




Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Evaluación de la fracción de plaquetas inmaduras y  
de otros biomarcadores asociados a complicaciones  
inflamatorias en el postoperatorio de cirugía cardíaca

TESIS DOCTORAL

Claudia Imperiali Rosario

Septiembre 2020





# UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de bioquímica i biologia molecular. Programa de doctorat en  
bioquímica, biologia molecular i biomedicina

Evaluación de la fracción de plaquetas inmaduras y de otros  
biomarcadores asociados a complicaciones inflamatorias en el  
postoperatorio de cirugía cardíaca

Tesis doctoral presentada por Claudia Imperiali Rosario para optar al **grado  
de doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina**

La doctoranda:

Claudia Imperiali Rosario

Los directores:

Juan Carlos López Delgado

Lourdes Sánchez Navarro

Macarena Dastis Arias

La tutora:

Francesca Canalías Reverter



# Evaluación de la fracción de plaquetas inmaduras y de biomarcadores asociados a complicaciones inflamatorias en el postoperatorio de cirugía cardíaca

Claudia Imperiali Rosario

Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona

Septiembre 2020

Esta tesis está bajo una licencia de Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional



A mis padres,  
a mi hermano,  
a Imanol,  
a Heura



## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a los directores de esta tesis: Dr. Juan Carlos López, Dra. Lourdes Sánchez y Dra. Macarena Dastis. Gracias por guiarme durante estos cinco años y, sobre todo, gracias por la confianza que habéis depositado en mí que ha sido el motor para llegar hasta este lugar.

Gracias a la tutora, Dra. Francesca Canalías, por haber aceptado esta tutoría, por su accesibilidad y por su gran ayuda con todos los trámites.

Gracias a los compañeros del laboratorio del Hospital Universitari de Bellvitge por haberme enseñado tanto durante los cuatro años de residencia. Quiero agradecer, especialmente, a la Dra. Dolors Dot por su gran apoyo durante todos estos años y por confiar en mí para seguir formando parte de su equipo. Gracias a los compañeros de residencia por todos los momentos divertidos que compartimos en esa etapa: Ariadna, Chema, Cristina y Bárbara.

Gracias a los miembros de la comisión de seguimiento, Dra. Ariadna Padró, Dr. Francisco Rodríguez y Dr. Josep Lluís Ventura por haberme brindado todo su conocimiento para poder llevar a cabo con éxito este proyecto.

Gracias a los compañeros del Laboratorio y colegas del Hospital de Viladecans por su gran acogida, por hacer amenas las horas de trabajo y por demostrarme cada día que esta es mi verdadera vocación.

Gracias a la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio por haberme otorgado la beca postresidencia que me permitió avanzar en este proyecto.

Gracias a los amigos que han estado ahí para apoyarme y distraerme cuando lo necesitaba.

Gracias a mi familia, que son incansables, perseverantes y por enseñarme que todo se consigue con esfuerzo.

Por último, gracias a Imanol, por sus correcciones, traducciones, por escucharme durante horas ensayar presentaciones. Estoy segura que después de estos cinco años ya te podrías sacar un segundo doctorado.

*“Lo que uno quiere de verdad, es lo que está hecho para uno; entonces hay que tomarlo, o intentar: En eso se te puede ir la vida, pero es una vida mucho mejor...”*

Mario Benedetti  
1920-2009  
Montevideo-Uruguay



## Abreviaturas

CCA: cirugía cardíaca

CEC: circulación extracorpórea

UCI: unidad de cuidados intensivos

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

MACE: eventos cardiovasculares adversos mayores

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II

SAPS: Simplified Acute Physiology Score

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

IL-10: interleucina-10

IL-6: interleucina-6

ELISA: enzimoimmunoanálisis

PCT: procalcitonina

TRACE: time-resolved amplified cryptate emission

PCR: proteína C reactiva

RNA: ácido ribonucleico

IPF: fracción de plaquetas inmaduras

RI: respuesta inflamatoria clínicamente significativa o exacerbada

$\Delta$ IPF: delta de la fracción de plaquetas inmaduras

pp: puntos porcentuales

OR: odds ratio

VRC: valor de referencia del cambio



AUC: área bajo la curva

TnT-hs: troponina T ultrasensible

$\Delta$ TnT-hs: delta de troponina T ultrasensible

$\Delta$ PCT: delta de procalcitonina

## Nomenclatura de las propiedades biológicas

A continuación se describen las propiedades biológicas evaluadas en esta tesis doctoral atendiendo a la descripción de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

<b>Descripción</b>	<b>Unidades</b>	<b>Abreviatura</b>
Plaq (San)—Plaquetas inmaduras; fr.núm.	%	IPF
Pla—Procalcitonina; c.sust.	µg/L	PCT
Pla—Proteína C reactiva; c.masa(CRM 470)	mg/L	PCR
Pla—Troponina T; c.masa	ng/L	TnT-hs
Pla—Interleucina-6; c.masa	pg/mL	IL-6

Abreviaturas: Plaq, plaquetas; San, sangre; Pla, plasma; fr.núm., fracción de número; c.sust., concentración de sustancia; c.masa, concentración de masa.



Tesis basada en las siguientes publicaciones:

1. **Imperiali CE**, Arbiol-Roca A, Sanchez-Navarro L, Dastis-Arias M, Lopez-Delgado JC, Cortes-Bosch A, et al. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex Xn hematology analyser in adult population. *Biochemia Medica* 2018;28.

doi: 10.11613/BM.2018.010708

2. **Imperiali CE**, Lopez-Delgado JC, Dastis-Arias M, Sanchez-Navarro L. Evaluation of the delta of immature platelet fraction as a predictive biomarker of inflammatory response after cardiac surgery. *J Clin Pathol* 2019;0:1-6.

doi: 10.1136/jclinpath-2019-206068

3. **Imperiali CE**, Lopez-Delgado JC, Dastis-Arias M, Sanchez-Navarro L. Biomarker evaluation for major adverse cardiovascular event development in patients undergoing cardiac surgery. *Adv Lab Med* 2020;2020031.

doi: <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0031>



# Índice de contenido

---

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Resumen en castellano	3
1.2. Resum en català	5
1.3. Abstract in english	7
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
2.1.La cirugía cardíaca	11
2.1.1.Introducción	11
2.1.2.Características de la población	11
2.1.3.Tipos de intervenciones cardíacas	13
2.1.4.Procedimientos asociados a la cirugía cardíaca	14
2.1.5.Postoperatorio de la cirugía cardíaca	17
2.1.5.1.Cuidados postoperatorios	17
2.1.5.2.Complicaciones postoperatorias y factores predisponentes	18
2.1.5.2.1.Eventos cardiovasculares adversos mayores	18
2.1.6.Herramientas actuales para valorar la evolución de los pacientes postoperados de cirugía cardíaca	20
2.2.Respuesta inflamatoria tras la cirugía cardíaca	23
2.2.1.Aspectos generales	23
2.2.2.Definición de respuesta inflamatoria en el contexto de cirugía cardíaca	23
2.2.3.Fisiopatología de la respuesta inflamatoria en cirugía cardíaca	24
2.2.3.1.Desarrollo de la respuesta inflamatoria derivada de los procedimientos asociados a la cirugía cardíaca	26
2.2.3.1.1.Activación del complemento	26
2.2.3.1.2.Cascada de citocinas	27
2.2.3.1.3.Óxido nítrico	27
2.2.3.1.4.Cascada de coagulación	28
2.2.3.1.5.Plaquetas	29

2.2.3.1.6.Endotelio	30
2.2.3.1.7.Respuesta inmune celular	31
2.2.4.Manejo clínico de la respuesta inflamatoria	35
2.3.Biomarcadores	37
2.3.1.Definición, características y clasificación	37
2.3.2.Biomarcadores de inflamación	39
2.3.2.1.Citocinas: interleucina-6	40
2.3.2.2.Proteínas de fase aguda	42
2.3.2.2.1.Procalcitonina	42
2.3.2.2.2.Proteína C reactiva	43
2.4.Desarrollo de un nuevo biomarcador	45
2.4.1.Las plaquetas: potencial biomarcador de inflamación	46
2.4.1.1.Aspectos generales	46
2.4.1.2.Megacariopoyesis	46
2.4.1.3.Plaquetas reticuladas o plaquetas inmaduras	48
2.4.1.4.Principios de medida de las magnitudes relacionadas con las plaquetas. Estado actual de la tecnología	49
2.4.1.5.Valor semiológico de la fracción de plaquetas inmaduras	52
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>53</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
5.1.Primer estudio	63
5.1.1.Presentación del primer estudio	63
5.1.2.Primer publicación	65
5.2.Segundo estudio	71
5.2.1.Presentación del segundo estudio	71
5.2.2.Segunda publicación	73
5.3.Tercer Estudio	75
5.3.1.Presentación del tercer estudio	75
5.3.2.Tercera publicación	77

<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
6.1.Primer estudio: elaboración de valores de referencia de la fracción de plaquetas inmaduras	91
6.2.Segundo estudio: evaluación de la fracción de plaquetas inmaduras como biomarcador de predicción de respuesta inflamatoria	93
6.3.Tercer estudio: utilidad de diferentes biomarcadores para la evaluación del desarrollo de MACE tras cirugía cardíaca	97
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>105</b>





**1.**

# **RESUMEN**

---



## 1.1. Resumen en castellano

Gracias a los avances en la disciplina y debido a los cambios en el estilo de vida de la población, el número de cirugías cardíacas ha ido incrementando con el tiempo. Dadas las características propias de la cirugía y de los pacientes cada vez más longevos y con mayores comorbilidades que se someten a ellas, existe un riesgo importante de aparición de complicaciones postoperatorias que pueden llegar a comprometer el éxito de la intervención.

La complejidad de la propia cirugía y de los procedimientos de los que de ella derivan, dan lugar a una respuesta inflamatoria reactiva, que en ciertos casos, puede verse exacerbada y originar complicaciones mayores.

Diferenciar entre una respuesta inflamatoria que sucede de forma fisiológica al trauma quirúrgico y una respuesta exacerbada, que puede comportar efectos perjudiciales para el paciente, supone un desafío para los clínicos, teniendo en cuenta las herramientas actuales disponibles. El estudio de nuevos biomarcadores implicados en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria, objetivo principal de la presente tesis doctoral, ayudarían al clínico a la hora de establecer el diagnóstico de forma objetiva y a valorar de forma precoz la evolución del paciente durante el postoperatorio.

