



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES PARA LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

EFFECTO DE LA PROTEINA C ACTIVADA RECOMBINANTE SOBRE LA
MORFOLOGÍA DEL ERITROCITO EN PACIENTES CON SEPSIS SEVERA.

Trabajo de Investigación

Que presenta

DRA. ELIZABETH ALVARADO CARBAJAL

Para obtener el Diploma de la Especialidad de:

ESPECIALIDAD EN MEDICINA DEL ENFERMO EN ESTADO CRÍTICO



Asesor de Tesis

Asesor teórico: Dr. Tiburcio López Valle

MEXICO, D. F

AÑO 2007

No. De Registro: 145.2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue desarrollada en el Hospital Regional “Adolfo López Mateos” Delegación Álvaro Obregón de la Ciudad de México, D.F.

Dedicatoria

*Este trabajo lo dedico con todo mi amor a mis padres **Abel** y **Beatriz** por ser los principales que han guiado mi camino hacia la superación y desarrollo profesional, darme su amor incondicional, estar siempre a mi lado y apoyarme en todos los aspectos de mi vida; a mi hermano **Abel**, a mis hermanas **Liliana**, **Bety**, **Marce** y **Cinthy** por su paciencia, cariño y su ayuda en todo momento; a mis sobrinitos **Idara** y **Haziel** que son mi tesoro y la alegría que resplandece en mi hogar, y a **Jaime** por ser el amor y la ilusión que inspira mi vida.*

Agradecimientos

A Dios, por darme la vida y permitirme realizar este proyecto, también porque me ha dado la oportunidad de continuar en el camino de la salud ayudándome a aprender cosas nuevas y mostrarme su belleza a través del estudio y los avances de la ciencia. Tu eres mi principio y fin.

Al Dr López Valle mi asesor de tesis por la confianza que me proporcionó y la experiencia para la realización de este trabajo.

A mi cuñado Adolfo, por ayudarme en la realización de la tesis y trabajos.

Al Dr Gayosso por darme la oportunidad, por compartir su experiencia y por la paciencia que me tuvo, mil gracias!

A todos mis adscritos que con sus enseñanzas han sembrado el conocimiento en mí y por los buenos momentos, gracias por haberlos conocido me llevo muy bonitos recuerdos de ustedes.

A mis compañeros y amigos Jaime, Iván, Lulú y Puerto con quienes compartí experiencias que hicieron enriquecer mi trabajo y vida personal, también a Dianita sobre todo por su calidez humana y compañerismo.

A mi amiga Magda, por su ayuda incondicional en los momentos más difíciles de mi vida, y a todos los buenos momentos que pasamos.

A la todo el personal que conocí durante estos dos años de formación que compartí experiencias y que me enseñaron muchas cosas y por hacerme tener un buen ambiente de trabajo.

DR SERGIO B. BARRAGAN PADILLA
COORDINADOR DE CAPACITACION DESARROLLO E INVESTIGACION

DR. CARLOS LENIN PLIEGO REYES
JEFE DE ENSEÑANZA

DR. CESAR RUISANCHEZ PEINADO
JEFE DE INVESTIGACION

DR. OTHON GAYOSSO CRUZ

PROF. TITULAR DE CURSO UNIVERSITARIO DE MEDICINA DEL
ENFERMO EN ESTADO CRÍTICO

DR. TIBURCIO LOPEZ VALLE

ASESOR DE TESIS

DR. ROBERTO BRUGADA MOLINA

VOCAL DE INVESTIGACION

ÍNDICE

Abreviaturas	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. Introducción	1
II. Planteamiento del problema	4
III. Marco teórico	5
Características clínicas de la sepsis severa	5
Vías de señalización de la Proteína C en el proceso anticoagulante y Sepsis Severa	7
Farmacología y Farmacocinética de la Proteína C Activada	12
Cambios hematológicos durante la sepsis	13
IV. Hipótesis	15
V. Objetivo general	16
VI. Material y Métodos	17
Diseño del estudio	17
Universo de estudio	17
Tamaño de la muestra	17
Criterios de Inclusión	17
Criterios de Exclusión	18
Criterios de Eliminación	18
Elección de pacientes y toma de muestras	18
Consideraciones éticas	19
Análisis estadístico	19

VII. Resultados	20
VIII. Discusión	26
IX. Conclusiones	28
X. Referencias Bibliográficas	29

Abreviaturas

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation. Evaluación de Salud Fisiológica Aguda y Crónica; se determina de acuerdo a la calificación de variables agudas, antecedentes de padecimientos crónicos, edad y categoría diagnóstica desarrollada por Knaus.

FDA: La administración de alimentos y drogas

IL: Interleucina

PAI-1: Inhibidor activado por plasminógeno.

SOFA: Sepsis Related Organ Failure Assesment. Valoración de la Falla Orgánica Relacionada a la Sepsis; intenta identificar a la falla orgánica múltiple en relación a un estado séptico.

TFPI: inhibidor de la vía factor-tejido

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la administración de la Proteína C activada humana recombinante sobre la morfología del eritrocito en pacientes con sepsis severa o choque séptico. Participaron en este estudio 5 pacientes con más de una falla orgánica o con una calificación de APACHE II de más de 25 puntos. Los pacientes fueron sometidos a un tratamiento con la proteína C activada recombinada (24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$). Para analizar la morfología de los eritrocitos se realizaron frotis de sangre periférica previo a la administración de la proteína y durante el tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 horas, se evaluó el porcentaje de eritrocitos con alteraciones en su tamaño (Anisocitosis) y forma (Poiquilocitosis). Los resultados encontrados muestran que los pacientes tratados con la proteína C activada recombinante, con un SOFA menor de 11, disminuyen el porcentaje de eritrocitos con alteraciones en su tamaño y forma, mientras que los pacientes con un SOFA mayor a 11 no mostraron cambios significativos en las alteraciones morfológicas de los eritrocitos. En conclusión, el tratamiento de pacientes sépticos tratados con la proteína C activada recombinante tiende a disminuir las alteraciones en la morfología de los eritrocitos aumentando la probabilidad de vida del paciente.

