

Artículo

El aumento de neutrófilos TLR-9 positivos se asocia a mal pronóstico en pacientes con sepsis

The increase in TLR-9 positive neutrophils is associated with poor prognosis in patients with sepsis

Por **Marianella Fernández de Larrea*** (1), **Beatriz M.I. Pereira** (2), **Claudia B. R. Aimaretto** (3), **Carolina A. Manera** (1), **Mónica Bellotti** (3), **Analia S. Trevani** (4), **Susana E. Gea** (5) y **Laura Giordanengo** (3).

*mail: marifdl@hotmail.com

1. Laboratorios Camperchioli, Villa María, Provincia de Córdoba, Argentina.
2. Laboratorio de Inmunología, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Córdoba Capital, Argentina.
3. Laboratorio Central, Hospital Regional Pasteur, Villa María, Provincia de Córdoba, Argentina.
4. Instituto de Medicina Experimental, CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.
5. Dpto. Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba Capital, Argentina.

Resumen:

Antecedentes: Los receptores tipo Toll (TLRs 1-11) participan en la respuesta inmune innata hacia patógenos y estimulan la respuesta inflamatoria. La expresión del TLR-9 en leucocitos se relaciona con el reconocimiento de ADN bacteriano, sin embargo su rol en sepsis humana está poco estudiado. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel del TLR-9 en la evolución de la sepsis en humanos analizando su expresión en leucocitos de sangre periférica provenientes de pacientes con sepsis.

Métodos: 14 pacientes sépticos y 14 individuos normales fueron incluidos en este trabajo. La expresión del TLR-9 fue analizada por citometría de flujo a nivel intracelular y en superficie de leucocitos totales y neutrófilos provenientes de sangre periférica. La producción de interleuquina-6 se determinó en suero por ensayo inmunoenzimático. Además se evaluaron parámetros bioquímicos y se identificó el agente patógeno causante de la sepsis.

Resultados: Los pacientes sépticos presentaron mayor cantidad de leucocitos que expresan TLR-9 tanto a nivel intracelular como en superficie respecto a individuos normales. La población de neutrófilos representó la mayoría de las células TLR-9 positivas. Los marcadores inflamatorios eritrosedimentación, proteína C reactiva e interleuquina-6 se encontraron aumentados en pacientes con sepsis. Además, se detectó leucocitosis, anemia, hiperglicemia, hiperbilirrubinemia, elevación de urea y creatinina y alteraciones de la coagulación. Los

microorganismos aislados fueron bacilos Gram-negativos con predominio de *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusiones: El aumento en el número de neutrófilos que expresan el TLR-9 se relaciona con la presencia de marcadores inflamatorios y síntomas críticos en los pacientes con sepsis. El bloqueo del TLR-9 podría ser una opción terapéutica para evitar o atenuar el desencadenamiento y consecuencias de esta patología.

Abstract:

Background: The Toll like receptors (TLRs 1-11) are involved in the innate immune response to pathogens and stimulate the inflammatory response. TLR-9 expression in leukocytes correlates with responsiveness to bacterial DNA but its role in human sepsis is still poorly studied. The aim of this work was to investigate the role of TLR-9 in the development of human sepsis analyzing its expression on peripheral blood leukocytes from septic patients.

Methods: 14 septic patients and 14 healthy subjects were included in this study. Intracellular and surface TLR-9 expression on total leukocytes and neutrophils from peripheral blood were detected by flow cytometry. Interleukin-6 production was determined in sera by ELISA. Further biochemical parameters were assessed and the causative agent of sepsis was identified.

Results: Septic patients presented greater amounts of leukocytes expressing intracellular and surface TLR-9 compared with normal individuals. The neutrophil population represented the most of the positive TLR-9 cells.

The inflammation markers such as erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein and interleukin-6 were increased. Moreover leukocytosis, anemia, hyperglycemia, hyperbilirubinemia, elevated urea and creatinine and coagulation abnormalities were detected. Isolated microorganisms were Gram-negative bacilli with predominance of Pseudomonas aeruginosa.

INTRODUCCIÓN

A fines del siglo pasado, el término de sepsis se definía como la etapa más temprana de un proceso infeccioso en la que puede detectarse evidencia de perfusión alterada de órganos [1]. Actualmente se considera como un desequilibrio entre las reacciones proinflamatorias (importantes para matar los patógenos invasores, pero al mismo tiempo responsable de daño a los tejidos) y las respuestas anti-inflamatorias (diseñadas para limitar la inflamación excesiva, pero al mismo tiempo haciendo al huésped más vulnerable a las infecciones secundarias) [2]. Desde el punto de vista clínico un paciente se define como séptico cuando muestra por lo menos dos de los criterios para Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) que incluyen: hipotermia (temperatura corporal menor a 36 °C) o hipertermia (temperatura corporal mayor a 38 °C), taquicardia (más de 90 latidos por minuto), taquipnea (más de 20 respiraciones por minuto o presión de dióxido de carbono menor a 32 mmHg) y leucopenia (menos de 4000 células por mm³) o leucocitosis (más de 12000 células por mm³) o más del 10% de neutrófilos en cayado además de evidencia de infección sospechada o confirmada microbiológicamente [1]. Cuando se agregan hipotensión, hipoperfusión o disfunción orgánica pasa a denominarse sepsis severa y el término de shock séptico se emplea ante la falta de respuesta clínica a pesar de una adecuada resucitación con líquidos y medicamentos inotrópicos pudiendo evolucionar al fallo multiorgánico y muerte. En términos generales podemos decir que el término de sepsis representa una respuesta inflamatoria sistémica a la presencia de una infección [3, 4, 5].

