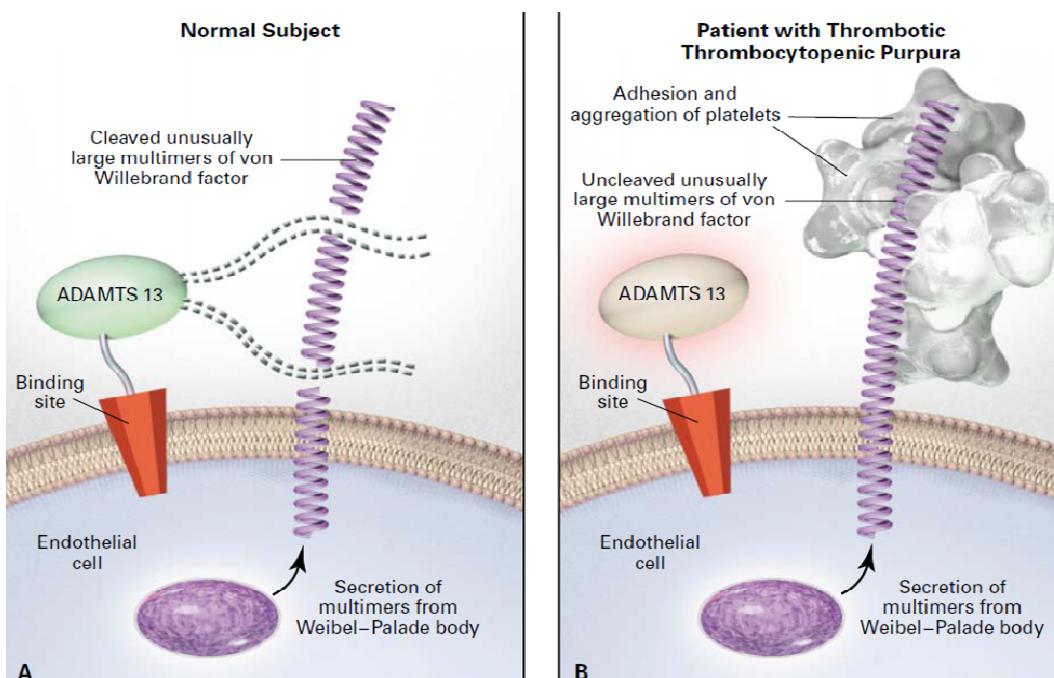
El factor de von Willebrand (vWF) es una glicoproteína multimérica que, entre otras funciones, realiza dos acciones críticas en la coagulación. Actúa como una molécula puente en el lugar de la lesión vascular para facilitar la adhesión plaquetaria normal; y, bajo condiciones de alto cizallamiento, promueve la agregación plaquetaria<sup>131</sup>. El vWF es sintetizado por las células endoteliales y por los megacariocitos como una proteína de 2.813 aminoácidos, que posteriormente se somete a una considerable transformación, incluyendo dimerización y multimerización en formas inusualmente grandes. Los multímeros más pequeños de vWF, que representan la mayoría de la proteína sintetizada, son secretadas desde las células endoteliales y los megacariocitos<sup>132</sup>, mientras que el restante vWF, que incluye los multímeros inusualmente grandes de vWF (UL-vWF), son dirigidos a los gránulos de almacenamiento citoplasmáticos (cuerpos de Weibel-Palade) de las células endoteliales y en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas<sup>133,134</sup>. Estos gránulos de almacenamiento citoplasmáticos también contienen otras proteínas como moléculas de adhesión celular (P-selectina), activador tisular del plasminógeno, CD63 y angiopoyetina. Durante la sepsis, el vWF es segregado desde las células endoteliales estimuladas como UL-vWF<sup>135</sup>.

El ADAMTS-13 es una metaloproteasa que escinde los UL-vWF, generando las formas más pequeñas de vWF que se encuentran en la circulación sanguínea (**Figura 5**)<sup>136-138</sup>. La disminución de los niveles de ADAMTS-13 resulta en la persistencia en la circulación de UL-vWF responsables de la formación de trombos plaquetarios en la microvasculatura con la consecuente isquemia microvascular y fallo orgánico en la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT)<sup>137,138</sup>. Aunque deficiencias graves de ADAMTS-13 parecen ser un hallazgo específico en la PTT<sup>139,140</sup>, déficits leves o

moderados de su actividad han sido descritos en diferentes situaciones clínicas como en la coagulación intravascular diseminada<sup>141</sup>, en alteraciones trombocitopénicas diferentes de la PTT<sup>139</sup>, en el ictus isquémico<sup>142</sup>, pacientes con enfermedad coronaria<sup>143</sup>, trombosis arteriales<sup>144</sup>, cirrosis hepática, embarazo, tras cirugía y en algunos sujetos sanos<sup>145</sup>.

### Figura5. Función del ADAMTS-13

En sujetos con niveles normales de ADAMTS-13, éste se une a su receptor en la superficie celular de las células endoteliales y escinde los multímeros inusualmente grandes del factor de von Willebrand (UL-vWF) que son secretados por las células endoteliales estimuladas (**Panel A**). Las formas más pequeñas del vWF que circulan después de la escisión no inducen la adhesión y agregación plaquetaria durante el flujo normal de la sangre. En sujetos con actividad ausente o gravemente reducida de ADAMTS-13 se impide la escisión de los UL-vWF, que inducen la adhesión y agregación de las plaquetas en la sangre (**Panel B**).



Fuente: Moake JL. N Engl J Med 2002<sup>139</sup>

En modelos murinos de sepsis, Lerolle y cols.<sup>131</sup> observaron que la actividad de ADAMTS-13 disminuye, aunque sin hallar relación entre su actividad y la mortalidad. Hyseni y cols.<sup>146</sup> observaron en 275 pacientes con SRIS (111 [40,4%] por sepsis) que aunque los niveles de ADAMTS-13 al ingreso eran iguales entre los que fallecían y los

supervivientes, los pacientes con niveles más bajos al tercer día tenían una mortalidad 4 veces mayor. Martin y cols.<sup>147</sup> también describieron que los pacientes que presentaban fracaso orgánico secundario a sepsis tenían una actividad y unos niveles de ADAMTS-13 inferiores a los pacientes con fracaso orgánico secundario a SRIS no infeccioso y a los controles sanos. Adicionalmente, en los pacientes sépticos el ADAMTS-13 se correlacionó negativamente con la puntuación del APACHE-II. Fukushima y cols.<sup>148</sup> constataron que niveles disminuidos de ADAMTS-13 durante la primera semana de ingreso en la UCI (días 1, 5 y 7) se correlacionaron con la puntuación de APACHE-II y SOFA máximo y con el pronóstico. Otros estudios han encontrado niveles disminuidos de ADAMTS-13 en sepsis, siendo más pronunciados en la sepsis grave y el shock séptico y en pacientes con SDOM, tanto en adultos como en poblaciones pediátricas<sup>27,130,149,150</sup>, aunque no hallaron correlación entre el ADAMTS-13 y la mortalidad.

Sin embargo, a pesar de estos estudios, el patrón de los niveles de ADAMTS-13 en los síndromes sépticos (sepsis, sepsis grave y shock séptico) y sus diferencias con otras causas de SRIS de origen no infeccioso en pacientes críticos no ha sido todavía evaluado.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **Artículo 1**

### ***Mononuclear cells adhesion dysfunction in patients with severe sepsis or septic shock due to community acquired pneumonia***

**“Alteración en la adhesión de células mononucleares en pacientes con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad”**

**Aibar J, Castro P, Perelló R, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Butjosa M, Sacanella E, Nicolás JM.**

Submitted in: *J Crit Care*

## **HIPÓTESIS**

La expresión y función de las moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales y sus niveles séricos están alteradas en pacientes con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad, y se asocian con la gravedad y el pronóstico.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la expresión y función de las moléculas de adhesión en células mononucleares de sangre periférica y los niveles séricos de moléculas solubles de adhesión endotelial en pacientes con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad, y determinar su asociación con la gravedad y el pronóstico de la enfermedad.



## **Artículo 2**

*Genotypes Coding for Low Serum Levels of Mannose-Binding Lectin Are Underrepresented among Individuals Suffering from Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome*

**“Los genotipos que codifican niveles séricos bajos de Lectina fijadora de Manosa (MBL) están infrarrepresentados en pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica no Infecciosa”**

Smithson A, Perelló R, **Aibar J**, Espinosa G, Tàssies D, Freire C, Castro P, Suárez B, Lozano F, Nicolás JM. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(3):447-53

## **HIPÓTESIS**

Los polimorfismos genéticos en el gen de la MBL2 y de la MASP2 influyen en la presentación de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, la evolución de sepsis a sepsis grave / shock séptico y el pronóstico de pacientes críticamente enfermos.

## **OBJETIVOS**

Evaluar las implicaciones de los polimorfismos de la MBL2 y de la MASP2 en paciente críticos con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica de origen infeccioso o no y su relación con la gravedad y el pronóstico de la enfermedad.



### **Artículo 3**

***Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with Septic Syndromes***

**“Patrón de las formas solubles de los receptores linfocitarios CD5 y CD6 en pacientes críticos con síndromes sépticos.”**

**Aibar J, Martínez-Florensa M, Castro P, Carrasco E, Escoda-Ferran C, Fernández S, Butjosa M, Hernández C, Rinaudo M, Lozano F, Nicolás JM.** *J Crit Care* 2015; 30:914-19

### **HIPÓTESIS**

Los niveles de las formas solubles de CD5 y CD6 se alteran en los diferentes síndromes sépticos y se asocian con el desarrollo de fracaso multiorgánico y el pronóstico de estos pacientes.

### **OBJETIVOS**

Evaluar los niveles de CD5 y CD6 solubles en pacientes críticos con síndromes sépticos o con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica no infeccioso y su relación con la gravedad de la enfermedad y la mortalidad.



## **Artículo 4**

*ADAMTS-13 in critically ill patients with Septic Syndromes and Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome*

**“ADAMTS-13 en pacientes críticos con Síndromes sépticos y Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica de origen no Infeccioso.”**

Aibar J, Castro P, Espinosa G, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Butjosa M, Tàssies D, Reverter JC, Nicolás JM. *Shock* 2015; 43(6): 556-62

### **HIPÓTESIS**

Los niveles de ADAMTS-13 se alteran en los diferentes síndromes sépticos y se asocian con el desarrollo de fracaso multiorgánico y el pronóstico de estos pacientes.

### **OBJETIVOS**

Evaluar los niveles de ADAMTS-13 en pacientes críticos con SRIS de origen infeccioso o no infeccioso y determinar su asociación con la gravedad y el pronóstico de la enfermedad.



## **PUBLICACIONES ORIGINALES Y RESULTADOS**



Los estudios que integran esta Tesis Doctoral se han publicado en revistas científicas revisadas por pares, como se detalla a continuación:

**Artículo 1:** Aibar J, Castro P, Perelló P, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Bujotsa M, Sacanella E, Nicolás JM. Mononuclear cells adhesion dysfunction in patients with severe sepsis or septic shock due to community acquired pneumonia.

Submitted in: *J Crit Care*

**Artículo2:** Smithson A, Perello R, **Aibar J**, Espinosa G, Tàssies D, Freire C, Castro P, Suarez B, Lozano F, Nicolas JM. Genotypes Coding for Low Serum Levels of Mannose-Binding Lectin Are Underrepresented among Individuals Suffering from Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(3):447-53

**Artículo 3:** Aibar J, Martínez-Florensa M, Castro P, Carrasco E, Escoda-Ferran C, Fernández S, Butjosa M, Hernández C, Rinaudo M, Lozano F, Nicolás JM. Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with Septic Syndromes. *J CritCare* 2015; 30:914-19

**Artículo 4:** Aibar J, Castro P, Espinosa G, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Butjosa M, Tàssies D, Reverter JC, Nicolás JM. ADAMTS-13 in critically ill patients with Septic Syndromes and Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Shock* 2015; 43(6): 556-62

**Artículo 1:** Aibar J, Castro P, Perelló P, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Butjosa M, Sacanella E, Nicolás JM. Mononuclear cells adhesion dysfunction in patients with severe sepsis or septic shock due to community acquired pneumonia.

Submitted in: *J Crit Care*

# **MONONUCLEAR CELLS ADHESION DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH SEVERE SEPSIS OR SEPTIC SHOCK DUE TO COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA**

**Jesús Aibar<sup>1</sup>, Pedro Castro<sup>1</sup>, Rafael Perelló<sup>2</sup>, Sara Fernández<sup>1</sup>, Cristina Hernández<sup>1</sup>, Mariano Rinaudo<sup>1</sup>, Montserrat Butjosa<sup>1</sup>, Emilio Sacanella<sup>3</sup>, Josep Maria Nicolás<sup>1</sup>.**

*Medical Intensive Care Unit<sup>1</sup>, Emergency Department<sup>2</sup>, Internal Medicine Department<sup>3</sup>, Hospital Clínic, IDIBAPS – University of Barcelona, Spain.*

**ABSTRACT- Purpose:** Community-acquired pneumonia (CAP) is a prevalent cause of sepsis. Although adhesion function of mononuclear cells has been associated with severity and mortality in sepsis, there is no data in septic syndromes specifically secondary to CAP. The aim of this study was to assess mononuclear cells adhesion in patients with severe sepsis or septic shock secondary to CAP. **Methods:** The study population consisted of 36 patients consecutively admitted to the medical ICU presenting CAP with severe sepsis or septic shock at admission or within the first 48 hours. Serum levels of soluble endothelial adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) and expression and function of adhesion molecules in peripheral blood mononuclear cells (VLA-4, LFA-1, Mac-1 and Sialyl Lewis X). **Results:** Septic patients showed increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Selectin and decreased levels of sP-Selectin, and patients with septic shock had higher levels of sVCAM-1 and sICAM-1. Expression of Sialyl Lewis X was higher in septic patients and in those with septic shock compared with severe sepsis. Septic patients also presented a decreased expression of LFA-1 and CD14/MCP-1, and septic shock patients had decreased expression of VLA-4, as well as decreased cellular adhesion in the monocyte/lymphocyte endothelium assay. Compared with survivors, non-survivors had lower expression of LFA-1 and VLA-4, and had lower levels of sE-selectin. **Conclusions:** Expression and function of adhesion molecules is altered in patients with sepsis secondary to CAP, especially in those with septic shock. This dysfunction seems to be associated with their prognosis.

**KEYWORDS-** Community-acquired pneumonia; sepsis; severe sepsis; septic shock; Systemic Inflammatory Response Syndrome; Soluble endothelial adhesion molecules; Mononuclear cells adhesion.

## **INTRODUCTION**

Community-acquired pneumonia (CAP) is a prevalent and increasing cause of intensive care unit (ICU) admission with a high overall mortality (1). Nearly 48% of CAP patients can develop severe sepsis and nearly 4.5% septic shock during their hospitalization (2).

There is evidence that the endothelium plays a central pathogenic role in sepsis (3-5). Activation of endothelial cells after exposure to lipopolysaccharide (LPS), cytokines, growth factors, or chemokines results in increased rolling, strong adherence and transmigration of leukocytes into underlying tissue. All of these functions and therefore adhesion molecules are cornerstone the development of an appropriate immune-inflammatory response against infectious

agents and in the pathogenesis of acute and chronic systemic inflammatory diseases as sepsis and multiorgan failure (6,7) . Adhesion molecules are present on circulating mononuclear cells and the endothelium. Three families of adhesion molecules are especially relevant in the leukocyte-endothelium interaction (8,9): selectins, integrins and immunoglobulin superfamily molecules. Among selectins, P-selectin is mainly involved in early leukocyte recruitment during the inflammatory response, whereas E-selectin facilitates rolling of leukocytes along the endothelial layer as a prelude to leukocyte adhesion (10). Selectin ligands such as Sialyl Lewis X are expressed on most leukocytes and can interact with selectins under inflammatory situations (11). Integrins are

responsible for adhesion of leukocytes to endothelial cells. VLA-4 (very late antigen-4) is an integrin expressed on eosinophils, lymphocytes and monocytes that binds the endothelial vascular cells adhesion molecule-1 (VCAM-1) and is important for the accumulation of these cell types at sites of infection (12). Lymphocyte function associated antigen (LFA)-1, Mac-1 and gp 150/95 are other integrins responsible of leukocyte adhesion and transmigration through endothelial cells (13). Regarding immunoglobulin superfamily molecules, they include VCAM-1 and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which are molecules expressed on endothelial cells that interact with integrins on leukocytes and are involved in firm adhesion and transmigration (14). Finally, the recruitment of leukocytes is governed by cell-specific chemoattractants, called chemokines (15). The monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a chemokine that regulates the migration and infiltration of monocytes, memory T lymphocytes, and natural killer (NK) cells, and seems to influence T-cell immunity (16).

The expression of adhesion molecules has been associated with sepsis severity, organ dysfunction and mortality in sepsis (4,5,9,17-25), but there is scarce data in the medical literature in patients with septic syndromes secondary to a specific cause of the sepsis as CAP. Moreover, adhesion function of mononuclear cells in these patients has not been assessed.

The aim of this study is to determinate the adhesion function of mononuclear cells in patients with severe sepsis or septic shock secondary to CAP admitted to ICU. We assessed expression and function of adhesion molecules (VLA-4, LFA-1, Mac-1 and Sialyl Lewis X) in peripheral blood mononuclear cells, and serum levels of soluble endothelial adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1), and evaluated their association with outcomes in these patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

All patients consecutively admitted during a 1 year period to the medical ICU of the Hospital Clinic of Barcelona diagnosed with CAP and that met the criteria for severe sepsis or septic shock were included. Patients with human immunodeficiency virus infection, hematologic malignancy, brain death diagnosis and those who presented an irreversible short term fatal disease or in whom futile care was decided were excluded. The patients were followed until hospital discharge. Patients included in the study were compared with 36 healthy controls.

Epidemiological data, severity indexes scores including APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), SAPS II (Simplified Acute Physiologic) and SOFA (Sequential-Organ Failure Assessment) were calculated at ICU admission, and thereafter on a daily basis. Multiorgan failure was considered in case of acute progressive dysfunction of two or more organ systems, with a minimum failure score of 3 points for each organ. Severe sepsis and septic shock were defined according to SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS consensus conference (26). CAP was defined according to the criteria of the IDSA (27).

Informed consent was obtained from the patients or their relatives within 24 hours after admission and none refused to participate. Blood samples and the information used in the study were coded and patient confidentiality was preserved. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Hospital.

Collection of venous blood samples was performed during the first 48 h of admission and between the 4th-8th day.

### Soluble endothelial adhesion molecules

Serum and EDTA-plasma samples were stored at -80°C for analysis of inflammatory and cell adhesion molecules at the end of the study. Analyses determined by subject in the frozen samples of whole serum or plasma as appropriate were interleukin (IL)-6, sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, and sP-selectin. They were performed by standard commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay (Bender MedSystems, Vienna, Austria) and in duplicate.

## **Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) immunophenotyping**

PBMC were obtained from whole blood by the Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) method (28). To measure PBMC expression of cell adhesion molecules (CAMs), a double direct immunofluorescence test was performed with commercial fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. Data analyses were performed with a FACScan Clinical Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) with the use of CELLQUEST software (version 7.5.3; Becton Dickinson, Aoust, Belgium). The following CAMs were measured: VLA-4 (anti-CD49d; (Clone 44H6; Cytogmos, Barcelona, Spain)), LFA-1 (anti-CD11a; (Clone R7.1; Bender MedSystems)),  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1) (anti-CD11b; (Clone LM2/1; Bender MedSystems)), and Sialyl Lewis X (anti-CD15s; (Clone CSLEX1; BD Biosciences, San Jose, CA)).

We also measured the expression of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 (Pharmingen, San Diego, CA,) and CD40 on the cell surface. Monocytes and T lymphocytes were identified with the use of anti-CD14 and anti-CD2 monoclonal antibodies (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), respectively.

### **Monocyte/Lymphocyte-endothelium adhesion assay**

After obtaining a suspension of PBMC, we collected the PBMC by using sterile glass pipettes without disturbing the other cell bands. Later, we added 20  $\mu$ L of magnetic bead labeled-antiCD14 $^{+}$  antibody to the tube containing the PBMC fraction for positive selection of monocytes. We incubated each cell suspension for 15 min at 4 °C. Each cell suspension and pellet was washed with 1 ml RPMI-BSA media as before and resuspended each pellet in 500  $\mu$ L RPMI-BSA. The labeled cells were separated in the magnetic field of the magnetic activated cell sorting (MACS) separator, measured by a commercially available method (MACS, Miltenyi Biotec Inc, Auburn CA, USA) to obtain the isolation of an enriched monocyte population (>95% CD14 $^{+}$  cells, as assessed by flow cytometry). After isolation of the monocytes, the cell pellet was resuspended in 80  $\mu$ L RPMI-BSA. Later, we added 20  $\mu$ L of CD61 $^{+}$  and CD235a $^{+}$  antibodies (for negative selection of lymphocytes) and incubate cell suspension for 15 min at 4 °C. Finally, we repeated the MACS separation as

before and collected the flow containing the enriched lymphocyte population.

Cell viability was determined by the Trypan blue dye exclusion test (Sigma-Aldrich, Irvine, CA). The endothelial cell line used was Ea.hy926, which is a fusion product between the human umbilical vein endothelial cell line and the epithelial cell line A549, and was processed as previously reported (28). Endothelial Ea.hy926 cell monolayers were grown to confluence in 96-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). The endothelium adhesion assay was performed under nonstimulated and stimulated conditions [with human recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 10ng/mL or with lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L]. We added  $1.5 \times 10^5$  human monocytes or lymphocytes/well (30 min at 37 °C) to allow the adhesion. After that, nonadherent cells were removed by aspiration, and the wells were washed. Adherent cells were fixed and stained with 0.2% crystal violet in 20% methanol in phosphate-buffered saline for 20 min and were washed repeatedly with distilled water. After solubilization with 1% sodium dodecyl sulfate, adhesion was measured in units of absorbance with a spectrophotometer at a wavelength of 600 nm (Multiskan RC ThermoLabsystems, Helsinki, Finland). The adhesion assay, for each subject and condition, was performed in quadruplicate.

### **Statistical analysis**

Descriptive statistics with means and SD were used for the baseline characteristics of the patients. Values with a skewed distribution were trasformed to their ln for analyses. Within-and between-group differences are expressed as means and 95% Confidence Interval (CI). All statistical tests were 2-tailed, and the significance level was 0.05. Analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## **RESULTS**

### **Baseline patient characteristics and white cell count**

During the study period 36 patients were included, 20 patients with severe sepsis and 16 with septic shock. All the subjects were of Caucasian descent, living in or around Catalonia (Spain). Their main

**Tabla 1** Epidemiological and clinical data of the patients in the study

<b>ICU admission</b>	<b>Healthy Controls (n = 36)</b>	<b>Severe sepsis (n = 20)</b>	<b>Septic shock (n = 16)</b>
Age (years)	63 ± 15	61 ± 15	64 ± 16
Sex (n, men/women)	23 / 13	12 / 8	10 / 6
Onset of symptoms to ICU entry (days)	NA	3.4 ± 3.4	4.8 ± 3.2
APACHE II score	NA	16.7 ± 6.5	18.9 ± 6.1
SAPS-II score	NA	40.2 ± 12.8	44.3 ± 12.0
SOFA score	NA	9.1 ± 3.6	10.5 ± 2.9
Prior antibiotics (n, %)	NA	3 (15)	3 (18)
Prior corticosteroids (n, %)	NA	3 (15)	2 (12)
Chronic respiratory disease (n, %)	NA	3 (15)	3 (18)
Invasive mechanical ventilation, n (%)	NA	15 (75)	14 (87)
Length of ICU stay (days)	NA	12.3 ± 12.7	11.5 ± 10.4
Δ SOFA score	NA	1.1 ± 1.9	1.6 ± 2.3
ICU mortality, n (%)	NA	0 (0)	6 (37) *

Quantitative data is expressed as mean ± standard deviation. APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), SAPS-II (Simplified Acute Physiologic) score, SOFA (Sequential-Organ Failure Assessment). Δ : Delta (Delta SOFA Calculation: Maximum score minus score at admission). NA: not applicable.\* P = 0.004 compared to severe sepsis.

epidemiological and clinical data are shown in **Table 1**. When compared, there were no significant differences regarding age, sex, APACHE-II score, SOFA score and SAPS-II score among patients with severe sepsis and septic shock. However ICU mortality was higher among septic shock patients (6 patients (37%) vs. 0 patients in the severe sepsis group). Patients with severe sepsis and septic shock presented increased neutrophil and monocyte (CD14<sup>+</sup> cells) cell count (proportion among PBMC) compared to healthy controls ( $p < 0.05$ ) and decreased total lymphocytes, T lymphocytes (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) and B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) cell count (**Table 2**).

### Soluble endothelial adhesion molecules and cytokines

Septic patients showed increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Selectin and lower levels of sP-Selectin compared with healthy controls (**Figure 1**).

When we compared severe sepsis and septic shock patients, patients with septic shock had

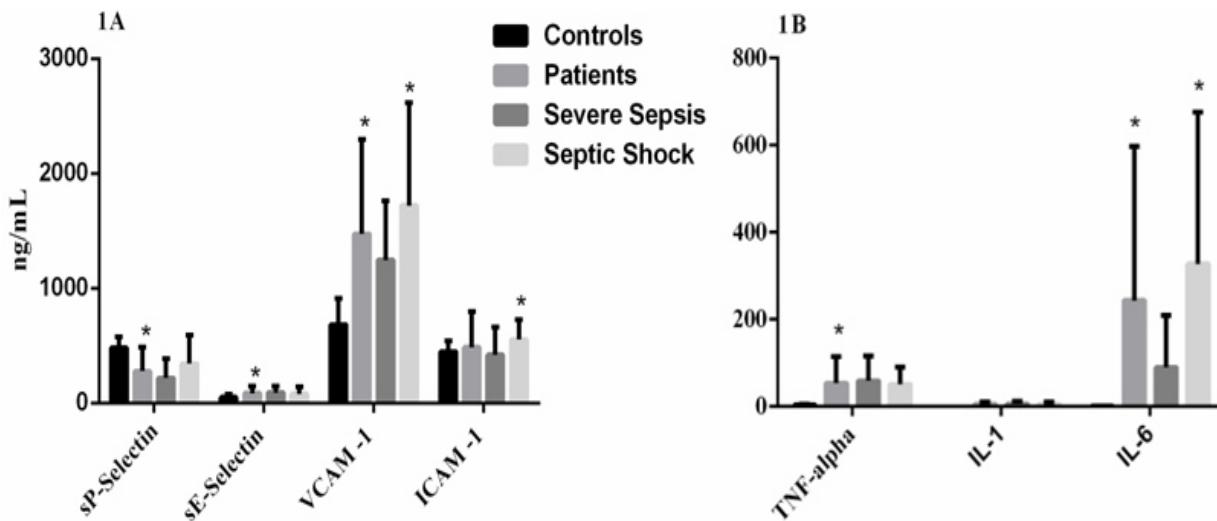
higher levels of VCAM-1 and ICAM-1 (**Figure 1**).

### Adhesion molecules expression in PBMC

**Table 2** shows adhesion molecules expression in PBMC at ICU admission. Patients with severe sepsis or septic shock presented an increased expression of Sialyl Lewis X and a decreased expression of LFA-1 both in lymphocytes and in monocytes compared to healthy controls ( $p < 0.05$ ). Moreover, MCP-1 expression in monocytes was also lower in septic patients than in healthy controls ( $p < 0.05$ ).

When comparing patients with severe sepsis or septic shock (**Table 2**) we observed that patients with septic shock had lower T cell count (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) compared to patients with severe sepsis ( $p < 0.05$ ), without differences among B lymphocyte and monocyte counts. Regarding the expression of adhesion molecules, septic shock patients showed increased expression of Sialyl

**Figure 1. Soluble endothelial adhesion molecules (1A) and cytokines (1B) in patients with community acquired pneumonia and severe sepsis / septic shock (and controls)**



VCAM-1: Soluble vascular cell adhesion molecule-1, ICAM-1: Soluble intercellular adhesion molecule-1, TNF: Tumor necrosis factor, IL: Interleukin. All values are mean  $\pm$  standard deviation (SD). \*  $P < 0.05$  compared to left-side column (two-tailed unpaired Student's  $t$  test)

Lewis X and lower expression of VLA-4 in monocytes compared to patients with severe sepsis.