Palabras Claves: Sepsis, Proteína C activada Recombinada Poiquilocitosis, Anisocitosis

Abstract

The objective this investigation was evaluated the effect of administration at recombinant human activated protein C on the erythrocytes morphology in patients with severe sepsis or septic shock. 5 patients participated in this study, with one or more organic failure or APACHE > 25 points. The Patients received recombinant activated protein C (24 µg/kg/hr). To analyze the erythrocytes morphology it done periphery blood extend on slides before activated protein C administration and during the therapy (to 24, 48, 72 and 96 hours), it evaluated the percentage of altered erythrocytes in size (Anisocytosis) and shade (Poikilocytosis). The results finding, it show that patients subject to therapy with the recombinant activated protein C with SOFA < 11 reduced the percentage of altered erythrocytes in both size and shade, unlike the patients with SOFA > 11, it not showed changes significant statistically in the alterations of erythrocytes morphology. In conclusion, therapy of septic patients with recombinant activated protein C trend to reduce the erythrocytes morphological alterations, and in consequence increases the survival probably.

Key words: Sepsis, recombinant activated Protein C, Poikilocytosis, Anisocytosis

I. Introducción

La sepsis severa, definida como la sepsis asociada a una disfunción orgánica, resulta de una respuesta inflamatoria generalizada y procoagulante a la infección (Abraham et al., 2005). La sepsis severa contribuye al 10% de los ingresos a la terapia intensiva en todo el mundo con una alta mortalidad del 20 al 52% (Bernad et al., 2001).

Aunque se han estado llevando investigaciones en el manejo intensivo y terapias antimicrobianas, la sepsis continua siendo un problema en las unidades de cuidados intensivos y una causa seria de morbi-mortalidad. La incidencia continúa en incremento con una mínima reducción de su mortalidad. Las dificultades consisten en una falta de identificación temprana de la sepsis severa y a la falta de terapias efectivas para su manejo (Vincent et al., 2005).

La proteína C activada es una proteína endógena que promueve la fibrinolisis e inhibe la trombosis y la inflamación, es un importante modulador de la coagulación y la inflamación asociada a sepsis severa. La proteína C es convertida de su precursor inactivo la proteína C por la trombina “acoplada” a la trombomodulina. La conversión de la Proteína C a Proteína C activada puede ser afectada durante la sepsis como resultado de la regulación de la trombomodulina por las citocinas inflamatorias. Niveles bajos de Proteína C son observados en la mayoría de los pacientes con sepsis y son asociados con un incremento en el riesgo de muerte (Bernard y cols., 2001).

Bernard y colaboradores realizaron un estudio sobre el uso de la proteína C activada en pacientes sépticos encontrando una deficiencia de esta en un 87% (Siegel, 2002). La eficacia clínica de la proteína C activada recombinante (Drotrecogin Alfa activada) fue evaluada en un estudio internacional, multicéntrico, doble ciego, controlado por placebo, aleatorio (PROWESS) en el cual 1690 pacientes con sepsis grave recibieron Drotrecogin Alfa activada o placebo, durante las 48 hrs de inicio de la primera disfunción orgánica inducida por sepsis. Los pacientes tratados con Drotrecogin alfa mostraron una mejoría en la supervivencia a los 28 días en comparación con aquellos tratados con placebo. A los 28 días, las tasas globales de mortalidad fueron 24.7% para el grupo tratado con Drotrecogin Alfa activada y 30.8% para el grupo tratado con placebo. Drotrecogin Alfa activada redujo el riesgo de muerte en 19.4% y aumentó las probabilidades de supervivencia en 38.1%. (Bernard, 2001).

En noviembre 2001 la FDA aprobó su uso de Drotrecogin Alfa activada para el tratamiento de pacientes sépticos con alto riesgo de muerte evaluado por APACHE II mayor de 25 puntos.

Otro estudio abierto, multicéntrico que incluyó a 2378 pacientes adultos con sepsis grave (ENHANCE) se evaluó la mortalidad a 28 días la cual fue de 25.3%. La tasa de mortalidad fue menor en los pacientes tratados dentro de las 24 horas de disfunción orgánica comparados con aquellos tratados después de 24 horas (Vincent, 2005).

Los eventos de sangrado son frecuentes en pacientes con sepsis grave y la alta incidencia de sangrado durante la infusión es debida a su propiedad antitrombótica y ocurre predominantemente en pacientes con predisposición a sangrado.

En el estudio PROWESS el porcentaje de pacientes que experimentaron cuando menos un evento de sangrado cuando fueron tratados con Drotrecogin Alfa activada y cuando fueron tratados con placebo fue de 23.9% y 17.3% respectivamente. En ambos grupos de tratamiento la mayoría de los eventos de sangrado fueron equimosis o sangrado del tracto gastrointestinal. La tasa de eventos graves de sangrado grave durante el periodo de estudio de 28 días fue de 6.5%. La incidencia de sangrado del Sistema Nervioso Central durante el periodo de estudio de 28 días fue de 1.5% (Bernard et al., 2001).

II. Planteamiento del Problema

La sepsis severa constituye una entidad heterogénea en la que se incluye a casos con infección producida por distintos microorganismos en una variedad de focos, condicionando daño a distintos órganos, distintos niveles de gravedad y distintos estadios evolutivos, acompañado en muchas ocasiones de estado de choque y como consecuencia falla o disfunción multiorgánica y muerte.

La sepsis severa es la primera causa de ingreso y de las enfermedades mas prevalentes en las unidades de cuidados intensivos, presenta una mortalidad elevada alcanzando hasta un 50% aun en unidades de terapia con alta tecnología.

En la terapia de la sepsis severa hoy en día se requiere de una terapia que mejore la perspectiva de sobrevivida de los pacientes en estado crítico y en este sentido la proteína C activada recombinante recientemente se ha colocado como un buen candidato para el tratamiento de sepsis severa por lo que aumenta la necesidad de realizar investigaciones acerca de los beneficios que puede tener el tratamiento con esta droga de origen recombinante.

III. Marco Teórico

La Drotrecogina alfa (activada) (Xigris, Eli Lilly, Indianapolis, USA), conocida formalmente como Proteína C activada humana recombinante, es una glucoproteína análoga de la proteína C endógena, sintetizada y secretada por células humanas manipuladas con ingeniería genética (Yan et al., 1990). La proteína C es un importante modulador de la coagulación y la inflamación asociada a sepsis severa. En Pacientes con sepsis, disminuye la proteína C y se reduce la capacidad para producir endogenamente proteína C activada, favoreciendo la inflamación sistémica, la coagulación y la muerte celular (Esmon, 1998).

La Drotrecogina alfa fue aprobada por la FDA de los Estados Unidos en Noviembre del 2001, para ser usada como tratamiento en combinación con la terapia convencional, en pacientes adultos en estado crítico con sepsis severa y alto riesgo de muerte. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/>

Características clínicas de la sepsis severa.