La inflamación puede ser inducida por causas no infecciosas como grandes injurias (quemaduras, pancreatitis, etc) donde se liberan componentes de la matriz extracelular que se

Conclusions: The increase in the number of neutrophils expressing TLR-9 is related to presence of inflammatory markers and critical symptoms in septic patients. A possible therapeutic option could be to block TLR-9 to prevent or mitigate the onset and consequences of this disease.

Palabras clave: Sepsis, Receptor tipo Toll-9.

denominan “alarminas”, o por causas infecciosas con la liberación de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) como Lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, arabinomananos, exotoxinas, glucanos, zimozan, ARN, ADN, etc. Las alarminas y ligandos endógenos liberados por el daño tisular se denominan Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) que junto con los PAMPs son reconocidos por Receptores de Reconocimientos de Patrones (PRRs), entre ellos, los Toll Like Receptors (TLRs). La unión de PAMPs y/o DAMPs a los TLRs induce una cascada de señalización que lleva a la activación de factores de transcripción que conducen a la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, óxido nítrico y factores de coagulación, responsables del daño endotelial, coagulación intravascular diseminada, hipoxia tisular, fallo multiorgánico y muerte [6, 7, 8].

Los TLRs son moléculas que se expresan en membrana o a nivel intracelular y juegan un papel primordial, tanto en el inicio de la respuesta innata como en la generación de la inmunidad adaptativa. Cada TLR (del 1 al 11 en humanos) muestra un perfil específico para el reconocimiento de un determinado componente molecular de microbio, y cada célula inmune tiene un patrón de expresión de TLRs diferente [9].

Las células del sistema inmune que expresan el TLR-9 son las células dendríticas, linfocitos B, células NK, macrófagos y monocitos. También está presente en células estructurales, incluyendo las células epiteliales alveolares y células endoteliales [10, 11, 12, 13, 14]. Recientemente se describió la presencia del TLR-9 en neutrófilos [15, 16]. El TLR-9 está localizado intracelularmente dentro de las vesículas endocíticas, y reconoce patrones del ADN microbiano (motivos CpG no metilados), liberado de las bacterias, virus u hongos durante una infección, como también del ADN de células propias como resultado de enfermedades

autoinmunes u otras [17, 18, 19, 20]. Además, en un trabajo realizado en humanos [8] se estudió la expresión del TLR-9 intracelular y en la superficie de linfocitos B de pacientes con traumas severos propensos a sepsis y observaron que después de una lesión grave traumática la expresión del TLR-9 se incrementa en la superficie celular a expensas de una disminución en la expresión intracelular.

La activación del TLR-9 resulta en liberación de citocinas proinflamatorias (Tumor Necrosis Factor alfa e interleuquina 6) y quimiocinas, el aumento de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales [21, 22]. Los niveles en sangre de marcadores inflamatorios como procalcitonina, interleuquina 6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR) pueden ser herramientas de diagnóstico adicionales a los cultivos de sangre u otros materiales representativos, para mejorar y acelerar el diagnóstico diferencial entre sepsis y SRIS no infeccioso [11, 23].

Las infecciones que pueden llevar a un síndrome de sepsis, abarcan un amplio espectro microbiano que incluye bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, virus, hongos o parásitos. Frecuentemente, la sepsis es causada por un estímulo polimicrobiano y no por una infección monomicrobiana. Por lo tanto, es probable que se estimulen varios TLRs simultáneamente. El TLR-9 puede ser considerado como un receptor central para la respuesta inflamatoria en cualquier tipo de sepsis. Posiblemente la razón de su importancia radique en su capacidad para unirse al ADN de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y por lo tanto para reaccionar frente a una amplia gama de agentes infecciosos [24].

Estudios *in vivo* realizados en ratones [25] hallaron un rol crítico del TLR-9 en la respuesta inmune excesiva y mortalidad asociadas a la sepsis. Se demostró que la respuesta inmune perjudicial para la sepsis bacteriana se produce a través de la estimulación del TLR-9, por lo que este receptor tiene un rol importante en la patogénesis de la sepsis polimicrobiana.