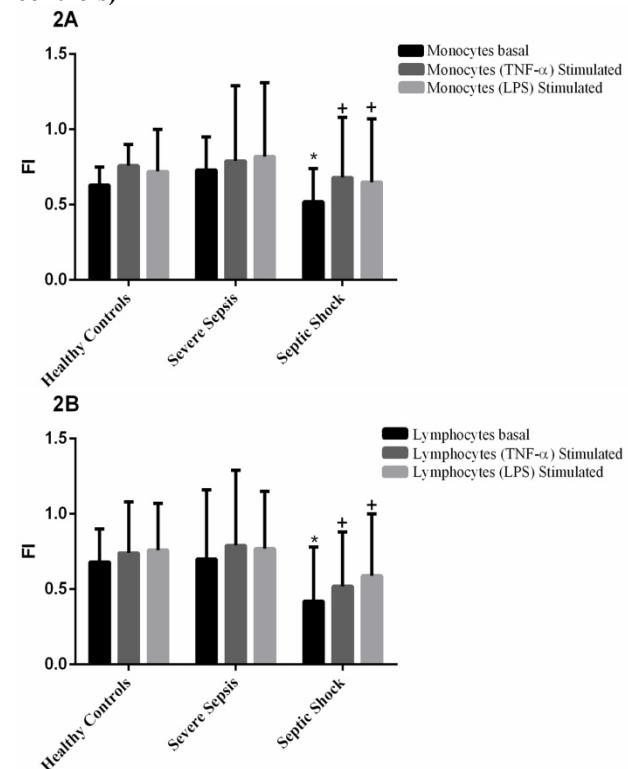
#### Adhesion function of mononuclear cells

At ICU admission, cellular adhesion of monocytes and lymphocytes in patients with septic shock was significantly lower than in patients with severe sepsis and healthy controls. After stimulation with TNF- $\alpha$  and LPS, cellular adhesion increased more in patients with septic shock than in those with severe sepsis and healthy controls ( $p < 0.05$ ), although their absolute values did not reach those of the other groups. **Figure 2** summarizes our findings on cellular adhesion.

#### Association of adhesion molecules levels and their evolution with prognosis

Lastly, we analyzed the association between adhesion molecules and prognosis among those patients with septic shock. Patients who died in the ICU ( $n = 6$ ) showed lower levels of CD8 $^{+}$  T cells, monocytes, and a reduced expression in lymphocytes of LFA-1 (CD2 $^{+}$ /LFA-1) and in monocytes of VLA-4 (CD4 $^{+}$ /VLA-4) at admission, as well as a further decrease afterwards compared with survivors ( $p < 0.05$ ) (**Table 3**). Finally, patients who died in the ICU had lower levels of sE-Selectin at admission (**Table 3**).

**Figure 2 Adhesion function in monocytes (2A) and lymphocytes (2B) of patients with CAP and severe sepsis or septic shock at ICU admission (and controls)**



All values are mean fluorescence intensity  $\pm$  standard deviation. FI: Fluorescence intensity, \*  $P < 0.05$  compared to controls and severe sepsis (two-tailed unpaired Student's  $t$  test), +  $P < 0.05$  compared with the percentage of increase in adhesion of monocyte (2A) or lymphocyte (2B) with controls and severe sepsis (two-tailed unpaired Student's  $t$  test).

**Table 2. Adhesion molecules expression in peripheral blood mononuclear cells at ICU admission in patients with community or septic shock (and controls)**

	Controls (n = 36)		Patients (n = 36)		Severe sepsis (n = 20)	
	% of cells	MFI	% of cells	MFI	% of cells	MFI
<b>CD3</b>	71 ± 7	269 ± 65	38 ± 18 *	144 ± 70 *	39 ± 19	148 ± 45
<b>CD2</b>	80 ± 4	431 ± 111	33 ± 24 *	270 ± 108 *	41 ± 23	266 ± 96
<b>CD2/LFA-1</b>	99 ± 1	139 ± 25	99 ± 25	86 ± 25 *	99 ± 24	82 ± 38
<b>CD2/Mac-1</b>	69 ± 18	24 ± 4	71 ± 19	28 ± 18	70 ± 16	34 ± 33
<b>CD2/VLA-4</b>	75 ± 18	28 ± 5	83 ± 21	33 ± 21	82 ± 19	46 ± 45
<b>CD2/Syalil-Lewis</b>	2 ± 2	16 ± 4	6 ± 5 #	34 ± 11#	18 ± 6	29 ± 15
<b>CD2/CD4</b>	44 ± 6	95 ± 42	19 ± 16 *	60 ± 33 *	25 ± 13	66 ± 34
<b>CD2/CD8</b>	31 ± 5	135 ± 59	11 ± 8 *	60 ± 37 *	15 ± 9	67 ± 39
<b>CD19</b>	13 ± 4	47 ± 25	4 ± 5 *	26 ± 17 *	4 ± 6	34 ± 31
<b>CD14</b>	10 ± 5	549 ± 139	44 ± 26 #	440 ± 241 *	42 ± 31	418 ± 247
<b>CD14/LFA-1</b>	95 ± 5	132 ± 17	99 ± 28	61 ± 30 *	99 ± 29	63 ± 20
<b>CD14/Mac-1</b>	97 ± 3	56 ± 12	84 ± 28	51 ± 23	87 ± 30	46 ± 15
<b>CD14/VLA-4</b>	70 ± 22	38 ± 6	69 ± 19	33 ± 15	66 ± 16	37 ± 17
<b>CD14/MCP-1</b>	17 ± 7	154 ± 84	5 ± 2 *	111 ± 76 *	5 ± 2*	106 ± 104
<b>CD14/Syalil-Lewis</b>	52 ± 22	65 ± 27	90 ± 20#	188 ± 170 #	99 ± 15	118 ± 74

All values are mean ± SD. MFI: fluorescence intensity. CD2 and CD3 correspond to T lymphocytes. CD19 indicates B lymphocytes. CD14 is a function-associated antigen 1; VLA-4: Very late activation antigen 4; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein. \* P < 0.05 decrease compared to controls (two-tailed unpaired Student's *t* test). \*\* P < 0.05 compared to severe sepsis.

**Table 3. Levels and evolution of adhesion molecules (soluble and in peripheral blood mononuclear cells) of patients with shock according to their survival**

	Non-survivors (n = 6)		Survivors (n = 10)	
	ICU entry	+ 4-8 days <sup>b</sup>	ICU entry	+ 4-8 days <sup>b</sup>
<b>CD3<sup>a</sup></b>	105 ± 56	64 ± 12 *	130 ± 40 #	159 ± 70
<b>CD2/LFA-1<sup>a</sup></b>	79 ± 9	57 ± 32 *	90 ± 12 #	123 ± 30
<b>CD2/CD4<sup>a</sup></b>	59 ± 18	33 ± 6 *	62 ± 34	77 ± 20
<b>CD2/CD8<sup>a</sup></b>	48 ± 9	25 ± 7 *	67 ± 40 #	78 ± 20
<b>CD14<sup>a</sup></b>	202 ± 129	185 ± 122	445 ± 234 #	520 ± 200
<b>CD14/VLA-4<sup>a</sup></b>	21 ± 4	23 ± 1	26 ± 4 #	43 ± 10
<b>CD14/Sialyl-Lewis<sup>a</sup></b>	283 ± 188	143 ± 31 *	147 ± 150	93 ± 40
<b>sE-Selectin (ng/mL)</b>	30 ± 4	33 ± 10	108 ± 75 #	43 ± 10
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1617 ± 1241	1627 ± 709	1769 ± 882	1560 ± 1000
<b>sICAM-1 (ng/mL)</b>	519 ± 415	309 ± 260	644 ± 385	344 ± 200

<sup>a</sup> All values are mean fluorescence intensity ± standard deviation. <sup>b</sup> Last value before death or ICU discharge. CD2 and CD3 correspond to associated antigen 1; CD4 identifies Helper T lymphocytes. CD14 identifies monocyte cells. VCAM-1: Soluble vascular cell adhesion molecule-1. # P < 0.05 compared to ICU entry of death patients. \* P < 0.05 compared to admission for each group (two-tailed paired Student's t test).

## DISCUSSION

In this study we have analyzed the expression and function of adhesion molecules in PBMC (VLA-4, LFA-1, Mac-1 and Sialyl Lewis X in lymphocytes and monocytes, and MCP-1 in monocytes) and the serum levels of soluble endothelial adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM-1) in a population of critically ill patients with severe sepsis and septic shock secondary to CAP. And we have found that there are changes in these patients that seem to be associated with their outcome.

We have shown, accordingly to previous reports that patients with severe sepsis and septic shock, in our study secondary to CAP, present an increase in neutrophils and monocytes and a decrease of total lymphocytes, T lymphocytes ( $CD4^+$  and  $CD8^+$ ) and B lymphocytes ( $CD19^+$ ) compared to healthy controls.

When we analyzed the expression of adhesion molecules in PBMC, we found that the expression of Sialyl Lewis X was higher in septic patients than controls and in those with septic shock than those with severe sepsis. Furthermore, among patients with septic shock who died during ICU admission there was a non-significant trend to have higher levels than in those who survived. Previous data in the literature support these findings (29). Brinkman-van der Linden et al (29) showed that patients with septic shock (of any origin) who died had higher levels of Sialyl Lewis X than patients who survived. These data suggest that Sialyl Lewis X could play a key role in the inflammatory response increasing the leukocyte response to infections. Ridings et al (30) showed in a porcine model of sepsis that treatment with a synthetic Sialyl Lewis X analog (CY-1503) decreased induced lung injury and neutrophil influx to the lungs, but did not prevent the development of pulmonary hypertension, systemic hypotension, decline in cardiac output, or severe neutropenia.

We have also found that the expression of MCP-1 in monocytes was lower in septic patients than in healthy controls. The main function of MCP-1 is to direct monocytes to the inflammatory focus

, being of major importance in inflammatory monocyte recruitment to the lungs in response to bacterial infection. In murine models of sepsis, endogenous MCP-1 has been shown to possess a beneficial effect by eliciting various leukocyte subpopulations needed to locally contain the initial insult and eliminate microbes (31). Then, presenting reduced levels, as we have found, could be harmful for controlling the infection. However, we cannot know if these reduced levels are consequence or cause of a worse septic process.

We have also demonstrated interesting changes in cellular integrins. We have found a lower expression of LFA-1 in PBMC of septic patients compared to healthy controls, as well as in septic shock non-survivors compared with survivors. Previous results are consistent with our data. Prince et al (32) described that mice deficient in LFA-1 that were challenged with i.p. *Streptococcus pneumoniae* had increased bacterial colony counts in spleen and liver and increased mortality compared with wild type mice. LFA-1 is essential for most adhesion-dependent lymphocyte functions and adhesion of lymphocytes to vascular endothelium (33), and lower levels would impair an optimal response. However, the role of this integrin in sepsis is not well defined.

Similarly, patients with septic shock and among them, those who did not survive, presented lower expression of VLA-4 in PBMC compared with severe septic patients and survivors, respectively. These data also support previous experimental findings in animal (mice) models, where Kadioglu et al (34) had shown a pivotal role of VLA-4 in *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating neutrophil and T cell recruitment into infected lungs and by influencing their behavior within the lung tissue itself. However no other human studies to date have studied these associations.

Regarding soluble endothelial adhesion molecules and cytokines, we have shown, as other previous studies in septic shock (4,5,9,17-25), that septic patients present increased levels at admission of TNF- $\alpha$ , IL-6, sVCAM-1, sICAM-1 and sE-Selectin and decreased levels

of sP-Selectine compared with healthy controls. However, previous studies included patients with sepsis from any source, with less than 30 cases of CAP when specified. Moreover, patients with septic shock had higher levels of sVCAM-1 and sICAM-1 compared with patients with severe sepsis. When it comes to prognosis, we found that patients with CAP and septic shock who died in the ICU presented lower levels of sE-Selectine than those who survive. sE-Selectin, sVCAM-1 and sICAM-1 have all been studied in relation to disease severity and outcome, with results that have been inconsistent and occasionally contradictory, probably due to differences in the studied population and the precise point in illness timeline the molecule is measured (10). In particular, sE-selectin is not an exception, with studies showing contradictory results (4,6,9,17-19,23).

Finally, we have assessed *ex vivo* the adhesion function of monocytes and lymphocytes in these patients before and after stimulation with TNF- $\alpha$  and LPS (7,35). It has been demonstrated in previous works that under normal physiological blood flow monocyte and lymphocyte adhesion appeared to be unaffected by LPS treatment. During septic shock, reduction in blood flow as a result of vasodilation and vascular permeability leads to adhesion and accumulation of LPS-stimulated circulating monocytes onto the blood vessel walls (35). Interestingly, we have found that patients with septic shock showed lower adhesion function than patients with severe sepsis and healthy controls. These function improved after stimulation, although without reaching those levels that presented healthy controls and severe sepsis patients. These data, together with decreased levels of VLA-4, LFA-1 and sE-selectin could support the hypothesis that our patients with septic shock who died were those in the “hypo-inflammatory” state of sepsis, with increased risk of nosocomial infections and other complications, compared with those with severe sepsis and healthy controls. Adhesion function of mononuclear cells depends, but not exclusively, on adhesion molecules (as VLA-4

and LFA-1), which are decreased in these patients as we have shown.

Our study has some limitations. First and more important, we have a relatively small sample size, which could prevent stronger conclusions. Other limitation is the control group. We decided to compare patients with CAP and severe sepsis or septic shock, and healthy volunteers. It would have been interesting to compare with patients with other causes of severe sepsis / septic shock, or even patients with CAP without severe sepsis / septic shock.

In conclusion, our study shows that patients with severe sepsis or septic shock secondary to CAP had changes in the levels and function of adhesion molecules and that these alterations seem to be associated with their outcome. Larger studies are required to confirm these results.

## REFERENCES

- (1) Woodhead M, Welch CA, Harrison DA, Bellingan G, Ayres JG: Community-acquired pneumonia on the intensive care unit: secondary analysis of 17,869 cases in the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit Care* 10 Suppl 2:S1,2006
- (2) Dremsizov T, Clermont G, Kellum JA, Kalassian KG, Fine MJ, Angus DC: Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? *Chest* 129:968-978,2006
- (3) Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765-3777,2003
- (4) Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC, Shapiro NI: Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock* 39:427-432,2013
- (5) Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, Trzeciak S, Ngo L, Aird WC: The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 14:R182,2010
- (6) Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plotz FB, Carman CV: Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the

- potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care* 18:204,2014
- (7) Doherty DE, Zagarella L, Henson PM, Worthen GS: Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell. *J Immunol* 143:3673-3679,1989
- (8) Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314,1994
- (9) Kayal S, Jais JP, Aguini N, Chaudiere J, Labrousse J: Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 157:776-784,1998
- (10) Page AV, Liles WC: Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* 4:507-516,2013
- (11) Alon R, Rosen S: Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites. *Nat Immunol* 8:339-341,2007
- (12) Kubes P, Niu XF, Smith CW, Kehrli ME, Jr., Reinhardt PH, Woodman RC: A novel beta 1-dependent adhesion pathway on neutrophils: a mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. *FASEB J* 9:1103-1111,1995
- (13) Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC: alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80:413-422,1995
- (14) Kelly M, Hwang JM, Kubes P: Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120:3-10,2007
- (15) Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL: Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol* 163:6148-6154,1999
- (16) Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313-326,2009
- (17) Boldt J, Muller M, Kuhn D, Linke LC, Hempelmann G: Circulating adhesion molecules in the critically ill: a comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Med* 22:122-128,1996
- (18) Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, Gopal TV, Wiener-Kronish J, Matthay MA: Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 150:644-654,1993
- (19) de PR, Monserrat J, Reyes E, Diaz D, Rodriguez-Zapata M, de la Hera A, Prieto A, Alvarez-Mon M: Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Eur J Intern Med* 24:132-138,2013
- (20) Hildebrand F, Pape HC, Harwood P, Muller K, Hoevel P, Putz C, Siemann A, Krettek C, van GM: Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis. *Exp Toxicol Pathol* 56:281-290,2005
- (21) Kung CT, Hsiao SY, Su CM, Tsai TC, Cheng HH, Tsai NW, Chang WN, Huang CR, Wang HC, Lin WC, et al: Serum adhesion molecules as predictors of bacteremia in adult severe sepsis patients at the emergency department. *Clin Chim Acta* 421:116-120,2013
- (22) Seidelin JB, Nielsen OH, Strom J: Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. *Intensive Care Med* 28:1613-1618,2002
- (23) Takala A, Jousela I, Jansson SE, Olkkola KT, Takkunen O, Orpana A, Karonen SL, Repo H: Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci (Lond)* 97:529-538,1999
- (24) Osaka D, Shibata Y, Kanouchi K, Nishiwaki M, Kimura T, Kishi H, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, et al: Soluble endothelial selectin in acute lung injury complicated by severe pneumonia. *Int J Med Sci* 8:302-308,2011
- (25) Llewelyn MJ, Berger M, Gregory M, Ramaiah R, Taylor AL, Curdt I, Lajaunias F, Graf R, Blincko SJ, Drage S, et al: Sepsis biomarkers in unselected patients on admission to intensive or high-dependency care. *Crit Care* 17:R60,2013
- (26) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31:1250-1256,2003
- (27) Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, et al: Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the

management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 44 Suppl 2:S27-S72,2007

(28) Sacanella E, Vazquez-Agell M, Mena MP, Antunez E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Lamuela-Raventos RM, Ros E, Estruch R: Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 86:1463-1469,2007

(29) Brinkman-van der Linden EC, van Ommen EC, van DW: Glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis(x) groups. *Glycoconj J* 13:27-31,1996

(30) Ridings PC, Holloway S, Bloomfield GL, Phillips ML, Fisher BJ, Blocher CR, Sugerman HJ, Fowler AA, III: Protective role of synthetic sialylated oligosaccharide in sepsis-induced acute lung injury. *J Appl Physiol (1985)* 82:644-651,1997

(31) Winter C, Herbold W, Maus R, Langer F, Briles DE, Paton JC, Welte T, Maus UA: Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 182:4931-4937,2009

(32) Prince JE, Brayton CF, Fossett MC, Durand JA, Kaplan SL, Smith CW, Ballantyne CM: The differential roles of LFA-1 and Mac-1 in host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 166:7362-7369,2001

(33) Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, McDonough JS, Tschoep J, Ferguson TA, McDunn JE, et al: IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* 184:3768-3779,2010

(34) Kadioglu A, De FK, Bangert M, Fernandes VE, Richards L, Jones K, Andrew PW, Hogg N: The integrins Mac-1 and alpha4beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 186:5907-5915,2011

(35) Bradfield PF, Johnson-Leger CA, Zimmerli C, Imhof BA: LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol* 20:247-257,2008

**Artículo 2:** Smithson A, Perelló R, **Aibar J**, Espinosa G, Tàssies D, Freire C, Castro P, Suarez B, Lozano F, Nicolás JM. Genotypes Coding for Low Serum Levels of Mannose-Binding Lectin Are Underrepresented among Individuals Suffering from Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(3):447-53.

## Genotypes Coding for Low Serum Levels of Mannose-Binding Lectin Are Underrepresented among Individuals Suffering from Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome<sup>▽</sup>

Alex Smithson,<sup>1\*</sup> Rafael Perello,<sup>2</sup> Jesus Aibar,<sup>3</sup> Gerard Espinosa,<sup>3</sup> Dolors Tassies,<sup>4</sup> Carolina Freire,<sup>4</sup> Pedro Castro,<sup>3</sup> Belen Suarez,<sup>5</sup> Francisco Lozano,<sup>5,6</sup> and Josep-Maria Nicolas<sup>3</sup>

*Emergency Department, Fundació Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma Gramenet, Spain<sup>1</sup>; Emergency Department,<sup>2</sup> Medical Intensive Care Unit,<sup>3</sup> Department of Hemotherapy and Hemostasis,<sup>4</sup> and Department of Immunology,<sup>5</sup> Hospital Clínic University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; and Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences,<sup>6</sup> Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain<sup>6</sup>*

Received 20 September 2009/Returned for modification 26 October 2009/Accepted 18 December 2009

**Gene polymorphisms, giving rise to low serum levels of mannose-binding lectin (MBL) or MBL-associated protease 2 (MASP2), have been associated with an increased risk of infections. The objective of this study was to assess the outcome of intensive care unit (ICU) patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) regarding the existence of functionally relevant *MBL2* and *MASP2* gene polymorphisms. The study included 243 ICU patients with SIRS admitted to our hospital, as well as 104 healthy control subjects. *MBL2* and *MASP2* single nucleotide polymorphisms were genotyped using a sequence-based typing technique. No differences were observed regarding the frequencies of low-MBL genotypes (O/O and XA/O) and *MASP2* polymorphisms between patients with SIRS and healthy controls. Interestingly, ICU patients with a noninfectious SIRS had a lower frequency for low-MBL genotypes and a higher frequency for high-MBL genotypes (A/A and A/XA) than either ICU patients with an infectious SIRS or healthy controls. The existence of low- or / high-MBL genotypes or a *MASP2* polymorphism had no impact on the mortality rates of the included patients. The presence of high-MBL-producing genotypes in patients with a noninfectious insult is a risk factor for SIRS and ICU admission.**

Sepsis is the main cause of death in intensive care units (ICU), with mortality rates above 50% in patients with septic shock (54). Increasing evidence suggests that variations in genes encoding different components of the immune system influence an individual's capacity to respond adequately to infections. Genetic polymorphisms of several molecules of the innate immune system, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (35), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) (2), and more recently plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) (12), have been associated with increased mortality in patients with severe sepsis and septic shock.

The mannose-binding lectin (MBL) is an important element of the innate immune defense system. The MBL is a circulating C-type plasma lectin, mainly produced by the liver, which binds to the specific carbohydrates present on the surface of different microorganisms (21, 38). In serum, MBL is present as oligomers (mainly trimers and tetramers) bound to the MBL-associated serine proteases (MASPs, which are also produced in the liver), mainly MASP2. Once bound to the carbohydrate residues, the MBL/MASP2 complex acts as an opsonin for phagocytosis for numerous pathogens and activates comple-

ment (21, 34, 38, 56). MBL is not only involved in complement activation but also is a potent modulator of proinflammatory cytokine production (27). Additionally, MBL is capable of increasing the clearance of endotoxin via Kupffer cells (40) and increasing the turnover of fibrinogen by cleavage of prothrombin, generating thrombin (29).

Three missense single nucleotide polymorphisms (SNP) have been reported within exon 1 of the *MBL2* gene, introducing amino acid replacements at codon 52 (allele D), 54 (allele B), or 57 (allele C), which cause a reduction of the MBL levels due to impaired assembly of MBL monomers into functional oligomers (14). In addition to these structural variant alleles, three SNP in the promoter region of the *MBL2* gene at positions -550 (H/L), +4 (P/Q) and, particularly, -221 (Y/X), influence the rate of transcription and are also associated with low concentrations of serum MBL (32, 47). Genetically defined MBL deficiency is common and appears to predispose to serious infections (9), particularly during early childhood (28), in patients undergoing chemotherapy (41) as well as in adults with concomitant diseases (15, 16). In the ICU setting, although several studies have suggested the existence of a relationship between low MBL serum levels and an increased risk of infections, the association with death has yielded conflicting results (17, 19, 24, 25, 50).

In addition to the *MBL2* polymorphisms, an inherited deficiency of MASP2 has also been reported. This deficiency is due to a homozygous mutation in exon 3 of the *MASP2* gene,

\* Corresponding author. Mailing address: Emergency Department, Fundació Hospital de l'Esperit Sant, c/Avinguda Mossen Pons i Rabadà s/n, 08923 Santa Coloma Gramenet, Spain. Phone: 34-93 386 02 02. Fax: 34-93 567 75 56. E-mail: asa30412@hotmail.com.

▽ Published ahead of print on 30 December 2009.

resulting in a change of aspartic acid to glycine at position 105 (Asp105Gly) of the CUB1 protein domain, which is an essential region for the formation of functional MBL/MASP2 complexes. This mutation renders MASP2 incapable of binding to MBL and therefore interrupts the MBL pathway of complement activation and also reduces the plasma concentration of MASP2 (48). Patients heterozygous for the *MASP2* Asp 105Gly SNP have no impairment in the lectin complement pathway (10, 11, 51). Several additional variants have been identified in exon 3 of the *MASP2* gene that do not cause a reduction of the levels or activity of the protein (31, 52).

The possible association between MASP2 deficiency and susceptibility to infections remains largely unknown. Schlapbach et al. recently demonstrated that MASP2 deficiency increases the risk of neutropenic fever in pediatric cancer patients (43). Granell et al. found an increased risk of invasive aspergillosis following allogeneic stem cell transplantation in adult patients heterozygous for the Asp105Gly SNP (20). On the other hand, three recent studies were unable to demonstrate an increased frequency for the Asp105Gly SNP in adult patients with community-acquired pneumonia, pneumococcal bacteremia in HIV-infected patients, and among renal transplant recipients with infectious complications (5, 10, 26).

The aim of the present study was to investigate the implications of *MBL2* and *MASP2* polymorphisms in the outcome of ICU patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS).

#### MATERIALS AND METHODS

**Study population.** We prospectively collected blood samples from 243 Caucasian patients admitted to the medical ICU of the Hospital Clinic of Barcelona between January 2003 and January 2004. Inclusion criteria for patients were age of >18 with a minimum ICU stay of 24 h and meeting the criteria for SIRS (see below). The patients were included and followed until hospital discharge. For further comparison, 104 healthy Caucasian blood donors from the geographic area of Barcelona were also included in the study. The present study was conducted with the approval of the hospital Ethics Committee and informed consent from the patients or their relatives within 24 h after admission.

Definitions for community- or nosocomial-acquired infection in ICU patients were established according to the Sepsis Forum Consensus Conference and the CDC guidelines (4, 13). The criteria for SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock were defined according to the SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS consensus conference (30). Clinical data, including demographic details and the severity indexes (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II [APACHE II], Simplified Acute Physiology Score II [SAPS II], and Sequential Organ Failure Assessment [SOFA]) were recorded for each patient at ICU admission and thereafter on a daily basis. Multiorgan failure was considered in cases of acute progressive dysfunction of two or more organ systems, with a minimum failure score of 3 points for each organ.

**MBL2 and MASP2 genotyping.** Genomic DNA was extracted from 1.5 ml of EDTA-treated whole blood samples by using the QIAamp DNA blood minikit according to the manufacturer's instructions (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and then stored at -80°C until used. Genotyping of the *MBL2* and the *MASP2* genes was performed by using a sequencing-based typing method according to the published sequences (GenBank accession numbers AF360991 for the *MBL2* gene and NG\_007289 for the *MASP2* gene). Six SNP in the *MBL2* gene (-550 G/C [rs11003125], -221 C/G [rs7096206], +4 C/T [rs7095891], codon 52 CGT/TGT [rs5030737], codon 54 GGC/GAC [rs1800450], and codon 57 GGA/GAA [rs1800451]) within the promoter and exon 1 of the *MBL2* gene were analyzed as previously reported (31). Briefly, a 969-bp fragment encompassing from the promoter to the end of exon 1 of the *MBL2* gene was obtained by PCR amplification using the sense primer 5'-GGGGAATTCTGCCAGAACGT-3' and antisense primer 5'-CATATCCCCAGGGCAGTTCTCT-3' and the Expand 20 kb<sup>PLUS</sup> PCR system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Five SNP in the *MASP2* gene (Pro111Leu [rs56392418], Asp105Gly [rs72550870], Arg84Gln [rs61735600], Thr73Met [rs61735601], and Arg103Cys [rs id not sub-

mitted]) within exon 3 of the *MASP2* gene were analyzed as previously reported (31). Similarly, a 354-bp fragment from exon 3 of the *MASP2* gene was PCR amplified by using the sense primer 5'-GCGAGTACGACTTCGTCAAGG-3' and antisense primer 5'-CTCGGCTGCATAGAAGGCCCTC-3' and the Expand high-fidelity PCR system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The cycling conditions for amplification were 94°C for 8 min, 35 cycles at 94°C for 45 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 90 s, and finally 72°C for 10 min. Five microliters of the resulting PCR product was treated with ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) and then subjected to direct sequencing with the BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom) following the manufacturer's instructions with the sense and antisense gene-specific primers mentioned above.

**Genetic groups.** The SNP at exon 1 of the *MBL2* gene are in strong linkage disequilibrium with those at the promoter and give rise to seven common haplotypes (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC, and HYPD). The HY haplotype induces high MBL concentrations, whereas exon 1 mutations (O variants) and the LX haplotypes cause reduced MBL concentrations (47). Therefore, the analysis of exon 1 and the promoter region of the *MBL2* gene allowed the categorization of individuals into three groups according to their *MBL2* genotype. Group I included genotypes responsible for high MBL levels (A/A and A/XA), group II genotypes were responsible for intermediate MBL levels (A/O and XA/XA) and, finally, group III genotypes were responsible for low MBL levels (O/O and XA/O), according to previously published results (32). The *MASP2* genotype was divided into wild type or mutant (Asp105Gly).

**Statistical analyses.** Continuous variables were compared with Student's *t* test or the Mann-Whitney U test when the distribution departed from normality and are described as means ( $\pm$ standard deviations) or medians (and ranges of values), respectively. Categorical data were compared by the chi-square or the Fisher's exact test as appropriate. Deviations from Hardy-Weinberg expectations were tested using the chi-square test for comparing observed and expected values. Statistical significance was defined as a two-tailed *P* value of <0.05. Statistical analysis was carried out with the program SPSS (version 15.0; SPSS, Inc., Chicago, IL).

#### RESULTS

The study population consisted of 243 consecutive adult patients (mean age,  $62.8 \pm 15.7$  years; range, 18 to 85 years; 63% men). The mean APACHE II, SAPS II, and SOFA scores at ICU entry were  $17.4 \pm 6.4$ ,  $37 \pm 11.9$ , and  $8.7 \pm 3.1$ , respectively. Within 24 h of ICU admission 101 patients (41.5%) met the criteria for septic shock and 28 (11.5%) for severe sepsis. For the remaining patients, 54 (22.2%) met the criteria for sepsis and 60 (24.7%) for a noninfectious SIRS. The main clinical characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1. Most of the patients had a medical indication for ICU admission, mainly a community-acquired pneumonia. In the group of septic shock patients, nosocomial pneumonia was the focus of infection in nearly 10% of ICU admissions. Additionally, 13% of the patients developed nosocomial pneumonia during ICU hospitalization.