La sepsis severa, se define como aquella sepsis asociada a una disfunción aguda de órgano, resultado de un proceso inflamatorio generalizado y una respuesta procoagulante a la infección (Bone et al., 2001). Como estadística relevante se ha estimado que la incidencia de sepsis en los Estados Unidos es de aproximadamente 750 000 casos por año generando un costo económico cercano a los 17 billones de dólares (Angus et al., 2001). A pesar

de los avances en cuidados intensivos, la sepsis severa conduce a una velocidad de mortalidad alta, en el rango de 30-50%. (Brun-Buisson et al., 1995; Friedman et al., 1998)

El síndrome de sepsis severa se caracteriza por un choque circulatorio y desarrollo de falla orgánica múltiple que puede llevar a la muerte del paciente (Parrillo, 1993). La terapia convencional consiste en erradicar la fuente de la infección administrando terapia antimicrobiana y soporte cardiovascular (Wheeler y Bernard, 1999). Se ha visto que una atención pronta a las alteraciones hemodinámicas puede influir en la recuperación de un paciente con sepsis severa. Rivers y sus colegas (2001) realizaron recientemente un estudio con pacientes que presentaban sepsis severa y choque séptico, el objetivo se dirigió rápidamente a restituir líquidos, administración de fármacos vasoactivos y transfusión de células rojas, el resultado que obtuvieron fue una reducción en la mortalidad comparado con pacientes que solo recibieron una terapia convencional.

Por 25 años, se han realizado pruebas clínicas dirigidas a tratar sepsis severa enfocándose principalmente en la respuesta inflamatoria, incluyendo el uso de glucocorticoides, anticuerpos contra endotoxina e inhibidores específicos de mediadores proinflamatorios (Opal y Cross, 1999; Freeman y Natanson, 2000; Natanson et al., 1998). Desafortunadamente las terapias antiinflamatorias han fallado al parecer en parte porque se había ignorado la importancia del sistema de coagulación en la sepsis (Freeman y Buchman, 2002; Matthay, 2001).

En los últimos 10 años, se ha incrementado el conocimiento del acoplamiento que existe entre los procesos de inflamación, coagulación microvascular y daño celular endotelial en la patofisiología de la sepsis severa (Iba et al., 1998). Estos hallazgos han llevado a realizar pruebas clínicas con agentes que tengan ambos efectos, anticoagulantes y anti-inflamatorios como terapia en sepsis severa, como la proteína C activada, el TFPI (inhibidor de la vía factor tisular) y antitrombina III (Bernard et al., 2001; Warren et al., 2001; Abraham, 2000). De estos tres agentes se ha demostrado que la proteína C activada es la única que mejora la sobrevivencia. Para entender mejor el mecanismo por el cual actúa la proteína C activada en la sepsis severa es mejor que expliquemos un poco la función de la proteína C en la vía anticoagulante y su asociación con el síndrome de sepsis.

Vías de señalización de la Proteína C en el proceso anticoagulante y Sepsis Severa.

La asociación entre la activación del sistema de coagulación y sepsis severa se conoce desde hace años (Corrigan et al., 1968). Durante la sepsis la liberación de toxinas microbianas y citocinas inflamatorias, incluyendo el TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa), IL-1 β e IL-6 de macrófagos entran en circulación sistémica desencadenando una cascada que resulta en una inflamación, daño endotelial y trombosis microvascular (Hinshaw et al., 1996). Pronto ocurren eventos en respuesta a la infección, el primero de ellos es la adhesión de leucocitos a células endoteliales lo cual es promovido por citocinas

proinflamatorias a través de una regulación positiva de moléculas de adhesión como la E-selectina y P-selectina (Parent y Eichacker, 1999). La adhesión de moléculas permite que los neutrófilos activen varias proteasas y otras citocinas proinflamatorias, lo cual contribuye a dañar el flujo sanguíneo y daño oxidante a vasos sanguíneos (Parent y Eichacker, 1999).

Además, para iniciar la cascada inflamatoria, toxinas microbianas y citocinas inflamatorias generan un ambiente procoagulante a través de varios mecanismos, en los cuales se incluye la activación de la vía de coagulación extrínseca por medio de la expresión del factor tisular proveniente de células endoteliales dañadas y monocitos activados (Levi y ten Cate, 1999; Osterud y Flaegstad, 1983). El factor tisular es un mediador clave en la activación de la coagulación en pacientes con sepsis. El factor tisular se une al factor de activación VII para formar el complejo factor tisular/factor VIIa, el cual a su vez activa al factor X. El factor X le permite al factor V (Va) convertir protrombina en trombina, la cual corta el fibrinógeno generando monómeros de fibrina, el cual polimeriza para formar fibrina (Taylor et al., 1991).

La importancia del factor tisular en la activación de la coagulación en sepsis fue confirmado en estudios con voluntarios sanos expuestos a endotoxina donde la inhibición del factor tisular por el TFPI previene la generación de trombina y formación de fibrina (Taylor et al., 1991).