Estos hallazgos descriptos demuestran que la activación del TLR-9 genera una respuesta inmune descontrolada que se asocia a una serie de eventos perjudiciales que ocurren en la sepsis. Si

bien esta hipótesis ha sido investigada en modelos murinos, aún permanece poco estudiada en humanos. El objetivo de este trabajo es analizar la expresión del TLR-9 a nivel intracelular y en superficie de leucocitos de sangre periférica de pacientes con sepsis comparando con individuos normales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles

El grupo problema consistió en 14 pacientes adultos (mayores de 21 años) de ambos sexos internados en la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Regional Pasteur de la ciudad de Villa María con diagnóstico de sepsis severa o shock séptico con confirmación microbiológica o no. Los pacientes fueron incluidos en el grupo de sepsis si cumplían con los criterios publicados por Bone y col. [1] y con menos de 7 días de diagnosticada la sepsis. Los 14 individuos adultos normales (controles) de ambos sexos fueron voluntarios y cumplían con los criterios de inclusión (sin patología de base, sin tratamiento con medicamentos, sin alteraciones en los parámetros bioquímicos estudiados).

Este protocolo fue aprobado por el Concejo de Evaluación Ética de la Investigación en Salud, el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud del Polo Hospitalario y el Comité de Capacitación y Docencia del Hospital Regional Pasteur de la ciudad de Villa María y todos los familiares de los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

Obtención de las muestras

A cada sujeto se le tomó una muestra de sangre periférica por vía intravenosa. Se utilizó sangre anticoagulada con EDTA para determinar la expresión del TLR-9, el recuento de glóbulos blancos (leucocitos), glóbulos rojos (hematíes), plaquetas, hematocrito y también para dosar la hemoglobina. Se trató sangre anticoagulada con citrato para determinar la velocidad de sedimentación globular (VSG), el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (KPTT). También se obtuvo suero para dosar PCR, glucosa, bilirrubina, urea, creatinina,

sodio, potasio e IL-6. A los pacientes sépticos se les tomaron muestras para cultivos según solicitud médica.

Determinación de la expresión de TLR-9 por citometría de flujo

Se determinó la expresión del TLR-9 en células de sangre periférica. Se realizó doble marcación, primero con el anticuerpo primario anti TLR-9 desarrollado en conejo (dil 1/10, Cell Signaling Technology) y el segundo paso con el anticuerpo secundario anti rabbit marcado con Alexa 488 (dil 1/40, Invitrogen). Las incubaciones con cada anticuerpo fueron realizadas durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, seguidas de lavados con PBS, centrifugación por 5 minutos a 1250 rpm y eliminación del sobrenadante.

Luego, se resuspendieron las células en PBS para la posterior adquisición en el citómetro de flujo. Para la marcación intracelular, las muestras fueron pretratadas con el reactivo para fijar y permeabilizar las células (IntraStain de Dako) según protocolo del fabricante. Para la marcación en superficie del TLR-9 se realizó al final de la técnica la lisis de los glóbulos rojos con el agregado de 1ml cloruro de amonio (NH₄Cl 150 mM) por 15 minutos. Se realizó un control de autofluorescencia para cada muestra siguiendo todos los pasos descriptos sin agregar los anticuerpos primario y secundario. Además, se efectuó un control de permeabilización celular utilizando un anticuerpo anti mieloperoxidasa marcado con Ficoeritrina (PE, Dako). Las muestras fueron analizadas en un citómetro COULTER EPICS XL, de 3 colores (FITC, PE Y PCy5), se adquirieron 10.000 eventos totales y se utilizaron los programas System II y FlowJo para analizar los datos obtenidos.

El valor absoluto de leucocitos y neutrófilos TLR-9 positivos fueron calculados a partir del porcentaje de células TLR-9 positivas en cada población y sus respectivos valores absolutos. Para determinar la expresión del TLR-9 en las distintas poblaciones de leucocitos se realizaron regiones de análisis en los gráficos *dot plot* combinando las características aportadas por los parámetros *forward scatter* y *side scatter* según los artículos [26] y [27].

Determinación de parámetros bioquímicos

Para realizar el recuento de leucocitos, hematíes y plaquetas, como así también para medir hematocrito y hemoglobina se utilizó el contador hematológico CELLDYN 1800 con reactivos Abbott. La PCR, glucosa, bilirrubina, urea y creatinina se dosaron en el autoanalizador químico Hitachi 902 Automatic Analyzer con reactivos Roche. El TP y el KPTT se realizaron con reactivos Wiener en el coagulómetro COATRON M1. La VSG fue obtenida por el método de Westergreen. La determinación de sodio y potasio fue realizada con el analizador de electrolitos 9180 Electrolyte Analyzer. El dosaje de IL-6 se determinó por ELISA de captura (BD Biosciences). Para todas las determinaciones se utilizaron controles de calidad internos y externos.