Durante el 2015 y 2017 se incluyeron 327 pacientes que ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Universitari de Bellvitge tras ser sometidos a una cirugía cardíaca mayor. Durante la estancia en UCI se midieron diferentes biomarcadores previamente seleccionados atendiendo a su implicación en la respuesta inflamatoria. Dichos biomarcadores fueron la fracción de plaquetas inmaduras, concentración de interleucina-6, procalcitonina, proteína C reactiva y de troponina T, este último, como biomarcador de daño

miocárdico. Durante el periodo de ingreso en UCI, a cada paciente se le calcularon diferentes *scores* pronósticos y se registraron las complicaciones que presentaron.

A través de tres publicaciones en revistas científicas, se ha demostrado que la diferencia entre dos resultados consecutivos de la fracción de plaquetas inmaduras (delta) se asocia a una respuesta inflamatoria clínicamente significativa y es un predictor independiente del riesgo de desarrollo de la misma. Asimismo, su combinación al *score* APACHE II, mejora la capacidad predictora de la respuesta inflamatoria. Por otro lado, y juntamente con el delta de troponina T, ambos biomarcadores se asocian al desarrollo de eventos cardiovasculares mayores postcirugía cardíaca.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demuestran, por primera vez, que la incorporación de la medición de la fracción de plaquetas inmaduras en el seguimiento del postoperatorio de los pacientes sometidos a cirugía cardíaca, es una herramienta útil para detectar aquellos pacientes que desarrollan una respuesta inflamatoria exacerbada, que puede dar lugar a complicaciones mayores.

## 1.2. Resum en català

Gràcies als avenços en la disciplina i a causa del canvi en l'estil de vida de la població, el nombre de cirurgies cardíaques s'ha vist incrementat amb el temps. Donades les característiques de la cirurgia i dels pacients que es sotmeten a elles; cada vegada més longeus i amb un major nombre de comorbiditats, existeix un important risc d'aparició de complicacions postoperatòries que poden arribar a comprometre l'èxit de la intervenció.

La complexitat de la cirurgia i dels procediments dels quals d'ella deriven, donen lloc a una resposta inflamatòria reactiva que, en certs casos, pot veure's exacerbada i originar complicacions majors.

Diferenciar entre una resposta inflamatòria que succeeix de forma fisiològica al trauma quirúrgic i una resposta exacerbada, que pot comportar efectes perjudicials per al pacient, suposa un repte pels clínics amb les eines actuals disponibles. L'estudi de nous biomarcadors implicats en la fisiopatologia de la resposta inflamatòria (l'objectiu principal de la present tesi doctoral) ajudarien al clínic a l'hora d'establir el diagnòstic de forma objectiva i a valorar de forma precoç l'evolució del pacient durant el postoperatori.

Durant el 2015 i 2017 es van incloure 327 pacients que van ingressar a la Unitat de Cures Intensives (UCI) de l'Hospital Universitari de Bellvitge després d'haver estat sotmesos a una cirurgia cardíaca major. Durant el període d'ingrés dels pacients a la UCI es van mesurar diferents biomarcadors seleccionats prèviament atenent a la seva implicació en la resposta inflamatòria. Aquests biomarcadors van ser la fracció de plaquetes immadures, la concentració d'interleucina-6, procalcitonina, proteïna C reactiva i de troponina T, aquest últim, com a biomarcador de dany miocàrdic. Durant el període d'ingrés a la UCI, a cada

pacient se li van calcular diferents *scores* pronòstics i es van registrar les complicacions que van presentar.

A través de tres publicacions en revistes científiques es va demostrar que la diferència entre dos resultats consecutius de la fracció de plaquetes immadures (delta) s'associa a una resposta inflamatòria clínicament significativa i és un predictor independent del risc de desenvolupament d'aquesta. Així mateix, la seva combinació al *score* APACHE II, millora la capacitat predictora de la resposta inflamatòria. D'altra banda, i juntament amb el delta de troponina T, tots dos biomarcadors s'associen al desenvolupament d'esdeveniments cardiovasculars majors postcirurgia cardíaca.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral demostren, per primera vegada, que la incorporació del mesurament de la fracció de plaquetes immadures en el seguiment del postoperatori dels pacients sotmesos a cirurgia cardíaca, és una eina d'utilitat per a la detecció d'aquells pacients que desenvolupen una resposta inflamatòria exacerbada que pot donar lloc a complicacions majors.

### 1.3. Abstract in english

Thanks to the technological advances in the discipline and due to the changes in the population lifestyle, the number of cardiac surgery has been increased over time. Given the specific characteristics of the surgery and since the greater longevity and major comorbidities of patients, there is an important risk of having postoperative complications. These complications might compromise the surgery success rates.

The complexity of the surgery and its derived procedures lead to a reactive inflammatory response. This inflammatory response may be exacerbated and it can cause major complications.

The differentiation between an inflammatory response that occurred physiologically after surgical trauma and an exacerbated inflammatory response (that it can lead adverse effects in the patient), it is still a challenge for the physicians with the current tools. The research in new biomarkers involved in the physiopathology of the inflammatory response, which is the principal aim of this thesis, can help the clinicians to establish an objective diagnosis and to the early assessment of the postoperative evolution of the patient.

From 2015 to 2017, 327 patients who were admitted at the Intensive Care Unit (ICU) of the Bellvitge University Hospital after major cardiac surgery, were enrolled in the study. Some previous selected inflammatory biomarkers were measured during the ICU stay. That biomarkers were: immature platelet fraction, interleukin-6, procalcitonin, C reactive protein, and troponin T, the last one was included as myocardial injury biomarker. Moreover, at the ICU stay, different prognostic scores were calculated and complications were recorded.



Through three publications in scientific journals, it has been shown that the difference between two consecutive results of immature platelet fraction (delta) is associated with clinically significant inflammatory response and it is an independent predictor of the risk of their development. Likewise, the combination of the delta of immature platelet with an APACHE II score, it improves their predictive capacity for inflammatory response. Furthermore, the delta of immature platelets and troponin T are associated with the development of major adverse cardiovascular events after surgery.

The obtained results in this thesis show, for the first time, that immature platelet fraction measurement during the postoperative period of cardiac surgery would be helpful to detect those patients who will develop an exacerbated inflammatory response that may lead to major complications.

## 2. INTRODUCCIÓN

---



# 2.1. La Cirugía Cardíaca

## 2.1.1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares, es decir, los trastornos que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, tienen una alta prevalencia en nuestra sociedad como consecuencia de los cambios en los hábitos de vida, representando la principal causa de mortalidad a nivel mundial (1). Dentro de estas enfermedades, destacan las patologías de las arterias coronarias y de las válvulas cardíacas. Es frecuente que dichas enfermedades en estadios avanzados requieran cirugía de revascularización coronaria o cirugía de reemplazo valvular e incluso, la combinación de ambos tipos de cirugía.

La cirugía cardíaca (CCA) consiste en un conjunto de procedimientos utilizados para tratar malformaciones cardíacas congénitas, problemas derivados de la cardiopatía isquémica; como el infarto y angina de pecho, problemas valvulares; como la endocarditis, entre otras.

La cirugía cardíaca nace en el siglo XX y es en la década del 60 cuando los pioneros en esta especialidad sientan las bases de la disciplina. Gracias al avance tecnológico y al mayor conocimiento de las patologías cardíacas, los resultados en CCA han ido mejorando a lo largo de los años tal y como puede observarse en los diferentes registros de la Sociedad Española de Cirugía Torácica-Cardiovascular (SECTCV), siendo la mortalidad observada muy ajustada al riesgo estimado (2). La mejora en los resultados en CCA también ha ido acompañada de un mayor número de intervenciones como se podrá observar más adelante.

## 2.1.2. Características de la población

En las últimas décadas, se ha producido una tendencia hacia una mayor longevidad. En consecuencia, el aumento gradual de la complejidad de los pacientes ha incrementado de

forma considerable la incidencia de enfermedades crónicas y cardiovasculares (3). Así, en la actualidad, la población que se somete a CCA es cada vez más heterogénea.

La diferencia de la cirugía cardíaca del paciente joven respecto al paciente con edad avanzada (> 75 años) radica en las comorbilidades que presenta, destacando la diabetes, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la hipertensión arterial, la insuficiencia renal, etc (4). Debido a la complejidad de estos pacientes y a pesar de los avances médicos, existe un elevado riesgo de morbi-mortalidad perioperatoria cuando son sometidos a CCA (5). En cuanto a datos de mortalidad, en el año 2018 se registró una mortalidad global de los procedimientos de CCA mayor del 5,02% en España (6).

### 2.1.3. Tipos de intervenciones cardíacas

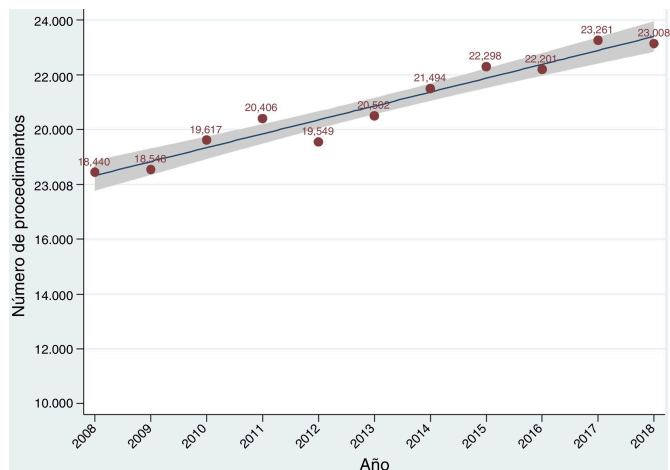
Dentro de las cirugías cardíacas, los siguientes procedimientos son considerados como **cirugías cardíacas mayores** según el Registro de intervenciones de la Sociedad Española de Cirugía Torácica-Cardiovascular (Tabla 1) (6):

**Tabla 1. Cirugías cardíacas mayores**

<b>Cirugía valvular</b>	Univalvular
	Múltiple
<b>Cirugía de revascularización coronaria con o sin CEC (<i>bypass</i>)</b>	
<b>Cirugía combinada o mixta (valvular y coronaria)</b>	
<b>Síndrome aórtico agudo</b>	Disección aórtica
	Ruptura traumática aórtica
<b>Procedimientos misceláneos con CEC</b>	Trasplante cardíaco
	Trasplante cardiopulmonar
	Cirugía de la arritmia aislada
	Implantación de dispositivos de asistencia ventricular aislada
	Tumor cardíaco (mixoma)

Abreviaturas: CEC, circulación extracorpórea.

La figura 1 muestra la evolución de procedimientos de CCA realizados en España entre los años 2008 y 2018. En ella puede observarse un incremento del número de CCA, principalmente en 2017 y manteniéndose en 2018 (6). En el año 2018 se practicaron 34.318 intervenciones de cirugía cardiovascular, de las cuales, 23.008 correspondieron a intervenciones de cirugía cardíaca mayor.



**Figura 1.** Cuerpo G et al. (Cir Cardio. 2019) (6). Evolución anual del número de procedimientos de cirugía cardíaca mayor en España.