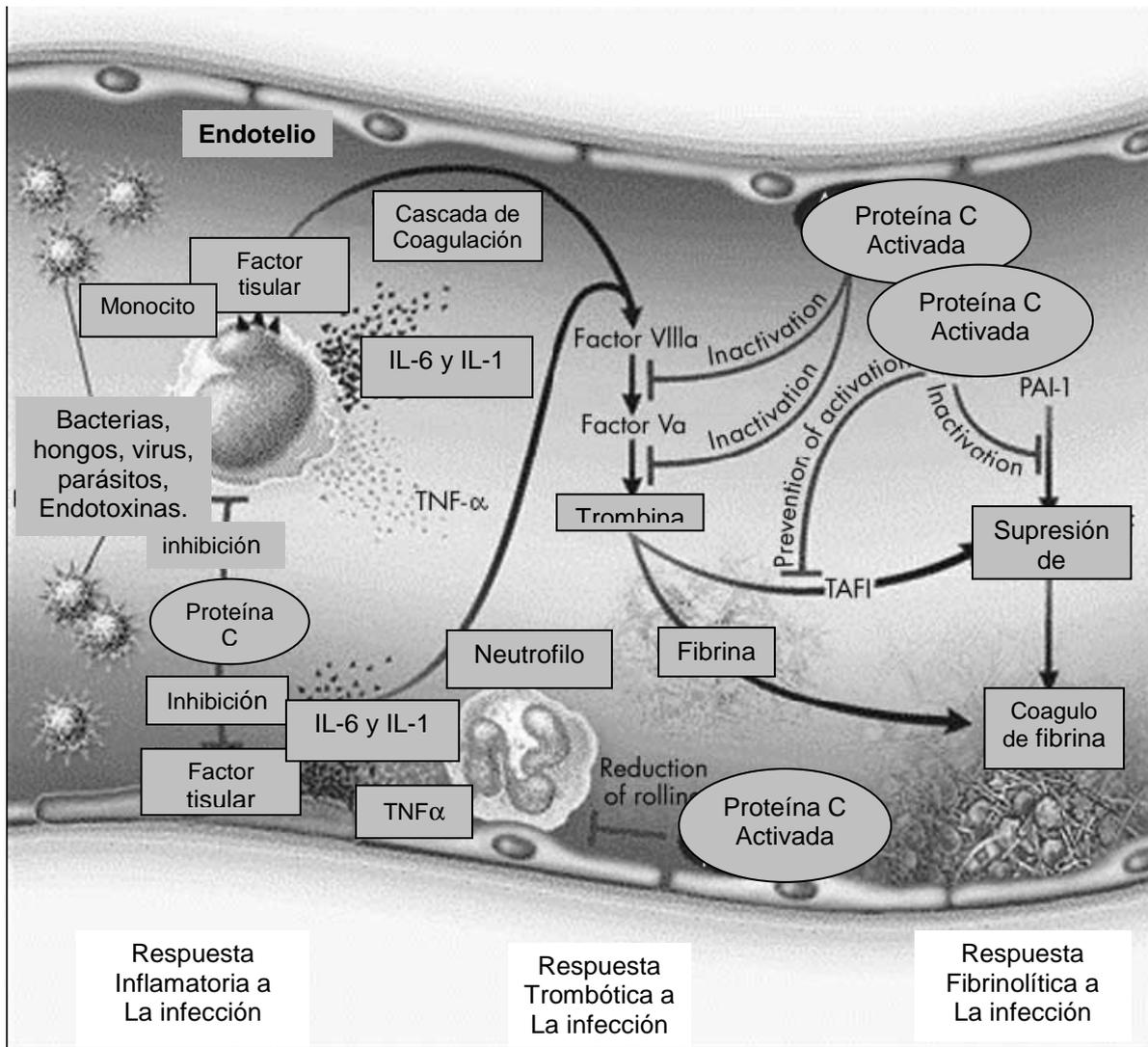


Figura 1. Mecanismos de acción de la proteína C activada.

Por el contrario, los eventos proinflamatorios pueden ser inducidos por componentes del sistema de coagulación (van der Poll et al., 1990; Dickneite, 1998; Levi et al., 1987). Por ejemplo, se ha mostrado que la trombina induce respuesta proinflamatoria directa en células endoteliales y macrófagos (Herbert et al., 1994; Jones y Geczy, 1990). De forma semejante el complejo factor tisular/factor VIIa puede aumentar la producción de especies reactivas de

oxígeno y la expresión del factor de histocompatibilidad clase II y receptores de adhesión celular en macrófagos (Cunningham et al., 1999).

Así, existen varias vías que pueden actuar de forma sinérgica con mecanismos inflamatorios y procoagulantes los cuales pueden iniciar y perpetuar trombosis microvascular, hipoperfusión tisular y disfunción de órgano en pacientes con sepsis.

Anormalidades en la coagulación y fibrinólisis son comúnmente observadas en pacientes con sepsis y ha sido asociado con una disminución de la supervivencia. (Mesters et al., 2000; Lorente et al., 1993; Fisher y Yan, 2000). Estos incluyen reducciones en todos los principales anticoagulantes fisiológicos, antitrombina III, proteína C y TFPI, asociados con incrementos en el PAI-1 y en el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina, el cual puede inhibir fibrinólisis.

La formación sistémica de fibrina resulta de un incremento en la generación de trombina, la supresión de mecanismos anticoagulantes fisiológicos y alteraciones en la fibrinólisis. Una extensa activación de la coagulación resulta de una deposición intravascular de fibrina y finalmente una oclusión de vasos de pequeño y mediano calibre comúnmente denominada diseminación intravascular de la coagulación la cual ha sido implicada en el desarrollo de sepsis induciendo falla multiorgánica.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la proteína C juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la modulación de la inflamación (Esmon et al., 1997). La proteína C es una glucoproteína dependiente de la vitamina K sintetizada por el hígado, esta formada por péptido de 155 aminoácidos (cadena ligera) y un péptido de 304 aminoácidos

(cadena pesada) unidos por un puente de disulfido (Comp y Esmon, 1991). La cadena ligera contiene residuos de carboxiglutamato gamma en la región N-terminal, la cual requiere de un procesamiento intracelular y de una unión dependiente de Calcio que se une negativamente a la membrana. La cadena pesada posee un dominio de serina proteasa. La proteína circula en la sangre como un zimógeno inactivo. En presencia de trombina, la proteína C se une a dos receptores que están sobre la superficie endotelial, el receptor endotelial a proteína C y el receptor a trombomodulina, convirtiéndose en proteína C activa. La proteína C activa con la proteína S actúa como un cofactor esencial, inactiva los factores Va y VIIa por lo tanto inhibe la generación de trombina. Además, la proteína C activa estimula la fibrinólisis disminuyendo la concentración de PAI-1. Finalmente, la proteína C activada tiene efectos directos anti-inflamatorios como lo demuestra su habilidad para inhibir tanto el TNF- α como la interleucina-1 por monocitos y la expresión de E-selectina sobre las células endoteliales, por lo tanto inhibe la fijación de leucocitos al endotelio.

La proteína C activa también modula directamente la señalización celular y el patrón de expresión de genes de células endoteliales (Joyce et al., 2001). Estudios moleculares han revelado que la proteína C activa inhibe la expresión de células de adhesión mediada por TNF y regulada por el factor de transcripción NF-kB (Grinnell y Joyce, 2001). La proteína C activa potencia la expresión de varios genes apoptóticos entre los cuales se encuentra el Bcl-2 y el inhibidor de apoptosis-1, así modula el proceso de apoptosis (muerte celular programada) (Deveraux y Reed, 1999). Entonces, con las evidencias encontradas en estos estudios es claro que la proteína C activa además de sus propiedades profibrinolíticas y antitrombóticas, juega un papel crucial

manteniendo el balance de los mecanismos anti-inflamatorios y apoptóticos en respuesta a un daño.

La conversión de la proteína C activa en proteína C es alterada durante la sepsis y se ha visto que existe una alta correlación entre la reducción en los niveles de la proteína C y el aumento en la morbilidad y mortalidad en pacientes con sepsis severa y choque séptico (Fijnvandraat et al., 1995). La terapia usando concentrados de proteína C ha mostrado prevenir coagulopatías y mejora la esperanza de vida en modelos de sepsis en animales (Taylor et al., 1987) y en humanos con meningococemia severa (Ettingshausen et al., 1999). El hecho que durante la sepsis severa se altera la activación de la proteína C, hace sugerir en principio que la administración de la proteína C activa puede ser una buena alternativa como terapia.