Cultivo, tipificación y antibiograma

Las muestras para cultivo de pacientes sépticos incluyeron hemocultivos, urocultivos, minibal y otras muestras representativas del sitio de infección sospechado. Dichos materiales se sembraron, jerarquizaron e identificaron según los Procedimientos Operativos Estándares de HandBook 2010 3era edición que tiene el Laboratorio de Microbiología y se efectuaron las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (datos no mostrados) según Normas del Clinical Laboratory Standard International.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo, determinando las variables cuantitativas: media, mediana, desviación estándar, empleando el paquete estadístico Prism GraphPad. Para evaluar su significación estadística se aplicaron el test t de Student, el test de Welch y el test de Mann Whitney según el análisis de los datos obtenidos. Consideramos que hay diferencias significativas entre las medias de ambos grupos (pacientes sépticos y personas normales) cuando el valor de p es menor a 0,05.

RESULTADOS

Los marcadores de respuesta inflamatoria están aumentados en pacientes con sepsis

El valor normal de leucocitos en sangre periférica es de 4.500 a 10.000 células por mm³ [28]. Los pacientes sépticos presentaron un aumento significativo de leucocitos en sangre periférica con respecto a las personas normales (Fig. 1 A). Nuestros resultados indican que la leucocitosis observada es debida a una neutrofilia bien marcada, ya que se obtuvieron diferencias significativas sólo en la población de neutrófilos pero no en las demás poblaciones (Fig. 1 A). Los marcadores de inflamación aguda más utilizados en la práctica clínica son VSG y PCR, los cuales se encontraron muy aumentados en los pacientes sépticos (Fig. 1 B, C). Los niveles de IL-6 también estuvieron incrementados en estos pacientes en comparación con los controles normales (Fig. 1 D).

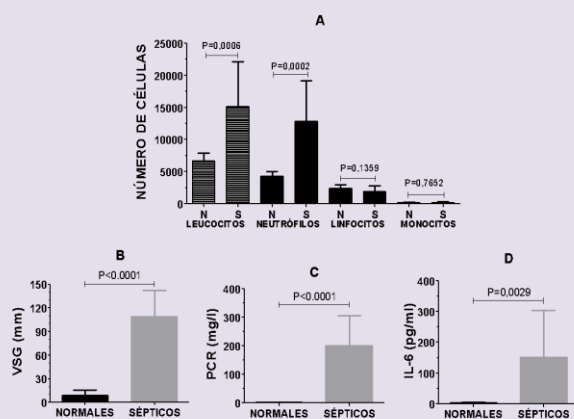


Figura 1: Expresión de marcadores de inflamación. (N=normales, S=sépticos) A) Leucocitos por mm³ de sangre periférica (N= 6721±1160, S= 15164±6951), Neutrófilos por mm³ de sangre periférica (N= 4302±743, S= 12887±6305), Linfocitos por mm³ (N= 2386±645, S= 1945±855) y Monocitos por mm³ (N= 214±44, S= 222±97) B) Velocidad de Sedimentación Global (N= 9±7, S= 109±33); C) Proteína C Reactiva (N= 1,5±0,8, S= 199,6±113,8) y D) Interleuquina-6 (N= 3,2±1,5, S= 152,0±152,4).

En los pacientes con sepsis se induce una mayor cantidad de leucocitos que expresan TLR-9

Cuando se analizó el porcentaje de leucocitos TLR9 positivos de los pacientes sépticos respecto a individuos normales se observaron diferencias significativas en cuanto a la marcación intracelular, en cambio cuando se analizó su expresión en la superficie celular, no se detectaron diferencias significativas (datos no mostrados). De

manera interesante, los valores absolutos de leucocitos TLR-9 positivos, ya sea a nivel intracelular (Fig. 2 A) como en superficie (Fig. 2 C) se mostraron muy incrementados respecto a los controles.

Los neutrófilos con marcación positiva para TLR-9 intracelular (Fig. 2 B) o en superficie (Fig. 2 D) estuvieron significativamente aumentados con respecto al grupo control.

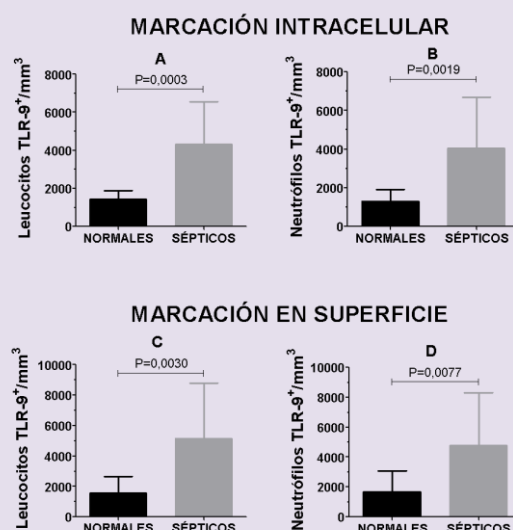


Figura 2: Expresión del TLR-9. (N=normales, S=sépticos) A) Leucocitos totales TLR-9 positivos (N= 1430±449, S= 4318±2248) o B) neutrófilos totales TLR-9 positivos (N= 1304±600, S= 4046±2632) para marcación intracelular. C) Leucocitos totales TLR-9 positivos (N= 1566±1087, S= 5149±3640) o D) neutrófilos totales TLR-9 positivos (N= 1678±1381, S= 4770±3542) para marcación en superficie.