Atendiendo a la distribución por tipos de CCA del año 2016 en España, la cirugía valvular representó el 42,3%, la cirugía coronaria el 23%, la cirugía combinada el 9,6%, la cirugía de la aorta el 9,3% y la cirugía de las cardiopatías congénitas el 9,3% del volumen de pacientes intervenidos (7).

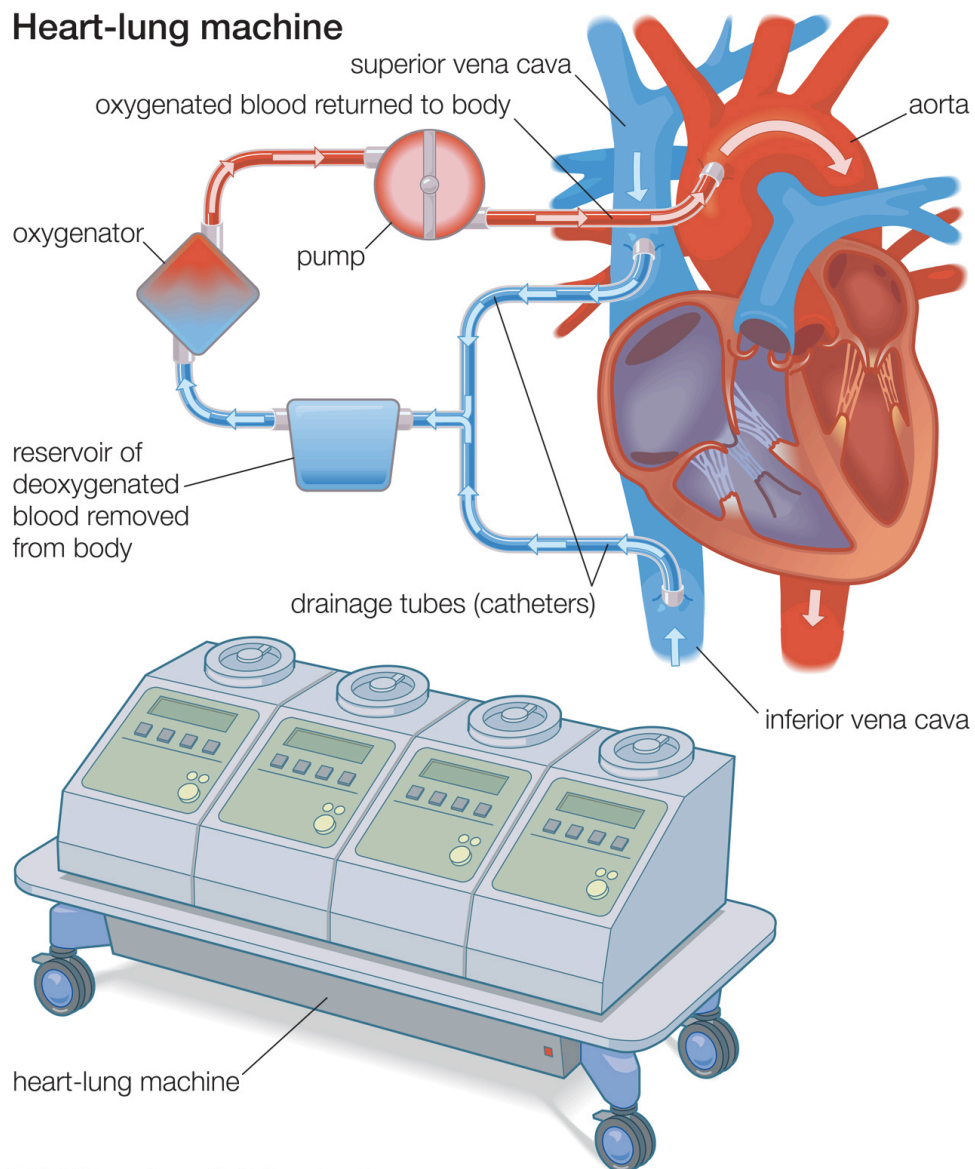
Un 90% de estas cirugías se llevaron a cabo utilizando como soporte procedimientos de circulación extracorpórea (CEC), que permite sustituir las funciones del corazón y del sistema respiratorio durante la intervención.

### 2.1.4. Procedimientos asociados a la cirugía cardíaca

La circulación extracorpórea, abreviada como CEC o CPB en inglés (*cardiopulmonary bypass*) es el procedimiento quirúrgico más empleado en CCA. Se utilizan con el objetivo de sustituir la funcionalidad de los pulmones y del corazón para que éste pueda ser intervenido, parado y las cavidades cardíacas libres de sangre, manteniendo la perfusión de todos los órganos y tejidos. Para ello se envía la sangre no oxigenada que llega al corazón hacia una

bomba que realiza el intercambio gaseoso y devuelve sangre oxigenada al organismo (8) (Figura 2).

A nivel cardíaco se lleva a cabo un pinzamiento o clampaje aórtico, a continuación se induce cardioplegia (arresto cardíaco) mediante solución hipercalémica, y por último, se mantiene en un estado de hipotermia para ralentizar su metabolismo.



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

**Figura 2.** Encyclopædia Britannica, 2010 (8). Esquema de la conexión del circuito de circulación extracorpóreo al corazón de un paciente.



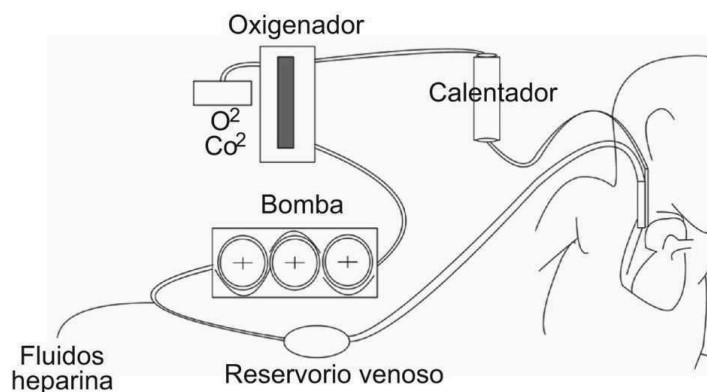
El circuito de CEC está compuesto por múltiples elementos entre los que cabe destacar los siguientes (Tabla 2):

**Tabla 2. Circuito de circulación extracorpóreo**

<b>Elemento</b>	<b>Principales Funciones</b>
<b>Reservorio venoso</b>	Permite el depósito de la sangre pobre en oxígeno que es drenada desde la aurícula derecha mediante las venas cavas.
<b>Oxigenador</b>	Intercambia el dióxido de carbono con el oxígeno. Habitualmente son membranas permeables que actúan como la membrana alveolo-capilar, permitiendo el intercambio gaseoso.
<b>Intercambiador térmico</b>	Controla la temperatura de perfusión para alcanzar el enfriamiento y recalentamiento de acuerdo a las necesidades durante la CEC.
<b>Bomba de perfusión</b>	Responsable de realizar el aspirado y bombeo de la sangre, remplazando la función cardíaca.

Abreviaturas: CEC, circulación extracorpórea.

El circuito de CEC se compone esquemáticamente de dos elementos clave, la bomba que permite la circulación de la sangre por el circuito y el oxigenador, que permite el intercambio de gases (9). El diagrama simplificado de los elementos que constituyen el circuito de CEC se muestra a continuación en la Figura 3:



**Figura 3.** Gómez-Caro A. et al. (Arch Bronconeumol., 2010) (9) . Elementos que constituyen el circuito de circulación extracorpóreo.

Para preparar el paso de la sangre por el circuito de CEC es necesaria la administración de un anticoagulante que permite el contacto de la sangre con este circuito extracorpóreo. En la actualidad, el anticoagulante utilizado con esta finalidad es la heparina, ya que reúne una serie de cualidades como son: fácil administración, rápida acción, actuación predecible y fácil reversión con protamina.

Una vez completado el procedimiento quirúrgico, se procede al desclampaje de la aorta y se prepara el corazón para la salida de la CEC: calentándolo y perfundiendo el miocardio para revertir la cardioplegia hasta que la actividad cardíaca retorna con un ritmo espontáneo.

La incorporación de la circulación extracorpórea en las intervenciones cardíacas, ha hecho posible el gran avance en la disciplina. Sin embargo, el contacto de la sangre a través de todas las superficies del circuito, el cambio de temperatura de la sangre, así como su mantenimiento en el reservorio venoso, desencadena una serie de reacciones adversas para el organismo que serán descritas más adelante. El control sobre estas reacciones adversas es imprescindible para el éxito de la intervención.

## 2.1.5. Postoperatorio de la cirugía cardíaca

### 2.1.5.1. Cuidados postoperatorios

Dada la elevada complejidad de los procedimientos que se llevan a cabo durante la cirugía cardíaca, los cuidados postoperatorios de los pacientes deben realizarse en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Estas unidades deben de estar formadas por profesionales altamente capacitados, y a ser posible, formados específicamente en el cuidado de pacientes postoperados cardíacos. Se calcula que la estancia media actual de estos pacientes en UCI tras la intervención, es de 3 a 4 días (7).

### 2.1.5.2. Complicaciones postoperatorias y factores predisponentes

La CCA conlleva una serie de complicaciones postoperatorias, destacando las de tipo pulmonar, renal, cardíaco, neurológico, infeccioso, que pueden incluso conducir al fallo multiorgánico y la muerte (10, 11). Dichas complicaciones se ven influenciadas por diferentes variables preoperatorias e intraoperatorias. Dentro de las variables preoperatorias, como se ha visto anteriormente, destacan las comorbilidades de los pacientes sometidos a CCA. En el caso de las variables intraoperatorias, todas tienen como denominador común las alteraciones hemodinámicas derivadas de la respuesta inflamatoria o Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) provocada por la propia CCA y los procedimientos que en ella suceden, tales como el trauma quirúrgico, el contacto de la sangre con superficies no endotelizadas (circulación extracorpórea), la isquemia-reperfusión, la hipotermia, las transfusiones, etc. Si bien es cierto que dichos mecanismos no son bien conocidos, la activación de la cascada inflamatoria desempeña un papel inequívoco en su patogénesis (12).

#### 2.1.5.2.1. Eventos cardiovasculares adversos mayores

La respuesta inflamatoria desencadenada por la cirugía cardíaca debe ser incluida en la patogénesis de la disfunción y desarrollo de eventos cardiovasculares. Entre otros factores, la disfunción endotelial derivada de la respuesta inflamatoria secundaria a la CCA, se asocia a la presencia de este tipo de patologías como consecuencia de la falta de regulación del tono vascular (13).