*MBL2* was genotyped in 216 patients (88.8% of the included patients) and *MASP2* in 240 patients (98.7% of the included patients). *MBL2* and *MASP2* were also genotyped in the 104 healthy blood donor volunteers. Genotype frequencies found for patients and control groups did not differ from those predicted by the Hardy-Weinberg expectations (*P* = 0.43 and *P* = 0.072 for healthy controls and ICU patients with SIRS, respectively, regarding *MBL2* genotypes; *P* = 0.88 and *P* = 0.66 for healthy controls and ICU patients with SIRS, respectively, regarding *MASP2* genotypes). Table 2 shows the frequencies for the *MBL2* and *MASP2* genotypes found among the ICU patients and the healthy control group. No significant differences in the frequencies for the different *MBL2* haplotypes were found between the ICU patients with SIRS and the healthy controls (data not shown). LYPB was the predominant

TABLE 1. Baseline characteristics of the ICU patients included in the study

Characteristic	Finding for patient group <sup>a</sup>			
	Septic shock (n = 101)	Severe sepsis (n = 28)	Sepsis (n = 54)	Noninfectious SIRS (n = 60)
Age (yrs)	64.2 ± 14.9	60.6 ± 17.9	57.8 ± 16.4	66 ± 14.5
Gender (M/F)	65/36	14/14	33/21	41/19
APACHE II score	19.1 ± 5.8	16 ± 6.7	14.2 ± 6.5	18.1 ± 5.8
SAPS II score	38.5 ± 13.1	39 ± 12.3	33.9 ± 10.1	35.5 ± 11
SOFA score	10.45 ± 2.7	8.1 ± 3.4	6.9 ± 2.7	8 ± 2.8
Invasive mechanical ventilation	72 (71.3)	12 (42.8)	27 (50)	44 (73.3)
Type of admission				
Acute surgery	24 (23.7)	3 (10.7)	5 (9.2)	14 (23.3)
Elective surgery	6 (5.9)	1 (3.5)	2 (3.7)	10 (16.6)
Medical	71 (70.3)	24 (85.7)	47 (87)	36 (60)
Chronic disease				
Chronic respiratory disease	27 (26.7)	7 (25)	19 (35.1)	14 (23.3)
Heart failure NYHA IV	3 (2.9)	2 (7.1)	3 (5.5)	8 (13.3)
Chronic kidney failure	5 (4.9)	1 (3.5)	0	3 (5)
Cirrhosis	6 (5.9)	0	0	4 (6.6)
Diabetes mellitus (type 1 or 2)	24 (23.7)	3 (10.7)	15 (27.7)	11 (18.3)
Active cancer	3 (2.9)	1 (3.5)	1 (1.8)	2 (3.3)
Hematological malignancy	11 (10.9)	0	3 (5.5)	3 (5)
AIDS	0	2 (7.1)	0	0
Immunosuppressive or corticosteroid treatment	21 (20.8)	0	9 (16.6)	7 (11.6)
Focus of infection at admission				
Nonpneumonic lower respiratory tract	7 (6.9)	1 (3.5)	14 (25.9)	NA <sup>b</sup>
Community-acquired pneumonia	40 (39.6)	14 (50)	28 (51.8)	NA
Hospital-acquired pneumonia	10 (9.9)	1 (3.5)	2 (3.7)	NA
Urinary tract	10 (9.9)	5 (17.8)	0	NA
Bacterial meningitis	3 (2.9)	1 (3.5)	2 (3.7)	NA
Peritonitis	18 (17.8)	2 (7.1)	5 (9.2)	NA
Other infections	13 (12.8)	4 (14.3)	3 (5.5)	NA

<sup>a</sup> Data are presented as means ± standard deviations (with the exception of the gender ratio data) or as the number of patients with the characteristic (with the percentage in parentheses).

<sup>b</sup> NA, not applicable.

#### MBL2 variant haplotype in both the ICU patients with SIRS and in the healthy controls.

No overall statistically significant differences were observed among the patients with SIRS and the healthy controls, respectively, for the frequencies of the genotypes high-*MBL2* (48.6% versus 54.8%; *P* = 0.29), intermediate-*MBL2* (38.4% versus 29.8%; *P* = 0.13), and low-*MBL2* (12.9% versus 15.3%; *P* = 0.55) (Table 2). The group of patients with an infectious SIRS, the analysis of which always included patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock, had an increased frequency for low-*MBL2* genotypes (15.9%) when compared with the frequency found among patients with a noninfectious SIRS (3.8%; *P* = 0.025). When comparisons were established with the healthy control group, no differences could be found (15.9% versus 15.3%; *P* = 0.91). In view of the results we decided to evaluate the frequencies for high-*MBL2* genotypes and observed a higher prevalence of these genotypes among ICU patients with a noninfectious SIRS compared to the frequencies found in ICU patients with an infectious SIRS (63.4% versus 43.9%; *P* = 0.014). A higher frequency for high-*MBL2* genotypes was also found when comparisons were established between ICU patients with a noninfectious SIRS and the healthy control group, although these differences did not reach statistical significance (63.4% versus 54.8%; *P* = 0.3).

We also analyzed the severity indexes at ICU entry among

patients with a noninfectious SIRS and observed higher APACHE II (19.7 ± 5.5 versus 10 ± 1.4; *P* = 0.02), SAPS II (34 ± 8.7 versus 32 ± 8.5; *P* = 0.75), and SOFA scores (8.8 ± 2.8 versus 5 ± 0; *P* = 0.04) in patients with high-*MBL2* genotypes than in patients with low-*MBL2* genotypes. Although infectious SIRS patients with high-*MBL2* genotypes also had higher APACHE II (16 ± 6.8 versus 16 ± 7.3; *P* = 0.9), SAPS II (37.7 ± 12.2 versus 35.6 ± 13.7; *P* = 0.54), and SOFA (9.1 ± 3.4 versus 8.9 ± 3.4; *P* = 0.84) scores than patients with low-*MBL2* genotypes, differences were not statistically significant.

The analysis of exon 3 of *MASP2* revealed no homozygous Asp105Gly carriers among patients or controls. As shown in Table 2, no significant differences were found for the frequency of the heterozygous *MASP2* Asp105Gly SNP between the ICU patients with SIRS (5%) and the healthy controls (2.8%; *P* = 0.56). One ICU patient included in the sepsis group was heterozygous for the Pro111Leu polymorphism, while none of the healthy controls had it. No differences were found in the frequency for the *MASP2* Asp105Gly SNP between the group of ICU patients with an infection (5%) and those with a noninfectious SIRS (5%).

Table 3 shows the outcomes for the patients during ICU stay according to the existence of normal- or low-*MBL2*-producing genotypes and the presence of the wild-type *MASP2* or the

TABLE 2. *MBL2* and *MASP2* genotype frequencies in the ICU patients with SIRS and the healthy control group

Expression type	No. (%) of people in group with genotype		<i>P</i> value <sup>b</sup>	No. (%) of people in group with genotype		<i>P</i> value <sup>c</sup>	No. (%) of people in group with genotype		
	Patients	Healthy controls		Noninfectious SIRS	Infectious SIRS		Septic shock	Severe sepsis	Sepsis
<i>MBL2</i> genotypes <sup>a</sup>									
Group 1 (high MBL)	105 (48.6)	57 (54.8)	0.29	33 (63.4)	72 (43.9)	0.014	41 (43.6)	13 (61.9)	18 (36.7)
A/A	68 (31.5)	33 (31.8)		21 (40.4)	47 (28.7)		23 (24.4)	11 (52.4)	13 (26.5)
A/XA	37 (17.1)	24 (23)		12 (23)	25 (15.2)		18 (19.2)	2 (9.5)	5 (10.2)
Group 2 (intermediate MBL)	83 (38.4)	31 (29.8)	0.13	17 (32.7)	66 (40.2)	0.33	38 (40.4)	5 (23.8)	23 (46.9)
XA/XA	10 (4.6)	3 (2.8)		2 (3.8)	8 (4.9)		4 (4.2)	1 (4.8)	3 (6.1)
A/O	73 (33.8)	28 (27)		15 (28.9)	58 (35.3)		34 (36.2)	4 (19)	20 (40.8)
Group 3 (low MBL)	28 (12.9)	16 (15.4)	0.55	2 (3.8)	26 (15.9)	0.025	15 (15.9)	3 (14.2)	8 (16.3)
XA/O	19 (8.8)	8 (7.7)		1 (1.9)	18 (11)		10 (10.6)	2 (9.5)	6 (12.2)
O/O	9 (4.1)	8 (7.7)		1 (1.9)	8 (4.9)		5 (5.3)	1 (4.7)	2 (4.1)
Total	216	104		52	164		94	21	49
<i>MASP2</i> genotypes									
Wild type	227 (94.6)	101 (97.1)	0.41	57 (95)	170 (94.4)	1	96 (96)	28 (100)	46 (88.4)
Asp105Gly <sup>d</sup>	12 (5)	3 (2.8)	0.56	3 (5)	9 (5)	1	4 (4)	0	5 (9.6)
Pro111Leu <sup>d</sup>	1 (0.4)	0	1	0	1 (0.5)	1	0	0	1
Total	240	104		60	180		100	28	52

<sup>a</sup> Y and X indicate base exchanges at codon -221. A, normal structural allele; O, variant alleles (B, codon 54; C, codon 57; and D, codon 52).

<sup>b</sup> *P* values indicate comparisons between genotype frequencies for ICU patients and healthy controls.

<sup>c</sup> *P* values indicate comparisons between genotype frequencies for ICU patients with noninfectious SIRS and those with infectious SIRS.

<sup>d</sup> Corresponds to the heterozygous genotype.

heterozygous Asp105Gly SNP. No differences in the length of hospital or ICU stay were seen between the different groups. The frequencies and the total days of invasive mechanical ventilation or for renal replacement techniques were also similar among the groups. Fifty-three (21.8%) patients acquired a nosocomial infection while hospitalized in the ICU, 32 cases (13%) of which were a pneumonia. No differences in the global incidence of nosocomial infection or in the frequency of hospital-acquired pneumonia were seen between the group of ICU patients with low-*MBL2* genotypes or with the heterozygous Asp105Gly SNP and the rest of the patients. We also compared the clinical outcomes of ICU patients with high-*MBL2* genotypes and those with low-*MBL2* genotypes, excluding from the analysis those with intermediate-*MBL2* genotypes with regard to the clinical variables exposed in Table 3, and we found nonsignificant differences between them (data not shown).

Regarding the mortality rate, 73 (30%) of the patients died during their hospital stay, 54 (22.2%) of whom died during their ICU stay. Multiorgan failure was the main cause of death (68.5%), although its frequency was different among ICU patients with a noninfectious SIRS and those with an infectious cause of SIRS (38.8% versus 76.3%; *P* = 0.003). Again, the existence of low-producing *MBL2* genotypes or the heterozygous *MASP2* Asp105Gly SNP had no influence on the mortality rate. When mortality was analyzed with consideration taken for the existence of high, intermediate, or low *MBL2*-producing genotypes, no significant differences were found (21.4%, 33.7%, and 29.5% respectively).

Microbial samples obtained at ICU entry were positive in 93 (50.8%) of the patients with an infectious SIRS. No differences were found regarding the frequencies for Gram-positive, Gram-negative, or fungi among patients with low-*MBL2* genotypes or heterozygous for the Asp105Gly SNP (Table 3).

## DISCUSSION

Despite the intense efforts that have been made to reduce the mortality related to sepsis, mainly driven through the implementation of the "Surviving Sepsis Campaign" guidelines (6), mortality rates continue to be high, around 40 to 70% in patients with septic shock (42). It has been estimated that each year in the United States 750,000 new cases of sepsis are diagnosed, and its frequency is rising due to an increasing aging population, the use of invasive diagnostic procedures, and aggressive therapies, together with the high prevalence of chronic diseases (33).

Although both the innate and adaptive immune systems are involved in the pathogenesis of sepsis, the innate immune system plays a pivotal role. Moreover, it has been suggested that susceptibility and response to infectious disease might be inheritable (3, 45). Numerous studies have evaluated different components of the innate immune system, including the MBL, searching for SNP associated with an increased risk for developing more severe forms of sepsis, organ dysfunction, or death in patients with sepsis (2, 17, 19, 24, 25, 35, 50).

The serum concentration and functional activity of MBL is determined by SNP at the promoter and exon 1 of the *MBL2* gene, while SNP at exon 3 of the *MASP2* gene, mainly the Asp105Gly SNP, cause a reduction in the serum levels of MASP2. In the present study nonsignificant differences for the frequencies of *MBL2* haplotypes and genotypes were observed between ICU patients with SIRS and healthy controls. The prevalence of low-*MBL2* genotypes was similar to the frequency observed by Garcia-Laorden et al. in Spain (10) and others in previous studies (17, 18). LYPB, as previously reported in other Caucasian populations (1, 46), was the predominant variant type of haplotype both in the group of patients with SIRS and in the healthy blood donors. Regarding

TABLE 3. Type of microorganism isolated and outcomes of patients according to existence of a deficient *MBL2* genotype or the heterozygous *MASP2* Asp105Gly genotype

Organism type or clinical outcome	Result for patients with <sup>a</sup> :		<i>P</i> value <sup>d</sup>	Result for patients with <sup>a</sup> :		<i>P</i> value <sup>e</sup>
	Nondeficient <i>MBL2</i> genotype	Deficient <i>MBL2</i> genotype		Nondeficient <i>MASP2</i>	Heterozygous Asp105Gly <i>MASP2</i>	
<b>Organism type</b>						
Gram positive	28 (20.3)	6 (23.1)	0.748	40 (23.4)	2 (22.2)	1
Gram negative	36 (26.1)	6 (23.1)	0.747	43 (25.1)	2 (22.2)	1
Mixed Gram negative and Gram positive	2 (1.4)	0	1	3 (1.8)	0	1
Fungi	6 (4.3)	2 (7.7)	0.614	9 (5.3)	1 (11.1)	0.41
<b>Clinical outcome</b>						
Length of ICU stay (days)	10.2 ± 10.7	10.4 ± 12.1	0.925	10.4 ± 10.9	8.9 ± 5.4	0.638
Length of hospital stay (days)	23.2 ± 19.5	21.1 ± 15.9	0.618	23.2 ± 19.1	21.0 ± 13.7	0.7
Highest APACHE II score	20.4 ± 7.1	19.2 ± 7.2	0.458	20.8 ± 7.0	17.7 ± 7.8	0.159
Highest SAPS II score	45.4 ± 16.6	46.0 ± 16.0	0.881	45.3 ± 16.3	52.3 ± 17.4	0.168
Highest SOFA score	10.3 ± 3.4	10.1 ± 3.9	0.794	10.3 ± 3.4	9.0 ± 2.3	0.201
Invasive mechanical ventilation <sup>b</sup>	143 (76.1)	20 (71.4)	0.595	171 (75)	11 (91.7)	0.303
Duration of invasive mechanical ventilation (days)	6.7 ± 9.3	6.0 ± 9.3	0.74	6.8 ± 9.6	6.4 ± 5.6	0.89
Renal replacement	25 (13.3)	6 (21.4)	0.253	32 (14)	0	0.377
Duration of renal replacement (days)	1.1 ± 4.5	0.4 ± 1.3	0.47	1.0 ± 4.1	0	0.413
Parenteral nutrition	38 (20.2)	6 (21.4)	0.882	43 (18.9)	2 (16.7)	1
Nosocomial infection <sup>c</sup>	39 (20.7)	6 (21.4)	0.934	50 (21.9)	3 (25)	0.73
Hospital-acquired pneumonia <sup>c</sup>	22 (11.7)	4 (14.3)	0.755	30 (13.1)	2 (16.7)	0.665
Overall mortality while in hospital	59 (31.4)	6 (21.4)	0.284	70 (30.7)	3 (25)	0.676
Mortality while in ICU	43 (22.9)	5 (17.9)	0.464	53 (23.2)	1 (8.3)	0.457
Multiorgan failure	39 (20.7)	5 (17.9)	0.714	48 (21.1)	1 (9.1)	0.469

<sup>a</sup> Data are presented as means ± standard deviations or the number (and percentage) of patients with the indicated characteristic.

<sup>b</sup> Includes patients with mechanical ventilation on admission to ICU and those requiring mechanical ventilation later during ICU stay.

<sup>c</sup> Excludes patients for whom the indication for ICU admission was a nosocomial infection.

<sup>d</sup> *P* values indicate comparisons between the type of microorganism isolated and the clinical outcome for patients with a nondeficient *MBL2* genotype and those with a deficient *MBL2* genotype.

<sup>e</sup> *P* values indicate comparisons between the type of microorganism isolated and the clinical outcome for patients with a nondeficient *MASP2* genotype and those heterozygous for the Asp105Gly *MASP2* polymorphism.

the *MASP2* gene SNP, neither patients nor healthy controls were homozygous for the Asp105Gly SNP. No significant differences in the frequency for the heterozygous *MASP2* Asp105Gly were seen between ICU patients with SIRS and the healthy controls, the prevalence of which was in turn similar to that found in previous studies (10, 48). One Caucasian patient carried the *MASP2* Pro111Leu SNP, as primarily described by Lozano et al. in North African individuals, which is not capable of causing reductions in the serum levels or activity of the MASP-2 (31, 52).

Previous studies have demonstrated a high prevalence of *MBL2*-deficient genotypes among patients with sepsis admitted to ICU (17, 19, 50). Accordingly, our data showed that patients with an infectious SIRS had a higher frequency for low-*MBL2* genotypes than patients with a noninfectious SIRS. This was due to the higher prevalence of high-*MBL2* genotypes observed in ICU patients with a noninfectious SIRS. The observation of a higher frequency for high-*MBL2* genotypes among ICU patients with a noninfectious SIRS is coincidental with that previously reported by Garred et al. (17).

SIRS describes physiological and laboratory abnormalities that accompany inflammation independently from the original cause (30). In a recent study, Dulhunty et al. demonstrated that patients with a noninfectious SIRS present clinical differences from patients with sepsis (7). According to this study patients with sepsis died more frequently from multiorgan failure than patients with nonseptic SIRS, which was also observed in our

study. We hypothesize that some of the clinical differences observed between noninfectious and infectious SIRS patients might reflect, at least in part, the existence of different subjacent physiological mechanisms.

The results of our study suggest that patients with a noninfectious insult and high-*MBL2* genotype are at risk of developing SIRS and require ICU admission without having significant infectious complications. High levels of functional MBL could directly be associated with the proinflammatory adverse effects following uncontrolled complement activation, which has been previously demonstrated in ischemic-reperfusion experimental mice models (22, 36, 55). According to these models, excess production of MBL or the administration of exogenous MBL following induced ischemia causes organ (myocardial, kidney, intestine) reperfusion injury due to complement activation, while low MBL levels are protective. One of the hallmarks of reperfusion to ischemic tissues is the severe oxidative stress that occurs at the level of the endothelium, which causes vascular injury. It has been suggested that the lectin pathway initiates complement activation following oxidative stress, particularly after myocardial, intestinal, and skeletal muscle ischemic-reperfusion-induced injury, at least in experimental models (23). Additionally, MBL has been reported to recognize apoptotic and necrotic cells (37, 39), which could also trigger activation of complement through the lectin pathway in patients with high-*MBL2* genotypes and a noninfectious SIRS. In fact a defective apoptotic clearance has been found in MBL-defec-

tive mice (49). Unfortunately we did not measure the level of inflammation or complement activation in our patients, and therefore we could not demonstrate a higher degree of activation, as we would have expected from our results, in patients with a noninfectious SIRS and high-*MBL2* genotypes. However, this group of patients had higher severity index scores, particularly a higher SOFA score, which measures organ failure due to endothelium injury.

The analysis of the outcomes of the ICU patients with SIRS, particularly for mortality, revealed no differences regarding the existence of low-*MBL2* genotypes. Also, no differences were seen between low- and high-*MBL2* genotypes (data not shown). The relationship between mortality and the presence of low-*MBL2* genotype continues to be a controversial issue, with studies supporting this association (17, 19, 24) and others like the present one finding no relationship (25, 50). In a recent meta-analysis by Eisen et al. (8), only a trend toward an increased mortality among patients with low-*MBL2* genotypes and bacterial infections was found. We could not observe a better outcome in patients with intermediate-*MBL2* genotypes, as demonstrated by Helleman et al. (24). It should be noted that one of the limitations of our study is the short follow-up period of the patients. Nowadays, with the application of increasingly effective organ support treatments, withdrawal of life support therapy is the most common terminal event in ICU patients, and thus longer-term mortality analyses are recommended (53).

Regarding the genotyping of exon 3 of *MASP2*, no significant differences were found in the frequency of the heterozygous *MASP2* Asp105Gly SNP between patients with an infectious versus a noninfectious SIRS. The *MASP2* Asp105Gly SNP was not associated with any of the clinical variables associated with an increased severity of disease at ICU admission, including mortality. Our results were similar to those reported by Garcia-Laorden et al. in patients with community-acquired pneumonia (10), but not to the ones from the study of Henciaerts et al., who observed an association between the existence of the heterozygous *MASP2* Asp105Gly SNP and higher mortality rates in ICU patients (25).

Our study was not capable of finding an increased prevalence of any microorganism or between Gram-positive and -negative bacteria among patients with low-*MBL2* genotypes. While some of the published studies have found an association between Gram-positive infections and MBL deficiency (8, 24), others have observed a link between Gram-negative infections and MBL deficiency (44).

The present study has important design limitations that have to be taken into consideration. First, our control group was composed of healthy unmatched blood donors. Although the use of healthy blood donors as a control group has commonly been used in genetic studies, it has the potential risk of misclassification of individuals, particularly when evaluating a condition with a high penetrance, such as MBL deficiency. Second, due to the retrospective design of the study, no power calculation was performed, which could seriously affect its capacity to detect small differences, particularly when analyzing the different subgroups of SIRS patients. Therefore, additional independent studies are required to replicate our observations.

In conclusion, this study shows that low-*MBL2* genotypes were significantly underrepresented among patients with a

noninfectious SIRS and were not associated with more severe forms of sepsis or with death. The presence of *MASP2* polymorphisms was not related to infectious SIRS and had no impact on the prognosis of ICU patients with SIRS. Thus, high-MBL producers seem to be at risk of developing a noninfectious SIRS, while low-MBL producers are not likely to be at higher risk of developing severe forms of infectious SIRS.

#### ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (050164).

#### REFERENCES

- Aitttoniemi, J., H. Soranummi, A. T. Rovio, M. Hurme, T. Pessi, M. Nieminen, and J. Karjalainen. 2005. Mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphism in asthma and atopy among adults. *Clin. Exp. Immunol.* **142**:120–124.
- Arnalich, F., D. Lopez-Maderuelo, R. Codoceo, J. Lopez, L. M. Solis-Garcido, C. Capiscol, C. Fernandez-Capitan, R. Madero, and C. Montiel. 2002. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* **127**:331–336.
- Burgner, D., and M. Levin. 2003. Genetic susceptibility to infectious diseases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**:1–6.
- Calandra, T., and J. Cohen. 2005. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* **33**:1538–1548.
- Cervera, C., F. Lozano, N. Saval, I. Gimferrer, A. Ibañez, B. Suarez, L. Linares, F. Cofan, M. J. Ricart, N. Esforzado, M. A. Marcos, T. Pumarola, F. Oppenheimer, J. M. Campistol, and A. Moreno. 2007. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation* **83**:1493–1500.
- Dellinger, R. P., J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, and M. M. Levy. 2004. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. *Crit. Care Med.* **32**:858–873.
- Dulhunty, J. M., J. Lipman, S. Finfer, and the Sepsis Study Investigators for the ANZICS Clinical Trials Group. 2008. Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive Care Med.* **34**:1654–1661.
- Eisen, D. P., M. M. Dean, M. A. Boermeester, K. J. Fidler, A. C. Gordon, G. Kronborg, J. F. Kun, Y. L. Lau, A. Payeras, H. Valdimarsson, S. J. Brett, W. K. Ip, J. Mila, M. J. Peters, S. Saevardsdottir, J. W. van Till, C. J. Hinds, and E. S. McBryde. 2008. Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin. Infect. Dis.* **47**:510–516.
- Eisen, D. P., and R. M. Minchinton. 2003. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **37**:1496–1505.
- Garcia-Laorden, M. I., J. Sole-Violan, F. Rodriguez de Castro, J. Aspa, M. L. Briones, A. Garcia-Saavedra, O. Rajas, J. Blanquer, A. Caballero-Hidalgo, J. A. Marcos-Ramos, J. Hernandez-Lopez, and C. Rodriguez-Gallego. 2008. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**:368–374.
- Garcia-Laorden, M. I., A. Garcia-Saavedra, F. R. de Castro, J. S. Violan, O. Rajas, J. Blanquer, L. Borderias, and C. Rodriguez-Gallego. 2006. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin associated serine protease 2 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**:1383–1386.
- Garcia-Segarra, G., G. Espinosa, D. Tassies, J. Oriola, J. Aibar, A. Bove, P. Castro, J. C. Reverte, and J. M. Nicolas. 2007. Increased mortality in septic shock with the 4G/4G genotype of plasminogen activator inhibitor 1 in patients of white descent. *Intensive Care Med.* **33**:1354–1362.
- Garnier, J. S., W. R. Jarvis, T. G. Emori, T. C. Horan, and J. M. Hugues. 1988. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am. J. Infect. Control* **16**:128–140.
- Garred, P. 2008. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem. Soc. Trans.* **36**:1461–1466.
- Garred, P., H. O. Madsen, U. Balslev, B. Hofmann, C. Pedersen, J. Gerstoft, and A. Svejgaard. 1997. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* **349**:236–240.
- Garred, P., H. O. Madsen, P. Halberg, J. Petersen, G. Kronborg, A. Svejgaard, V. Andersen, and S. Jacobsen. 1999. Mannose binding polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **42**:2145–2152.