Los pacientes sépticos presentan alteraciones en diferentes parámetros bioquímicos

En los pacientes con diagnóstico de sepsis se observaron valores elevados de glucosa, urea, creatinina y bilirrubina (Fig. 3 A, B, C, D), mientras que los niveles de sodio y potasio se mantuvieron normales (datos no mostrados). Con respecto a los parámetros hemostáticos se registraron alteraciones en el TP (Fig. 3 E) y valores normales de KPTT y de plaquetas (datos no mostrados). Por otro lado, un dato importante a destacar fue la marcada anemia que presentaron los pacientes sépticos manifestada por los valores disminuidos de

hemoglobina y hematocrito y también por el descenso del número de hematíes (Fig. 3 F, G, H).

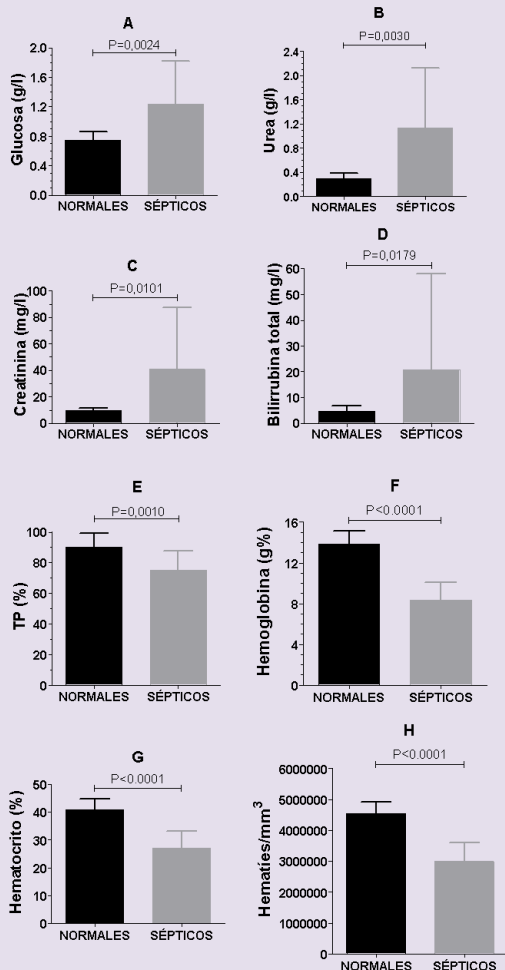


Figura 3: Determinación de parámetros bioquímicos. (N=normales, S=sépticos) A) Glucosa (N= 0,75±0,11, S= 1,23±0,58); B) Urea (N= 0,30±0,09, S= 1,13±0,99); C) Creatinina (N= 9,62±1,88, S= 40,58±46,54); D) Bilirrubina (N= 4,7±2,0, S= 20,6±37,5); E) Tiempo de Protrombina (N= 90±9, S= 75±12); F) Hemoglobina (N= 13,8±1,3, S= 8,4±1,7); G) Hematocrito (N= 40,8±4,0, S= 27,1±6,0) y H) Hematíes por mm³ de sangre periférica (N= 4532857±385116, S= 2988571±603526).

Identificación de los microorganismos causantes de sepsis en este estudio

Se procesaron hemocultivos (H), minibal (Mb), urocultivos (U), materia fecal (MF), líquido de drenaje de hematoma de neurocirugía (LD), líquido de punción abdominal (LAB), secreción de herida quirúrgica (Hqx) y absceso inframesocólico (Abs).

Las muestras de H y U se obtuvieron en todos los pacientes. Los microorganismos aislados fueron: *Acinetobacter baumannii* (1/Mb y 1/LD), *Enterobacter aerogenes* (1/H y 1/Hqx), *Enterobacter cloacae* (1/Abs), *Escherichia coli* (1/U y 1/Mb), *Klebsiella pneumoniae* (3/H), *Pseudomonas aeruginosa* (2/Mb, 2/U, 1/H y 1/LAB), *Salmonella Typhimurium* (1/H y 1/MF) y *Serratia marcescens* (1/Hqx) (Fig. 4).

La confirmación microbiológica de sepsis se realizó en 12 de 14 pacientes siendo los microorganismos aislados bacilos Gram-negativos con predominio de *Pseudomonas aeruginosa*. Cinco pacientes presentaron cultivos polimicrobianos.