Farmacología y Farmacocinética de la Proteína C Activa (Drotrecogina alfa).

Es una forma recombinante que se expresa en células humanas de riñón de la línea 293 (Ehrlich et al., 1989). La droga tiene un peso molecular de 55 kDa y al igual que la forma endógena también consta de una cadena pesada y una ligera, posee propiedades anti-trombóticas, profibrinolíticas y anti-inflamatorias (Eli Lilly, 2001). En pacientes con sepsis severa se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas después de dos horas de su administración (12 µg/kg/hr a 30 µg/kg/hr). La droga puede ser inactivada por inhibidores de proteasas plasmáticas endógenas. En la mayoría de los pacientes, los niveles plasmáticos de la droga disminuyen a niveles no

detectables dos horas después de retirar la infusión. La droga tiene un aclaramiento de aproximadamente 40 litros/hr en pacientes sanos y aumenta un 50% en pacientes con sepsis severa al parecer resultado de una disminución en los inhibidores de proteasas endógenos.

Cambios hematológicos durante la sepsis

La sepsis es un proceso fisiopatológico que involucra alteraciones de la microcirculación y cambios en las características bioquímicas y fisiológicos en los constituyentes de la sangre.

Las alteraciones en las propiedades de los eritrocitos contribuyen a la fisiopatología de la sepsis, incluyendo anormalidades en el transporte de oxígeno y cambios en las propiedades mecánicas que alteran la reología de la microcirculación (Goyette et al., 2004).

La disfunción del sistema hematológico es una manifestación temprana de los pacientes sépticos. Las anormalidades más comunes en el sistema hematológico son anemia, leucocitosis, trombocitopenia, activación del sistema coagulación y cambios a nivel del endotelio, además de alteraciones morfológicas de los eritrocitos junto con disminución de flujo, hipoxia local e hipoperfusión secundarias, contribuyendo al desarrollo de la falla orgánica múltiple.

Numerosos estudios en varios modelos experimentales de sepsis han demostrado severas alteraciones a nivel microvascular incluyendo disminución funcional de la densidad capilar, alterando la extracción de oxígeno y alteraciones morfológicas y un alto porcentaje cambios irreversibles en los

eritrocitos como ovalocitos, esferocitos y equinocitos (Scharte, 2003; Berezina. et al., 2004).

La deformidad del eritrocito ocurre tempranamente en la sepsis, contribuyendo a la disminución del flujo sanguíneo y mayor tiempo de exposición a estas células en la microcirculación.

Recientes avances para monitoreo de la circulación se ha observado que la proporción de capilares perfundidos fue marcadamente mas disminuida en pacientes con sepsis severa y choque séptico comparada con voluntarios sanos. Los resultados mostraron que las alteraciones en la microcirculación mejoraron rápidamente en los sobrevivientes pero no en los no sobrevivientes además que la severidad de las alteraciones microvasculares fueron correlacionados con la severidad de la falla orgánica (Ezz el din et al., 2005).

IV. Hipótesis

La administración intravenosa de Proteína C activada recombinante reduce las alteraciones morfológicas que se presentan en los eritrocitos de pacientes con sepsis severa.

V. Objetivo General

Estudiar el efecto de la administración de la Proteína C activada recombinante sobre la morfología del eritrocito en pacientes con sepsis severa o choque séptico.

VI. Materiales y Métodos

Diseño del estudio:

Descriptivo, Longitudinal, Transversal, Prospectivo.

Universo de estudio:

Paciente adulto con diagnóstico de sepsis grave o choque séptico con más de una falla orgánicas o con una calificación de APACHE II de más de 25 puntos, candidatos a la administración de Proteína C activada recombinante en la Terapia Intensiva Adultos del “Hospital Regional Adolfo López Mateos”, durante el periodo comprendido de abril a septiembre del 2006.

Tamaño de la muestra:

5 pacientes

Criterios de Inclusión:

Pacientes adultos con sepsis severa o choque séptico que tengan más de una falla orgánica o APACHE II mayor de 25 puntos.

Criterios de Exclusión

Paciente con sepsis o choque séptico que tengan solo una falla orgánica, pacientes embarazadas, transplantados, cuenta de plaquetas menores 30 mil.

Criterios de Eliminación:

Sangrado activo, pacientes con diálisis peritoneal o hemodiálisis.

Elección de pacientes y toma de muestras.

Se eligieron como candidatos aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Se tomó un frotis de sangre periférica antes de iniciar el tratamiento con la Proteína C activada recombinante (Drotrecogin alfa, adquirida de la compañía Eli Lilly), se administró a una dosis de 24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ (fue preparada siguiendo las recomendaciones para su administración del fabricante) en infusión continua durante 96 hrs.

Durante el tratamiento se tomaron frotis de sangre periférica a las 24, 48, 72 y 96 hrs para monitorizar el efecto sobre las variables hematológicas; las laminillas fueron fijadas y teñidas con tinción de Write. Las laminillas fueron observadas con un microscopio óptico de luz polarizada acoplado a una cámara digital que permitió la adquisición de imágenes (microscopio Olympus modelo BXS1WI).

Consideraciones éticas:

Este estudio se ajustó a las normas éticas institucionales y de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, de acuerdo con las disposiciones del artículo No. 17 sección III en lo que se fundamenta la investigación.

Este estudio se ajustó a las normas e instructivos institucionales en materia de investigación científica, por lo que fue aprobado por el comité de Investigación del Hospital.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron manejados y tratados con el programa Sigma Plot versión 6.0, mientras que las pruebas estadísticas se realizaron en el programa Minitab Release 12 para Windows. Los datos expresados como porcentajes se presentan como media \pm desviación estándar, se realizaron como pruebas de significancia: la prueba de Man-Whitney, el coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de Chi-Cudrada, se consideraron que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando se tenía una $p < 0.05$.

VII. Resultados

En la tabla número uno podemos apreciar las características de los sujetos que fueron elegidos para participar en el estudio, como podemos apreciar de forma general el promedio de edad fue de 45 ± 12 años con un valor promedio en la escala de APACHE de 28 ± 3 y un SOFA medio de 13 ± 4 .

Tabla 1. Características de los pacientes seleccionados para el estudio.