17. Garred, P., J. Strom, L. Quist, E. Taaning, and H. O. Madsen. 2003. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J. Infect. Dis.* **188**:1394–1403.
18. Gelejns, K., A. Roos, J. J. Houwing-Duistermaat, W. van Rijs, A. P. Tioguillen, J. D. Laman, P. A. van Doorn, and B. C. Jacobs. 2006. Mannose binding lectin contributes to the severity of Guillain-Barre syndrome. *J. Immunol.* **177**:4211–4217.
19. Gordon, A. C., U. Waheed, T. K. Hansen, G. A. Hitman, C. S. Garrad, M. W. Turner, N. J. Klei, S. J. Brett, and C. J. Hinds. 2006. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock* **25**:88–93.
20. Granell, M., A. Urbano-Ispizua, B. Suarez, M. Rovira, F. Fernandez-Aviles, C. Martinez, M. Ortega, C. Uriburu, A. Gaya, J. M. Roncero, A. Navarro, E. Carreras, J. Mensa, J. Vives, C. Rozman, E. Montserrat, and F. Lozano. 2006. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **34**:1435–1441.
21. Guardia, A., and F. Lozano. 2003. Mannose binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. *Rev. Med. Microbiol.* **14**:41–52.
22. Hart, M. L., K. A. Ceonzo, L. A. Shaffer, K. Takahashi, R. P. Rother, W. R. Reenstra, J. A. Buras, and G. L. Stahl. 2005. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin pathway dependent without involving Clq. *J. Immunol.* **174**:6373–6380.
23. Hart, M. L., M. C. Walsh, and G. L. Stahl. 2004. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol. Immunol.* **41**:165–171.
24. Hellermann, D., A. Larsson, H. O. Madsen, J. Bonde, J. O. Jarlov, J. Wiis, T. Faber, J. Wetterslev, and P. Garred. 2007. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. *Hum. Mol. Genet.* **16**:3071–3080.
25. Henckaerts, L., K. R. Nielsen, R. Steffensen, K. Van Steen, C. Mathieu, A. Giulietti, P. J. Wouters, I. Milants, I. Vanhorebeek, L. Langouche, S. Vermeire, P. Rutgeerts, S. Thiel, A. Wilmer, T. K. Hansen, and G. Van den Berghe. 2009. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* **37**:192–201.
26. Horcajada, J. P., F. Lozano, A. Muñoz, B. Suarez, C. Fariñas-Alvarez, M. Almela, A. Smithson, E. Martínez, J. Mallolas, J. Mensa, and J. M. Gatell. 2009. Polymorphic receptors of the innate immune system (MBL/MASP-2 and TLR2/4) and susceptibility to pneumococcal bacteremia in HIV-infected patients: a case-control study. *Curr. HIV Res.* **7**:218–223.
27. Jack, D. L., R. C. Read, A. J. Tanner, M. Frosch, M. W. Turner, and N. J. Klein. 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect. Dis.* **184**:1152–1162.
28. Koch, A., M. Melbye, P. Sorensen, P. Homoe, H. O. Madsen, K. Molbak, C. H. Hansen, L. H. Andersen, G. W. Hahn, and P. Garred. 2001. Acute respiratory tract infections and mannos-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* **285**:1316–1321.
29. Krarup, A., R. Wallis, J. Presanis, P. Gal, and R. B. Sim. 2007. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine proteases 2. *PLoS One* **2**:e623.
30. Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, and G. Ramsay. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* **31**:1250–1256.
31. Lozano, F., B. Suarez, A. Muñoz, J. C. Jensenius, J. Mensa, J. Vives, and J. P. Horcajada. 2005. Novel MASP2 variants detected among North African and sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* **66**:131–135.
32. Madsen, H. O., P. Garred, S. Thiel, J. A. Kurtzhals, L. U. Lamm, L. P. Ryder, and A. Svegaard. 1995. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J. Immunol.* **155**:3013–3020.
33. Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**:1546–1554.
34. Matsushita, M. 1996. The lectin pathways of the complement system. *Microbiol. Immunol.* **40**:887–893.
35. Mira, J. P., A. Cariou, F. Grall, C. Delclaux, M. R. Losser, F. Heshmati, C. Cheval, M. Monchi, J. L. Teboul, F. Riche, G. Leleu, L. Arbibe, A. Mignon, M. Delpech, and J. F. Dhainaut. 1999. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* **282**:561–568.
36. Moller-Kristensen, M., W. Wang, M. Ruseva, S. Thiel, S. Nielsen, K. Takahashi, L. Shi, A. Ezekowitz, J. C. Jensenius, and M. Gadjeva. 2005. Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand. J. Immunol.* **61**:426–434.
37. Nauta, A. J., N. Raaschou-Jensen, A. Roos, M. R. Daha, H. O. Madsen, M. C. Borrias-Essers, L. P. Ryder, C. Koch, and P. Garred. 2003. Manose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* **33**:2853–2863.
38. Neth, O., D. L. Jack, A. W. Dodds, H. Holzel, N. J. Klein, and M. W. Turner. 2000. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.* **68**:688–693.
39. Ogden, C. A., A. de Cathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2001. Clq and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **194**:781–795.
40. Ono, K., C. Nishitani, H. Mitsuzawa, T. Shimizu, H. Sano, H. Suzuki, T. Kodama, N. Fjii, K. Fukase, K. Hirata, and Y. Kuroki. 2006. Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A. *J. Immunol.* **177**:5517–5523.
41. Peterslund, N. A., C. Koch, J. C. Jensenius, and S. Thiel. 2001. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infection after chemotherapy. *Lancet* **358**:637–638.
42. Russell, J. A. 2006. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **355**:1699–1713.
43. Schlapbach, L. J., C. Aebi, M. Otth, K. Leibundgut, A. Hirt, and R. A. Ammann. 2007. Deficiency of mannose-binding lectin associated serine protease-2 associated with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**:989–994.
44. Smithson, A., A. Muñoz, B. Suarez, S. M. Soto, R. Perello, A. Soriano, J. A. Martinez, J. Vilà, J. P. Horcajada, J. Mensa, and F. Lozano. 2007. Association between mannose-binding lectin deficiency and septic shock following acute pyelonephritis due to *Escherichia coli*. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**:256–261.
45. Sorensen, T. I., G. G. Nielsen, P. K. Andersen, and T. W. Teasdale. 1988. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N. Engl. J. Med.* **318**:727–732.
46. Sorensen, G. L., I. Petersen, S. Thiel, M. Fenger, K. Christensen, K. O. Kyvik, T. I. Sorensen, U. Holmskov, and J. C. Jensenius. 2007. Genetic influences on mannan-binding lectin and mannan-binding lectin associated serine protease-2 activity. *Genet. Epidemiol.* **31**:31–41.
47. Steffensen, R., S. Thiel, K. Varming, C. Jersild, and J. C. Jensenius. 2000. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J. Immunol. Methods* **241**:33–42.
48. Stengaard-Pedersen, K., S. Thiel, M. Gadjeva, M. Moller-Kristensen, R. Sorensen, L. T. Jensen, A. G. Sjoholm, L. Fugger, and J. C. Jensenius. 2003. Inherited deficiency of mannan-binding-associated serine proteases 2. *N. Engl. J. Med.* **349**:554–560.
49. Stuart, L. M., K. Takahashi, L. Shi, J. Savill, and R. A. Ezekowitz. 2005. Mannose-binding lectin deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J. Immunol.* **174**:3220–3226.
50. Sutherland, A. M., K. R. Walley, and J. A. Russell. 2005. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit. Care Med.* **33**:638–644.
51. Thiel, S., R. Steffensen, I. J. Christensen, W. K Ip, Y. L. Lau, I. J. Reason, H. Eiberg, M. Gadjeva, M. Ruseva, and J. C. Jensenius. 2007. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.* **8**:154–163.
52. Valles, X., M. R. Sarrias, F. Casals, M. Farnos, R. Piñer, B. Suarez, L. Morais, I. Mandomando, B. Sigauque, A. Roca, P. L. Alonso, A. Torres, N. M. Thielens, and F. Lozano. 2009. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in South-Eastern African children. *Tissue Antigens* **74**:298–307.
53. Vincent, J. L. 2004. Endpoints in sepsis trials: more than just 28-day mortality? *Crit. Care Med.* **32**(Suppl.):S209–S213.
54. Vincent, J. L., Y. Sakr, C. L. Sprung, V. M. Ranieri, K. Reinhardt, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J. R. Le Gall, D. Payen, and the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**:344–353.
55. Walsh, M. C., T. Boucier, K. Takahashi, L. Shi, M. N. Busche, R. P. Rother, S. D. Solomon, R. A. Ezekowitz, and G. L. Stahl. 2005. Mannose-bindig lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Immunol.* **175**:541–546.
56. Worthley, D. L., P. G. Bardy, and C. G. Mullighan. 2005. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern. Med. J.* **35**:548–555.

**Artículo 3:** Aibar J, Martínez-Florensa M, Castro P, Carrasco E, Escoda-Ferran C, Fernández S, Butjosa M, Hernández C, Rinaudo M, Lozano F, Nicolás JM. Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with Septic Syndromes. *J Crit Care* 2015; 43(6):556-62.



## Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes<sup>☆</sup>



Jesús Aibar, MD <sup>a</sup>, Mario Martínez-Florencio, PhD <sup>b</sup>, Pedro Castro, MD, PhD <sup>a,\*</sup>, Esther Carrasco, PhD <sup>b</sup>, Cristina Escoda-Ferran, BSc <sup>b</sup>, Sara Fernández, MD <sup>a</sup>, Montserrat Butjosa, MD <sup>a</sup>, Cristina Hernández, MD <sup>a</sup>, Mariano Rinaudo, MD <sup>a</sup>, Francisco Lozano, MD, PhD <sup>b,c,d,1</sup>, Josep Maria Nicolás, MD, PhD <sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Group of Immunoreceptors of the Innate and Adaptive System, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Immunology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, School of Medicine, University of Barcelona Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

CD5

CD6

Sepsis

Systemic inflammatory response syndrome

### ABSTRACT

**Purpose:** Soluble forms of CD5 and CD6 lymphocyte surface receptors (sCD5 and sCD6) are molecules that seem to prevent experimental sepsis when exogenously administered. The aim of this study was to assess sCD5 and sCD6 levels in patients with septic syndromes.

**Materials and methods:** The study population consisted of 218 patients admitted to the medical intensive care unit (ICU) presenting either septic syndromes or noninfectious systemic inflammatory response syndrome at admission or within the first 48 hours. The sCD5 and sCD6 levels were analyzed by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** Almost 50% of the patients had undetectable levels of sCD5 or sCD6, with no differences in clinical or biological variables with detectable patients. There was a correlation between the delta Sequential Organ Failure Assessment score and both sCD6 and sCD5 levels in all groups. Patients with sCD5 or sCD6 levels greater than 1500 ng/mL presented a higher in-ICU mortality ( $P < .05$ ). Logistic regression analysis showed that increased sCD6 levels were associated with an increased risk of in-ICU mortality.

**Conclusions:** Levels of sCD5 and sCD6 in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome present a high variation and an elevated proportion of undetectability. Levels of sCD6 are associated with an increased risk of mortality in these patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Sepsis is a clinical entity characterized by a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) secondary to infection [1].

**Abbreviations:** APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; APS, Acute Physiologic Score; CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ICU, intensive care unit; IP, intraperitoneal; MODS, multiple organ dysfunction syndrome; OR, odds ratio; SAPS, Simplified Acute Physiologic Score; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; SRCR-SF, scavenger receptor cysteine-rich superfamily; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; TBS, Tris-buffered saline.

☆ Conflict of interest disclosure: None of the authors has any financial or any other conflict of interest related to the content of this manuscript.

\* Corresponding author at: Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275411; fax: +34 934020293.

E-mail addresses: [jaibar@clinic.ub.es](mailto:jaibar@clinic.ub.es) (J. Aibar), [mariomartinez80@gmail.com](mailto:mariomartinez80@gmail.com) (M. Martínez-Florencio), [pcastro@clinic.ub.es](mailto:pcastro@clinic.ub.es) (P. Castro), [esthercdm@gmail.com](mailto:esthercdm@gmail.com) (E. Carrasco), [criescodaferran@gmail.com](mailto:criescodaferran@gmail.com) (C. Escoda-Ferran), [sfernann@clinic.ub.es](mailto:sfernann@clinic.ub.es) (S. Fernández), [mbutjosa@clinic.ub.es](mailto:mbutjosa@clinic.ub.es) (M. Butjosa), [chernan1@clinic.ub.es](mailto:chernan1@clinic.ub.es) (C. Hernández), [marianorinaudo@gmail.com](mailto:marianorinaudo@gmail.com) (M. Rinaudo), [flozano@clinic.ub.es](mailto:flozano@clinic.ub.es) (F. Lozano), [nicolas@clinic.ub.es](mailto:nicolas@clinic.ub.es) (J.M. Nicolás).

<sup>1</sup> These authors should be considered as senior co-authors of the work.

Current theories on the development and progression of sepsis are focused on the dysregulation of inflammatory response, which can lead to the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) responsible for the high mortality associated with these patients [2,3]. Different molecules involved in this response have been evaluated as potential therapeutic targets in animal models with promising results, but none have been fully confirmed in clinical studies in humans [2,4,5].

The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF) is an ancient highly conserved family of proteins that can be found either on the cell surfaces or as soluble molecules [6]. The latter can be secreted by cells of hematopoietic origin such as lymphocytes (CD5, CD6, and T19/WT1) or by nonhematologic cells. Although there is no unifying function for all of the members of the SRCR-SF, some have been implicated in the development of the immune system and in the regulation of innate and adaptive immune responses [7–9].

The CD5 and CD6 receptors are the only 2 members of the SRCR-SF that are expressed on conventional T and B1a lymphocytes [9,10]. Both are lymphoid-specific surface glycoproteins that share important similarities in structure, function, and tissue expression. They have

also been identified at very low levels (picomolar to nanomolar range) as soluble forms in human serum (sCD5 and sCD6) [9–12].

Little is known about the function of these sCD5 and sCD6 forms. However, *in vitro* studies have demonstrated that affinity-purified recombinant forms of these molecules selectively inhibit T-cell proliferation induced by certain polyclonal stimuli and antigen-presenting cells [13–15].

Recently, it has also been reported that both sCD5 and sCD6 could have a role in the pathophysiology of sepsis [9,10,16]. Specifically, intra-peritoneal (IP) administration of recombinant forms of sCD5 and sCD6 has been associated with better survival rates in mouse sepsis models of fungal or bacterial origin, respectively. Accordingly, it has been demonstrated that these molecules bind with relative high affinity to conserved cell wall components from either gram-negative (eg, lipopolysaccharide) or gram-positive (eg, lipoteichoic acid) bacteria (sCD6) [9,10] or from saprophytic and pathogenic fungi (eg, linear  $\beta$ -glucans) (sCD5) [16]. This binding induces bacterial/fungal aggregation, thereby likely facilitating their engulfment and clearance from the circulation by phagocytic cells, and reduces the serum levels of proinflammatory cytokines induced by either whole pathogens or their isolated cell wall components [16].

To the best of our knowledge, there are no studies assessing the role of sCD5 and sCD6 in septic syndromes in humans. We designed this study with the aim of analyzing sCD5 and sCD6 levels in critically ill patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

The study population consisted of all patients consecutively admitted to the medical intensive care unit (ICU) of the Hospital Clinic of Barcelona with septic syndromes or noninfectious SIRS at admission or within the first 48 hours and staying more than 2 days. Patients with HIV infection, hematologic/neoplastic disease, or a diagnosis of brain death and those presenting with an irreversible short-term fatal disease or in whom futile care was decided were excluded.

During an 8-month period, 274 patients were admitted and 218 were included (Fig. 1). The patients were followed until hospital discharge. Informed consent was obtained from the patients or their relatives within 24 hours after admission. The protocol was approved by the institutional review board of the hospital.

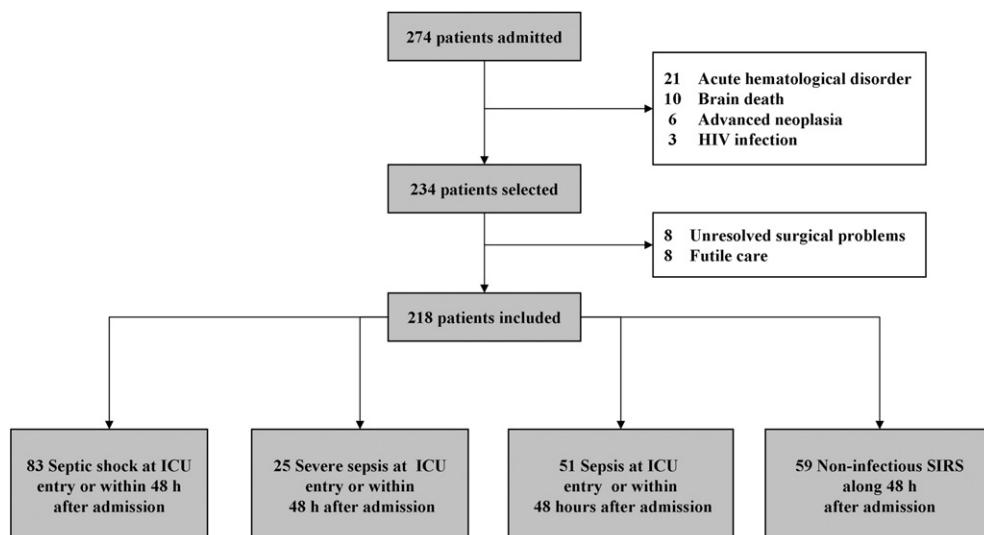
Epidemiological data, the primary site of infection, and infection-related organisms were recorded. Clinical infections were defined according to the Centers for Disease Control and Prevention criteria [17].

Severe sepsis and septic shock were defined according to the Society of Critical Care Medicine (SCCM), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), American College of Chest Physicians (ACCP), American Thoracic Society (ATS), and Surgical Infection Society (SIS) consensus conference [1]. Severity indexes including the Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II score, the Simplified Acute Physiologic Score (SAPS) II score, the Acute Physiologic Score (APS), and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score were calculated at ICU admission and thereafter on a daily basis. The delta ( $\Delta$ , difference between the maximum score and the score at admission) SOFA,  $\Delta$  SAPS II, and  $\Delta$  APACHE II were calculated [18–21]. Multiple organ dysfunction syndrome was considered in cases of acute progressive dysfunction of 2 or more organ systems, with a minimum failure score of 3 points for each organ.

### 2.2. Laboratory studies

Collection of venous blood samples was performed according to standard procedures of the hospital during the first 48 hours of admission. The samples were processed according to standard operating procedures of the hospital. All samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  during the first hour after their collection. Samples were stored in the same freezer fitted with an alarm connected directly to the hospital in case of failure. These molecules are stable over time with this process if they are not exposed to freezing/thawing cycles.

Serum levels of both sCD5 and sCD6 were quantified using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich developed in our laboratory. Briefly, F96 Maxisorp plates (Nunc, Kamstrup, Denmark) were coated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with 500 ng of affinity-purified anti-CD5 (Cris-1) or anti-CD6 (161-8) monoclonal antibodies. After 4 washes with Tris-buffered saline (TBS; Tris-HCl 10 mmol/L, 150 mmol/L NaCl) plus 0.05% Tween-20, the plates were blocked for 1 hour at room temperature with TBS plus 5% bovine serum albumin. Test samples (100  $\mu\text{L}$ ) were incubated for 2 hours and 30 minutes at room temperature in blocking solution (TBS-bovine serum albumin). After another washing cycle, wells were incubated for 1 hour at room temperature with biotin-labeled anti-CD5 (Leu-1) or anti-CD6 (SPV-L14.2) monoclonal antibodies in blocking solution. After another washing step, the assay was developed with the ELISA Amplification System (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Absorbance at 492 nm was measured using an Epoch Bitek ELISA reader. As a standard protein, we used serial dilutions of affinity-purified human recombinant soluble forms of CD5 and CD6 [10,16] in blocking solution. The lower detection limit was 0.5 ng/mL for both proteins.



**Fig. 1.** Flowchart of the patients in the study according to the inclusion criteria.

### 2.3. Statistical analysis

Results are expressed as mean and standard deviation for quantitative variables following a normal distribution and as median and interquartile range otherwise. Qualitative variables are expressed as percentages. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

Because plasma levels of both sCD5 and sCD6 did not follow a normal distribution, nonparametric tests were used for all the statistical analyses including these variables. Correlation studies were performed using Spearman  $\rho$  and comparison of the sum of ranks with the Mann-Whitney test. In comparisons that included only variables with a normal distribution, a Student  $t$  test was used.

$\chi^2$  and Fisher tests were used to compare qualitative variables. A logistic regression model including sCD5 and sCD6 levels was used to assess if they were independently associated with ICU mortality.

All tests were performed with a bilateral significance level of  $P < .05$ . Statistical analysis was done with SPSS statistical software (version 18.0.0; SPSS, Chicago, IL).

## 3. Results

### 3.1. Baseline patient characteristics

A total of 218 patients were studied. Eighty-three patients (38%) had septic shock, 25 (11.5%) severe sepsis, 51 (23.4%) sepsis, and 59 (27.1%) noninfectious SIRS at ICU admission or within the following 48 hours

(Fig. 1). The main epidemiological and clinical data of the patients are shown in Table 1. The mean age of the patients was  $62.2 \pm 16$  years (range, 18–85), and 63.8% were men. The mean APACHE II, SAPS II, and SOFA scores at ICU admission were  $16.7 \pm 6.3$ ,  $37.2 \pm 12.2$ , and  $8.5 \pm 3$ , respectively.

The characteristics among the different groups were compared (Table 1). There were no statistically significant differences regarding age, sex, primary site of infection, or use of corticosteroids in the last month. Patients with septic syndromes presented a higher exposure to antibiotics the month before admission compared with those with noninfectious SIRS. The APACHE II and SOFA scores were higher in patients with severe sepsis and septic shock compared with other groups, as was the length of ICU stay ( $P < .05$ ).

Intensive care unit mortality was 14.7% (32 patients), and it was significantly higher in septic shock patients (27.7%) compared with those with sepsis (3.9%) and noninfectious SIRS (5.1%). The main cause of death was MODS in septic patients (84.4%) and cardiovascular collapse in noninfectious SIRS (2 of 3 deaths). The in-hospital mortality among ICU survivors was 6.4%, and it was higher in patients with noninfectious SIRS (13.5%) compared with those with septic syndromes (6%,  $P < .05$ ).

### 3.2. sCD5 and sCD6 levels and clinical features

The distribution of sCD5 and sCD6 levels according to diagnostic category in our population is shown in Fig. 2. Neither original levels nor logarithmic transformation followed a normal distribution.

**Table 1**

Epidemiological and clinical data of the patients in the study

	Septic shock (n = 83)	Severe sepsis (n = 25)	Sepsis (n = 51)	Noninfectious SIRS (n = 59)	Total (N = 218)
Age, y	62.6 (15.2)	64.3 (16.3)	58.2 (17.1)	64 (15.7)	62.17 (16)
Sex, % men	66.3%	56%	58.8%	67.8%	64%
Hospital stay before ICU admission, d	2 (3.7)	2.6 (8.2)	1(2.5)	1.5 (4.4)	1.7 (4.4)
APACHE II score at admission	18.4 (6)	17.7 (6.5)	13.3 (6.3)*,§,#	17.0 (5.5)	16.7 (6.3)
Δ APACHE II	3.7 (4.1)	4 (3.6)	2.9 (4)	2.2 (4.4)†	3.1 (4.2)
SAPS II score at admission	42.0 (12.0)	40.2 (13)	29.7 (11.7)*,§,#	35.6 (9.1)*,§	37.2 (12.2)
Δ SAPS II	8.5 (12)	5.4 (8)	6 (10.8)	3.8 (6.2)†	6.3 (10)
SOFA score at admission	10.0 (3.0)	9.0 (3.7)	6.8 (2.8)*,  ,**	7.8 (2.4)*	8.5 (3.1)
Δ SOFA	1.6 (2.4)	1.2 (2)	1.5 (2.3)	1.3 (1.8)	1.5 (2.2)
APS at admission	16.4 (7.3)	15 (7.6)	9.7 (4.9)*,§,**	12.7 (5.8)†	13.7 (7)
Surgery, n (%) <sup>a</sup>	24 (28.9)	6 (24)	7 (13.7)†	22 (37.2)	59 (27)
Site of infection, n (%)					
Respiratory	46 (55.4)	16 (64)	35 (68.6)	NA	97 (44.5)
Digestive	15 (18.1)	4 (16)	4 (7.8)	NA	23 (10.5)
Urinary	9 (10.8)	0	1 (2)	NA	10 (4.6)
Central nervous system	4 (4.8)	4 (16)	4 (7.8)	NA	12 (5.5)
Cutaneous	2 (2.4)	1 (4)	1 (2)	NA	4 (1.8)
Cardiovascular	2 (2.4)	0	0	NA	2 (0.9)
Others	5 (6)	0	5 (10)	NA	10 (4.6)
Glucose, mg/dL	179 (83)	159 (81)	192 (104)	202 (103)	185 (94)
CRP, mg/dL	24.4 (14.3)	14.6 (8)†	13.2 (8.5)*,#	6.2 (5.9)*,§	16.8 (12.8)
Lymphocytes, $10^9/L$	896 (879)	1067 (892)	1409 (1630)†	1284 (866)†	1141 (1115)
Length of ICU stay, d	12 (10.6)	14.3 (15.7)	8 (5.8)‡,§	8.3 (9)‡,§	10.3 (10.2)
Invasive mechanical ventilation during ICU stay, n (%)	70 (85)	19 (76)	29 (56.8)*,**	46 (78)	164 (75.23)
Parenteral nutrition during ICU stay, n (%)	26 (31.3)	6 (24)	9 (17.6)**	4 (6.8)*,§	45 (20.6)
Renal replacement therapy during ICU stay, n (%)	13 (15.7)	5 (20)	4 (7.8)‡,§	3 (5.1)‡,§	25 (11.5)
ICU mortality, n (%)	23 (27.7)	4 (16)	2 (3.9)*	3 (5.1)*	32 (14.67)
Multiorgan failure, n (%)	20 (24.0)	4 (16)	2 (3.9)*	1 (1.6)*,§	27 (12.4)
Sudden cardiovascular collapse, n (%)	3 (3.6)	0	0	2 (3.4)	5 (2.3)
Post-ICU in-hospital mortality, n (%)	5 (6)	1 (4)	0 <sup>j</sup>	8 (13.5)	14 (6.4)
Overall hospital mortality, n (%)	28 (33.7)	5 (20)	2 (3.9)*,§,**	11 (18.6)†	46 (21.1)

Characteristics in septic shock, severe sepsis, sepsis, and noninfectious SIRS are compared. Data refer to values at admission unless otherwise indicated. Data are expressed as mean and standard deviation for quantitative variables and percentages for categorical variables. NA indicates not applicable.

<sup>a</sup> Surgery as cause of ICU entry or performed during ICU stay.

\*  $P < .001$  compared with septic shock.

†  $P < .01$  compared with septic shock.

‡  $P < .05$  compared with septic shock.

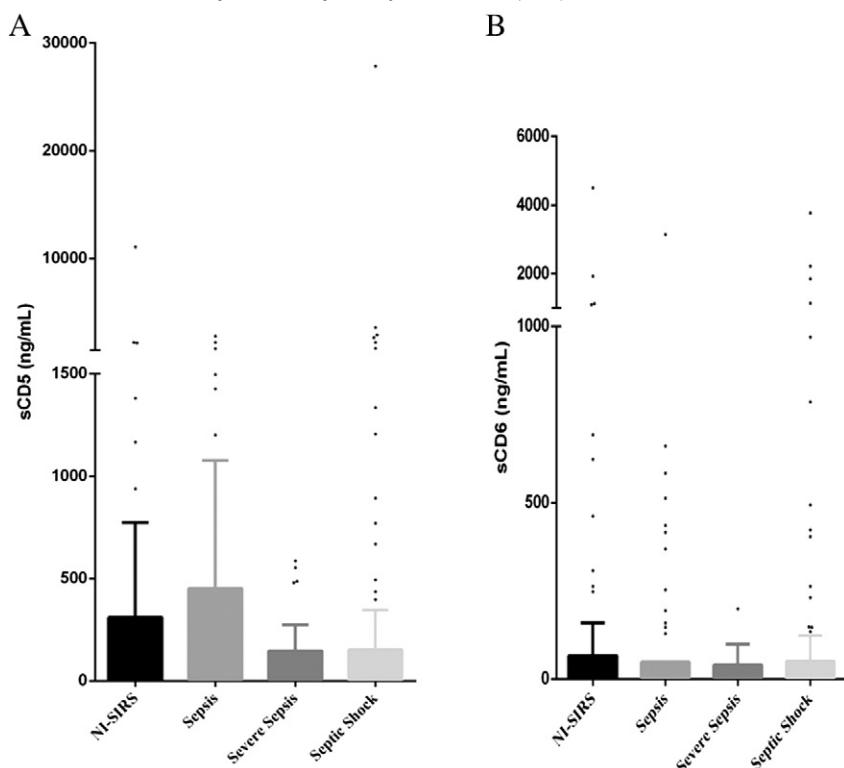
§  $P < .001$  compared with severe sepsis.

¶  $P < .01$  compared with severe sepsis.

||  $P < .05$  compared with severe sepsis.

#  $P < .01$  compared with noninfectious SIRS.

\*\*  $P < .05$  compared with noninfectious SIRS.



**Fig. 2.** Distribution of sCD5 (2A) and sCD6 (2B) levels according to diagnostic category. NI-SIRS: Non-infectious Systemic Inflammatory Response Syndrome. Data are expressed as median and interquartile range. Comparisons were made using the Kruskal-Wallis test.

The median and mean sCD5 values were 10 and 439.2 ng/mL, respectively (range, 0–27860), and 107 (49.1%) patients had undetectable levels.

Regarding the sCD6 levels, the median and mean values were 8.5 and 156.5 ng/mL, respectively (range, 0–4499); and in 99 (45.4%) patients, the levels were undetectable.

There was a strong correlation between the levels of sCD5 and sCD6 ( $r = 0.6$ ,  $P = .01$ ), and there were no statistically significant differences between any clinical variable between patients with and without detectable sCD5 or sCD6 levels (data not shown).

We analyzed the levels of sCD5 and sCD6 according to different clinical features. There were no statistically significant differences in sCD5 or sCD6 levels regarding sex, diagnostic category (noninfectious SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock), the presence of bacteremia during hospitalization, type of microorganism (if any was isolated), site of infection, need for renal replacement therapy, mechanical ventilation, or length of ICU stay, among others (Table 2).

We found a significant positive correlation between the  $\Delta$  SOFA score and sCD5 (and a marked trend with sCD6) levels regardless of the diagnostic group (Table 3). However, no significant correlations were found with other quantitative variables at admission such as C-reactive protein (CRP); total lymphocyte count; and APACHE II, SAPS II, or SOFA scores. Only sCD6 levels significantly correlated with glucose levels at ICU admission.

Taking into account the high number of patients with undetectable levels of both sCD5 and sCD6, we also performed the data analysis excluding these patients; but the differences continued to be nonsignificant.

Finally, we stratified patients into 2 groups according to sCD5 and sCD6 levels: group 1 (0–1499 ng/mL) and group 2 ( $\geq 1500$  ng/mL). Patients in group 2 required more renal replacement therapy ( $P = .04$ ).

### 3.3. sCD5 and sCD6 levels and outcome

There were no differences between sCD5 and sCD6 levels among ICU survivors and nonsurvivors. However, in the logistic regression analysis,

we found that sCD6 but not sCD5 levels were associated with an increased risk of death in the ICU (odds ratio [OR], 1.001; 95% confidence interval [CI], 1.000–1.001;  $P = .007$  for sCD6; OR, 1.0001; 95% CI, 0.9999–1.0003;  $P = .33$  for sCD5).

There were no differences between sCD5 and sCD6 levels among patients who died during hospitalization and those who survived after ICU discharge.

When we stratified patients into 2 groups according to sCD5 and sCD6 levels greater than or less than 1500 ng/mL, we found that those with levels of at least 1500 ng/mL presented higher in-ICU mortality for both sCD5 (13.1% vs 41.67% for groups 1 and 2, respectively;  $P < .05$ ) and sCD6 (13% vs 66.67% for groups 1 and 2, respectively;  $P < .05$ ) (Fig. 3).

## 4. Discussion

In this study, we assessed sCD6 and sCD5 levels in a population of critically ill patients with infectious and noninfectious SIRS and evaluated their relationship with different clinical features and outcome. The main findings were that sCD6 levels were associated with an increased risk of mortality and that both sCD5 and sCD6 levels had a good correlation with the evolution of MODS measured by the  $\Delta$  SOFA score. Moreover, those patients with sCD5 or sCD6 levels greater than 1500 ng/mL presented higher in-ICU mortality.