Se entiende por eventos cardiovasculares adversos mayores (MACE del acrónimo en inglés *Major Adverse Cardiovascular Events*) al conjunto de patologías que habitualmente incluye el

infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, síndrome de bajo gasto cardíaco y muerte por causa cardiovascular.

Según los datos del Registro Español de Cirugía Cardíaca en Medicina Intensiva, el infarto de miocardio supone un 2,2% de las complicaciones postoperatorias, los accidentes cerebrovasculares un 1,4%, la insuficiencia cardíaca una 2,6%, el síndrome de bajo gasto cardíaco un 11,9%. Es importante enfatizar que en este registro las complicaciones por *shock* cardiogénico suponen un 4,5% de las mismas y el paro cardíaco un 1,4% (<https://semicyuc.org/2015/11/registro-espanol-de-cirurgia-cardiaca-en-medicina-intensiva-reccmi-2013/>). Pese a que no consta el porcentaje de muertes por causas cardiovasculares, estas dos últimas complicaciones suelen presentar un desenlace fatal para el paciente.

### 2.1.6. Herramientas actuales para valorar la evolución de los pacientes postoperados de cirugía cardíaca

Para estimar el riesgo postoperatorio en los pacientes que se van a someter a CCA, existen diferentes escalas o *scores*. Los *scores* específicos de CCA, como el EuroSCORE evalúan únicamente el estado preoperatorio de los pacientes, y pueden ser inexactos en el caso de complicaciones asociadas a la propia cirugía (14). Su poder de predicción disminuye en ciertas poblaciones, ya que no tienen en cuenta muchas variables intraoperatorias, como la CEC, ni variables postoperatorias (15).

Dada la estrecha relación entre la respuesta inflamatoria desarrollada tras la cirugía, existe un creciente interés por detectar aquella respuesta que resultará clínicamente significativa, que permita predecir precozmente el riesgo de mortalidad u otras complicaciones tras CCA. Los *scores* propios de la UCI, como *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE), *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS), *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), entre otros, llegan a reflejar el estado crítico del paciente, incluyendo enfermedades crónicas y variables de laboratorio en su evaluación (16, 17). Sin embargo, no son específicos para la CCA y requieren 24 horas para su cálculo. En definitiva, existen pocas herramientas disponibles para evaluar el pronóstico inmediato tras la CCA y su predicción, supone un desafío.

Una exhaustiva evaluación preoperatoria, el éxito de la cirugía y la precocidad de las intervenciones postoperatorias, son cruciales para obtener mejores resultados en CCA (18). Es por ello que se requiere un alto grado de conocimiento y especialización en la predicción de complicaciones asociadas al postoperatorio, que permitan realizar intervenciones más precoces, capaces de mejorar los resultados a corto y largo plazo de la CCA.

Se postula que el desarrollo de *scores* locales basados en las características epidemiológicas y la evaluación de las variables postoperatorias inmediatas, como algunos biomarcadores, podrían mejorar la predicción de la evolución del paciente a corto y largo plazo (19). De esta manera, se permitiría aplicar diferentes estrategias para minimizar y controlar la respuesta inflamatoria en aquellos pacientes candidatos.



# 2.2. Respuesta Inflamatoria Tras La Cirugía Cardíaca

## 2.2.1. Aspectos generales

Los pacientes sometidos a CCA, habitualmente desarrollan una respuesta inflamatoria sistémica (20). A pesar de que esta respuesta inflamatoria se considera como una respuesta fisiológica al propio acto quirúrgico, su exacerbación puede contribuir a la aparición de las complicaciones postoperatorias ya mencionadas, pudiéndose llegar a manifestar con disfunción orgánica e incluso la muerte. Dicha respuesta inflamatoria se puede evidenciar en primera instancia con fiebre, taquicardia, hipotensión, edemas, etc., síntomas que normalmente preceden al fallo orgánico (3).

## 2.2.2. Definición de respuesta inflamatoria en el contexto de cirugía cardíaca

La definición de respuesta inflamatoria generalizada o sistémica nace en 1992 en la Conferencia Consenso de la American College of Chest Physicians/Society of Clinical Care Medicine (21) bajo el acrónimo en inglés de SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*). El SIRS se define como la presencia de dos o más criterios relacionados con la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y concentración de leucocitos en sangre (Tabla 3).



**Tabla 3. Criterios diagnósticos de SIRS**

<b>Criterio</b>	
<b>Temperatura corporal (°C)</b>	<36 o >38
<b>Frecuencia respiratoria (respiraciones /minuto)</b>	>20
<b>Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)</b>	>90
<b>Recuento de leucocitos (<math>\times 10^9</math>)</b>	<4 o >12

Si bien es cierto que esta definición es la más ampliamente utilizada, la “respuesta inflamatoria sistémica” nunca ha sido definida desde la perspectiva de la cirugía cardiotorácica (22). Atendiendo a los criterios clásicos de SIRS, más del 95% de los pacientes sometidos a CCA, cumplen con al menos dos criterios diagnósticos durante las primeras 24 horas de ingreso en la UCI (12). Por tanto, la aplicación de esta definición en esta población, resulta inadecuada por su bajo valor predictivo positivo. El trauma de la intervención sumado a la utilización de circuitos extracorpóreos, favorecen el desarrollo del SIRS pero, como se verá más en profundidad en el siguiente apartado, no siempre es clínicamente relevante y en la mayoría de ocasiones comporta efectos beneficiosos. Es por este motivo que a lo largo de los años se han evaluado diversas opciones para definir el “SIRS” en el contexto de la CCA, ya sea modificando los actuales criterios de SIRS, incorporando magnitudes de laboratorio o biomarcadores, e incluso, teniendo en cuenta el requerimiento de fármacos vasoactivos para tratar la hipotensión resultante de la inflamación (12, 23-25).

### 2.2.3. Fisiopatología de la respuesta inflamatoria en cirugía cardíaca

En términos generales, el trauma provocado por la propia cirugía induce la activación de los neutrófilos, plaquetas y células endoteliales. Además, estimula mediadores de la respuesta

inflamatoria, como por ejemplo, interleucinas (26). Esta situación se puede ver exacerbada en aquellas cirugías con requerimiento de circuitos extracorpóreos. Dichos circuitos, favorecen la situación inflamatoria debido al contacto de la sangre con superficies no endotelizadas, principalmente.

Los largos circuitos de circulación extracorpórea y la pérdida de sangre durante la cirugía, pueden causar hemodilución y provocar el requerimiento de transfusión de hemoderivados. Es bien conocido que las transfusiones conllevan un riesgo que suele ser superado por los beneficios. A pesar de ello, éstas no son inocuas y pueden influir en la clínica del paciente (10). Además, un excesivo tiempo en CEC puede inducir una mayor vasodilatación, por consiguiente, a un mayor requerimiento de fármacos vasopresores.

Por otro lado, como consecuencia del pinzamiento de la aorta, existe un periodo de isquemia seguido de una etapa de reperfusión (fenómeno denominado isquemia-reperfusión). La reoxigenación de los tejidos tras el pinzamiento aórtico desencadena una respuesta inflamatoria mediada, por un lado, por la interacción de los neutrófilos y las células endoteliales, y por otro, por el incremento de especies reactivas del oxígeno y citocinas (3).

### 2.2.3.1. Desarrollo de la respuesta inflamatoria derivada de los procedimientos asociados a la cirugía cardíaca

Como se ha visto anteriormente, la CCA requiere en muchas ocasiones del soporte de ciertos procedimientos necesarios para la intervención del corazón, como es el caso de la CEC. Este procedimiento desencadena una respuesta inflamatoria específica a través de tres mecanismos:

- ~ **activación por contacto**, *exposición de la sangre a superficies no entotelizadas del circuito extracorpóreo.*
- ~ **isquemia-reperfusión**, *existe un periodo de isquemia seguido de una reperfusión como consecuencia del pinzamiento de la aorta.*
- ~ **endotoxemia**, *daño en la barrera intestinal como consecuencia de la hipoperfusión hepato-esplácnica que favorece la translocación bacteriana y consiguiente paso de endotoxinas a la sangre.*

A continuación se explicaran los componentes fundamentales implicados en la respuesta inflamatoria derivados de estos tres mecanismos (20, 27).

#### 2.2.3.1.1. Activación del complemento

La cascada del complemento es activada por la presencia de endotoxinas o directamente por la CEC debido al contacto de la sangre con una superficie extraña, principalmente a través de la vía alternativa del complemento. Por otro lado, la administración de protamina para revertir el efecto del anticoagulante heparina, promueve la formación de complejos heparina-

protamina que tienden a activar la cascada del complemento por la vía clásica. Ambas vías convergen en la formación de anafilotoxinas (responsables de estimular la expresión de moléculas en el endotelio necesarias para la unión de los neutrófilos a él) y el desarrollo de complejos de ataque a la membrana (responsable de desencadenar la lisis celular). Asimismo, los productos del complemento generados tras su activación junto a la generación de trombina, son responsables de la activación plaquetar.

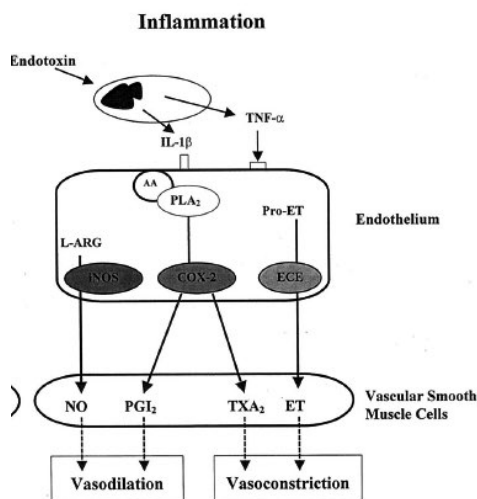
#### 2.2.3.1.2. Cascada de citocinas

Las citocinas son proteínas y polipéptidos solubles sintetizadas por múltiples células del sistema inmune con funciones pro y antiinflamatorias. La elevación de citocinas proinflamatorias en respuesta a la CCA, es compensada por la respuesta de las citocinas antiinflamatorias. El balance entre ambas, es crucial para el pronóstico clínico de la CCA. Las citocinas proinflamatorias desempeñan un papel clave en la cascada inflamatoria, activando y promoviendo la diferenciación de linfocitos y la activación y quimiotaxis de los neutrófilos, estimulando la producción de proteínas de fase aguda, activando la coagulación y el complemento, induciendo la producción de óxido nítrico sintetasa, entre otras funciones. El daño causado por la isquemia-reperfusión parece ser el mecanismo con mayor implicación en la respuesta de las citocinas (28).