	Sexo	Edad (Años)	Localización de la Infección	APACHE	SOFA
1	M	54	Abdomen	26	15
2	F	34	Respiratorio	26	11
3	M	45	Abdomen	30	10
4	F	32	Abdomen/Respiratorio	31	18
5	F	61	Abdomen	25	10

Para evaluar el efecto de la proteína C activada recombinada sobre las alteraciones en la morfología de los eritrocitos, clasificamos las alteraciones morfológicas del eritrocito en dos grupos: de Tamaño (Anisocitosis) y en su forma (Poiquilocitosis).

Los resultados que se obtuvieron al realizar el análisis de los frotis se pueden observar en la tabla número 2. En dos de los 5 pacientes que participaron en el estudio no se observaron mejorías en la morfología de los eritrocitos ni en su forma ni en el tamaño, sin embargo, tres de los pacientes al ser tratados con las infusiones de la proteína C activada recombinada si presentan mejoría, estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), en la morfología de

los eritrocitos tanto en forma como en tamaño, tal como se puede apreciar en la figura 2A y 2B.

Tabla 2. Alteraciones en la morfología del eritrocito en pacientes con sepsis

Paciente	sTX		TX-24 hrs		TX-48 hrs		TX-72 hrs		TX-96 hrs	
	T	F	T	F	T	F	T	F	T	F
1	38	35	34	32	39	33	39	34	42	35
2	30	22	29	20	20	14	16	8	12	8
3	12	8	9	6	5	3	2	2	1	1
4	52	40	50	39	55	41	54	40	58	40
5	15	12	12	11	9	8	9	7	7	5

T= Porcentaje de eritrocitos que tienen alteraciones en su tamaño, F= Porcentaje de eritrocitos que tienen alteraciones en su forma, sTX = Previo a la administración de la proteína C activada recombinada, TX = a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con la proteína C activada recombinada.

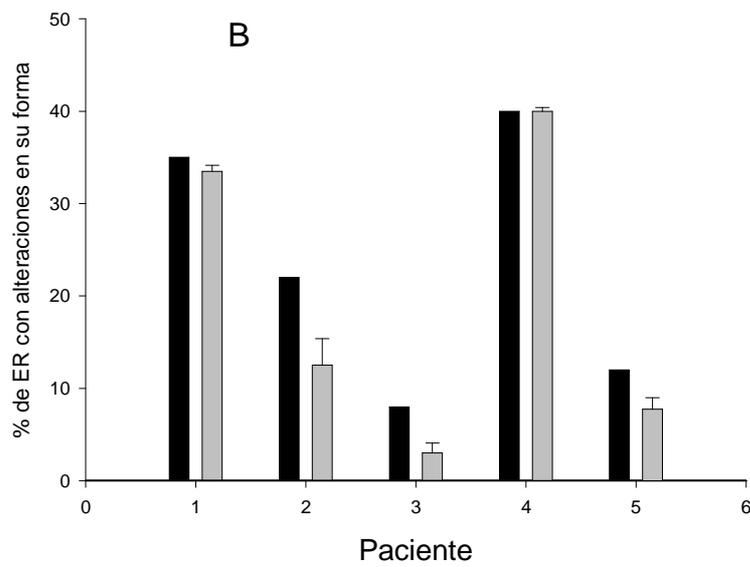
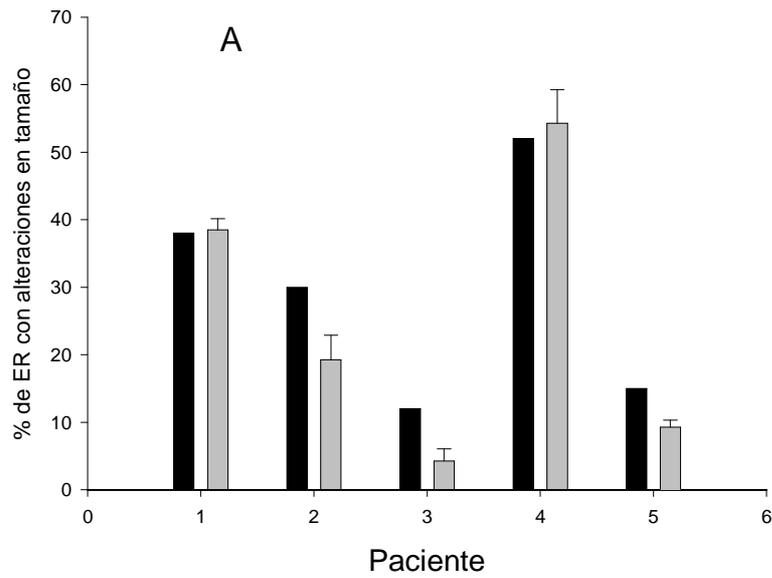


Figura 2. Efecto de la proteína C activada recombinante sobre las alteraciones en el tamaño (Panel A) y forma (Panel B) del eritrocito (ER). La Barra negra representa el porcentaje de alteración antes de administrar la proteína C activada y la barra en gris representa el porcentaje promedio en al final del tratamiento con la proteína C activada. Los porcentajes están graficados como media \pm desviación estándar.

También resulta muy importante resaltar que 2 de los 5 pacientes que participaron en el estudio murieron. Los pacientes que murieron son el 1 y el 4, justo los que tienen un mayor SOFA (16.5 ± 1.5) respecto de los que no murieron (10.3 ± 0.3).

En este estudio, además, se puede apreciar que en los pacientes sépticos existe una correlación entre el valor del SOFA y las alteraciones en la morfología del eritrocito tanto en su tamaño (Coeficiente de correlación de Pearson de 0.9513) como en su forma (Coeficiente de correlación de Pearson de 0.9520)(ver figura 3, donde se muestra la correlación).