Soluble forms of CD5 and CD6 act as pattern recognition receptors for microbial cell wall components of fungal (sCD5) [16] or bacterial (sCD6) origin [9,10], and recent experimental studies have demonstrated that they are potential targets in the treatment of sepsis [9,10,16]. In an experimental animal model of IP injection of lipopolysaccharide, prophylactic administration of a recombinant soluble form of CD6 (shCD6) induced a significant reduction in plasma levels of proinflammatory cytokines, a significant increase in plasma levels of anti-inflammatory cytokines, and a significant improvement in the survival rate of the mice compared with controls [9,10]. Similarly, administration of shCD5 in a mouse model of SIRS of fungal origin induced by IP zymosan

**Table 2**

Levels of sCD5 and sCD6 levels according to different clinical features

Variables	n	sCD5 (ng/mL)	sCD6 (ng/mL)
Sex			
Men	139	3 (262)	9 (66)
Women	79	22 (297)	8 (48)
Bacteremia			
Yes	27	54 (436)	13 (123)
No	191	0 (255)	8 (51)
Need for renal replacement therapy			
Yes	25	0.0 (425)	13 (413)
No	193	22 (265.5)	8 (42.5)
Need for mechanical ventilation			
Yes	162	3 (270)	8 (50)
No	56	22 (30)	10 (60)
Need for parenteral nutrition			
Yes	45	0.0 (41.5)	0.0 (23.5)
No	173	26 (318)*	10 (63.5)
Use of corticosteroids in the last month			
Yes	26	0.0 (32)	3 (57)
No	192	22 (270)	9 (51)
Site of infection			
Cardiovascular	2	0.0 (0–0)	0.0 (0–0)
Cutaneous	4	28.5 (43)	11.5 (10)
Digestive	23	3 (274)	3 (77)
Pulmonary	110	1.5 (300)	10 (51)
Central nervous system	12	81 (893)	10.5 (153)
Urinary	11	0.0 (71)	13 (39)
No infection	56	19.5 (274)	4 (68.25)
Isolated germ			
No isolated germ	96	0.0 (286.5)	0.0 (68)
Gram-negative bacilli	60	30 (182)	11 (49)
Gram-positive bacilli	49	3 (332)	10 (50)
Fungal infection	6	218 (862)	41 (502)
Virus	4	131 (1724)	11 (282)
Parasites	3	0.0 (0–0)	0.0 (0–0)
Diagnostic category			
Septic shock	83	0.0 (154)	2 (51)
Severe sepsis	25	0.0 (146)	0.0 (40)
Sepsis	51	43 (452)	12 (48)
Noninfectious SIRS	59	26 (311)	10 (66)
Prognosis			
Survivor	186	11 (256)	9.5 (50)
Nonsurvivor	32	8.5 (473)	4 (327)

Data are expressed as median and interquartile range for quantitative variables.

\* P &lt; .05.

resulted in a significant reduction in the toxicity score, peritoneal leukocyte infiltration, and serum levels of proinflammatory cytokines, and also increased the survival rate [16]. However, to the best of our knowledge, no human study had evaluated the role of sCD5 and sCD6 in sepsis to date.

Our study shows some interesting results. Almost half of the patients presented undetectable levels of both sCD5 (49.1%) and sCD6 (45.4%). A similar proportion has previously been described by Ramos-Casals et al [22] in patients with Sjögren syndrome and also in healthy individuals (50% undetectable, with lower titers). As we could not demonstrate any demographic, clinical, or biological differences among patients with undetectable vs detectable levels, genetic factors may account for this diversity.

There were no significant differences regarding the levels of both sCD5 and sCD6 between patients with septic syndromes and noninfectious SIRS. That could suggest that the cause of their increase is inflammation whether the cause is infectious or not.

We also observed that, although we could not find correlations with the APACHE II, SAPS II, APS, or SOFA scores at admission, the levels of both sCD5 and sCD6 (the latter not significant but with a marked trend) had a good positive correlation with Δ SOFA. There is evidence that Δ SOFA is associated with prognosis even more than SOFA at admission [18,21]. That is, patients with higher sCD5 and sCD6 levels presented a higher risk of increase in their degree of MODS regardless of the initial score. Furthermore, logistic regression analysis showed that

**Table 3**

Correlation between sCD5 and sCD6 levels and quantitative variables

Variables at ICU admission	sCD5	sCD6		
	Correlation coefficient <sup>a</sup>	P	Correlation coefficient <sup>a</sup>	P
Age, y	0.013	.85	0.13	.06
Glucose, mg/dL	0.051	.45	<b>0.24</b>	<.01
CRP, mg/dL	-0.14	.14	-0.13	.18
Lymphocyte count, 10 <sup>6</sup> /L	-0.02	.8	-0.006	.93
Platelet count, 10 <sup>6</sup> /L	0.024	.73	0.05	.44
SOFA score	-0.085	.22	-0.07	.3
Δ SOFA score	<b>0.15</b>	<b>.03</b>	<b>0.12</b>	<b>.08</b>
SAPS II score	-0.01	.89	0.06	.38
Δ SAPS II score	0.06	.4	0.055	.42
APACHE II score	0.064	.35	0.08	.24
ΔAPACHE II	-0.11	.1	0.013	.85
APS	0.013	.9	0.02	.8
ICU length of stay	-0.012	.86	-0.022	.74
Hospital length of stay	0.04	.56	0.08	.25

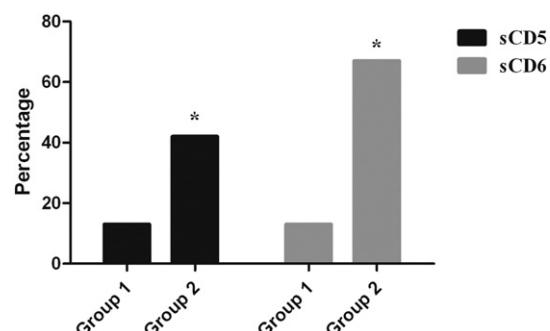
<sup>a</sup> Spearman ρ.

higher levels of sCD6, but not sCD5, were associated with an increased risk of mortality. However, given the values obtained (OR, 1.001; 95% CI, 1.000–1.001; P = .007) for sCD6, the clinical relevance of this result should be interpreted with caution.

We found that sCD6 correlated with glucose levels. We do not know of any previously published association between these 2 molecules. A logistic regression model including blood glucose and sCD6 was performed, and only sCD6 remained significantly associated with mortality. Therefore, we can conclude that association of sCD6 with mortality was independent of glucose levels.

Given previous experimental data [9,10] where infusion of shCD6 improved the survival of septic mice, our results seem contradictory. However, there exist some differences that can explain such controversy. First, the amounts of shCD6 administered to the septic animals (1.25 mg/kg) resulted in sCD6 serum levels far above (micromoles-per-liter range) the expected baseline levels (picomoles/nanomoles-per-liter range) in those mice [9,10]. Second, sCD6 was administered in the mice before the septic insult, whereas we measured sCD6 levels once the sepsis is established. One could speculate that only very high and prompt levels could be beneficial.

In our opinion, the association of increased levels of sCD6 and in-ICU mortality could be due to 2 different scenarios. On the one hand, our in vitro data and previous works indicate that sCD6 (and sCD5) may result from proteolytic cleavage of the membrane-bound form following polyclonal T-cell activation [13,23] and then they can selectively inhibit the T cell proliferation [13]. We could hypothesize that this is as a control mechanism of the host to avoid hyperinflammation, but an excessive counterregulation of T cells could cause a "hypoinflammatory" state responsible for increased mortality [24–26]. On the other hand, the



**Fig. 3.** In-ICU mortality according to the stratification of sCD5 and sCD6 levels. Group 1: 0 to 1499 ng/mL; group 2: greater than 1500 ng/mL. \*P < .05 with respect to the other groups.

increased levels of sCD6 (and sCD5) that we have shown in humans could be not an adaptive response but a consequence of the widespread apoptosis that happens during the acute phase of the disease [27,28]. Programmed death of lymphocytes in these patients could therefore increase the release of CD5 and CD6 from their surface. Favoring this hypothesis, patients with septic shock had the lowest level of circulating lymphocytes (Table 1) [26]. However, there was no correlation between sCD5 or sCD6 levels and lymphocyte count.

Interestingly, only the sCD6 levels were associated with mortality. Although both could be released when T cells are activated, it seems that sCD6 is more related to bacterial infections, whereas sCD5 is more related to fungal agents [9,10,16]. Most of the infections in our patients (50%) were of bacterial origin (Table 2), which could explain this difference.

Our study has several important limitations. Because it is the first time that sCD5 and sCD6 are evaluated in critically ill patients with SIRS, we cannot know if our sample size was big enough to find more differences. Moreover, we only analyzed one sample at admission. Perhaps, the levels of sCD5 and sCD6 present marked oscillations in time that could be more associated with prognosis or, contrarily, make the relation we found merely spurious. Another potential limitation of the study is that we did not use non-SIRS ICU patients, non-ICU-admitted patients, or healthy age- and sex-matched controls to compare with our patients. This may partly explain why we were unable to discern many significant correlations between sCD5 and sCD6 levels and disease outcomes in the different patient populations. Finally, it would have been very interesting to evaluate the correlation between the levels of sCD5 and sCD6 and the inflammatory molecules involved in infectious and noninfectious SIRS, similar to animal models [9,10,16]. However, the study was oriented to make a description for the first time of sCD5 and sCD6 molecules in critically ill septic patients; and their exact role in sepsis needs further research.

In conclusion, sCD5 and sCD6 levels in critically ill patients with SIRS present a high variation and an elevated proportion of undetectability. Levels of sCD6 but not sCD5 are associated with an increased risk of mortality in critically ill patients with SIRS, either infectious or not.

## Acknowledgments

The work by Francisco Lozano was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-19717), Generalitat de Catalunya (2009SGR1101), and the Instituto de Salud Carlos III (REIPI, RD06/0008/1013, and RD12/0015/0018).

Mario Martínez-Florensa and Cristina Escoda-Ferran are recipients of fellowships from the Generalitat de Catalunya (2010TEM37) and the Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2008-005544), respectively.

The work by Esther Carrasco was supported by grants from the Spanish Ministry of Education (JCI-2008-3294).

## References

- [1] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003;31:1250–6.
- [2] Riedemann NC, Ward PA. Anti-inflammatory strategies for the treatment of sepsis. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:339–50.
- [3] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138–50.
- [4] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303–10.
- [5] Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1197–205.
- [6] Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, et al. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8810–4.
- [7] Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskron U, Lozano F. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 2004;24:1–37.
- [8] Aruffo A, Bowen MA, Patel DD, Haynes BF, Starling GC, Gebe JA, et al. CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 1997;18:498–504.
- [9] Martínez-Florensa M, Consuegra-Fernandez M, Martínez VG, Cañadas O, Armiger-Borràs N, Bonet-Rosselló L, et al. Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6. *J Infect Dis* 2014;209:1077–86.
- [10] Sarrias MR, Farnós M, Mota R, Sánchez-Barbero F, Ibáñez A, Gimferrer I, et al. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11724–9.
- [11] Carmo AM, Castro MA, Arosa FA. CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells. *J Immunol* 1999;163:4238–45.
- [12] Calvo J, Places L, Espinosa G, Padilla O, Vilà JM, Villamor N, et al. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 1999;54:128–37.
- [13] Gimferrer I, Calvo M, Mittelbrunn M, Farnós M, Sarrias MR, Enrich C, et al. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 2004;173:2262–70.
- [14] Hassan NJ, Barclay AN, Brown MH. Frontline: optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 2004;34:930–40.
- [15] Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R, Parnes JR, Leeuwen FN, Figdor CG. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 2006;107:3212–20.
- [16] Vera J, Fenutria R, Canadas O, Figueras M, Mota R, Sarrias MR, et al. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1506–11.
- [17] Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988;16:128–40.
- [18] Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001;286:1754–8.
- [19] Kajdacsy-Balla Amaral AC, Andrade FM, Moreno R, Artigas A, Cantraine F, Vincent JL. Use of the Sequential Organ Failure Assessment score as a severity score. *Intensive Care Med* 2005;31:243–9.
- [20] Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonça A, Cantraine F, Thijss L, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 1999;25:686–96.
- [21] Sakr Y, Lobo SM, Moreno RP, Gerlach H, Ranieri VM, Michalopoulos A, et al. Patterns and early evolution of organ failure in the intensive care unit and their relation to outcome. *Crit Care* 2012;16:R222 [1–9].
- [22] Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Calvo J, Places L, Padilla O, et al. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:1056–9.
- [23] Gimferrer I, Farnós M, Calvo M, Mittelbrunn M, Enrich C, Sánchez-Madrid F, et al. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* 2003;278:8564–71.
- [24] van der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 1995;3:1–12.
- [25] Mira JP, Carion A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282:561–8.
- [26] Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011;306:2594–605.
- [27] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230–51.
- [28] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Shmieg Jr RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952–63.

**Artículo 4:** Aibar J, Castro P, Espinosa G, Fernández S, Hernández C, Rinaudo M, Butjosa M, Tàssies D, Reverter JC, Nicolás JM. ADAMTS-13 in critically ill patients with Septic Syndromes and Noninfectious Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Shock* 2015; 2015; 43(6):556-62.



## ADAMTS-13 IN CRITICALLY ILL PATIENTS WITH SEPTIC SYNDROMES AND NONINFECTIOUS SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME

Jesús Aibar,\* Pedro Castro,\* Gerard Espinosa,† Sara Fernández,\* Cristina Hernández,\* Mariano Rinaudo,\* Montserrat Butjosa,\* Dolors Tàssies,‡ Joan Carles Reverter,‡ and Josep Maria Nicolás\*

\*Medical Intensive Care Unit, †Department of Autoimmune Diseases, and ‡Department of Hemotherapy and Hemostasis, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain

Received 3 Oct 2014; first review completed 5 Nov 2014; accepted in final form 16 Jan 2015

**ABSTRACT—Purpose:** Decreased ADAMTS-13 (A Disintegrin and Metalloprotease with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) seems to be associated with a poor prognosis in sepsis. However, its role in different septic syndromes and other causes of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) remains unclear. The aims of this study were to assess ADAMTS-13 levels in patients with septic syndromes or noninfectious SIRS and to determine their association with morbidity and mortality.

**Methods:** The study population consisted of 178 patients admitted to the medical intensive care unit presenting either septic syndromes or noninfectious SIRS. ADAMTS-13 levels were analyzed. **Results:** Patients with septic syndromes showed significantly lower levels of ADAMTS-13 compared with those with noninfectious SIRS ( $P = 0.014$ ). Patients with severe sepsis or septic shock presented lower levels than those of patients with sepsis ( $P = 0.086$ ). A significant negative correlation was found between ADAMTS-13 levels and delta Sequential Organ Failure Assessment and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II scores at admission in the septic patients. Patients who died had significantly lower levels of ADAMTS-13 compared with survivors, both in the whole population and among the septic patients ( $P = 0.002$  and  $P = 0.009$ , respectively). Logistic regression analysis showed that decreased ADAMTS-13 levels were associated with an increased risk of in-intensive care unit mortality (odds ratio, 0.985; 95% confidence interval, 0.973–0.998;  $P = 0.023$ ). **Conclusions:** Septic patients have lower levels of ADAMTS-13 than do patients with noninfectious SIRS. Levels of ADAMTS-13 are correlated with illness severity in patients with septic syndromes. ADAMTS-13 levels were associated with an increased risk of mortality in critically ill patients with SIRS especially those with septic syndromes.

**KEYWORDS**—ADAMTS-13 protein, human, sepsis, severe sepsis, septic shock, systemic inflammatory response syndrome

## INTRODUCTION

Sepsis is a clinical syndrome characterized by systemic inflammation secondary to infection (1). There is a continuum of severity from sepsis to severe sepsis and septic shock. Despite mortality by septic shock has decreased over the last decade, it remains high even with optimal treatment (2–5).

The endothelium is a cornerstone in the pathophysiology of sepsis (6). Under normal conditions, endothelial cells inhibit coagulation, prevent platelet aggregation as well as adherence and migration of blood cells, and regulate vascular tone and permeability (7, 8). Endothelial activation, which is present in sepsis because of several cytokines and other inflammatory mediators, can induce a procoagulant state that is associated with widespread microvascular injury and thrombosis (7, 9).

The von Willebrand factor (VWF), a multimeric protein, is involved in this process (10, 11). It is released from the stimulated endothelium as unusually large multimers (UL-VWF) (12). ADAMTS-13 (A Disintegrin and Metalloprotease with a ThromboSpondin type 1 motif, member 13) is the protease that cleaves the UL-VWF (13), generating smaller forms normally found in the blood circulation (14, 15). The decrease in the activity of ADAMTS-13 results in the persistence of UL-VWF and the formation of microvascular platelet thrombi in small arterioles resulting in microvascular ischemia and organ failure in throm-

bolic thrombocytopenic purpura (TTP) (14, 15). Although severe deficiency of ADAMTS-13 appears to be a specific finding of TTP (16, 17), mild or moderate deficits of its activity have been described in several clinical situations such as disseminated intravascular coagulation (18), thrombocytopenic disorders other than TTP (16), ischemic stroke (19), patients with coronary artery disease (20), arterial thrombosis (21), liver cirrhosis, pregnancy, after surgery, in newborns, and in some healthy subjects (22).

Recently, some studies have also shown a decreased activity (7, 9, 23, 24) or antigen levels (9) of ADAMTS-13 in sepsis. However, the pattern of ADAMTS-13 levels in different septic syndromes and their differences with other causes of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) of noninfectious origin in critically ill patients have not been evaluated.

We designed this study to explore a potential role of ADAMTS-13 in the pathophysiology of sepsis, with the aim of assessing and comparing ADAMTS-13 levels in critically ill patients with different septic syndromes (sepsis, severe sepsis, and septic shock) and noninfectious SIRS, as well as evaluate their relationship (if any) with severity of illness, patient outcome, and mortality.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

We conducted a nonrandomized observational prospective cohort study in a university hospital in Barcelona (Hospital Clinic of Barcelona). All patients consecutively admitted to the medical intensive care unit (ICU) of the Hospital Clinic of Barcelona during an 8-month period with a septic syndrome or noninfectious SIRS at admission or within the first 48 h were included. Patients with an ICU stay of less than 48 h, human immunodeficiency virus infection, hematologic malignancy, cardiac arrest with or without therapeutic hypothermia, or diagnosis of brain death

Address reprint requests to Pedro Castro, MD, PhD, Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: pcastro@clinic.ub.es.  
DOI: 10.1097/SHK.0000000000000341

Copyright © 2015 by the Shock Society

and those who presented an irreversible short-term fatal disease or in whom futile care was decided were excluded. The patients were followed up until hospital discharge.

Epidemiologic data, the primary site of infection, and infection-related organisms were recorded. Severity indexes including the APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) score, the SAPS II (Simplified Acute Physiologic) score, and the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score were calculated at ICU admission and thereafter on a daily basis. Delta ( $\Delta$ ) SOFA (maximum SOFA score minus SOFA score at admission) was also calculated (25, 26). Multiorgan failure was considered in case of acute progressive dysfunction of two or more organ systems, with a minimum failure score of three points for each organ.

For analysis purpose, patients were categorized based on the presence of noninfectious SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock according to the Society of Critical Care Medicine/European Society of Intensive Care Medicine/American College of Chest Physicians/American Thoracic Society/Surgical Infection Society consensus conference definitions (1). Clinical infections were defined according to the Centers for Diseases Control and Prevention criteria (27).

The protocol was approved by the institutional review board of the Hospital Clinic of Barcelona. Informed consent was obtained from the patients or their relatives within 24 h after admission, and none refused to participate. Blood samples and the information used in the study were coded, and patient confidentiality was preserved.

### Laboratory studies

Samples of venous blood were collected in 3.8% sodium citrate. Platelet-poor plasmas were obtained by centrifugation and immediately aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

ADAMTS-13 was measured by a commercially available chromogenic method (IMUBIND ADAMTS13 ELISA; American Diagnostica, Stamford, Conn) in a blinded fashion. In brief, diluted plasma samples (1:10) were added to 96-microwell plates coated with a rabbit polyclonal antibody against ADAMTS-13 and incubated for 150 min at room temperature on an orbital shaker with agitation (at 250 revolutions/min [rpm]). After washing, a biotinylated rabbit anti-ADAMTS-13 polyclonal antibody was added and incubated for 1 h at room temperature on an orbital shaker with agitation (at 250 rpm). A streptavidin-horseradish peroxidase conjugate was then added for 1 h at room temperature on an orbital shaker with agitation (at 250 rpm) to complete the formation of the antibody-enzyme detection complex. The ADAMTS-13 protein captured on the plate was revealed by incubation (8 min at room temperature) with a perborate-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate dilution. The reaction was stopped by adding sulfuric acid (0.5 M) to the wells. Microwell absorbances were read at 450 nm, and the value was extrapolated with those of a standard curve. In our population, the median of ADAMTS-13 levels in citrated plasma from 50 healthy volunteers was 222.5 ng/mL (interquartile range [IQR], 131.75–354.25 ng/mL), with intra-assay and interassay coefficients of variation of 4.9% and 7.4%, respectively (28).

For hemostasis studies, blood was collected in 3.8% sodium citrate-containing tubes (Becton Dickinson, San Jose, Calif). Samples were centrifuged, and platelet-poor plasma aliquots were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time were determined in an automated BCS XP analyzer (Siemens, Marburg, Germany) using standard reagents (Thromborel and Actin FS; Siemens). Fibrinogen was measured by the Clauss technique. For platelet counts blood was collected in K<sub>2</sub> EDTA-containing tubes (Becton Dickinson) and determined in an Advia 2120 analyzer (Siemens, Deerfield, Ill).

### Statistical analysis

Results are expressed as mean and SD for quantitative variables that follow a normal distribution and as median and IQR (25th–75th percentiles) otherwise. Qualitative variables are expressed as percentages. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

Because the plasma levels of ADAMTS-13 did not follow a normal distribution, nonparametric tests were used for all statistical analyses including this variable. Correlation studies were performed using Spearman  $\rho$  and comparison of the sum of ranks with the Mann-Whitney  $U$  and Kruskal-Wallis tests. In comparisons including only variables with a normal distribution, a Student  $t$  test was used.

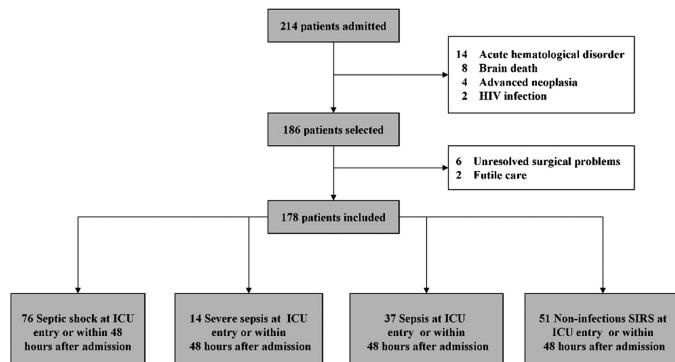
$\chi^2$  And Fisher tests were used to compare qualitative variables. A logistic regression model including ADAMTS-13 levels and other hemostatic parameters (platelets, prothrombin, fibrinogen, and activated partial thromboplastin time) was used to assess if they were independently associated with ICU mortality.

All tests were performed with a bilateral significance level of  $P < 0.05$ . Statistical analysis was done with SPSS statistical software (version 18.0.0; SPSS Inc, Chicago, Ill).

## RESULTS

### Baseline patient characteristics

During the study period, 214 patients were admitted to the ICU, and 178 were included (Fig. 1). All the subjects were of



**FIG. 1. Flowchart of the patients in the study according to inclusion criteria.** All patients consecutively admitted to the medical ICU during an 8-month period with a septic syndrome or noninfectious SIRS at admission or within the first 48 h were included. HIV indicates human immunodeficiency virus.

white descent, living in or around Barcelona (Catalonia, Spain). Seventy-six patients (42.7%) had septic shock, 14 (7.86%) severe sepsis, 37 (20.8%) sepsis, and 51 (28.65%) noninfectious SIRS at ICU admission or within the following 48 h (Fig. 1). The main epidemiologic and clinical data of the patients are shown in Table 1. The mean age of the patients was  $62.9 \pm 15.67$  years (range, 18–85 years), and 61.2% were men. The mean APACHE II, SAPS II, and SOFA scores at ICU admission were  $17.0 \pm 6.4$ ,  $38.2 \pm 12.3$ , and  $8.6 \pm 3.2$ , respectively.

We compared the patient characteristics among the different groups (sepsis, severe sepsis, septic shock, and noninfectious SIRS) (Table 1). There were no statistically significant differences regarding age, sex, or primary site of infection. The APACHE II and SOFA scores were lower in patients with sepsis compared with the other groups ( $P < 0.05$ ). The length of ICU stay was shorter in patients with sepsis and noninfectious SIRS compared with patients with severe sepsis and septic shock ( $P < 0.02$ ).

Intensive care unit mortality was 14.0% (25 patients), mainly due to multiorgan failure (84.0%). It was significantly higher in septic shock patients (25.0%) compared with patients with sepsis (5.4%) and noninfectious SIRS (3.9%). Conversely, in-hospital mortality among ICU survivors was higher, albeit not statistically significant, in patients with noninfectious SIRS (15.7%) compared with patients with septic shock (6.6%). The overall hospital mortality was 21.9%. Regarding the cause of death in the ICU, most patients with septic syndromes died because of multiple organ failure (91.3%), whereas the cause of in-ICU death of patients with noninfectious-SIRS (two of 51 patients) was cardiovascular collapse (100%).

### ADAMTS-13 levels and patients characteristics

The median value of ADAMTS-13 levels in our population was 85.22 ng/mL (IQR, 58.4–116.11 ng/mL). The values did not follow a normal distribution, even after logarithmic transformation.

We analyzed ADAMTS-13 levels according to different clinical features. There were no statistically significant differences in ADAMTS-13 levels regarding sex, site of infection, presence of bacteremia during hospitalization, need for mechanical ventilation, or renal replacement therapy, among others (Table 2).

We also evaluated possible correlations between ADAMTS-13 levels and other quantitative variables (Table 3). We did not find correlation with any of the parameters studied except for fibrinogen and length of ICU stay.

TABLE 1. Characteristics of the patients included in the study

	Septic shock (n = 76)	Severe sepsis (n = 14)	Sepsis (n = 37)	Noninfectious SIRS (n = 51)	P*
Age, median (IQR), y	67 (22)	72 (21)	61 (27)	70 (24)	NS
Sex, n (%) of men	50 (65.8)	7 (50)	19 (51.4)	33 (64.7)	NS
APACHE II score	18.6 (6.2)	17.3 (6)	13.2 (6.5)	17.4 (5.5)	<0.05
SAPS II score	42.3 (12.1)	44 (13)	31 (12)	35.6 (9.4)	<0.05
SOFA score	10.2 (2.9)	8.7 (3.3)	6.3 (2.7)	7.7 (2.4)	<0.05
Surgery <sup>†</sup>	22 (28.9)	6 (43)	7 (18.9)	19 (37.3)	NS
Heart failure NYHA IV	1 (1.3)	1 (7.1)	0	10 (19.6)	<0.05
Chronic respiratory disease	25 (32.9)	7 (50)	11 (29.7)	16 (31.4)	<0.05
Chronic kidney failure	1 (1.3)	0	0	0	<0.05
Liver cirrhosis	5 (6.6)	0	0	2 (3.9)	<0.05
Site of infection					
Respiratory	42 (55.3)	10 (71.4)	23 (62.2)	NA	NS
Digestive	14 (18.4)	2 (14.3)	4 (10.8)	NA	NS
Urinary	8 (10.5)	0	1 (2.7)	NA	NS
Central nervous system	4 (5.3)	1 (7.1)	2 (5.4)	NA	NS
Cutaneous	2 (2.6)	1 (7.1)	1 (2.7)	NA	NS
Cardiovascular	2 (2.6)	0	0	NA	NS
Others	4 (5.3)	0	6 (16.2)	NA	NS
Glucose, mg/dL	182 (86)	186 (93)	192.1 (106)	207.6 (109)	NS
CRP, mg/dL	23.3 (13.7), n = 40	10.8 (5.8), n = 6	12.9 (8.6), n = 18	5.2 (5.7), n = 14	<0.05
Platelet count, $\times 10^9/L$	178.18 (127)	201.8 (91)	195 (118)	171.3 (86.3)	NS
Partial thromboplastin time, s	34.11 (5.1)	32.3 (4.8)	29.6 (4.4)	33.7 (9.2)	<0.001
Prothrombin time, %	65.76 (16.3)	71.07 (22.3)	81.4 (17.8)	73.8 (19.7)	<0.001
Fibrinogen, g/L	5.7 (2.7)	5.2 (1.45)	4.87 (1.9)	4.26 (1.6)	<0.05
Lymphocytes, cells $\times 10^6/L$	910.9 (907.1)	811.4 (705.3)	1,525.1 (1,746)	1,300.4 (881)	0.001
Length of ICU stay, d	12.3 (10.9)	13 (12)	8.41 (6)	7.4 (7.1)	<0.02
Invasive mechanical ventilation during ICU stay	65 (85.5)	13 (93)	24 (65)	39 (76.5)	<0.05
Parenteral nutrition during ICU stay	26 (34.2)	2 (14.3)	7 (18.9)	2 (3.9)	0.001
Need of vasopressors	76 (100)	0 (0)	0 (0)	17 (33.3%)	<0.0015
Renal replacement therapy during ICU stay	13 (17.1)	3 (21.4)	5 (13.5)	2 (3.9)	<0.05
ICU mortality	19 (25)	2 (14.3)	2 (5.4)	2 (3.9)	<0.05
Post-ICU in-hospital mortality	5 (6.6)	1 (7.1)	0	8 (15.7)	NS
Overall hospital mortality	24 (31.6)	3 (21.4)	2 (5.4)	10 (19.6)	<0.05

Data refer to values at admission otherwise indicated. Data are expressed as mean (SD) for quantitative variables and count (percentages) for categorical variables, otherwise indicated.