#### 2.2.3.1.3. Óxido nítrico

El óxido nítrico es un agente vasoactivo responsable de la vasodilatación endotelial. Por un lado, el óxido nítrico induce vasodilatación previniendo así la acumulación de sustancias

nocivas en el endotelio. Sin embargo, el papel del óxido nítrico en la respuesta inflamatoria tras la CCA es complejo y puede tener diferentes acciones deletéreas, pudiendo llegar a producir un aumento de la permeabilidad vascular y una vasodilatación exacerbada que puede dar como resultado un *shock* distributivo. Las citocinas secretadas por los macrófagos en respuesta a la endotoxina, inducen el incremento de óxido nítrico sintetasa en el endotelio (Figura 4). A su vez, el óxido nítrico puede combinarse con radicales libres de superóxido, formando peroxidonitrito. Finalmente, el óxido nítrico tiene la capacidad de actuar sobre la célula predisponiendo su muerte celular.



**Figura 4.** Laffey JG, et al. (Anesthesiology, 2002) (20). Regulación del tono vascular.

#### 2.2.3.1.4. Cascada de coagulación

La cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico están estrechamente conectados con la respuesta inflamatoria. En el contexto de la CCA, el contacto de la sangre con el circuito de CEC estimula la activación de la vía intrínseca de la cascada de coagulación. Por otro lado, la expresión del factor tisular en el endotelio en respuesta al estrés oxidativo y a las citocinas proinflamatorias, hace que se active también la vía extrínseca de la coagulación. Tras la

activación de la cascada de coagulación, se produce la activación plaquetaria en el lugar del daño tisular. Debe de existir un adecuado balance entre factores procoagulantes y anticoagulantes. Este balance se ve distorsionado por la CEC, la activación de la trombina por la CEC, requiere el aporte de anticoagulantes para prevenir la formación de coágulos. La estimulación de la fibrinólisis puede contribuir a la aparición de coagulopatías postoperatorias, pudiendo resultar en la acumulación de depósitos de fibrina en los vasos de menor calibre, provocando oclusión de la microcirculación y causando finalmente daño en distintos órganos.

#### 2.2.3.1.5. Plaquetas

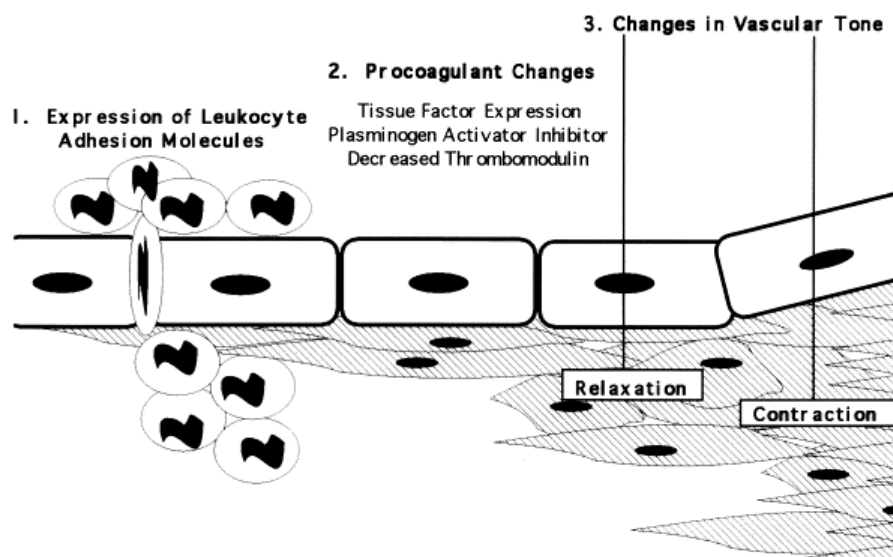
Las plaquetas se ven afectadas en la respuesta inflamatoria tanto a nivel cualitativo como a nivel funcional. La activación del complemento y de la cascada de la coagulación son las principales responsables de su activación. Las plaquetas aumentan su capacidad adherente y el contenido de sus gránulos, compuestos por quimiocinas, citocinas proinflamatorias, factores angiogénicos, factores de coagulación, etc. La activación plaquetaria en el lugar del daño tisular, provocan la estimulación de sustancias proinflamatorias *in situ*, alterando la integridad del tejido y promoviendo la unión de leucocitos al endotelio.

Asimismo, la liberación de sustancias proinflamatorias estimulan la producción hepática de trombotocina lo que incrementa aún más la producción de plaquetas.

### 2.2.3.1.6. Endotelio

El endotelio controla el tono y la permeabilidad vascular, regula la coagulación, secreta mediadores solubles y expresa proteínas de superficie que permiten el paso de los leucocitos hacia las áreas de inflamación.

La respuesta inflamatoria que se produce tras la CCA se caracteriza por la activación extendida del endotelio, provocando la disfunción del mismo. Ciertas citocinas proinflamatorias se unen a receptores en el endotelio, causando la activación de las células endoteliales. Las células activadas del endotelio expresan proteínas (como el factor tisular) que promueven la activación de la coagulación a través de la vía extrínseca, como se ha visto anteriormente. El endotelio puede expresar moléculas que permiten la adhesión de células del sistema inmune, como los neutrófilos, así como la activación y la degranulación de los mismos. En consecuencia, esto produce una mayor disfunción endotelial, provocando fugas capilares y la formación de edemas. Finalmente, las citocinas proinflamatorias también pueden deteriorar las funciones del endotelio, haciendo que éste pierda su capacidad de dilatación. Este hecho explica la asociación entre inflamación y el riesgo de presentar eventos cardiovasculares (Figura 5) (29).



**Figura 5.** Verrier ED, et al. (Ann Thorac Surg. 1996) (29). Daño endotelial producido por la respuesta inflamatoria.

#### 2.2.3.1.7. Respuesta inmune celular

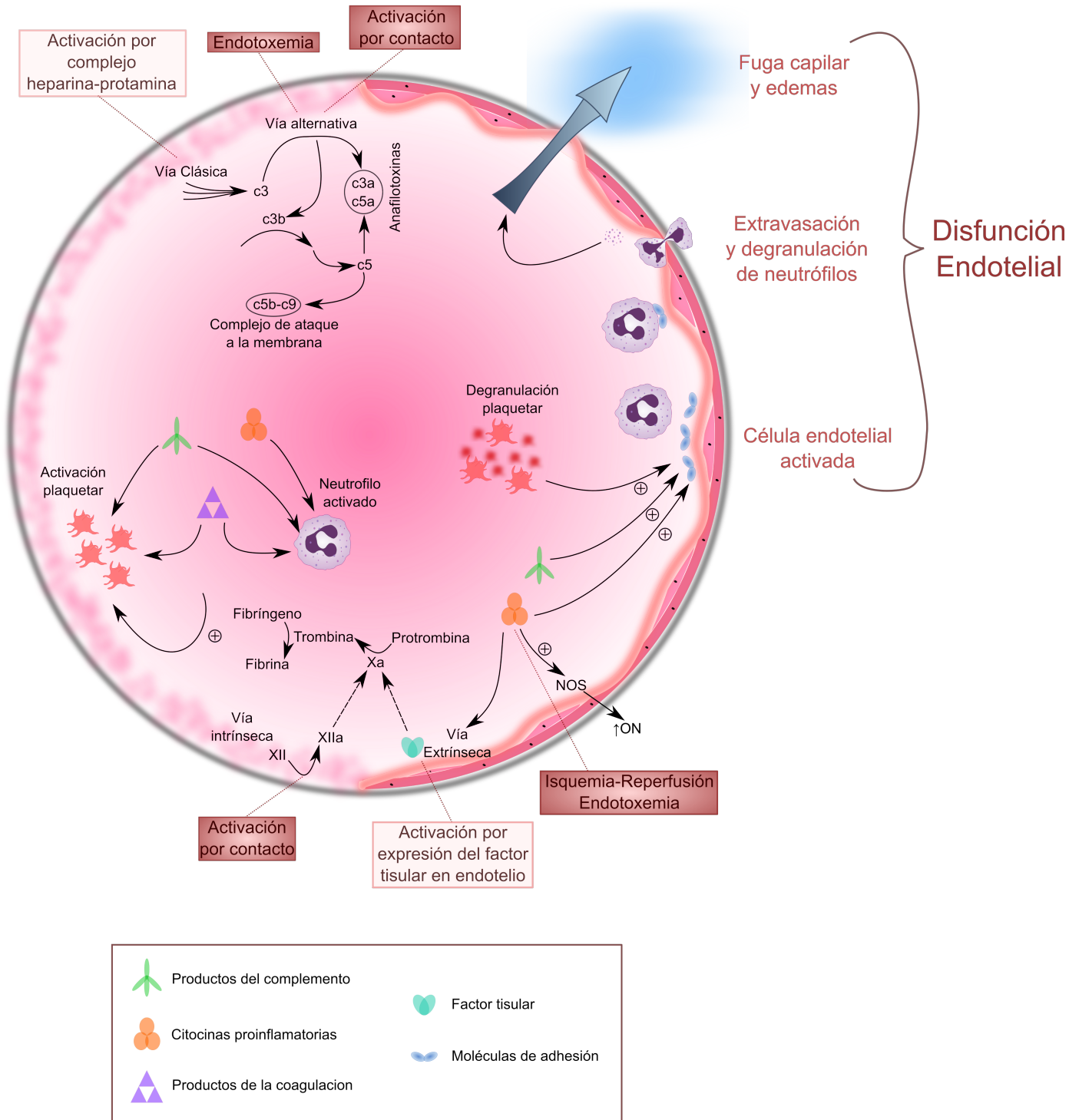
Como ya se ha visto anteriormente, el daño endotelial favorece que se adhieran los neutrófilos jugando un papel esencial en la respuesta inflamatoria. De forma coordinada, las quimiocinas, la desgranulación plaquetar y los productos del complemento, favorecen la migración y unión de las células del sistema inmunológico, dañando aún más el endotelio y los tejidos colindantes. No sólo los neutrófilos están involucrados en la respuesta inflamatoria postcirugía cardíaca, la CEC también activa los monocitos y los macrófagos mediante la producción de citocinas, incrementando la producción de las mismas. La importancia a nivel clínico de los leucocitos, radica en que éstos promueven aún más la lesión de órganos.

La figura 6 que se muestra a continuación sintetiza la respuesta inflamatoria desencadenada por el CEC.