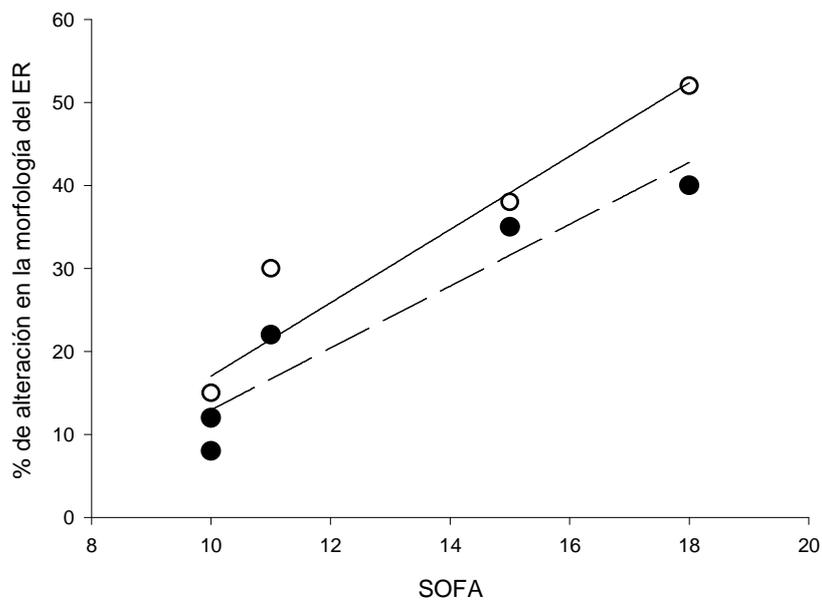


Figura 3. Correlación entre el SOFA y el porcentaje de alteraciones en la morfología del eritrocito (ER). Los círculos claros (○) representan el porcentaje de ER con alteraciones en su tamaño, mientras que los círculos rellenos de negro (●) representan el porcentaje de ER con alteraciones en su forma. (—) correlación entre el SOFA y la alteración en el tamaño del ER y (- -) correlaciona el SOFA con la alteración en la forma del ER. Estos datos que se muestran corresponden a valores de estas variables previas al tratamiento con la proteína C activada recombinada.

Otro análisis que se realizó fue una prueba de chi-cuadrada con el fin de ver asociaciones entre variables de estudio. Como se puede apreciar en los análisis realizados (tablas 3 y 4) existe una relación significativa ($p < 0.05$) entre las alteraciones morfológicas del eritrocito y la sobrevivencia.

Tabla 3. Relación entre el porcentaje promedio de eritrocitos con alteraciones en el tamaño al final del tratamiento con la proteína C activada recombinada y la sobrevivencia.

		TX	% de ER con alteración en el Tamaño
Sobrevivieron	Si	3	11
	No	2	46

Chi-cuadrada = 4.3, $p = 0.03$.

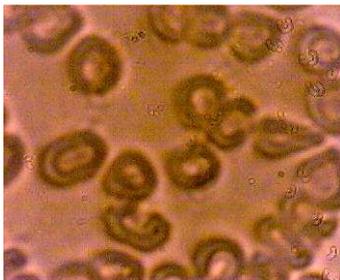
Tabla 4. Relación entre el porcentaje promedio de eritrocitos con alteraciones en su forma al final del tratamiento con la proteína C activada recombinada y la sobrevivencia.

		TX	% de ER con alteración en su forma
Sobrevivieron	Si	3	8
	No	2	37

Chi-cuadrada = 4.6, $p = 0.03$.

Finalmente, podemos ver dos imágenes ilustrativas donde se aprecian alteraciones en la forma (Imagen A) y en el tamaño (Imagen B) de los eritrocitos en pacientes sépticos.

A



B



VIII. Discusión

En este trabajo de investigación se soporta que los pacientes con sepsis severa o choque séptico presentan alteraciones en la morfología de los eritrocitos tanto en su forma como en su tamaño, dichas modificaciones pueden impactar funciones como el transporte de oxígeno e inducir cambios en la reología de la microcirculación como lo sugieren otros autores comprometiendo en estado de salud del paciente (Goyette et al., 2004).

Se ha visto que la disfunción del sistema hematológico es una de las manifestaciones tempranas de los pacientes sépticos, entre estas anormalidades que se han reportado, además de los cambios en la morfología de eritrocito, se encuentran la anemia, leucocitosis, trombocitopenia, activación del sistema coagulación, cambios a nivel del endotelio capilar, disminución de flujo, hipoxia local e hipoperfusión secundarias, contribuyendo al desarrollo de la falla orgánica múltiple (Scharte, 2003; Berezina. et al., 2004; Ezz el din et al., 2005). Estas anormalidades podrían explicar lo observado en nuestra investigación donde los pacientes con un SOFA mayor están correlacionados con un alto porcentaje de eritrocitos con alteraciones morfológicas que comprometen el estado crítico del mismo y reduciendo la esperanza de vida tal como ocurrió con dos pacientes que fallecieron.

Recientes avances en la terapia de los pacientes con sepsis severa y choque séptico usando la proteína C activada recombinante han demostrado que disminuye los índices de mortalidad y mejora la expectativa de vida de los pacientes en estado crítico (Pastores, 2003), en nuestro estudio el tratamiento con la proteína C activada recombinante también mejoró la esperanza de vida de los pacientes y demostramos además que reduce las alteraciones morfológicas de los eritrocitos dato que no ha sido reportado previamente.

IX. Conclusiones

1. Existe una correlación entre los valores de SOFA y el porcentaje de eritrocitos con alteraciones morfológicas.
2. Los pacientes con un SOFA menor a 11 respondieron satisfactoriamente al tratamiento con la proteína C activada recombinada mientras que a valores mayores de SOFA no se observaron cambios en la morfología alterada de los eritrocitos.
3. La terapia de pacientes sépticos con la proteína C activada recombinada parece mejorar la esperanza de recuperación en un 60%.

En general, los datos obtenidos en esta investigación hacen sugerir que los pacientes con sepsis severa y choque séptico cuando se someten a terapia con la proteína C activada recombinada pueden disminuir las alteraciones morfológicas de los eritrocitos tanto en su tamaño como en su forma mejorando la expectativa de vida de los pacientes.

X. Referencias Bibliográficas

1. Abraham E. (2000). Tissue factor inhibition and clinical trial results of tissue factor pathway inhibitor in sepsis. *Crit Care Med.* 28(suppl 9):S31–S33.
2. Abraham E, Laterre PF, Garg R et al. (2005). Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med.* 353:1332-41.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, *et al.* (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303–10.
4. Anti-infective Advisory Committee. *FDA briefing document: drotrecogin alfa (activated) [recombinant human activated protein C (rhAPC)] Xigris, BLA#125029/0.* Rockville, MD: Food and Drug Administration, 12 September 2001 (accessed 24 September 2002, at http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3797b1_02_FDA briefing.doc
5. Astiz ME, DeGent GE, Lin R, Rackow E. (1995). Microvascular function and rheologic changes and circulatory abnormalities at the microvascular level during severe sepsis. *Crit Care Med.* 23:265-71.