\*Kruskal-Wallis test for quantitative variables and  $\chi^2$  test for qualitative variables.

<sup>†</sup>Surgery as cause of ICU entry or performed during ICU stay.

NYHA indicates New York Heart Association; CRP, C reactive protein; NA, not applicable; NS, not significant.

#### ADAMTS-13 levels and septic syndromes

The levels of ADAMTS-13 were analyzed by groups according to the presence of a septic process (sepsis, severe sepsis, or septic shock) or noninfectious SIRS.

Patients with septic syndromes showed significantly lower levels of ADAMTS-13 compared with those with noninfectious SIRS. All groups, including noninfectious SIRS, had significantly lower ADAMTS-13 levels than our healthy reference population ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

On the analysis of only septic patients, the more severe the sepsis was, the lower the ADAMTS-13 levels were. Thus,

patients with severe sepsis or septic shock presented lower levels, albeit not statistically significant, than did patients with sepsis ( $P = 0.086$ ). Similarly, among these patients, but not in noninfectious SIRS, a significant negative correlation was found between ADAMTS-13 levels and the APACHE II score at admission (Table 3).

We also found that, among patients with septic syndromes, those with fungi as the etiologic agent presented significantly lower levels of ADAMTS-13 when compared with those with bacteria or virus or without an isolated etiologic agent (Table 2).

TABLE 2. Levels of ADAMTS-13 according to different clinical features

Variables	n	ADAMTS-13 levels, ng/mL	P
Sex			
Men	109	77.34 (60.3)	0.137
Women	69	89.75 (53.04)	
Need for renal replacement therapy			
Yes	23	89.75 (85.1)	0.96
No	155	85 (55.3)	
Need for mechanical ventilation			
Yes	141	79.65 (62.2)	0.42
No	37	97.66 (45.65)	
Need for parenteral nutrition			
Yes	37	64.5 (64.3)	<b>0.007</b>
No	141	87.55 (55.3)	
Use of corticosteroids in the last month			
Yes	24	80.46 (66.1)	0.46
No	154	85.5 (59)	
Bacteremia			
Yes	19	99.5 (69.6)	0.47
No	159	84.13 (54.73)	
Site of infection			
Cardiovascular	2	114.6	0.322
Cutaneous	4	83.76 (21.66)	
Digestive	20	82.77 (55.44)	
Pulmonary	75	74.2 (61.3)	
Central nervous system	7	105 (73)	
Urinary	9	87.77 (63.6)	
No infection	51	95.3 (65.04)	
Microorganism isolated			
No microorganism isolated	79	89.75 (55.84)	<b>0.005</b>
Gram-negative bacilli	51	75.3 (53.2)	
Gram-positive bacilli	38	89.6 (44.6)	
Fungal infection	6	46.3 (16.4)	
Virus	3	122.34	
Parasites	1		
Diagnostic category			
Septic shock	76	76.32 (56.98)	<b>0.027</b>
Severe sepsis	14	73 (68.5)	
Sepsis	37	102 (64)	
Noninfectious SIRS	51	95.03 (65)	

Data are expressed as median and IQR. Comparisons were made using the Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests. Values presented in bold are statistically significant.

### ADAMTS-13 levels and outcome

Lastly, we analyzed the association between ADAMTS-13 levels and outcomes. ADAMTS-13 levels were negatively correlated with ΔSOFA in septic patients: patients with lower levels at admission progressed to multiorgan dysfunction.

Moreover, patients who died either in the ICU or in the hospital after ICU discharge had significantly lower levels of

ADAMTS-13 at ICU admission compared with survivors, both in the whole population or among the septic patients (Fig. 3). The group of noninfectious SIRS showed a nonsignificant trend.

When logistic regression analysis was performed, reduction in the levels of ADAMTS-13 were significantly associated with an increased risk of death in the ICU (odds ratio [OR], 1.02; 95% confidence interval [CI], 1.002–1.03; *P* = 0.023) in the whole population (a decrease of 1 ng/mL in ADAMTS-13 levels was associated with an estimated 1.5% increase in the risk of death). This significance was maintained on including other coagulation parameters (platelets and prothrombin, which were also significantly associated with survival, fibrinogen, and activated partial thromboplastin time, which were not associated with survival). When only septic patients were analyzed, there was a trend toward statistical significance (OR, 1.01; 95% CI, 0.99–1.02; *P* = 0.08). In patients with noninfectious SIRS, the analysis was not significant (OR, 1.06; 95% CI, 0.97–1.16; *P* = 0.204).

### DISCUSSION

In this study, we analyzed and compared ADAMTS-13 levels in a population of critically ill patients with septic syndromes (sepsis, severe sepsis, and septic shock) and noninfectious SIRS, and we assessed their association with different clinical features and outcome.

ADAMTS-13 levels were lower in patients with septic syndromes compared with those with noninfectious SIRS, and patients with septic shock or severe sepsis presented lower levels than did those with sepsis. Furthermore, among septic patients, a significant negative correlation was found between ADAMTS-13 levels and the APACHE II score at admission.

Finally, ADAMTS-13 levels were associated with the ΔSOFA score and mortality, as survivors presented higher levels at admission.

Our findings are supported by previous data in the literature (29, 30). In sepsis induced by cecum ligation and puncture in mice, Lerolle et al. (29) observed that ADAMTS-13 activity decreased after cecum ligation and puncture but not in sham-operated mice. However, no relation was found between mortality and ADAMTS-13 activity.

Regarding human studies, recently Hyseni et al. (23) observed in 275 patients with SIRS (111 [40.4%] had a septic syndrome) that at admission, levels of ADAMTS-13 were not different between patients who survived and those who died. On day 3, however, patients with ADAMTS-13 levels in the highest tertile showed a fourfold decreased mortality rate compared with patients with ADAMTS-13 levels in the lowest tertile. Martin et al. (9) found that patients with sepsis-induced organ failure presented decreased activity and levels of ADAMTS-13 antigen when compared with patients with organ failure of noninfectious origin and control subjects. Moreover, in septic patients (but not in the noninfected), ADAMTS-13 activity was strongly and negatively correlated with APACHE-II and survival, as in our study (9). Fukushima et al. (24) observed that decreased ADAMTS-13 levels during the first week (days 1, 5, and 7) of ICU admission in septic patients were correlated with disease severity scores (APACHE II and maximum SOFA) and outcome. Other studies have also found a decrease in ADAMTS-13 levels

TABLE 3. Correlation between ADAMTS-13 levels and different parameters

Variables at ICU admission	All patients		Septic patients		Noninfectious SIRS	
	Correlation coefficient*	P	Correlation coefficient*	P	Correlation coefficient*	P
Age	-0.11	0.14	-0.07	0.4	-0.34	<b>0.014</b>
Fibrinogen	0.21	<b>0.004</b>	0.26	<b>0.003</b>	0.26	0.065
Platelet count	-0.058	0.44	0.03	0.8	-0.3	<b>0.034</b>
ΔSOFA score	-0.194	<b>0.009</b>	-0.179	<b>0.045</b>	-0.169	0.24
APACHE II score	-0.125	0.1	-0.2	<b>0.03</b>	-0.23	0.11
Length of ICU stay	-0.21	<b>0.006</b>	-0.17	0.055	-0.25	0.07

\*Spearman  $\rho$ . $\Delta$  (Delta calculation) indicates maximum score minus score at admission.

in sepsis, being more pronounced in severe sepsis and septic shock and in patients with more organ failure, both in adults and in pediatric population (31, 32). However, they did not find a correlation between ADAMTS-13 and outcome, probably because of differences in sample size, as these previous studies included less than 40 patients, whereas our study included 127 patients with septic syndromes (90 with severe sepsis or septic shock).

These results suggest a role of ADAMTS-13 in the pathophysiology of sepsis. Decreased levels of ADAMTS-13 in septic patients may have several explanations. One could be the consumption of ADAMTS-13 involved in the proteolysis of UL-VWF at the surface of endothelial cells (15), which is supported by the negative correlation found between the activity of ADAMTS-13 and VWF Ag in patients with sepsis-induced organ dysfunction (9). Another mechanism may be a potential inhibition in the transcription and secretion of ADAMTS-13 induced by proinflammatory cytokines increased in sepsis such as interleukin 6 (IL-6), IL-4, interferon  $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  (9). Other studies have shown that ADAMTS-13 could be digested in vitro by proteases such as thrombin, plasmin, or granulocyte elastases (33). Finally, sepsis-induced liver dysfunction could be an additional mechanism for decreasing ADAMTS-13 synthesis. However, because of the limitations of the study, these explanations are speculative, and they should be interpreted with caution.

Some of these mechanisms can also be shared by noninfectious SIRS, which may explain the decrease in ADAMTS-13 levels that we have shown in these patients. However, why they present a lower reduction compared with the more severe septic syndromes is not clear. Actually, their levels were similar to those of patients with only sepsis (although noninfectious SIRS had a higher APACHE II score). Perhaps patients with severe sepsis and septic shock presented a higher inflammatory response or additional mechanisms, although we did not explore these issues in our study.

The exact role of ADAMTS-13 in the pathophysiology of sepsis and its association with outcome remains to be fully explained. As there is an increase in VWF production in sepsis (10, 32), it is possible that, as occurs in TTP, decreased ADAMTS-13 levels result in the persistence of UL-VWF and consequently the formation of microvascular platelet thrombi in small arterioles resulting in microvascular ischemia and organ failure (15, 16), worsening the prognosis. In our study, we found that septic patients with lower ADAMTS-13 at admission presented progression in multiorgan failure, as their SOFA score increased. The fact that VWF production is not as increased and

ADAMTS-13 levels are not as decreased in noninfectious SIRS could explain why the severity or outcome of these patients is not so clearly associated with ADAMTS-13 levels. This hypothesis is reinforced as the ΔSOFA was not correlated with the levels of ADAMTS-13 in our noninfectious SIRS patients.

We also found that patients with fungal infection had lower levels of ADAMTS-13 compared with those with bacterial infections. To the best of our knowledge, there are no data in the literature that allow the comparison of these data. It is known that different microbes can induce different inflammatory responses (34), and this could have different effects on the levels of ADAMTS-13. However, given the limited sample of these infections (six patients with fungal infection), these data should be interpreted with caution.

Our study has some limitations. We only analyzed the levels of ADAMTS-13 at admission. It would be interesting to know their evolution during ICU stay and their association with outcome as

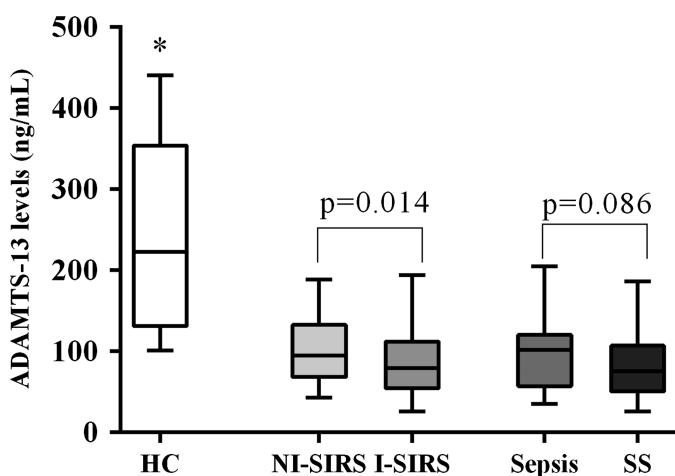
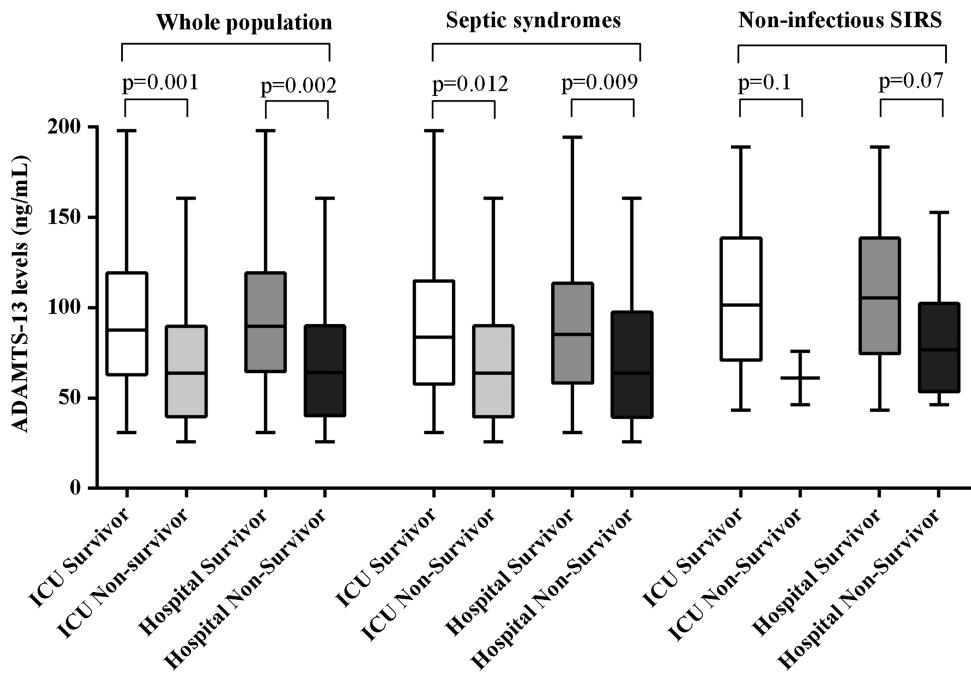


FIG. 2. ADAMTS-13 levels according to diagnostic group. ADAMTS-13 levels of control subjects (data from 50 healthy volunteers from the reference population) and SIRS of infectious and noninfectious origin and sepsis or severe sepsis-septic shock patients were compared. Patients with septic syndromes showed significantly lower levels of ADAMTS-13 compared with those with noninfectious SIRS. All groups, including noninfectious SIRS, had significantly lower ADAMTS-13 levels than did control subjects. Patients with severe sepsis or septic shock presented lower levels, albeit not statistically significant, than did patients with sepsis. HC indicates healthy controls (data from 50 healthy volunteers from the reference population); NI-SIRS, noninfectious SIRS; I-SIRS, infectious SIRS; SS, severe sepsis and septic shock. Data are expressed as median and IQR. Comparisons were made using the Kruskal-Wallis test. \* $P < 0.001$  with respect to the SIRS patients (infectious or not).



**FIG. 3. ADAMTS-13 levels and outcomes.** ADAMTS-13 levels were compared among survivors and nonsurvivors. Patients who died either in the ICU or in the hospital after ICU discharge had significantly lower levels of ADAMTS-13 at ICU admission compared with survivors, both in the whole population or among the septic patients. This comparison in the group of noninfectious SIRS showed a nonsignificant trend. Data are expressed as median and IQR. Comparisons were made using the Kruskal-Wallis test.

in the study by Fukushima et al. (24). Furthermore, we only determined ADAMTS-13 levels, and we did not analyze other molecules that would have been interesting to evaluate such as VWF:Ag, IL-4, IL-6, or tumor necrosis factor  $\alpha$ . Therefore, it is difficult to confirm our physiopathological hypothesis. It has also to be noted that, although significant, the correlation between ADAMTS-13 levels and  $\Delta$ SOFA score was small, with a correlation coefficient of  $-0.179$ , and consequently, the clinical relevance of this result should be interpreted with caution. In addition, we used as control subjects healthy volunteers. Possibly age-matched in-hospital controls patients without SIRS would have been more appropriate. Finally, this study assessed only the antigen levels of ADAMTS-13 and not its activity. However, it has been described that there exists a good correlation between these two measurements in healthy individuals and patients with sepsis (9, 35), contrarily to TTP patients with anti-ADAMTS-13 autoantibodies who may have high levels of ADAMTS-13 antigen with greatly diminished activity (35).

In conclusion, the levels of ADAMTS-13 are decreased in critically ill septic patients compared with patients with noninfectious SIRS and control subjects. Furthermore, these levels are correlated with illness severity and progression of multiorgan failure in these septic patients. Decreased ADAMTS-13 levels were associated with an increased risk of in-ICU mortality in the whole population and in patients with septic syndromes.

## REFERENCES

- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31(4):1250–1256, 2003.
- Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348(2):138–150, 2003.
- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R: Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. *JAMA* 311(13):1308–1316, 2014.
- Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ: Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis. *Crit Care Med* 42(3):625–631, 2014.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 34(2):344–353, 2006.
- Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G: The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 36(8):1286–1298, 2010.
- Kremer Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, Romani de WT, van Mourik JA, Hack CE, ten CH, Reitsma PH, Wuillemin WA, Lammle B: ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 5(11):2284–2290, 2007.
- Hack CE, Zeerleder S: The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 29(Suppl 7):S21–S27, 2001.
- Martin K, Borgel D, Lerolle N, Feys HB, Trinquet L, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Legendre P, Diehl JL, Baruch D: Decreased ADAMTS-13 (A Disintegrin and Metalloprotease with a ThromboSpondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure. *Crit Care Med* 35(10):2375–2382, 2007.
- Rubin DB, Wiener-Kronish JP, Murray JF, Green DR, Turner J, Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Matthay MA: Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *J Clin Invest* 86(2):474–480, 1990.
- Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA: Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 170(7):766–772, 2004.
- Ruggeri ZM: von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1(7):1335–1342, 2003.
- Levy GG, Motto DG, Ginsburg D: ADAMTS13 turns 3. *Blood* 106(1):11–17, 2005.
- Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung DW: Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49):18470–18474, 2006.
- Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, Lopez JA, Cruz MA: ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem* 278(32):29633–29639, 2003.
- Moake JL: Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 347(8):589–600, 2002.
- Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle B: von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 100(2):710–713, 2002.

18. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Takano K, Ohmori T, Sakata Y: Severe secondary deficiency of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* 107(2):528–534, 2006.
19. Bongers TN, de Maat MP, van Goor ML, Bhagwanbali V, van Vliet HH, Gomez Garcia EB, Dippel DW, Leebeek FW: High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke* 37(11):2672–2677, 2006.
20. Chion CK, Doggen CJ, Crawley JT, Lane DA, Rosendaal FR: ADAMTS13 and von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 109(5):1998–2000, 2007.
21. Bongers TN, de Bruijne EL, Dippel DW, de Jong AJ, Deckers JW, Poldermans D, de Maat MP, Leebeek FW: Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients. *Atherosclerosis* 207(1):250–254, 2009.
22. Loof AH, van Vliet HH, Kappers-Klunne MC: Low activity of von Willebrand factor–cleaving protease is not restricted to patients suffering from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 112(4):1087–1088, 2001.
23. Hyseni A, Kemperman H, de Lange DW, Kesecioglu J, de Groot PG, Roest M: Active von Willebrand factor predicts 28-day mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 123(14):2153–2156, 2014.
24. Fukushima H, Nishio K, Asai H, Watanabe T, Seki T, Matsui H, Sugimoto M, Matsumoto M, Fujimura Y, Okuchi K: Ratio of von Willebrand factor propeptide to ADAMTS13 is associated with severity of sepsis. *Shock* 39(5):409–414, 2013.
25. Kajdacsy-Balla Amaral AC, Andrade FM, Moreno R, Artigas A, Cantraine F, Vincent JL: Use of the sequential organ failure assessment score as a severity score. *Intensive Care Med* 31(2):243–249, 2005.
26. Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, Takala J, Sprung C, Antonelli M, Bruining H, et al: The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 25(7):686–696, 1999.
27. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA: CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 36(5):309–332, 2008.
28. Starke R, Machin S, Scully M, Purdy G, Mackie I: The clinical utility of ADAMTS13 activity, antigen and autoantibody assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 136(4):649–655, 2007.
29. Lerolle N, Dunois-Larde C, Badirou I, Motto DG, Hill G, Bruneval P, Diehl JL, Denis CV, Baruch D: von Willebrand factor is a major determinant of ADAMTS-13 decrease during mouse sepsis induced by cecum ligation and puncture. *J Thromb Haemost* 7(5):843–850, 2009.
30. Chauhan AK, Walsh MT, Zhu G, Ginsburg D, Wagner DD, Motto DG: The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood* 111(7):3452–3457, 2008.
31. Karim F, Adil SN, Afafq B, Ul HA: Deficiency of ADAMTS-13 in pediatric patients with severe sepsis and impact on in-hospital mortality. *BMC Pediatr* 13(1):44, 2013.
32. Kayal S, Jais JP, Aguini N, Chaudiere J, Labrousse J: Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 157(3 Pt 1):776–784, 1998.
33. Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA: Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* 105(3):1085–1093, 2005.
34. Moine P, Abraham E: Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 22(4):297–308, 2004.
35. Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, Weber A, Remuzzi G, Dockal M, Plaimauer B, et al: Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost* 95(2):212–220, 2006.





## **DISCUSIÓN**



En la presente Tesis Doctoral hemos evaluado diversos factores genéticos y moleculares implicados en el fracaso multiorgánico y el pronóstico en pacientes críticos con síndromes sépticos (sepsis, sepsis grave o shock séptico): las **moléculas de adhesión**, implicadas en la migración de los PMN al sitio de infección; los **polimorfismos genéticos de la MBL2 y de la MASP2**, implicados en la “susceptibilidad genética” a presentar o no síndromes sépticos; el **sCD5 y sCD6**, que actúan como PRR; y el **ADAMTS-13**, implicado en las alteraciones hemostáticas de la sepsis.

La sepsis es la causa más frecuente de muerte en las UCI no coronarias. Antes de la aparición de las UCI actuales, la sepsis grave y el shock séptico se asociaban a una elevada mortalidad. Afortunadamente, en los últimos años se han conseguido avances importantes en el conocimiento de la epidemiología y la fisiopatología de la sepsis que han permitido mejorías en la supervivencia. Sin embargo, a pesar de los avances en la formación, una mejor vigilancia y monitorización y un inicio precoz del tratamiento antiinfeccioso, la mortalidad por sepsis grave / shock séptico se sitúa todavía entre el 20-30% en la mayoría de las series recientes<sup>1,4,6,151,152</sup>.

La sepsis es la culminación de interacciones complejas entre el microorganismo infeccioso y la respuesta inmune, inflamatoria y de la coagulación del huésped. En la presente Tesis Doctoral se ha intentado caracterizar algunos de los actores implicados en su fisiopatología y su relación con el pronóstico. Para ello diseñamos cuatro trabajos en pacientes críticos mayores de 18 años con el diagnóstico de síndrome séptico o SRIS no infeccioso al ingreso o en las primeras 48 horas del ingreso en la UCI y una duración estimada de la estancia mayor de 48 horas. En el primer trabajo (**Artículo 1**) se analizó la expresión y función de las moléculas de adhesión en células mononucleares de sangre periférica y los niveles séricos de moléculas solubles de adhesión endotelial (implicadas

en la respuesta inmunológica innata) en pacientes con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad, con la intención de valorar su papel en una entidad particular (la neumonía) causante del síndrome séptico. En el segundo trabajo (**Artículo 2**) se evaluó la existencia y relevancia funcional de los polimorfismos genéticos en el gen de la MBL2 y de la MASP2 (también implicadas en la respuesta inmunológica innata) en pacientes con SRIS de origen infeccioso o no. En el tercer trabajo (**Artículo 3**) se analizaron los niveles de CD5 y CD6 soluble (implicados en la respuesta inmunológica innata y adaptativa) en pacientes con síndromes sépticos y con SRIS no infeccioso. Finalmente, en el cuarto trabajo (**Artículo 4**) se evaluaron los niveles de ADAMTS-13 (implicado en la alteración de la coagulación en la sepsis) en pacientes con SRIS de origen infeccioso o no.

Todos los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral son estudios de cohorte prospectivos, observacionales y no randomizados realizados en una UCI médica de un hospital Universitario (Hospital Clínic de Barcelona). Se excluyeron pacientes con una estancia en la UCI menor de 48 horas, pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes con neoplasias hematológicas, pacientes con muerte cerebral y aquellos que presentaban una enfermedad fatal e irreversible en un periodo corto de tiempo o aquellos en los que se decidió limitar el tratamiento de soporte vital. Los pacientes se siguieron hasta el alta hospitalaria, recogiéndose datos epidemiológicos, el lugar primario de la infección y escalas de gravedad, incluyendo el APACHE-II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*)<sup>153,154</sup>, el SAPS-II (*Simplified Acute Physiologic*)<sup>153</sup> y el SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)<sup>155</sup>. Además también se calculó el Delta ( $\Delta$ ) SOFA (SOFA máximo menos SOFA al ingreso)<sup>156-158</sup>. Los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Clínic de Barcelona. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares

dentro de las 24h de ingreso en la UCI. Las muestras sanguíneas y la información utilizada en los estudios fueron codificadas para preservar la confidencialidad de los pacientes.

En el primer estudio (**Artículo 1**) se incluyeron un total de 36 pacientes con sepsis secundaria a neumonía adquirida en la comunidad (NAC) de los cuales 20 (55,6%) presentaban sepsis grave y 16 (44,4%) shock séptico. Planteamos este trabajo porque, como se ha comentado anteriormente, el endotelio vascular juega un papel importante en la fisiopatología de la sepsis. La activación de las células endoteliales tras la exposición a LPS, citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas, entre otros, conduce a un aumento en la rodadura, adhesión y transmigración de los leucocitos al tejido lesionado. Las moléculas de adhesión son las responsables de esta adhesión de los PMN al endotelio. Aunque estas moléculas han sido ampliamente estudiadas en la sepsis, no hay estudios que hayan evaluado su expresión en pacientes con diferentes síndromes sépticos secundarios a una causa específica, como la neumonía adquirida en la comunidad. Además, y también de forma innovadora, analizamos la función de adhesión de los monocitos y linfocitos de estos pacientes, antes y tras la estimulación con TNF- $\alpha$  y LPS.

En este trabajo se analizó la expresión y función de las moléculas de adhesión en PBMC (VLA-4, LFA-1, Mac-1 y Sialyl Lewis X en linfocitos y monocitos, y MCP-1 en monocitos) y los niveles séricos de moléculas solubles de adhesión endotelial (sP-selectina, sE-selectina, sVCAM-1 y sICAM-1), observando alteraciones que pudiesen estar asociadas con el pronóstico.

Los pacientes sépticos tenían niveles superiores de sVCAM-1, sICAM-1 y sE-selectina, especialmente aquellos con shock séptico, y menores de sP>Selectina(comparados con los controles sanos). Además, los pacientes con shock

séptico que fallecieron, tenían unos niveles de sE-Selectina menores que los que sobrevivieron.

Tanto sE-Selectina, como sVCAM-1 y sICAM-1 han sido ampliamente estudiadas en sepsis, con resultados que en ocasiones han sido inconsistentes y a veces contradictorios, probablemente debido a diferencias en las poblaciones de estudio y en el momento exacto de la enfermedad en el que se analizaron dichas moléculas<sup>23,24,27,47,49,57,159-163</sup>.

Así, diversos autores han relacionado los niveles de sE-Selectina, sVCAM-1 y sICAM-1 con la gravedad de la sepsis, de forma que cuanto más alto son los niveles, más grave es el proceso<sup>27,47,48,55,56</sup>. Sin embargo, Schuetz P y cols.<sup>164</sup>, en un estudio de cohortes de 161 pacientes, hallaron esta relación para la sE-Selectina pero no para sVCAM-1 o sICAM-1.

Respecto al pronóstico también existen discrepancias en el rol preciso de estas moléculas de adhesión. Autores como Kayal S y cols.<sup>27</sup> en sepsis en general y Knapp S y cols.<sup>163</sup> en pacientes con meningitis hallaron que los niveles de sICAM-1 eran un predictor independiente de mortalidad, pero no los de sE-Selectina ni sVCAM-1, mientras que otros como Cowley y cols.<sup>56</sup> han hallado relación tanto de la sE-Selectina como de la sICAM-1 con el SDOM y la mortalidad. Contrariamente, otros estudios no han hallado relación o han demostrado la relación inversa. Briassoulis y cols.<sup>165</sup> demostraron en niños con sepsis, que los niveles elevados de sICAM-1 se asociaron con un mejor pronóstico y mejores tasas de supervivencia. Takala y cols.<sup>162</sup>, en un estudio con 20 pacientes con SRIS de origen infeccioso y bacteriemia documentada, observaron que los niveles de sE-Selectina no fueron predictivos de SDOM ni de mortalidad. En un estudio experimental de sepsis en ratones<sup>24</sup>, los ratones deficientes para sE-Selectina presentaban una mayor carga bacteriana y una mayor mortalidad. En nuestro estudio,

los pacientes con shock séptico que fallecieron tenían también niveles más bajos de sE-Selectina. En este sentido, se ha postulado que la sE-Selectina podría limitar las interacciones leucocito-endotelio tanto por la disminución de la densidad de la superficie celular en el endotelio (al ser liberada al suero) como al constituirse como un inhibidor competitivo intravascular(un “ligando señuelo”) para los leucocitos circulantes, reduciendo así el daño colateral por la “hiperinflamación” en el huésped<sup>166</sup>.