La sepsis se asoció a infección hospitalaria en 7 pacientes, de los cuales 4 tuvieron neumonía por respirador, 2 con infección de herida quirúrgica y un paciente con infección urinaria. Los cinco pacientes restantes se asociaron a urosepsis con diabetes mellitus como patología de base, intoxicación alimentaria en paciente inmunocompetente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa, paciente epiléptico y neumonía por broncoaspiración debido a una intoxicación medicamentosa.

DISCUSIÓN

La sepsis es la causa más importante de morbilidad y mortalidad en pacientes en estado crítico que permanecen en unidades de cuidados intensivos debido en gran parte al desarrollo del síndrome de disfunción orgánica múltiple [29]. Los pacientes sépticos presentan alteraciones en la temperatura, el ritmo cardíaco y respiratorio, debilidad generalizada y estado mental alterado. Con respecto a las demás manifestaciones bioquímicas reportadas en la bibliografía para los procesos sépticos [30], nuestro grupo de pacientes también presentó leucocitosis, hiperglucemia, hiperbilirrubinemia, elevación de urea y creatinina, disminución en el tiempo de protrombina y parámetros hematológicos alterados que indican anemia.

La leucocitosis puede ser originada por un aumento de la población de neutrófilos (neutrofilia), linfocitos (linfocitosis) o monocitos (monocitosis) y

rara vez el aumento de leucocitos puede deberse a un incremento de eosinófilos o basófilos. Es igualmente infrecuente que todas las líneas celulares estén aumentadas al mismo tiempo. La distribución de los diversos tipos de leucocitos ayuda a orientar un diagnóstico en cuanto al posible origen de la leucocitosis. Los neutrófilos son los glóbulos blancos que se encuentran en mayor cantidad y son la causa más común de leucocitosis, situación que indica generalmente una infección de origen bacteriano como las reveladas en este trabajo. En los procesos sépticos la cantidad de neutrófilos y por consiguiente de leucocitos aumenta marcadamente para tratar de combatir la infección [28, 31].

Anteriormente se consideraba que el TLR-9 sólo tenía expresión intracelular en el compartimiento endosomal de la célula [32]. Sin embargo, el TLR-9 también se ha detectado en la superficie de varias células del sistema inmune en sangre periférica, entre ellas, las células B [8, 11], los neutrófilos [15] y los monocitos [10, 22]. Juárez y col [9], especulan en este sentido que se produce la internalización del TLR-9, desde la superficie celular, luego de la unión a su ligando (ADN bacteriano o propio). Proponen que este receptor expresado en la superficie de la célula es no funcional y sólo el TLR-9 intracelular clivado es el componente funcional capaz de estimular la producción de citoquinas, constituyendo este mecanismo un paso extra de seguridad antes de la inducción de la cascada inflamatoria. Teniendo en cuenta esta hipótesis de recirculación del receptor, decidimos estudiar la expresión del TLR-9 tanto a nivel intracelular como en la superficie de la célula. De manera interesante, demostramos que en los pacientes sépticos se incrementan los leucocitos TLR-9 positivos, principalmente los neutrófilos, que expresan el receptor localizado tanto a nivel intracelular como en la superficie de dichas células. Además observamos que la población de neutrófilos constituyó la mayoría de los leucocitos TLR-9 positivos tanto en los pacientes con sepsis como en el grupo control. Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en cuanto a la intensidad de fluorescencia media por célula entre los dos grupos de pacientes. Por lo tanto, el aumento en la expresión del receptor en la sepsis se debe a la aparición de nuevas células que lo

expresan como consecuencia de la leucocitosis característica de estos pacientes, en lugar de un aumento de la expresión de TLR-9 en la célula.

Se ha demostrado que el polimorfismo en el TLR-9 puede alterar la respuesta inmune innata y adaptativa en los procesos sépticos desarrollados en pacientes críticos [18]. Una vez que el TLR-9 reconoce su ligando ya sea ADN bacteriano, viral, fúngico o liberado de células propias del individuo, se inicia la vía de señalización a través de proteínas adaptadoras como el factor de diferenciación mieloide-88 (MyD88) que lleva finalmente a la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) encargado de la producción de citoquinas proinflamatorias entre las que se encuentra la IL-6 [10, 18, 22, 33].

En nuestro grupo de pacientes sépticos los resultados demostraron altos niveles de IL-6 presentes en suero, sosteniendo que al menos en parte, la producción de esta citocina inflamatoria podría estar dada por la activación del TLR-9 expresado en la elevada cantidad de leucocitos presentes en sangre periférica. Está descripto que la medición de la concentración de esta citoquina en sangre puede ser útil para la detección temprana y el pronóstico en pacientes con septicemia [34]. En coincidencia con nuestro hallazgo, un estudio mostró que los niveles de IL-6, PCR y procalcitonina eran bajos en el grupo de pacientes con SRIS, intermedios en el grupo con sepsis y más altos en los pacientes con sepsis severa/shock séptico. Según estos autores la IL-6 mostró la más alta especificidad para el diagnóstico de sepsis y la procalcitonina mostró la más alta sensibilidad, parámetro que no fue analizado en nuestro estudio [35].