# Superficie extracorpórea

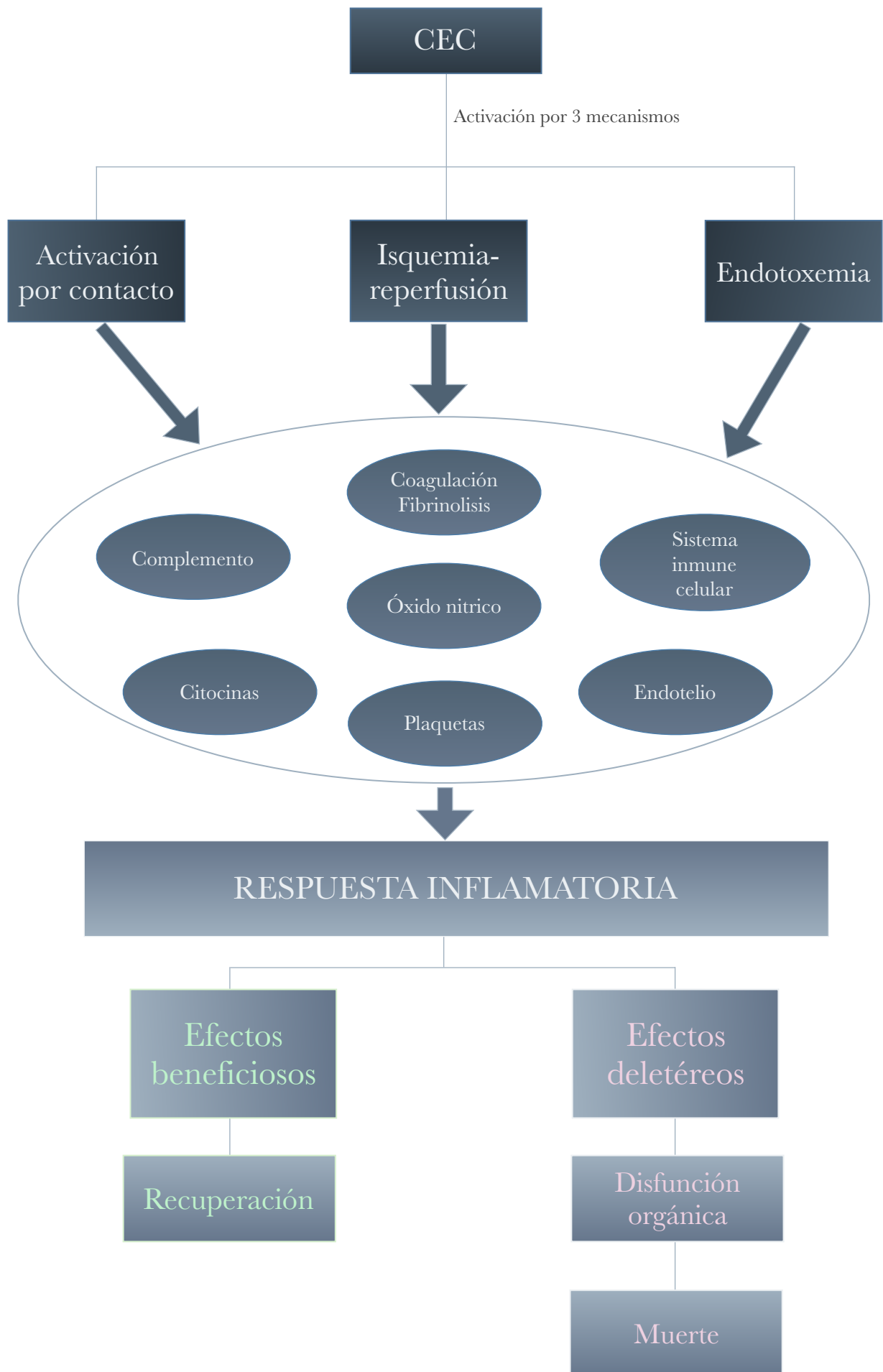
# Endotelio



**Figura 6.** Respuesta inflamatoria desencadenada por el CEC. En la parte izquierda de la figura se puede observar cómo el contacto de la sangre con una superficie no endotelizada (en este caso, el circuito extracorpóreo), activa el sistema del complemento y la cascada de coagulación. Estos dos sistemas son, en parte, los responsables de la reacción inflamatoria que sucede a continuación: elevación de citocinas proinflamatorias, activación de plaquetas y neutrófilos. Como consecuencia, sucede una serie de acciones que pueden dar lugar a efectos deletéreos como la disfunción endotelial (parte derecha de la figura). Los rectángulos más oscuros indican la respuesta inflamatoria específica desencadenada por el CEC.

En función del balance entre los factores inflamatorios y antiinflamatorios, la respuesta clínica del paciente frente a esta situación puede acabar en una respuesta inflamatoria controlada con **efectos beneficiosos**, favoreciendo la preparación del sistema inmune para prevenir infecciones perioperatorias y promover la cicatrización de la herida quirúrgica. De lo contrario, una respuesta inflamatoria exacerbada, puede comportar **efectos deletéreos** para el paciente pudiéndolo llevar a una situación de fallo orgánico y en el peor de los casos, a la muerte.

La siguiente figura muestra de forma esquemática la evolución del proceso inflamatorio que tiene lugar durante la CCA con CEC (Figura 7).



**Figura 7.** Diagrama de la secuencia de eventos que tiene lugar tras una CCA bajo CEC.

## 2.2.4. Manejo clínico de la respuesta inflamatoria

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, los efectos deletéreos tienen un gran impacto sobre la presencia de complicaciones o disfunciones orgánicas. Las diferentes estrategias que se pueden aplicar durante el postoperatorio tras la CCA, podrían actuar a diversos niveles, por ejemplo: reduciendo la endotoxemia, manteniendo la estabilidad hemodinámica y la perfusión orgánica, mediante técnicas de hemofiltración, administrando agentes para suprimir la respuesta inflamatoria o inmunomodularla, entre otras (20).

El objetivo de esta modulación de la respuesta inflamatoria postquirúrgica es atenuar los efectos deletéreos, pero preservando sus efectos beneficiosos.

Los efectos deletéreos tienen un gran impacto sobre la presencia de complicaciones o disfunciones orgánicas. Las más frecuentes que se pueden dar durante el postoperatorio de la CCA son principalmente a nivel pulmonar, vascular, neurológico, cardíaco, renal y gastrointestinal (3). Un hecho importante a destacar en esta tesis es que la respuesta inflamatoria, como se ha visto anteriormente, puede incrementar el riesgo de sufrir un evento cardíaco perioperatorio (20, 30).



## 2.3. Biomarcadores

### 2.3.1. Definición, características y clasificación

El término biomarcador fue definido en 1998 por el National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group como “una característica que es medida y evaluada objetivamente como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” (31). La Organización Mundial de la Salud, en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas y la Organización Internacional de Laboratorios, definieron biomarcador como “cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medido en el cuerpo o en sus productos y que influye o predice la incidencia o resultado de una enfermedad” (32). Por tanto, desde la presión arterial hasta moléculas que se puedan detectar en especímenes biológicos, pueden ser biomarcadores candidatos. Una definición más amplia de éste término incluye no sólo la incidencia o resultado de una enfermedad, sino también efectos de tratamiento, intervenciones e incluso el efecto a exposiciones ambientales, como químicos o nutrientes (32).

Los biomarcadores más clásicos utilizados en clínica hace más de dos siglos hacían referencia a variables fácilmente medibles relativas a signos clínicos como en el caso de la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca o la presión arterial. Los avances tecnológicos producidos en el siglo XX permitieron conocer la composición del medio interno mediante, por ejemplo, la medida de la concentración de glucosa en sangre, de enzimas hepáticas, etc. Este hecho ha revolucionado la práctica clínica y se ha hecho esencial en el manejo habitual de los pacientes.

De forma más aplicada a la Medicina de Laboratorio, se podría deducir que un biomarcador es cualquier molécula medible que puede reflejar una función biológica y que resulta útil en el

cribado, diagnóstico, pronóstico, monitorización de respuesta terapéutica o en la predicción del riesgo de presentar o desarrollar determinadas situaciones clínicas específicas.

Un biomarcador óptimo debería cumplir las siguientes características (33):

- ~ Estar implicado en la principal vía fisiopatológica de la enfermedad.
- ~ Ser accesible en términos de coste y disponibilidad.
- ~ Ser fácilmente medible con la instrumentación disponible, de forma reproducible y fiable.
- ~ Proporcionar nueva información de la enfermedad, o bien información añadida respecto al resto de biomarcadores conocidos.
- ~ Mostrar un comportamiento dosis-respuesta, en relación a la extensión o gravedad de la enfermedad o a la progresión de esta con el tratamiento.
- ~ Ser sensible para la enfermedad, lo que es especialmente relevante para posibles estrategias de cribado o de diagnóstico.
- ~ Ser específica de la enfermedad. Es decir, su presencia o elevación no puedan ser debidas a fenómenos fisiopatológicos distintos de la propia enfermedad.

Hay que tener presente, sin embargo, que es muy difícil encontrar un biomarcador que cumpla con todas las características anteriormente descritas. Por lo tanto, en la práctica, de Lemos y Morrow sugirieron tres criterios fundamentales para la evaluación de nuevos biomarcadores: ¿se puede medir?, ¿añade nueva información [respecto a los biomarcadores actuales]?, ¿ayuda al clínico en el manejo de los pacientes? (34).

Los biomarcadores pueden clasificarse atendiendo a su naturaleza molecular entre marcadores génicos, proteicos o metabólicos. En la actualidad, la mayoría de biomarcadores utilizados son proteínas, péptidos o pequeños metabolitos. Por otro lado, también pueden clasificarse según su valor clínico: biomarcadores diagnósticos, predictivos, pronósticos o de respuesta (31). Los primeros hacen referencia a aquellos biomarcadores que ayudan en la identificación de pacientes con una determinada enfermedad e incluso permiten estratificar en estados evolutivos o la gravedad. Los biomarcadores predictivos brindan información sobre la probabilidad de desarrollar una patología. Los biomarcadores pronósticos, en cambio, ofrecen probabilidad acerca de la evolución de una patología. Por último, los biomarcadores de respuesta anticipan la respuesta a intervenciones terapéuticas, permitiendo así seleccionar el tratamiento terapéutico más indicado.