Respecto a la expresión de las moléculas de adhesión en PBMC hallamos, en concordancia con estudios previos<sup>51</sup> que los niveles de Sialyl Lewis X eran más elevados en los pacientes sépticos respecto a los controles sanos y en los que presentaron shock séptico respecto a los pacientes con sepsis grave. Además, los pacientes con shock séptico que murieron tenían unos niveles más elevados que los que sobrevivieron. Está descrito que, para facilitar la rodadura de los PMN en las fases iniciales de la adhesión celular, se requiere la unión de la E-Selectina al Sialyl Lewis X. Sin embargo, Walz y cols.<sup>167</sup> sugirieron que *in vivo* los niveles elevados de Sialyl Lewis X podrían tener un efecto inhibitorio (*feedback negativo*) sobre la adhesión leucocitaria, con la consecuente alteración en la respuesta inmune del huésped. Así, tanto la elevación de Sialyl Lewis X como los niveles disminuidos de sE-Selectina contribuirían a la mayor mortalidad en estos pacientes.

En nuestro estudio también hallamos alteraciones interesantes en los niveles de las integrinas LFA-1 y de VLA-4, de forma que los niveles de éstas en PBMC de pacientes sépticos fueron más bajos que en los controles sanos y, entre los pacientes con shock séptico, también en los que fallecieron. Estudios experimentales animales también han demostrado que el déficit de LFA-1 y VLA-4 se asocia a un aumento de la mortalidad<sup>53,54</sup>. Probablemente esto sea debido a que estos pacientes presentan una

respuesta inmunitaria deficiente, con una disminución de la adhesión celular y el consecuente aumento de la mortalidad secundario.

Finalmente, en este primer trabajo evaluamos *ex vivo* la función de adhesión de los monocitos y linfocitos en estos pacientes antes y tras la estimulación con TNF- $\alpha$  y LPS<sup>25,168,169</sup>. Estudios previos habían demostrado que en el flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas, la adhesión de los monocitos y linfocitos no se ve afectada con la administración de LPS. Sin embargo, durante la sepsis grave y el shock séptico la reducción del flujo sanguíneo como resultado de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar conduce a la adherencia y la acumulación de monocitos circulantes estimulados con LPS en las paredes de los vasos sanguíneos<sup>168</sup>. De forma interesante hemos hallado que los pacientes con shock séptico secundario a neumonía extrahospitalaria presentaron una función de adhesión de monocitos y linfocitos disminuida respecto a los pacientes con sepsis grave y los controles sanos, mejorando dicha función tras la administración de LPS y TNF- $\alpha$ , aunque sin alcanzar los valores que presentaron los controles sanos y los que presentaban sepsis grave. Estos datos, junto con los niveles disminuidos de VLA-4, LFA-1 y sE-Selectina, y los elevados de Sialyl Lewis X, podrían apoyar la hipótesis de que los pacientes con neumonía y shock séptico que murieron eran aquellos que presentaban una alteración de la respuesta inmune innata.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. La principal, el tamaño limitado de la muestra que puede haber influido en la obtención de conclusiones más sólidas. Además, nuestro grupo control fueron controles sanos. Hubiese sido probablemente más informativo un grupo control de pacientes con sepsis grave / shock séptico de otro origen o incluso a pacientes con NAC sin sepsis grave / shock séptico.

A pesar de las limitaciones, este trabajo evalúa por primera vez la expresión de las moléculas de adhesión en pacientes con diferentes síndromes sépticos secundarios a una causa específica, como la NAC. Además, y también de forma innovadora, analizamos la función de adhesión de los monocitos y linfocitos de estos pacientes, antes y tras la estimulación con TNF- $\alpha$  y LPS.

En el segundo artículo de esta Tesis Doctoral (**Artículo 2**) investigamos si los SNP de la MBL2 se asociaban con un incremento del riesgo para el desarrollo de formas graves de sepsis (sepsis grave o shock séptico), de SDOM o de muerte en pacientes con sepsis. La razón por la que se realizó este trabajo fue que, a pesar de que los polimorfismos de la MBL2 y de la MASP2 pueden representar un punto importante para la comprensión del desarrollo de la sepsis y la susceptibilidad a las infecciones debido a su papel en la activación del complemento, la cascada de la coagulación y la respuesta inflamatoria sistémica, los estudios hasta la fecha habían mostrado resultados controvertidos.

En este estudio se incluyeron un total de 243 pacientes, de los cuales 60 (24,7%) cumplían criterios de SRIS no infecciosa, 54 (22,2%) presentaron sepsis, 28 (11,5%) sepsis grave y 101 (41,5%) shock séptico. Además, los pacientes incluidos en el estudio fueron comparados con 104 controles sanos. Se realizó el genotipado de MBL2 en 216 pacientes (88,8% de los pacientes incluidos) y el de MASP2 en 240 pacientes (98,7%). El genotipado de MBL2 y MASP2 se realizó también en todos los controles sanos.

El desequilibrio de ligamiento que producen los SNP en el exón 1 y en la región promotora del gen de la MBL2 da lugar a 7 haplotipos (HUPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC y HYPD). El haplotipo HY induce altas concentraciones de MBL, mientras que las mutaciones del exón 1 (variantes O) y los haplotipos LX inducen concentraciones de MBL disminuidas<sup>72</sup>. Por lo tanto el análisis del exón 1 y la región

promotora del gen de la MBL2 permite la categorización de los individuos en tres grupos de acuerdo a su genotipo. El grupo I incluye los genotipos de la MBL2 responsables de niveles elevados de MBL (A/A y A/XA), el grupo II incluye genotipos responsables de niveles intermedios de MBL (A/S y XA/XA), y por último el grupo III incluye genotipos que determinan niveles bajos de MBL (O/S y XA/O)<sup>71</sup>. Los genotipos de la MASP2 se dividieron en genotipo mutante (Asp105Gly) y el genotipo *wild type*.

En nuestro estudio no existían diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos de MBL2 entre pacientes y controles sanos, siendo el haplotipo LYPB el más frecuente. La prevalencia de genotipos de baja expresión de MBL hallada en nuestro estudio fue similar a la observada en otros estudios<sup>82,104,170</sup>, y el haplotipo LYPB fue también el más frecuente en concordancia con otros estudios en población caucásica<sup>63,171</sup>. Sin embargo, otros trabajos sí han mostrado una mayor prevalencia de genotipos de baja expresión de MBL en pacientes con sepsis ingresados en la UCI<sup>82,85,98</sup> que en controles sanos. Por el contrario, hallamos que los pacientes con síndromes sépticos presentaban una mayor frecuencia del genotipo de baja expresión de MBL (Grupo III) respecto a los pacientes con SRIS de origen no infeccioso (15,9% vs 3,8% respectivamente, p=0,025) y menor del genotipo de alta expresión (Grupo I) (43,9% vs 63,4%, p= 0,014). Creemos que estas diferencias pueden ser debidas, al menos en parte, a la existencia de diferentes mecanismos fisiopatológicos subyacentes en el SRIS infeccioso y no infeccioso. Nuestro trabajo sugiere que los pacientes con un insulto no infeccioso y un genotipo de alta expresión de MBL tienen un riesgo más elevado de presentar SRIS y requerir ingreso en UCI sin comportar un aumento del riesgo de complicaciones infecciosas. Niveles elevados de MBL podrían estar asociados directamente con los efectos adversos de un exceso de respuesta proinflamatoria y una activación incontrolada de la vía del complemento, tal y como se ha demostrado en

modelos animales, en los que la producción excesiva de MBL o su administración exógena tras isquemia de órganos (corazón, riñón, intestino...) produce lesión de reperfusión debido a una activación excesiva del complemento, mientras que los niveles bajos de MBL son protectores<sup>172-174</sup>. Una de las características de la reperfusión en los tejidos isquémicos es el estrés oxidativo que se produce a nivel del endotelio que provoca lesión vascular. Se ha sugerido que la vía de las lectinas inicia la activación del complemento tras la aparición del estrés oxidativo, en particular después de un infarto miocárdico, intestinal o del músculo esquelético, induciendo lesión por reperfusión, al menos en modelos experimentales<sup>175</sup>. Adicionalmente se sabe que la MBL reconoce las células apoptóticas y necróticas, las cuales también podrían actuar de *trigger* para la activación del complemento a través de la vía de la lectina en pacientes con SRIS no infeccioso y genotipo de alta expresión de MBL<sup>176,177</sup>. De hecho, en ratones con un defecto en la MBL se ha demostrado una alteración en el aclaramiento de células apoptóticas<sup>178</sup>. Desafortunadamente, en nuestro estudio no medimos los niveles de inflamación ni la activación del complemento, por lo que no podemos demostrar este aumento de activación que podría explicar nuestros resultados en pacientes con genotipo de alta expresión de MBL y SRIS no infeccioso.

Por otro lado, aunque aquellos pacientes con SRIS no infeccioso del Grupo I tenían un APACHE-II, SOFA y SAPS-II más elevado al ingreso que los pacientes con un genotipo de baja expresión de MBL (Grupo III), ni la presencia del genotipo de baja expresión de MBL o de los heterocigotos para el SNP Asp105Gly de la MASP2 se relacionó con la mortalidad en estos pacientes o en los sépticos. La relación entre la mortalidad y la presencia de genotipos de baja expresión de MBL o de diferentes polimorfismos de la MBL2 continúa siendo motivo de controversia, con estudios que

apoyan esta asociación<sup>82,83,98,104</sup>, mientras que otros como el nuestro no hallan relación con la mortalidad<sup>84,85</sup>.

Por último, tampoco se hallaron diferencias en la frecuencia de heterocigotos de SNP de MASP2 (Asp105Gly) ni tuvo impacto en el pronóstico en pacientes con SRIS. A este respecto, y de la misma manera que con los polimorfismos de la MBL2, la presencia de la mutación Asp105Gly SNP continúa siendo motivo de controversia, con estudios en los que se demuestra una asociación con la gravedad y el pronóstico de la sepsis<sup>84</sup> y otros en los que no se halla tal relación<sup>104,109,110</sup>.

Resumiendo, este estudio mostró que el genotipo de baja expresión de MBL estaba infrarrepresentado en los pacientes con SRIS no infeccioso pero que no se asoció con mayor gravedad ni con la mortalidad. El genotipo de alta expresión de MBL parece ser por tanto un factor de riesgo para desarrollar SRIS no infeccioso. La presencia de polimorfismos de la MASP2 no se relacionó con el SRIS infeccioso y tampoco tuvo impacto en el pronóstico en pacientes con SRIS.

La limitación más relevante de este segundo trabajo probablemente es el hecho de utilizar controles sanos no emparejados como grupo control. Se ha descrito que el uso de donantes de sangre sanos como grupo control (que se utiliza de forma frecuente en estudios genéticos) tiene un riesgo potencial de errores de clasificación de los individuos, particularmente cuando se evalúa una condición con alta penetrancia como la deficiencia de MBL. En segundo lugar, debido al diseño retrospectivo del estudio, no se realizó un cálculo del poder estadístico, lo que podría afectar su capacidad para detectar pequeñas diferencias, sobretodo en el análisis de los diferentes subgrupos de pacientes con SRIS.

A pesar de las limitaciones descritas, la importancia de este trabajo radica en que se confirma que los pacientes con un insulto no infeccioso y genotipo de alta expresión de

MBL presentan un mayor riesgo de desarrollar SRIS y de requerir ingreso en UCI y que la presencia de genotipo de baja expresión de MBL y/o de heterocigotos de la MASP-2 no se relacionaron con la mortalidad.

En el tercer artículo de esta Tesis Doctoral (**Artículo 3**) evaluamos los niveles de CD5 y CD6 solubles en pacientes críticos con SRIS no infeccioso o síndromes sépticos y su relación con diferentes variables clínicas y el pronóstico. En este estudio se incluyeron un total de 218 pacientes de los cuales 59 (27,1%) cumplían criterios de SRIS no infeccioso, 51 (23,42%) presentaron sepsis, 25 (11,55%) sepsis grave y 83 (38%) shock séptico.

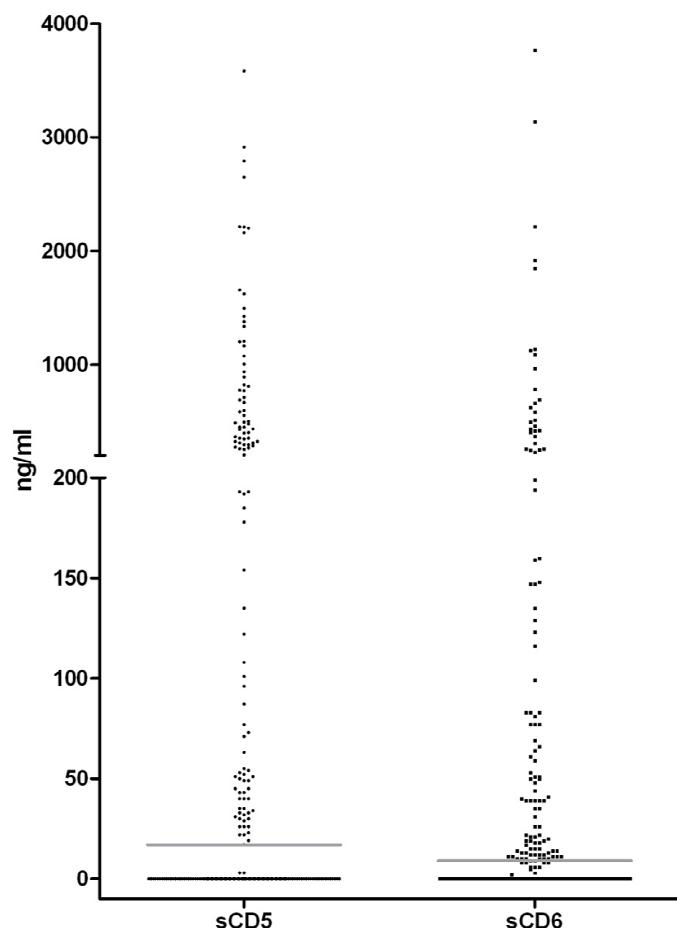
Los principales hallazgos fueron que los niveles de CD6 soluble (sCD6) se asociaron con un incremento en la mortalidad y que tanto el sCD6 como el CD5 soluble (sCD5) tuvieron una correlación con la evolución a SDOM medida por el ΔSOFA. Además los pacientes con niveles de sCD5 y sCD6 mayores de 1.500ng/mL presentaron una mayor mortalidad intra-UCI.

Las formas solubles de CD5 y CD6 actúan como PRR de componentes de la pared celular de los patógenos, predominantemente bacterias en el caso de sCD6<sup>112,114</sup>, y hongos en el caso de sCD5<sup>128</sup>. Estudios experimentales han demostrado que el sCD5 y sCD6 son objetivos potenciales en el tratamiento de la sepsis. En un modelo de sepsis murino mediante la administración de LPS intraperitoneal, la administración profiláctica de sCD6 recombinante (rsCD6) indujo una reducción significativa en plasma de citoquinas proinflamatorias, un aumento significativo de citoquinas antiinflamatorias y una mejoría significativa en la tasa de supervivencia respecto a los controles<sup>114,115</sup>. De manera similar, la administración de sCD5 recombinante (rsCD5) en un modelo animal de sepsis de origen fúngico inducido por la administración intraperitoneal de zymosan indujo una disminución de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y un

aumento en la supervivencia respecto a los controles<sup>128</sup>. Nos planteamos este estudio porque hasta el momento no se había evaluado en humanos el papel del sCD5 y sCD6 en la sepsis, pudiendo ser relevante como potencial diana terapéutica.

El primer resultado a destacar fue la gran variabilidad en los valores de estas moléculas entre los pacientes, existiendo una alta proporción de indetectabilidad (**Figura 6**).

**Figura 6. Distribución de los niveles séricos sCD5 y sCD6 en la población estudiada**



\* La línea gris representa la mediana

Así, los niveles de sCD5 presentaron una mediana de 10 ng/mL (rango 0 - 27.860) y los de sCD6 de 8,5 ng/mL(rango 0 – 4.499). Además, casi la mitad de los pacientes

presentaron niveles indetectables de sCD5 (49,1%) y de sCD6 (45,4%). Esta proporción es similar a la descrita en estudios previos de nuestro grupo en pacientes con síndrome de Sjögren y también en controles sanos<sup>179</sup>. En este sentido, no hallamos diferencias demográficas, clínicas o biológicas entre los pacientes con niveles detectables o indetectables. Creemos que debe estar implicado algún factor genético que explique esta diversidad, aunque la ausencia de estudios previos en pacientes sépticos con los que comparar limitan las potenciales hipótesis. Cabe comentar así mismo que existía una correlación positiva entre los niveles de sCD5 y sCD6 ( $r= 0,6$ ,  $p=0,01$ ).

Los pacientes incluidos, sépticos o con SRIS no infeccioso, presentaron niveles más elevados de sCD5 y sCD6 que los controles sanos. Sin embargo, no encontramos diferencias en dichos niveles entre pacientes con SRIS no infeccioso y síndromes sépticos, lo que podría sugerir que el aumento de los niveles de sCD5 y sCD6 se debe más a una respuesta inflamatoria que a una respuesta a la infección propiamente dicha.

Diversos datos obtenidos en este trabajo sugieren un papel de estas moléculas en la fisiopatología de la sepsis y su evolución a SDOM, y por tanto riesgo de mortalidad. Por un lado, los niveles de sCD5 y sCD6 (este último no significativo pero con una marcada tendencia) se correlacionaron de forma positiva con el ΔSOFA. Hay evidencia científica que indica que el ΔSOFA se asocia con el pronóstico incluso mejor que el SOFA solo al ingreso<sup>157,180</sup>, con lo que pacientes con niveles elevados de sCD5 y sCD6 presentarían un mayor riesgo de aumento de su grado de SDOM independientemente del SOFA al ingreso. Por otro lado, el análisis de Regresión Logística evidenció que los niveles elevados de sCD6 (no los de sCD5) se asociaron con un aumento del riesgo de mortalidad. Es cierto que la relevancia clínica de estos resultados debe interpretarse con cautela, dada la pequeña magnitud de los valores obtenidos (OR, 1,001; 95% IC, 1,000-1,001;  $P=0,007$ ). Finalmente, al estratificar a los pacientes en función de los niveles de

sCD5 y sCD6 en dos grupos (mayor o menor de 1.500ng/mL) observamos que los pacientes con niveles mayores de 1.500ng/mL presentaron una mayor mortalidad intra-UCI tanto con sCD5 (13,1% vs 41,7%, P< 0,05) como con sCD6 (13% vs 66,67%, P<0,05). La proporción de pacientes que tenían estos niveles tan elevados fue pequeña (5,5% y 2,8% para sCD5 y sCD6 respectivamente), pero la asociación con la mortalidad de estos pacientes fue muy elevada.

Nuestros resultados parecerían ser contradictorios con los datos experimentales previos<sup>114,115,128</sup>, donde la administración exógena de rsCD6 mejoraba la supervivencia en modelos experimentales de sepsis en ratones. Sin embargo, existen algunas diferencias que pueden explicar esta controversia. En primer lugar, la dosis que se administró a los animales con sepsis de rsCD6 dio como resultados niveles séricos de sCD6 muy por encima (en rango de micromoles/L) de los niveles fisiológicos o incluso los hallados en condiciones de sepsis (rango picomoles-nanomoles/L). En segundo lugar, el rsCD6 fue administrado a los animales antes del insulto séptico, mientras que nosotros medimos los niveles de sCD6 una vez la sepsis ya estaba establecida. Si valores muy elevados de estas moléculas y de aparición precoz pudieran ser beneficiosos es algo que se podría especular, aunque no existen datos clínicos en humanos que lo demuestren.

La asociación hallada entre los niveles aumentados de sCD6 y la mortalidad intra-UCI podría, en nuestra opinión, explicarse por dos motivos. Por un lado, nuestros datos *in vitro* y los datos de otros trabajos previos indican que el sCD6 (y el sCD5) pueden ser el resultado de la escisión proteolítica de la forma unida de CD5 y CD6 a la membrana después de la activación de los linfocitos T policlonales<sup>118,181</sup>. Esta proteólisis, con el consecuente aumento de los niveles de sCD5 y sCD6, podría entonces inhibir selectivamente la proliferación de células T (*feedback negativo*)<sup>118</sup>. Se podría plantear la

hipótesis de que éste es un mecanismo de control del huésped para evitar la “hiperinflamación”, y que un exceso de esta contrarregulación de las células T podría conducir a un estado “hipoinflamatorio” responsable del incremento de la mortalidad<sup>35,182,183</sup>. Por otro lado, los niveles elevados de sCD5 y sCD6 que hemos hallado en humanos podrían no ser una respuesta adaptativa sino una consecuencia de la apoptosis generalizada que puede suceder durante la fase aguda de la enfermedad, de forma que estos niveles aumentarían por la muerte celular programada de los linfocitos. A favor de esta hipótesis, los pacientes con shock séptico tenían niveles más bajos de linfocitos circulantes que el resto de pacientes. Sin embargo, no hallamos correlación entre los niveles de sCD5 y sCD6 y los linfocitos circulantes.

De forma interesante, sólo los niveles de sCD6 se asociaron con la mortalidad. Aunque ambas moléculas pueden liberarse cuando se activan las células T, parece ser que el sCD6 se relaciona más con las infecciones bacterianas, mientras que el sCD5 está más relacionado con las infecciones fúngicas. La mayoría de nuestros pacientes presentaron infecciones de origen bacteriano, lo que podría explicar estos hallazgos.

Resumiendo, los niveles de sCD5 y sCD6 en pacientes críticos con SRIS presentan una elevada variación y una elevada proporción de indetectabilidad. Los niveles de sCD6, pero no los de sCD5, están asociados con aumento del riesgo de muerte en pacientes críticos con SRIS de causa infecciosa o no.

En el último artículo de esta Tesis Doctoral (**Artículo 4**) investigamos los niveles de ADAMTS-13 también en pacientes críticos con síndrome séptico o SRIS no infeccioso y su relación con diferentes variables clínicas y el pronóstico.

Planteamos este trabajo porque dentro del papel relevante que juega el endotelio en la fisiopatología de la sepsis, existe un estado procoagulante que se asocia con lesión microvascular generalizada y trombosis secundario a la activación de las células

endoteliales. En este proceso, el ADAMTS-13 podría ser importante, pues su disminución resulta en la persistencia en la circulación de UL-vWF, responsables de la formación de trombos plaquetarios en la microcirculación. Recientemente, algunos estudios han demostrado una disminución de la actividad o de los niveles de antígeno de ADAMTS-13 en la sepsis<sup>131,146-148</sup>. Sin embargo, a pesar de estos estudios, el patrón de los niveles de ADAMTS-13 en los síndromes sépticos (sepsis, sepsis grave y shock séptico) y sus diferencias con otras causas de SRIS de origen no infeccioso en pacientes críticos no había sido todavía evaluado.

En este estudio se incluyeron un total de 178 pacientes, de los cuales 51 (28,6%) cumplían criterios de SRIS no infecciosa, 37 (20,8%) presentaron sepsis, 14 (7,9%) sepsis grave y 76 (42,7%) shock séptico.

Los pacientes con síndromes sépticos presentaron niveles más bajos de ADAMTS-13 que los pacientes con SRIS no infeccioso, siendo además más bajos en los pacientes con sepsis grave o shock séptico que en los pacientes con sepsis. Estos hallazgos son similares a los descritos previamente en la literatura<sup>131,146-150,184</sup>. Esta disminución de los niveles de ADAMTS-13 en la sepsis puede tener varias explicaciones. La primera podría ser por el consumo del ADAMTS-13 involucrado en la proteólisis de los UL-vWF en la superficie de las células endoteliales<sup>138</sup>, avalado por la correlación negativa encontrada entre la actividad del ADAMTS-13 y el antígeno del vWF en pacientes con fracaso orgánico inducido por sepsis<sup>147</sup>. Otro mecanismo que explicaría la disminución del ADAMTS-13 en la sepsis sería por una potencial inhibición en la transcripción y secreción de ADAMTS-13 inducida por las citoquinas proinflamatorias aumentadas en la sepsis como la IL-6, IL-4, IFN-γ y TNF-α tal y como describen Martin y cols.<sup>147</sup>. Otros estudios han sugerido que el ADAMTS-13 puede ser digerido *in vitro* por proteasas como la trombina, plasmina o elastinas granulocitarias<sup>185</sup>. Finalmente, la

disfunción hepática que puede asociarse a la sepsis podría ser otro mecanismo adicional que disminuiría los niveles de ADAMTS-13. Algunos de estos mecanismos pueden ser compartidos por el SRIS, lo que explicaría la disminución de los niveles de ADAMTS-13 en pacientes con SRIS no infeccioso. Sin embargo, el porqué estos pacientes presentan una reducción menor que los pacientes con síndromes sépticos no está claro. En realidad, en nuestro estudio los niveles de ADAMTS-13 en pacientes con SRIS no infeccioso fueron similares a los niveles de ADAMTS-13 en los pacientes con sepsis (no grave ni shock séptico), aunque los pacientes con SRIS no infeccioso tenían puntuación en el APACHE-II más elevada que los pacientes con sepsis. Es posible que los pacientes con sepsis grave o shock séptico presentasen una mayor respuesta inflamatoria u otros mecanismos adicionales que disminuyeran los niveles de ADAMTS-13.

Los pacientes con síndromes sépticos presentaban una correlación negativa entre los niveles de ADAMTS-13 y el APACHE-II (a mayor puntuación en el APACHE-II, niveles más bajos de ADAMTS-13) y el ΔSOFA (a mayor ΔSOFA (más progresión a SDOM) niveles más bajos de ADAMTS-13). Además, los pacientes que fallecieron, de cualquier grupo, tenían unos niveles de ADAMTS-13 más bajos que los que sobrevivieron, asociándose la disminución de los niveles de ADAMTS-13 con un aumento de riesgo de muerte en la UCI en el análisis de regresión logística(OR 1,02; 95% IC; 1,002-1,03; p= 0,023), de modo que un descenso de 1ng/mL de los niveles de ADAMTS-13 se asoció con un incremento estimado del riesgo de muerte del 1,5%.

El papel exacto del ADAMTS-13 en la fisiopatología de la sepsis y su asociación con el pronóstico no está todavía plenamente explicado. En la sepsis existe un aumento en la producción del vWF<sup>27,133</sup>, y es posible, tal y como ocurre en la PTT, que los niveles disminuidos de ADAMTS-13 resulten en la persistencia de UL-vWF, con la

consecuente formación de trombos plaquetarios en las pequeñas arteriolas produciendo isquemia microvascular y disfunción orgánica<sup>138,139</sup>, empeorando el pronóstico. La correlación negativa del ΔSOFA (y por tanto de la progresión a SDOM) con los niveles de ADAMTS-13 al ingreso en la UCI apoya esta hipótesis. En este sentido, el hecho de que en el SRIS no infeccioso la producción de vWF no sea tan elevada y que los niveles de ADAMTS-13 no sean tan bajos como en la sepsis, podría explicar por qué la gravedad y el pronóstico de estos pacientes no están claramente asociadas con los niveles de ADAMTS-13. De hecho, no existió correlación entre los niveles de ADAMTS-13 y el ΔSOFA en los pacientes con SRIS no infeccioso.

Este estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, sólo analizamos los niveles de ADAMTS-13 al ingreso en la UCI. Hubiera sido interesante conocer su evolución durante la estancia en la UCI y su asociación con el pronóstico, tal y como realizaron en el estudio de Fukushima y cols.<sup>148</sup>, demostrando que los niveles disminuidos de ADAMTS-13 durante la primera semana de ingreso (días 1, 5 y 7) se correlacionaron con el APACHE-II y el SOFA máximo y con el pronóstico. Además, sólo determinamos los niveles de ADAMTS-13 y no analizamos otras moléculas implicadas en la fisiopatología de la sepsis y relacionadas con su función como el antígeno del vWF, IL-4, IL-6 o el TNF- $\alpha$ . Por lo tanto, es difícil confirmar nuestra hipótesis fisiopatológica. En tercer lugar, hemos de destacar que, aunque significativa, la correlación hallada entre los niveles de ADAMTS-13 y el ΔSOFA es pequeña, con un coeficiente de correlación de -0,179, y en consecuencia la relevancia clínica de este resultado debe interpretarse con cautela. Por otro lado, y de la misma manera que en los estudios previos, utilizamos como controles a voluntarios sanos. Posiblemente hubiera sido más apropiado usar pacientes hospitalizados sin SRIS emparejados por edad como controles. Por último, este trabajo evaluó solamente los niveles de antígeno de

ADAMTS-13 y no su actividad. Cabe decir, sin embargo, que se ha descrito una buena correlación entre la actividad del ADAMTS-13 y los niveles de antígeno en individuos sanos y en pacientes con sepsis, al contrario que sucede en pacientes con PTT, en los que los pacientes pueden presentar niveles altos de antígeno de ADAMTS-13 con una actividad muy disminuida<sup>186</sup>.

Resumiendo, los niveles de ADAMTS-13 están disminuidos en los pacientes críticos con síndromes sépticos comparados con los pacientes con SRIS no infeccioso y con los controles sanos. Estos niveles se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad y la progresión a fracaso multiorgánico en los pacientes sépticos y con un incremento del riesgo de muerte en todos los pacientes (síndromes sépticos y SRIS no infeccioso).