6. Baskurt OK, Meiselman HJ. (2003). Blood Rheology and Hemodynamics. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 29:435-50.
7. Berezina. TL, Zaets SB, Machiedo GW. (2004). Alterations of Red Blood Cell Shape in Patients with SevereTrauma. *J Trauma*. 57:82–87.
8. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, *et al.* (2001). Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 344:699–709.
9. Bernard GR, Ely EW, Wright TJ, *et al.* (2001). Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis. *Crit Care Med*. 29:2051–9.
10. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. (1997). Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*.112:235–43.
11. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, *et al.* (1995). Incidence, risk factors and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. *JAMA*. 274:968–74.
12. Comp PC, Esmon CT. (1991). Regulatory mechanisms in hemostasis: natural anticoagulants. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, *et al*, eds. *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill Livingstone. 1243–51.

13. Corrigan JJ, Ray WL, May N. (1968). Changes in the blood coagulation system associated with septicemia. *N Engl J Med.* 279:851–6.
14. Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, et al. (1999). Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood.* 94:3413–20.
15. Deveraux QL, Reed JC. (1999). IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239–52.
16. Dickneite G. (1998). Antithrombin III in animal models of sepsis and organ failure. *Semin Thromb Haemost.* 24:61–9.
17. Ehrlich HJ, Jaskunas SR, Grinnell BW, et al. (1989). Direct expression of recombinant activated human protein C, a serine protease. *J Biol Chem.* 25:264:14298–304.
18. Eli Lilly. (2001). Xigris (drotrecogin alfa [activated]). Product information. Indianapolis: Eli Lilly.
19. Esmon Ch. (2000). The protein C pathway. *Crit Care Med.* 28:44-47. (Suppl.)
20. Esmon CT. (1998). Inflammation and thrombosis: mutual regulation by protein C. *Immunologist.* 6:84–9.

21. Esmon CT, Ding W, Yasuhiro K, et al. (1997). The protein C pathway: new insights. *Thromb Haemost.* 78:70–4.
22. Ettingshausen CE, Veldmann A, Beeg T, et al. (1999). Replacement therapy with protein C concentrate in infants and adolescents with meningococcal sepsis and purpura fulminans. *Semin Thromb Hemost.* 25:537–41.
23. Ezz el din S. Ibrahim, MSc. (2005). Red blood cell 2,3-diphosphoglycerate concentration and in vivo P50 during early critical illness. *Crit Care Med.* 33:2247–52.
24. Fijnvandraat K, Derkx B, Peters M, et al. (1995). Coagulation activation and tissue necrosis in meningococcal septic shock: severely reduced protein C levels predict a high mortality. *Thromb Haemost.* 73:15–20.
25. Fisher CJ, Yan SB. (2000). Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med.* 28(suppl):S49–S56.
26. Freeman BD, Buchman TG. (2002). Coagulation inhibitors in the treatment of sepsis. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 11:69–74.
27. Freeman B, Natanson C. (2000). Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 9:1651–63.

28. Friedman G, Silva E, Vincent JL. (1998). Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med*; 26:2078–86.
29. Goyette RE, Key NS, Ely W. (2004). Hematologic Changes in Sepsis and Their Therapeutic Implications. *Sem Resp Crit Care*. 25;6:645-59.
30. Grinnell BW, Joyce D. (2001). Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med*. 29(suppl):S53–S61.
31. Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, et al. (1994). Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J*. 303:227–31.
32. Hinshaw LB. (1996). Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med*. 24:1072–8.
33. Iba T, Kidokoro A, Yagi Y. (1998). The role of the endothelium in changes in procoagulant activity in sepsis. *J Am Coll Surg*. 187:321–9.
34. Jones A, Geczy CL. (1990). Thrombin and factor Xa enhance the production of interleukin-1. *Immunology*. 71:236–41.

35. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al. (2001). Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 276:11199–203.
36. Levi M, ten Cate H. (1999). Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med.* 341:586–92.
37. Levi M, van der Poll T, ten Cate H, et al. (1987). The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxemia. *Eur J Clin Invest.* 27:3–9.
38. Lorente JA, Garcia-Frade LJ, Landin L, et al. (1993). Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest.* 103:1536–42.
39. Machiedo GW, Zaets S, Berezina T. et al.(2004). Red Blood Cell Damage after Trauma-Hemorrhage Is Modulated by Gender. *J Trauma.* 56:837–844.
40. Manns B. (2002). An economic evaluation of Activated Protein C Treatment for severe sepsis. *N Engl J Med.* 347:993-1000.
41. Matthay M. (2001). Severe sepsis-a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties [editorial]. *N Engl J Med.* 344:759–62.

42. Mesters RM, Helterbrand J, Utterback B, et al. (2000). Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med.* 28:2209–16.
43. Natanson C, Esposito C, Banks S. (1998). The siren's song of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling errors. *Crit Care Med.* 26:1927–31.
44. Opal SM, Cross AS. (1999). Clinical trials for severe sepsis: past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am.* 3:285–97.
45. Osterud B, Flaegstad T. (1983). Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavorable prognosis. *Thromb Haemost.* 49:5–7.
46. Parent C, Eichacker PQ. (1999). Neutrophil and endothelial cell interactions in sepsis: the role of adhesion molecules. *Infect Dis North Am.* 13:427–47.
47. Parrillo JE. (1993). Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* 328:1471–7.
48. Pastores, SM. (2003). Drotrecogin alfa (activated): a novel therapeutic strategy for severe sepsis *Postgrad Med J.* 79:5–10

49. Pöschl Johannes M, (2003). Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and in vitro. *Crit Care Med.* 31-3
50. Pöschl JM, Ruef P, Schnaffer M, et al. (1996). Group B Streptococcus impairs erythrocyte deformability in neonates more than in adults. *Arch Disease in Childhood.* 74:187-190.
51. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, *et al.* (2001). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 345:1368–77.
52. Siegel Jay P. (2002). Assessing the Use of Activated Protein C in the Treatment of Severe Sepsis. *N Engl J Med.* 347:1030-34.
53. Scharfe M. (2003). Red blood cell physiology in critical illness. *Crit Care Med.* 31[Suppl.]:S651–S657.
54. Taylor FB, Chank A, Esmon CT, et al. (1987). Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of E coli infusion in the baboon. *J Clin Invest.* 79:918–25.
55. Taylor FB Jr, Chang A, Ruf W, et al. (1991). Lethal E coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock.* 33:127–34.

56. Van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, et al. (1990). Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med.* 322:1622–7.
57. Vincent, J, PhD, Gordon B. (2005). Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: Further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med.* 33-10.
58. Warren BL, Eid A, Singer P, et al. (2001). High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 286:1869–78.
59. Wheeler AP, Bernard GR. (1999). Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med.* 340:207–14.
60. Yan SC, Razzano P, Chao YB, et al. (1990). Characterization and novel purification of recombinant human activated protein C from three mammalian cell lines. *Biotechnology.* 8:655–61