### 2.3.2. Biomarcadores de inflamación

Como ya se ha comentado anteriormente, la inflamación es una respuesta fisiológica del organismo ante una agresión por estímulos mecánicos, químicos o infecciosos. Se trata de una respuesta rápida, desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales, controlada a nivel humoral y celular. Diversas son las moléculas implicadas en esta respuesta, en un artículo de revisión se encontraron más de 170 biomarcadores de inflamación diferentes derivados de miles de estudios relacionados con la sepsis (35). Atendiendo a los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la respuesta inflamatoria, se han estudiado diversos biomarcadores con diferentes finalidades. La naturaleza de éstos es muy variable, pero desde un punto de vista estructural y de función biológica, se podrían describir las siguientes categorías de biomarcadores inflamatorios y algunos ejemplos de ellos (Tabla 4) (35):



Tabla 4. Clasificación de los biomarcadores de inflamación

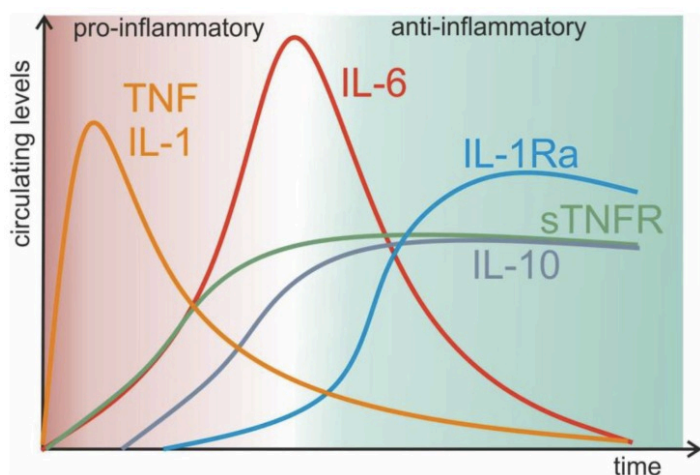
Citocinas	Proteínas de fase aguda	Receptores de superficie celular y formas solubles	De daño endotelial	Vasodilatación
IL-6	PCR	CD14	Endocan	MR-proADM
IL-10	PCT	suPAR	Neopterina	Copeptina
TNF $\alpha$	Pentaxina-3	ST2	Angiopoyetina	Elastina

Abreviaturas: IL-6, Interleucina-6; IL-10, Interleucina-10; TNF $\alpha$ , Factor de necrosis tumoral alfa; PCR, Proteína C reactiva; PCT, Procalcitonina; CD14, cluster of differentiation 14; suPAR, Soluble Plasminogen Activator Urokinase Receptor; ST2, suppression of tumourigenicity 2; MR-proADM, Proadrenomedulina.

A continuación se pasaran a detallar más en profundidad aquellos que se han considerado para este proyecto de tesis.

### 2.3.2.1. Citocinas: interleucina-6

Las citocinas son la familia de mediadores de respuesta inflamatoria mejor conocidos y estudiados. Se tratan de glicoproteínas cuyo peso molecular puede variar de 6 a 70 KDa (36). Tras un estímulo inicial se desencadena la producción de citocinas proinflamatorias (Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e Interleucina-1 (IL-1)). Estas citocinas tempranas estimulan la producción de otros mediadores más tardíos, como por ejemplo la IL-6 (37) (Figura 8).



**Figura 8.** Steeland S., et al. (Int J Mol Sci. 2018) (37). Cinética de liberación de citocinas tras un estímulo.

La IL-6 en concreto, es sintetizada por las células del sistema mononuclear-fagocítico y se convierte en un estímulo para la liberación de proteínas de fase aguda. Además de los macrófagos, los linfocitos, las células endoteliales, prácticamente cualquier tipo celular es capaz de producir citocinas tras su estimulación. Las citocinas son pleiotrópicas dado que son capaces de dirigirse a múltiples dianas produciendo inflamación y daño tisular a diferentes niveles (36).

La producción de citocinas es transitoria y rápidamente regulada. En personas sanas, su concentración acostumbra a ser indetectable, cuando ésta se eleva, indica que ha habido una activación de la cascada como consecuencia de un estímulo inflamatorio (38). Es por esta razón que la medida de las citocinas puede resultar de utilidad para entender y predecir la progresión de la enfermedad, o bien, para determinar la respuesta a un tratamiento.

La medida de la concentración de citocinas en suero o plasma se puede realizar de forma rutinaria en los laboratorios clínicos. Habitualmente se miden mediante métodos basados en enzimoimmunoanálisis (ELISA) manuales o automatizados, siendo la IL-6 la que se encuentra más ampliamente incorporada en las plataformas automatizadas. Las citocinas suelen presentar una vida media corta y una cinética muy rápida, característica que hace que su medición no esté totalmente instaurada en los laboratorios clínicos y, en muchos casos, debido a la falta de estandarización del método de medida e incluso a la falta de intercambiabilidad entre especímenes, su uso está más enfocado hacia la investigación (39, 40).

El daño tisular asociado al trauma producido por la propia cirugía, promueve la activación de diferentes células del sistema inmunitario provocando así el aumento de la concentración de interleucinas, como la IL-6. Este hecho desencadena una respuesta inflamatoria de crucial importancia para el subsecuente desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica y

complicaciones postoperatorias subyacentes (41). Diversos estudios han demostrado que el aumento de la concentración de IL-6 se correlaciona con la severidad de la disfunción orgánica, e incluso mortalidad, producida tras la cirugía (41-43).

## 2.3.2.2. Proteínas de fase aguda

### 2.3.2.2.1. Procalcitonina

La procalcitonina (PCT) fue descrita por primera vez en 1993 como una proteína asociada a un proceso infeccioso (44). Se trata de una molécula de 114-116 aminoácidos precursora de la hormona calcitonina cuya síntesis tiene lugar fundamentalmente en la glándula tiroides y en las células neuroendocrinas del pulmón. Tras una infección bacteriana, las citocinas y endotoxinas liberadas inhiben el paso de PCT a calcitonina, provocando así un aumento de la concentración del precursor hormonal. Estudios posteriores han demostrado que ante la presencia de una infección bacteriana, diversos órganos son capaces de sintetizar PCT y liberarla a la circulación sanguínea (45, 46). En situaciones fisiológicas, su concentración en sangre es prácticamente indetectable, comenzando a aumentar aproximadamente después de 2-4 horas del inicio de una infección generalizada, mostrando un pico de máxima concentración a las 24-48 horas (47) y presentando una vida media de 20-36 horas (46).

En la actualidad, existen diversos métodos de medida para la cuantificación de PCT en plasma, suero e incluso sangre. La determinación de PCT se encuentra disponible en la mayoría de laboratorios clínicos de forma automatizada mediante métodos de inmunoanálisis mediante tecnología TRACE (*time-resolved amplified cryptate emission*), quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes o bien, inmunoturbidimétricos. Existen también métodos cualitativos y semicuantitativos inmunocromatográficos. Se trata de una proteína muy estable y que no requiere ningún manejo preanalítico particular. Sin embargo y pese a que su uso

cada vez está más extendido, su determinación presenta aún un coste elevado que requiere una exhaustiva gestión de la demanda.

A pesar de que se trate de un biomarcador fundamentalmente orientado para el diagnóstico de la sepsis, se ha descrito elevación de su concentración también en procesos inflamatorios de origen no infecciosos como cirugía mayor, traumatismos, quemaduras, entre otros (48). Concretamente, después de una intervención quirúrgica, la concentración de PCT en sangre se relaciona con el tipo y la severidad del trauma quirúrgico. Por ejemplo, tras una CCA cuyo curso postoperatorio evoluciona con normalidad, la inducción de PCT es sólo moderada. Sin embargo, en pacientes con evolución tórpida o que manifiestan complicaciones postoperatorias, expresan concentraciones significativamente elevadas de PCT (49). A pesar de que la CCA suele ser altamente estéril, la etiología a través de la cual se estimula la producción de PCT no es del todo conocida y se presupone estar relacionada por la acción de citocinas proinflamatorias (48).

#### 2.3.2.2.2. Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) fue descrita por primera vez en 1930 por Tillet y Francis tras encontrar una sustancia que precipitaba con el polisacárido C del *Streptococcus pneumoniae* en el suero de pacientes con neumonía (50). Posteriormente, en 1941, esta sustancia pasó a ser identificada como una proteína y denominada proteína C reactiva (51).

La PCR se sintetiza fundamentalmente en los hepatocitos tras la estimulación por citocinas proinflamatorias (principalmente IL-6) en respuesta a cualquier tipo de proceso inflamatorio. Esta proteína de fase aguda está involucrada en diferentes funciones inmunológicas. Activa el sistema del complemento vía el complejo C1q, facilitando su eliminación por los macrófagos (52). Presenta una cinética más lenta que los biomarcadores anteriormente mencionados, la

PCR comienza a elevarse en sangre a las 12 horas después de iniciarse el estímulo inflamatorio/infeccioso y puede, incluso, seguir sintetizándose durante varios días tras haber remitido el estímulo desencadenante (46).

La PCR es uno de los biomarcadores de inflamación más ampliamente estudiados. Sin embargo, a pesar de que presenta una alta sensibilidad para el diagnóstico de una infección, se trata de un marcador altamente inespecífico ya que su concentración aumenta en cualquier tipo de desorden inflamatorio ya sea agudo o crónico e incluso durante el postoperatorio de cirugías no complicadas (53, 54). No obstante, otras investigaciones apoyan la hipótesis de que la PCR se relaciona con complicaciones postoperatorias (55, 56). Pese a que su papel es aún controvertido, se trata de una magnitud ampliamente utilizada y disponible en los laboratorios clínicos desde hace muchos años, su medición está completamente automatizada para la mayoría de plataformas analíticas mediante diversos métodos de medida de inmunoanálisis (57). No requiere de condiciones preanalíticas particulares, presenta una alta estabilidad en suero o plasma y se dispone de calibradores trazables a materiales de referencia. Además, su determinación es relativamente económica por lo que sus aplicaciones son numerosas y hoy en día continúa siendo un marcador de vanguardia.

## 2.4. Desarrollo De Un Nuevo Biomarcador

Para disponer de un biomarcador útil, se requieren dos etapas: la primera de identificación de magnitudes biológicas con sentido fisiopatológico o clínico y la segunda, su validación clínica. Durante la primera etapa de identificación, los biomarcadores candidatos surgen normalmente de la propia literatura, tras la selección de los posibles biomarcadores se pasa a la etapa de verificación mediante ensayos clínicos y estudios científicos con el objetivo de determinar si existe suficiente evidencia científica para continuar el proceso. Tras esta primera fase, el biomarcador debe ser validado con una determinada finalidad. En esta etapa se debe mostrar la utilidad clínica real, su validez y su seguridad. Durante la etapa de *post-marketing*, los laboratorios clínicos deben de poder optimizar y evaluar los biomarcadores continuamente, eliminando biomarcadores en desuso y sustituyéndolo por nuevos (58).

La actual falta de biomarcadores que ayuden al clínico a detectar precozmente una respuesta inflamatoria clínicamente significativa en el contexto de CCA, crea la necesidad de realizar estudios dirigidos con dicha finalidad.

La presente tesis doctoral se centrará con más detalle en las plaquetas inmaduras como potencial magnitud biológica de interés en el perioperatorio de la CCA.