Nuestros resultados indican claramente que en los pacientes estudiados con diagnóstico de sepsis se desarrolla una importante respuesta inflamatoria que conduce al fallo multiorgánico y los predispone a la muerte. En este sentido, de los 14 pacientes estudiados, 12 murieron en el hospital a los pocos días de haber tomado la muestra y 2 fueron trasladados a otros centros de salud por lo que se desconoce su desenlace. En concordancia con la respuesta inflamatoria marcada que presentaron nuestros pacientes con sepsis se revelaron valores muy elevados de VSG y PCR en el presente estudio.

La expresión del TLR-9 detectada por citometría de flujo no mostró un patrón uniforme. Creemos que este fenómeno puede deberse a varias causas; diferencias propias de cada paciente, situación del paciente al momento de la toma de la muestra, condiciones de transporte de las muestras, distintos microorganismos causantes de la sepsis, entre otras.

Pudimos lograr la confirmación microbiológica de sepsis en 12 de los 14 pacientes estudiados, lo cual coincide con la bibliografía que describe un 70 % de documentación microbiológica de sepsis en pacientes internados en unidades de terapia intensiva. Aunque la mayoría de las bacteriemias nosocomiales se originan en catéteres venosos centrales, el sitio respiratorio es el principal foco de sepsis, seguido por el intra abdominal, infecciones urinarias e infecciones de piel y partes blandas [36, 37], estando los cocos Gram-positivos en primer lugar de aislamiento [38]. En este estudio, sin embargo, los microorganismos aislados fueron bacilos Gram-negativos con predominio de *Pseudomonas aeruginosa*.

De manera interesante se describió en modelos murinos que la señalización a través del TLR-9 durante la sepsis produce disfunción vascular [39] y trastornos cardiovasculares causando insuficiencia cardíaca [29]. Además se demostró que el bloqueo del TLR-9 atenúa la disfunción cardíaca en ratones sépticos a través de la modulación del TLR-9 por CpG-ODN, proponiéndose a este ligando como un tratamiento eficaz para pacientes con sepsis o shock séptico [19].

En conclusión, a través de este trabajo, hemos demostrado que en la sepsis humana se produce un aumento de la cantidad de células en sangre periférica que expresan el TLR-9 en un contexto inflamatorio nocivo para el paciente impidiendo la resolución de este proceso. Proponemos que el TLR-9 sería uno de los actores claves en este escenario y el principal responsable de causar los síntomas críticos en los pacientes. En consecuencia se podría plantear como una opción terapéutica bloquear el TLR-9 para minimizar la respuesta perjudicial que se desencadena cuando se activa este receptor.

AGRADECIMIENTOS

Parte de los reactivos utilizados fueron obtenidos gracias a la ayuda económica de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Damos las gracias a la Bioq. Esp. Susana Rubiolo, por el apoyo técnico en la utilización del citómetro de flujo y a la Dra. Pilar Aoki por cedernos el anticuerpo secundario.

Al personal de todos los centros a los cuales pertenecen los investigadores por su colaboración y buena predisposición. Un agradecimiento especial al jefe del servicio de terapia intensiva del Hospital Regional Pasteur Dr. Luis Seggiaro por permitirnos acceder a las historias clínicas de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A. y col. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* (1992) 101:1644-1655.
2. Anas A. A., Wiersinga W. J., de Vos A. F., van der Poll T. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *J. Medicine* (2010) 68(4):147-152.
3. Rittirsch D., Hoesel L. M., Ward P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* (2007) 81: 137-143.
4. Young L. S. Síndrome de sepsis. En: *Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica*. Mandell-Douglas y Bennett, editores. Ed Panamericana, 5ª Ed; 2002, 1:973-989.
5. Chen P., Stanojic M., Jeschke M. G. Differences between murine and human sepsis. *Surg. Clin. North Am.* (2014) 94(6):1135-1149.
6. Vanlaere I., Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in Infections caused by Gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* (2009) 22(2):224-239.
7. Cai B., Deitch E., Ulloa L. Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage. *Mediators of inflammation* (2010) 1-10.
8. Baiyee E. E., Flohe S., Lendemans S., Bauer S., Mueller N., Kreuzfelder E. y col. Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clinical and Experimental Immunology* (2006) 145: 456-462.