Los cuatro trabajos que constituyen la presente Tesis Doctoral adolecen de algunas debilidades comunes a todos los estudios observacionales, como por ejemplo que fueron realizados en una sola institución con un número limitado de participantes, lo cual reduce la potencia para detectar diferencias significativas. Además, con independencia de los métodos analíticos utilizados, teniendo en cuenta que son estudios observacionales, persisten las dificultades para establecer relaciones causales, y que puede haber limitaciones al tratar de aplicar los resultados a otros escenarios. Sin embargo su fuerza reside en el carácter prospectivo de los estudios, que han posibilitado una asignación exacta a cada grupo diagnóstico en los cuatro trabajos.

Creemos que los hallazgos en los cuatro estudios presentados son de importancia, pues, de confirmarse, ayudan a mejorar en el conocimiento de la fisiopatología de la sepsis y podrían permitir una mejor estratificación de los pacientes en riesgo, facilitando una optimización de los recursos destinados a los pacientes más graves. Además, en el

caso del ADAMTS-13 y sCD5 y sCD6, los trabajos demuestran que, aunque todavía estamos lejos de ello, pueden ser potenciales dianas terapéuticas.

A modo de corolario de esta Tesis Doctoral, debemos destacar que la fisiopatología de la sepsis es un proceso complejo resultado de la interacción entre el microorganismo infeccioso y la respuesta inmune, inflamatoria y de la coagulación del huésped. La respuesta a la infección en cualquier paciente dependerá del patógeno causante (inóculo y virulencia) y del huésped (características genéticas, comorbilidad, etc.), con respuestas diferentes a nivel local, regional y sistémico, y con múltiples factores implicados. Entre los diferentes actores y sistemas implicados en la fisiopatología de la sepsis y su evolución a sepsis grave / shock séptico y fracaso multiorgánico, dos especialmente relevantes son el sistema inmunitario, con sus respuestas innata y adaptativa, y el sistema hemostático de la coagulación, como hemos mostrado con los cuatro trabajos expuestos en esta Tesis Doctoral.

Sin embargo, es importante destacar que todavía hay muchos aspectos de la fisiopatología de la sepsis que se desconocen o no se han explicado adecuadamente. Esto es debido a varios motivos, como una probable mala selección de los pacientes en la elaboración de los estudios publicados, ya que en la mayoría de éstos se incluyen pacientes sólo con criterios clínicos de sepsis –fiebre, leucocitosis, taquipnea o taquicardia- junto con pacientes con sepsis documentada por gérmenes Gram negativos y/o Gram positivos, obviando que en función del tipo de infección la respuesta inmuno-inflamatoria puede ser diferente. Otro de los motivos podría ser el momento de la selección de los pacientes, ya que la fisiopatología de la sepsis es un proceso dinámico y en función del momento de selección de los sujetos del estudio pueden predominar los efectos inflamatorios o los antiinflamatorios.

En este sentido y en relación a los resultados obtenidos en los estudios presentados en esta Tesis Doctoral, la siguiente etapa a realizar para corroborar los hallazgos obtenidos, e incluso en el caso del ADAMTS-13 y el sCD5 y el sCD6 utilizarlos como estrategias terapéuticas en los síndromes sépticos, es realizar ensayos clínicos aleatorizados y multicéntricos que permitirán homogeneizar los pacientes y aumentar la muestra para obtener resultados más concluyentes.



## **CONCLUSIONES**



- Los pacientes críticos con sepsis grave o shock séptico secundario a neumonía adquirida en la comunidad presentan alteraciones en los niveles y en la función de las moléculas de adhesión leucocitarias y endoteliales, y estas alteraciones parecen estar asociadas con el pronóstico.
- Los genotipos de baja expresión de la Lectina fijadora de Manosa están infrarrepresentados en pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica de origen no infeccioso, pero no se asocian con la gravedad ni con la mortalidad.
- El genotipo de alta expresión de la Lectina fijadora de Manosa parece ser un factor de riesgo para desarrollar Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica no infeccioso.
- Los niveles de CD5 soluble y CD6 soluble en pacientes críticos con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica presentan una elevada variación y una elevada proporción de indetectabilidad.
- Los niveles de CD6 soluble, pero no los de CD5 soluble, están asociados con un aumento del riesgo de muerte en pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica de origen infeccioso o no.
- Los niveles de ADAMTS-13 están disminuidos en los pacientes críticos con síndromes sépticos comparados con los pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica de origen no infeccioso y con los controles sanos.
- Estos niveles se correlacionan con la gravedad de la enfermedad y la progresión a síndrome de disfunción orgánica múltiple en los pacientes sépticos.
- Los niveles de ADAMTS-13 se asocian con un incremento del riesgo de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos en los pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, de origen infeccioso o no.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013 Aug 29;369(9):840-51.
- 2 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992 Jun;20(6):864-74.
- 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. *Crit Care Med* 2003 Apr;31(4):1250-6.
- 4 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 Jul;29(7):1303-10.
- 5 Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014 Jan 1;5(1):4-11.
- 6 Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006 Feb;34(2):344-53.
- 7 Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Penuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med* 2007 May;35(5):1284-9.

- 8 Peake SL, Delaney A, Bailey M, Bellomo R, Cameron PA, Cooper DJ, et al. Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N Engl J Med* 2014 Oct 16;371(16):1496-506.
- 9 Mouncey PR, Osborn TM, Power GS, Harrison DA, Sadique MZ, Grieve RD, et al. Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. *N Engl J Med* 2015 Apr 2;372(14):1301-11.
- 10 Holst LB, Haase N, Wetterslev J, Wernerman J, Guttormsen AB, Karlsson S, et al. Lower versus higher hemoglobin threshold for transfusion in septic shock. *N Engl J Med* 2014 Oct 9;371(15):1381-91.
- 11 Suffredini AF, Munford RS. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA* 2011 Jul 13;306(2):194-9.
- 12 Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2007 Aug;20(4):345-52.
- 13 Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 2010 Jun 23;303(24):2495-503.
- 14 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- 15 Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997 Jul;112(1):235-43.

- 16 Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-S32.
- 17 Marshall JC, Charbonney E, Gonzalez PD. The immune system in critical illness. *Clin Chest Med* 2008 Dec;29(4):605-16, vii.
- 18 Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001 Apr 26;410(6832):1103-7.
- 19 Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997;66:101-95.
- 20 Huet O, Laemmel E, Fu Y, Dupic L, Aprico A, Andrews KL, et al. Interleukin 10 antioxidant effect decreases leukocytes/endothelial interaction induced by tumor necrosis factor alpha. *Shock* 2013 Jan;39(1):83-8.
- 21 Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med* 2006 Oct 19;355(16):1699-713.
- 22 Parent C, Eichacker PQ. Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis. The role of adhesion molecules. *Infect Dis Clin North Am* 1999 Jun;13(2):427-47, x.
- 23 Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plotz FB, Carman CV. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care* 2014;18(1):204.

- 24 Munoz FM, Hawkins EP, Bullard DC, Beaudet AL, Kaplan SL. Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J Clin Invest* 1997 Oct 15;100(8):2099-106.
- 25 Doherty DE, Zagarella L, Henson PM, Worthen GS. Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell. *J Immunol* 1989 Dec 1;143(11):3673-9.
- 26 Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994 Jan 28;76(2):301-14.
- 27 Kayal S, Jais JP, Aguini N, Chaudiere J, Labrousse J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Mar;157(3 Pt 1):776-84.
- 28 Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990 Jul 13;62(1):3-6.
- 29 Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Jul;120(1):3-10.
- 30 Alon R, Rosen S. Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites. *Nat Immunol* 2007 Apr;8(4):339-41.
- 31 Kubes P, Niu XF, Smith CW, Kehrli ME, Jr., Reinhardt PH, Woodman RC. A novel beta 1-dependent adhesion pathway on neutrophils: a mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. *FASEB J* 1995 Aug;9(11):1103-11.

- 32 Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995 Feb 10;80(3):413-22.
- 33 Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000 Jul 6;343(1):37-49.
- 34 Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993 Feb;103(2):565-75.
- 35 Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011 Dec 21;306(23):2594-605.
- 36 Szabo G, Miller CL, Kodys K. Antigen presentation by the CD4 positive monocyte subset. *J Leukoc Biol* 1990 Feb;47(2):111-20.
- 37 Cavaillon JM, Fitting C, Adib-Conquy M. Mechanisms of immunodysregulation in sepsis. *Contrib Nephrol* 2004;144:76-93.
- 38 Souza-Fonseca-Guimaraes F, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis - guilty or not guilty? *Crit Care* 2013;17(4):235.
- 39 Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 2005 Dec;33(12 Suppl):S506-S509.
- 40 Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 2013 Mar 1;11(2):150-60.

- 41 Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003 May 15;101(10):3765-77.
- 42 Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, et al. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock* 2013 May;39(5):427-32.
- 43 Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010;14(5):R182.
- 44 Hack CE, Zeerleider S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001 Jul;29(7 Suppl):S21-S27.
- 45 Mayer K, Merfels M, Muhly-Reinholz M, Gokorsch S, Rousseau S, Lohmeyer J, et al. Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Aug;283(2):H811-H818.
- 46 McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997 Aug 1;100(3):485-91.
- 47 de PR, Monserrat J, Reyes E, Diaz D, Rodriguez-Zapata M, de la Hera A, et al. Circulating sICAM-1 and sE-Selectin as biomarker of infection and prognosis in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Eur J Intern Med* 2013 Mar;24(2):132-8.

- 48 Kung CT, Hsiao SY, Su CM, Tsai TC, Cheng HH, Tsai NW, et al. Serum adhesion molecules as predictors of bacteremia in adult severe sepsis patients at the emergency department. *Clin Chim Acta* 2013 Jun 5;421:116-20.
- 49 Seidelin JB, Nielsen OH, Strom J. Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. *Intensive Care Med* 2002 Nov;28(11):1613-8.
- 50 Steeber DA, Tang ML, Green NE, Zhang XQ, Sloane JE, Tedder TF. Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol* 1999 Aug 15;163(4):2176-86.
- 51 Brinkman-van der Linden EC, van Ommen EC, van DW. Glycosylation of alpha 1-acid glycoprotein in septic shock: changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis(x) groups. *Glycoconj J* 1996 Feb;13(1):27-31.
- 52 Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994 Oct 1;84(7):2068-101.
- 53 Prince JE, Brayton CF, Fossett MC, Durand JA, Kaplan SL, Smith CW, et al. The differential roles of LFA-1 and Mac-1 in host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2001 Jun 15;166(12):7362-9.
- 54 Kadioglu A, De FK, Bangert M, Fernandes VE, Richards L, Jones K, et al. The integrins Mac-1 and alpha4beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 2011 May 15;186(10):5907-15.

- 55 Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, et al. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 May;151(5):1420-7.
- 56 Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR. Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med* 1994 Apr;22(4):651-7.
- 57 Hildebrand F, Pape HC, Harwood P, Muller K, Hoevel P, Putz C, et al. Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis. *Exp Toxicol Pathol* 2005 Mar;56(4-5):281-90.
- 58 Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol* 1999 Dec 1;163(11):6148-54.
- 59 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Jun;29(6):313-26.
- 60 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, et al. A second serine protease associated with mannose-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997 Apr 3;386(6624):506-10.
- 61 Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* 1994 Dec 15;2(12):1227-40.

- 62 Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem Soc Trans* 2008 Dec;36(Pt 6):1461-6.
- 63 Aittoniemi J, Miettinen A, Laippala P, Isolauri E, Viikari J, Ruuska T, et al. Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr* 1996 Aug;85(8):906-9.
- 64 Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 2000 Feb;68(2):688-93.
- 65 Matsushita M. The lectin pathway of the complement system. *Microbiol Immunol* 1996;40(12):887-93.
- 66 Neth O, Jack DL, Johnson M, Klein NJ, Turner MW. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2002 Oct 15;169(8):4430-6.
- 67 Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern Med J* 2005 Sep;35(9):548-55.
- 68 Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* 2001 Nov 1;184(9):1152-62.
- 69 Ono K, Nishitani C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Sano H, Suzuki H, et al. Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, *Staphylococcus aureus*,

- and Escherichia coli by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A. *J Immunol* 2006 Oct 15;177(8):5517-23.
- 70 Krarup A, Wallis R, Presanis JS, Gal P, Sim RB. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One* 2007;2(7):e623.
- 71 Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995 Sep 15;155(6):3013-20.
- 72 Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immunol Methods* 2000 Jul 31;241(1-2):33-42.
- 73 Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994;40(1):37-44.
- 74 Garred P, Madsen HO, Kurtzhals JA, Lamm LU, Thiel S, Hey AS, et al. Dihybridic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. *Eur J Immunogenet* 1992 Dec;19(6):403-12.
- 75 Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003 Dec 1;37(11):1496-505.

- 76 Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001 Mar 14;285(10):1316-21.
- 77 Friberg JT, Jarrett RF, Koch A, Garred P, Freeland JM, Andersen A, et al. Mannose-binding lectin genotypes and susceptibility to epstein-barr virus infection in infancy. *Clin Vaccine Immunol* 2010 Sep;17(9):1484-7.
- 78 Garred P, Brygge K, Sorensen CH, Madsen HO, Thiel S, Svejgaard A. Mannan-binding protein--levels in plasma and upper-airways secretions and frequency of genotypes in children with recurrence of otitis media. *Clin Exp Immunol* 1993 Oct;94(1):99-104.
- 79 Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001 Aug 25;358(9282):637-8.
- 80 Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997 Jan 25;349(9047):236-40.
- 81 Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999 Oct;42(10):2145-52.
- 82 Garred P, Strom J, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis* 2003 Nov 1;188(9):1394-403.

- 83 Hellemann D, Larsson A, Madsen HO, Bonde J, Jarlov JO, Wiis J, et al. Heterozygosity of mannose-binding lectin (MBL2) genotypes predicts advantage (heterosis) in relation to fatal outcome in intensive care patients. *Hum Mol Genet* 2007 Dec 15;16(24):3071-80.
- 84 Henckaerts L, Nielsen KR, Steffensen R, Van SK, Mathieu C, Giulietti A, et al. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2009 Jan;37(1):192-3.
- 85 Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005 Mar;33(3):638-44.
- 86 Fidler KJ, Wilson P, Davies JC, Turner MW, Peters MJ, Klein NJ. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. *Intensive Care Med* 2004 Jul;30(7):1438-45.
- 87 Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Saha DC, Rackow EC. Alterations in C3, C4, factor B, and related metabolites in septic shock. *Clin Immunol Immunopathol* 1993 Nov;69(2):136-42.
- 88 Zhao L, Ohtaki Y, Yamaguchi K, Matsushita M, Fujita T, Yokochi T, et al. LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 2002 Nov 1;100(9):3233-9.
- 89 Levi M, ten CH. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999 Aug 19;341(8):586-92.

- 90 Takahashi K, Chang WC, Takahashi M, Pavlov V, Ishida Y, La BL, et al. Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology* 2011 Jan;216(1-2):96-102.
- 91 Berger SP, Roos A, Mallat MJ, Schaapherder AF, Doxiadis II, van KC, et al. Low pretransplantation mannose-binding lectin levels predict superior patient and graft survival after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2007 Aug;18(8):2416-22.
- 92 Moller-Kristensen M, Ip WK, Shi L, Gowda LD, Hamblin MR, Thiel S, et al. Deficiency of mannose-binding lectin greatly increases susceptibility to postburn infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 2006 Feb 1;176(3):1769-75.
- 93 Kaur S, Gupta VK, Thiel S, Sarma PU, Madan T. Protective role of mannan-binding lectin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Exp Immunol* 2007 May;148(2):382-9.
- 94 Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, Fujita T, Endo Y, Hansen S, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog* 2012;8(7):e1002793.
- 95 Capoluongo E, Vento G, Rocchetti S, Giardina E, Concolino P, Sinibaldi C, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and pulmonary outcome in premature neonates: a pilot study. *Intensive Care Med* 2007 Oct;33(10):1787-94.

- 96 Ozdemir O, Dinleyici EC, Tekin N, Colak O, Aksit MA. Low-mannose-binding lectin levels in susceptibility to neonatal sepsis in preterm neonates with fetal inflammatory response syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010 Sep;23(9):1009-13.
- 97 Eisen DP, Dean MM, Thomas P, Marshall P, Gerns N, Heatley S, et al. Low mannose-binding lectin function is associated with sepsis in adult patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006 Nov;48(2):274-82.
- 98 Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrard CS, Turner MW, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock* 2006 Jan;25(1):88-93.
- 99 Dean MM, Flower RL, Eisen DP, Minchinton RM, Hart DN, Vuckovic S. Mannose-binding lectin deficiency influences innate and antigen-presenting functions of blood myeloid dendritic cells. *Immunology* 2011 Feb;132(2):296-305.
- 100 Dean MM, Minchinton RM, Heatley S, Eisen DP. Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. *J Clin Immunol* 2005 Jul;25(4):346-52.
- 101 Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJ, et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun* 2007 Mar;8(2):154-63.
- 102 Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med* 2003 Aug 7;349(6):554-60.

- 103 Garcia-Laorden MI, Garcia-Saavedra A, de Castro FR, Violan JS, Rajas O, Blanquer J, et al. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006 Dec;118(6):1383-6.
- 104 Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de CF, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, et al. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol* 2008 Aug;122(2):368-74, 374.
- 105 Lozano F, Suarez B, Munoz A, Jensenius JC, Mensa J, Vives J, et al. Novel MASP2 variants detected among North African and Sub-Saharan individuals. *Tissue Antigens* 2005 Aug;66(2):131-5.
- 106 Valles X, Sarrias MR, Casals F, Farnos M, Piner R, Suarez B, et al. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in south-eastern African children. *Tissue Antigens* 2009 Oct;74(4):298-307.
- 107 Schlapbach LJ, Aebi C, Otth M, Leibundgut K, Hirt A, Ammann RA. Deficiency of mannose-binding lectin-associated serine protease-2 associated with increased risk of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. *Pediatr Infect Dis J* 2007 Nov;26(11):989-94.
- 108 Granell M, Urbano-Ispizua A, Suarez B, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martinez C, et al. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2006 Oct;34(10):1435-41.
- 109 Horcajada JP, Lozano F, Munoz A, Suarez B, Farinas-Alvarez C, Almela M, et al. Polymorphic receptors of the innate immune system (MBL/MASP-2 and

- TLR2/4) and susceptibility to pneumococcal bacteremia in HIV-infected patients: a case-control study. *Curr HIV Res* 2009 Mar;7(2):218-23.
- 110 Cervera C, Lozano F, Saval N, Gimferrer I, Ibanez A, Suarez B, et al. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation* 2007 Jun 15;83(11):1493-500.
- 111 Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, et al. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Nov;87(22):8810-4.
- 112 Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 2004;24(1):1-37.
- 113 Aruffo A, Bowen MA, Patel DD, Haynes BF, Starling GC, Gebe JA, et al. CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 1997 Oct;18(10):498-504.
- 114 Martinez-Florensa M, Consuegra-Fernandez M, Martinez VG, Canadas O, Armiger-Borras N, Bonet-Rosello L, et al. Targeting of Key Pathogenic Factors From Gram-Positive Bacteria by the Soluble Ectodomain of the Scavenger-Like Lymphocyte Receptor CD6. *J Infect Dis* 2013 Dec 19.
- 115 Sarrias MR, Farnos M, Mota R, Sanchez-Barbero F, Ibanez A, Gimferrer I, et al. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jul 10;104(28):11724-9.

- 116 Bowen MA, Aruffo AA, Bajorath J. Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions. *Proteins* 2000 Aug 15;40(3):420-8.
- 117 Patel DD, Wee SF, Whichard LP, Bowen MA, Pesando JM, Aruffo A, et al. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med* 1995 Apr 1;181(4):1563-8.
- 118 Gimferrer I, Calvo M, Mittelbrunn M, Farnos M, Sarrias MR, Enrich C, et al. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 2004 Aug 15;173(4):2262-70.
- 119 Carmo AM, Castro MA, Arosa FA. CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells. *J Immunol* 1999 Oct 15;163(8):4238-45.
- 120 Calvo J, Places L, Espinosa G, Padilla O, Vila JM, Villamor N, et al. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 1999 Aug;54(2):128-37.
- 121 Hassan NJ, Barclay AN, Brown MH. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 2004 Apr;34(4):930-40.
- 122 Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R, Parnes JR, van Leeuwen FN, Figdor CG. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 2006 Apr 15;107(8):3212-20.
- 123 Azzam HS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 1998 Dec 21;188(12):2301-11.

- 124 Bikah G, Lynd FM, Aruffo AA, Ledbetter JA, Bondada S. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol* 1998 Aug;10(8):1185-96.
- 125 Osman N, Lazarovits AI, Crumpton MJ. Physical association of CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993 May;23(5):1173-6.
- 126 Lankester AC, van Schijndel GM, Cordell JL, van Noesel CJ, van Lier RA. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 1994 Apr;24(4):812-6.
- 127 Osman N, Ley SC, Crumpton MJ. Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992 Nov;22(11):2995-3000.
- 128 Vera J, Fenutria R, Canadas O, Figueras M, Mota R, Sarrias MR, et al. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Feb 3;106(5):1506-11.
- 129 Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010 Aug;36(8):1286-98.
- 130 Kremer Hovinga JA, Zeerleder S, Kessler P, Romani de WT, van Mourik JA, Hack CE, et al. ADAMTS-13, von Willebrand factor and related parameters in severe sepsis and septic shock. *J Thromb Haemost* 2007 Nov;5(11):2284-90.

- 131 Lerolle N, Dunois-Larde C, Badirou I, Motto DG, Hill G, Bruneval P, et al. von Willebrand factor is a major determinant of ADAMTS-13 decrease during mouse sepsis induced by cecum ligation and puncture. *J Thromb Haemost* 2009 May;7(5):843-50.
- 132 Zhou Z, Nguyen TC, Guchhait P, Dong JF. Von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Thromb Hemost* 2010 Feb;36(1):71-81.
- 133 Rubin DB, Wiener-Kronish JP, Murray JF, Green DR, Turner J, Luce JM, et al. Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *J Clin Invest* 1990 Aug;86(2):474-80.
- 134 Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Oct 1;170(7):766-72.
- 135 Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003 Jul;1(7):1335-42.
- 136 Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. *Blood* 2005 Jul 1;106(1):11-7.
- 137 Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA, Chung DW. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Dec 5;103(49):18470-4.

- 138 Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2003 Aug 8;278(32):29633-9.
- 139 Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002 Aug 22;347(8):589-600.
- 140 Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002 Jul 15;100(2):710-3.
- 141 Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood* 2006 Jan 15;107(2):528-34.
- 142 Bongers TN, de Maat MP, van Goor ML, Bhagwanbali V, van Vliet HH, Gomez Garcia EB, et al. High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke* 2006 Nov;37(11):2672-7.
- 143 Chion CK, Doggen CJ, Crawley JT, Lane DA, Rosendaal FR. ADAMTS13 and von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 2007 Mar 1;109(5):1998-2000.

- 144 Bongers TN, de Bruijne EL, Dippel DW, de Jong AJ, Deckers JW, Poldermans D, et al. Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients. *Atherosclerosis* 2009 Nov;207(1):250-4.
- 145 Loof AH, van Vliet HH, Kappers-Klunne MC. Low activity of von Willebrand factor-cleaving protease is not restricted to patients suffering from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001 Mar;112(4):1087-8.
- 146 Hyseni A, Kemperman H, de Lange DW, Kesecioglu J, de Groot PG, Roest M. Active von Willebrand factor predicts 28-day mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 2014 Apr 3;123(14):2153-6.
- 147 Martin K, Borgel D, Lerolle N, Feys HB, Trinquart L, Vanhoorelbeke K, et al. Decreased ADAMTS-13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats) is associated with a poor prognosis in sepsis-induced organ failure. *Crit Care Med* 2007 Oct;35(10):2375-82.
- 148 Fukushima H, Nishio K, Asai H, Watanabe T, Seki T, Matsui H, et al. Ratio of von Willebrand Factor Propeptide to ADAMTS13 Is Associated With Severity of Sepsis. *Shock* 2013 May;39(5):409-14.
- 149 Karim F, Adil SN, Afaq B, Ul HA. Deficiency of ADAMTS-13 in pediatric patients with severe sepsis and impact on in-hospital mortality. *BMC Pediatr* 2013 Mar 28;13(1):44.
- 150 Nguyen TC, Liu A, Liu L, Ball C, Choi H, May WS, et al. Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica* 2007 Jan;92(1):121-4.

- 151 Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011 Nov;140(5):1223-31.
- 152 Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis\*. *Crit Care Med* 2014 Mar;42(3):625-31.
- 153 Salluh JI, Soares M. ICU severity of illness scores: APACHE, SAPS and MPM. *Curr Opin Crit Care* 2014 Oct;20(5):557-65.
- 154 Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981 Aug;9(8):591-7.
- 155 Vincent JL, de MA, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998 Nov;26(11):1793-800.
- 156 Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 1999 Jul;25(7):686-96.
- 157 Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001 Oct 10;286(14):1754-8.

- 158 Kajdacsy-Balla Amaral AC, Andrade FM, Moreno R, Artigas A, Cantraine F, Vincent JL. Use of the sequential organ failure assessment score as a severity score. *Intensive Care Med* 2005 Feb;31(2):243-9.
- 159 Osaka D, Shibata Y, Kanouchi K, Nishiwaki M, Kimura T, Kishi H, et al. Soluble endothelial selectin in acute lung injury complicated by severe pneumonia. *Int J Med Sci* 2011;8(4):302-8.
- 160 Boldt J, Muller M, Kuhn D, Linke LC, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in the critically ill: a comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Med* 1996 Feb;22(2):122-8.
- 161 Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, et al. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993 Jan 15;150(2):644-54.
- 162 Takala A, Jousela I, Jansson SE, Olkkola KT, Takkunen O, Orpana A, et al. Markers of systemic inflammation predicting organ failure in community-acquired septic shock. *Clin Sci (Lond)* 1999 Nov;97(5):529-38.
- 163 Knapp S, Thalhammer F, Locker GJ, Laczika K, Hollenstein U, Frass M, et al. Prognostic value of MIP-1 alpha, TGF-beta 2, sELAM-1, and sVCAM-1 in patients with gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998 May;87(2):139-44.
- 164 Schuetz P, Jones AE, Aird WC, Shapiro NI. Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. *Shock* 2011 Aug;36(2):104-8.

- 165 Briassoulis G, Papassotiriou I, Mavrikiou M, Lazaropoulou C, Margeli A. Longitudinal course and clinical significance of TGF-beta1, sL- and sE-Selectins and sICAM-1 levels during severe acute stress in children. *Clin Biochem* 2007 Mar;40(5-6):299-304.
- 166 Smith CW. Potential significance of circulating E-selectin. *Circulation* 1997 Apr 15;95(8):1986-8.
- 167 Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 1990 Nov 23;250(4984):1132-5.
- 168 Bradfield PF, Johnson-Leger CA, Zimmerli C, Imhof BA. LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol* 2008 Feb;20(2):247-57.
- 169 Bauer GJ, Arbabi S, Garcia IA, de H, I, Rosengart MR, Maier RV. Adherence regulates macrophage signal transduction and primes tumor necrosis factor production. *Shock* 2000 Oct;14(4):435-40.
- 170 Geleijns K, Roos A, Houwing-Duistermaat JJ, van RW, Tio-Gillen AP, Laman JD, et al. Mannose-binding lectin contributes to the severity of Guillain-Barre syndrome. *J Immunol* 2006 Sep 15;177(6):4211-7.
- 171 Sorensen GL, Petersen I, Thiel S, Fenger M, Christensen K, Kyvik KO, et al. Genetic influences on mannan-binding lectin (MBL) and mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) activity. *Genet Epidemiol* 2007 Jan;31(1):31-41.

- 172 Hart ML, Ceonzo KA, Shaffer LA, Takahashi K, Rother RP, Reenstra WR, et al. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol* 2005 May 15;174(10):6373-80.
- 173 Moller-Kristensen M, Wang W, Ruseva M, Thiel S, Nielsen S, Takahashi K, et al. Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand J Immunol* 2005 May;61(5):426-34.
- 174 Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K, Shi L, Busche MN, Rother RP, et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2005 Jul 1;175(1):541-6.
- 175 Hart ML, Walsh MC, Stahl GL. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol Immunol* 2004 Jun;41(2-3):165-71.
- 176 Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003 Oct;33(10):2853-63.
- 177 Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001 Sep 17;194(6):781-95.

- 178 Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol* 2005 Mar 15;174(6):3220-6.
- 179 Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Calvo J, Places L, Padilla O, et al. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2001 Sep;40(9):1056-9.
- 180 Sakr Y, Lobo SM, Moreno RP, Gerlach H, Ranieri VM, Michalopoulos A, et al. Patterns and early evolution of organ failure in the intensive care unit and their relation to outcome. *Crit Care* 2012 Nov 16;16(6):R222.
- 181 Gimferrer I, Farnos M, Calvo M, Mittelbrunn M, Enrich C, Sanchez-Madrid F, et al. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* 2003 Mar 7;278(10):8564-71.
- 182 van der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 1995 Jan;3(1):1-12.
- 183 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999 Aug 11;282(6):561-8.
- 184 Chauhan AK, Walsh MT, Zhu G, Ginsburg D, Wagner DD, Motto DG. The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood* 2008 Apr 1;111(7):3452-7.

185 Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA.  
Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. Blood 2005  
Feb 1;105(3):1085-93.

186 Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, et  
al. Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in  
healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). Thromb  
Haemost 2006 Feb;95(2):212-20.