9. Juárez E., Sarabia M. del C., Escobedo D., Sada E., Torres M. Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por TLR2 y TLR9 en macrófagos alveolares y monocitos humanos. *Neumol. Cir. Torax.* (2010) 69(2): 84-90.
10. Valencia-Pacheco G., Pinzón-Herrera F. J., Cruz-López J. J., Vera-Gamboa L. del C., Pavía-Ruiz N., Santos-Rivero A. y col. Expression and activation of intracellular receptors TLR7, TLR8 and TLR9 in peripheral blood monocytes from HIV-infected patients. *Colomb Med.* (2013) 44(2): 92-99.
11. Eaton-Bassiri A., Dillon S. B., Cunningham M., Ryczyn M. A., Mills J., Sarisky R. T., Mbow M. L. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* (2004) 72(12): 7202-7211.
12. Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T. y col. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* (2002) 168: 4531-4537.
13. Bourke E., Bosisio D., Golay J., Polentarutti N., Mantovani A. The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* (2003) 102: 956-963.
14. Mesa-Villanueva M., Patiño P. J. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología* (2006) 25 (2): 115-130.
15. Alvarez-Arellano L., Cortés-Reynosa P., Sánchez-Zauco N., Salazar E., Torres J., Maldonado-Bernal C. TLR9 and NF- κ B are partially involved in activation of human neutrophils by *Helicobacter pylori* and its purified DNA. *PLoS ONE* (2014) 9(7): e101342.
16. Bellocchio S., Moretti S., Perruccio K., Fallarino F., Bozza S., Montagnoli C y col. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.* (2004) 173: 7406-7415.
17. Tinsley K. W., Grayson M. H., Swanson P. E., Drewry A. M., Chang K. C., Karl I. E. y col. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J. Immunol.* (2003) 171: 909-914.
18. Chen K. H., Zeng L., Gu W., Zhou J., Du D. Y., Jiang J. X. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *British Journal of Surgery* (2011). Publicado sólo en Wiley Online Library (www.bjs.co.uk).
19. Gao M., Ha T, Zhang X., Wang X., Liu L., Kalbfleisch J. y col. The toll-like receptor 9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide, attenuates cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis, involving activation of both phosphoinositide 3 kinase/akt and extracellular-signal-related kinase signaling. *J. I. D.* (2013) 207:1471-1479.
20. Cui G. Y., Diao H. Y. Recognition of HBV antigens and HBV DNA by dendritic cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* (2010) 9 (6): 584-592.
21. Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008) 60(7): 795-804.
22. Juárez E., Núñez C., Sada E., Ellner J. J., Schwander S. K., Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir. Res.* (2010) 11: 2.
23. Vaschetto R., Protti A. Biomarkers of sepsis in long-term critically ill patients. *Minerva anesthesiologica* (2010) 76(10): 771-772.
24. Boehm O., Markowski P., van der Giet M., Gielen V., Kokalova A., Brill C. y col. In Vivo TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators of Inflammation* (2013) ID: 217297.
25. Plitas G., Burt B. M., Nguyen H. M., Bamboat Z. M., DeMatteo R. P. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* (2008) 205(6): 1277-1283.
26. Centers for disease control and prevention. 1997 Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR Recomm. Rep.* (1997) 46(RR-2): 1-29.
27. Lineth Rojas-Restrepo J., Álvarez-Álvarez J. A., Montoya-Giraldo J. D. y Trujillo-Vargas C M. Validation of the dihidrorhodamine test for the diagnosis of chronic granulomatous disease in Colombia. *Inmunología.* (2014) 33: 71-80.
28. Aminzadeh Z., Parsa E. Relationship between age and peripheral white blood cell count

in patients with sepsis. *Int. J. Prev. Med.* (2011) 2(4): 238-242.

29. Lohner R., Schwederski M., Narath C., Klein J., Duerr G. D., Torno A. y col. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators of Inflammation* (2013) ID: 261049.

30. Indira Briceño. Sepsis: Definiciones y aspectos fisiopatológicos. *MEDICRIT* 2005; 2(8): 164-178.

31. Chabot-Richards D. S., George T. I. Leukocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* (2014) 36(3): 279-288.

32. Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.* (2004) 25: 381-385.

33. Li G., Wang X., Jiang T., Gong J., Niu L., Li N. Berberine prevents intestinal mucosal barrier damage during early phase of sepsis in rat through the Toll-like receptors signaling pathway. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* (2015) 19: 1-7.

34. Praveen Makhija, Sangita Yadav, Archana Thakur. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-

6 in infants with sepsis. *Indian Pediatrics* (2005) 42: 1024-1028.

35. Jekarl D. W., Lee S. Y., Lee J., Park Y. J., Kim Y., Park J. H. y col. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2013); 75(4): 342-347.

36. Soloaga R. Rol del Bacteriólogo Clínico frente al paciente séptico en la era de la automatización. *Bioanálisis I* Jul - Ago 2010.

37. Soloaga R. Rol del Bacteriólogo Clínico frente al paciente séptico en la era de la automatización. *Bioanálisis I* Set • Oct 2010.

38. Biondi E, Galas M, Tuduri E, Vazquez M, Corso A. Datos de la Red Argentina Whonet, año 2010.

39. Ehrentraut S. F., Dörr A., Ehrentraut H., Lohner R., Lee S. H., Hoeft A. y col. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. *PLoS ONE* (2012) 7(9): e44531.