## 2.4.1. Las plaquetas: potencial biomarcador de inflamación

### 2.4.1.1. Aspectos generales

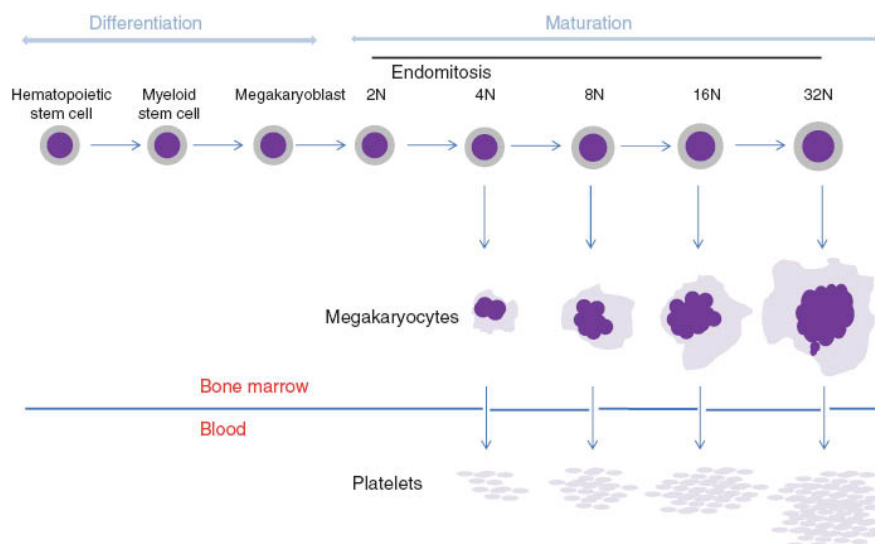
El hemograma constituye uno de los conjuntos de pruebas de laboratorio habitualmente más solicitados, dado que forma parte del estudio inicial de la mayoría de los individuos. Este conjunto de pruebas incluye la medición de las concentraciones de las entidades celulares presentes en la sangre tales como los eritrocitos, las plaquetas, los leucocitos así como las diferentes entidades leucocitarias. La información que proporciona el hemograma es de gran utilidad diagnóstica, tanto de enfermedades del sistema hematopoyético como de otros órganos y sistemas, ya que muchas de ellas afectan a las magnitudes del hemograma, ya sea a nivel cuantitativo como cualitativo. Por tanto, su valor semiológico puede llegar a ser muy amplio: permite reflejar el funcionamiento de la hematopoyesis, detectar y clasificar las anemias, detectar procesos inflamatorios e infecciosos, entre otros.

Las plaquetas se caracterizan por presentar principalmente importantes funciones en la hemostasia y están directamente implicadas en los mecanismos de trombosis, inflamación y cicatrización. Las entidades nosológicas que afectan a estos tipos celulares son de dos clases: alteraciones a nivel cuantitativo y alteraciones a nivel cualitativo. El laboratorio clínico ha de poder proporcionar esta información para el correcto estudio de la hemostasia primaria y del estado de la médula ósea (megacariopoyesis).

### 2.4.1.2. Megacariopoyesis

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados y representan el estadio terminal de la megacariopoyesis, que consiste en una serie de eventos de proliferación y maduración que

tienen lugar en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotentes. Estas células pluripotentes proliferan y se diferencian hasta megacariocitos, pasando por el estadio de megacarioblasto. Cuando se alcanza el estado de megacarioblasto, la célula pierde su capacidad de proliferar y comienza el proceso madurativo. Dicho proceso se compone de sucesivas divisiones nucleares sin divisiones del citoplasma celular, originando células poliploides. Finalmente, la maduración da como resultado los denominados megacariocitos, que presentan múltiples copias de material genético y un gran citoplasma. Según los requerimientos fisiológicos, la endomitosis se detiene y comienza la formación de plaquetas por fragmentación del citoplasma de estas células (Figura 9).



**Figura 9.** Hoffmann J. (Clin Chem Lab Med, 2014) (59). Representación esquemática de la megacariopoyesis.

Los megacariocitos, desarrollan una extensiones citoplasmáticas denominadas pseudópodos que penetran en los capilares sinusoides medulares para liberar las plaquetas al espacio extracelular. Se producen de 1 a 2 millones de plaquetas por segundo en un individuo sano, pudiéndose incrementar hasta 10 veces la producción ante una situación de trombopenia. Su vida media en sangre es de 8 a 10 días (59).



La megacariopoyesis es un proceso que presenta una duración variable (de 5 a 10 días) y está regulada por numerosos factores de crecimiento y citocinas. Por ejemplo, la IL-6 estimula la producción hepática de trombopoyetina (60), factor esencial para mantener una adecuada concentración de plaquetas ya que controla el número, el tamaño y la dotación cromosómica de los megacariocitos (61).

### 2.4.1.3. Plaquetas reticuladas o plaquetas inmaduras

Las plaquetas jóvenes, recién liberadas de la médula ósea, presentan un alto contenido citoplasmático de ácido ribonucleico (RNA) y se conoce que son más reactivas que las plaquetas maduras. El término reticulocito se acuñó en el siglo pasado tras describir los eritrocitos jóvenes que contienen RNA residual, y fue en 1969 cuando debido a la homología con estos reticulocitos, se describieron las plaquetas reticuladas. A diferencia de las plaquetas maduras, que persisten en sangre durante 8-10 días, las plaquetas reticuladas tienen una vida media mucho más corta (1 día) (59), pudiendo reflejar, a tiempo real, la actividad megacariopoyética de la médula ósea. Los analizadores hematológicos que han incorporado la citometría de flujo como principio de medida, son capaces de calcular el porcentaje de plaquetas que presentan un alto contenido de RNA, gracias al uso de colorantes fluorescentes que penetran la membrana celular poniendo de manifiesto el contenido de material genético, a dicho porcentaje se le conoce como la fracción de plaquetas inmaduras (IPF del acrónimo en inglés *immature platelet fraction*).

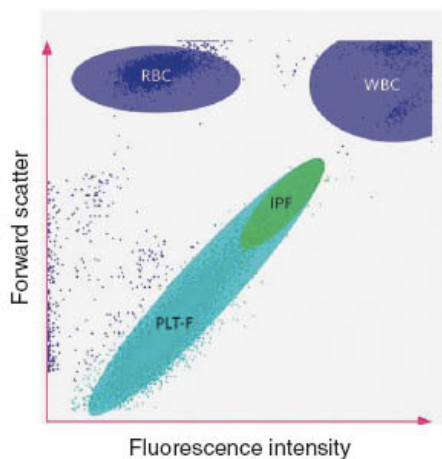
#### 2.4.1.4. Principios de medida de las magnitudes relacionadas con las plaquetas. Estado actual de la tecnología

Tradicionalmente, el recuento de la concentración de plaquetas se realizaba mediante el examen microscópico en cámara hematocitométrica. En la actualidad, los laboratorios clínicos disponen de sistemas de medida totalmente automatizados para este propósito. En las últimas décadas, los analizadores hematológicos han experimentado una gran evolución tecnológica. Por un lado, gracias a la introducción de nuevos principios de medida como la citometría de flujo, y por otro, debido a la progresiva evolución informática que permite el desarrollo de software cada vez más sofisticados. Como resultado de estos avances, ha habido una mejora tanto a nivel metrológico como a nivel de la información proporcionada.

Además de las magnitudes tradicionales del hemograma, otras nuevas magnitudes han ido cobrando cada vez mayor importancia en los últimos años, tales como las plaquetas reticuladas o la fracción de plaquetas inmaduras. Los avances tecnológicos también han supuesto una mejora en la medición de esta magnitud pasando de una metodología laboriosa como la citometría de flujo con marcadores monoclonales a una medición rápida, de bajo coste y totalmente automatizada, como es la citometría de flujo por fluorescencia.

El sistema de medida Sysmex XN (Sysmex, Kobe, Japan) integra tres métodos de medida diferentes para la medición de las magnitudes relacionadas con las plaquetas: la citometría de flujo por impedancia o resistencia eléctrica, el método óptico o medida de la intensidad de luz dispersada y la citometría de flujo por fluorescencia. El método de la citometría de flujo por fluorescencia permite (además de medir la concentración de número de plaquetas) determinar la IPF. Para ello se utiliza un colorante fluorescente de oxazina que atraviesa la bicapa lipídica y tiñe el material genético (RNA) de las plaquetas. Este fragmento celular marcado, pasa a través de un haz de luz láser semiconductor y, en función de los ángulos de

dispersión de la luz, evalúa diferentes características de las plaquetas tales como su tamaño celular, gracias a la dispersión de la luz en sentido frontal (también denominado *Forward Scattered Light*) o el contenido de RNA, gracias a la dispersión de la luz fluorescente en sentido lateral (también denominada *Side Fluorescent Light*). La representación gráfica de ambas dispersiones permite diferenciar el área de mayor intensidad de fluorescencia, que representan la IPF (Figura 10).



**Figura 10.** Hoffmann J. (Clin Chem Lab Med, 2014) (59). Escatergrama de representación de la medida de IPF en Sysmex XN.

Este método de medición presenta ventajas metrológicas y de practicabilidad respecto a los métodos “clásicos”, tanto para la medición de la concentración de plaquetas como para la medición de las IPF, tales como una menor imprecisión en los resultados obtenidos, sobretodo en las concentraciones de plaquetas cercanas a los límites de decisión terapéutica. Asimismo su medición no se ve influenciada en determinadas situaciones en las que existen alteraciones de la forma, tanto de las plaquetas (p.ej. en los casos de anisocitosis plaquetaria) como de los eritrocitos (p.ej. en los casos de presencia de microcitos, esquistocitos o anisocitosis marcada). No obstante, este método de medición también presenta inconvenientes. El principal, en el caso concreto de la medición de las IPF, es la falta de intercambiabilidad con otros sistemas de

medida para su medición, ya sea del mismo fabricante como de otros. Reflejo de esta limitación es el amplio intervalo de referencia de la IPF documentado en la bibliografía (62, 63)

Estas variaciones pueden ser explicadas por la evidente falta de estandarización. Los diferentes factores pueden justificar este inconveniente son: el tipo de colorante fluorescente empleado y su concentración, el tiempo y la temperatura de incubación, la falta de materiales de referencia internacionales, entre muchos otros. Pese a ello, el potencial valor semiológico que se le atribuye a esta magnitud hace que se estén realizando múltiples esfuerzos para favorecer la armonización entre los sistemas de medida existentes.

#### 2.4.1.5. Valor semiológico de la fracción de plaquetas inmaduras

En los últimos años, diferentes estudios han demostrado la utilidad clínica en la clasificación de las trombopenias basada en a la cuantificación de la IPF, ayudando a establecer un diagnóstico diferencial entre trombopenia de origen periférico y central (64).

Las investigaciones en el campo de las enfermedades inflamatorias han ganado un reciente interés en la medición de la IPF. Diversos estudios muestran una clara asociación entre la IPF y el diagnóstico de enfermedades de origen inflamatorio (65). Existen múltiples factores que conducen a alteraciones de la microcirculación, fundamentalmente las alteraciones en la coagulación, originando una gran cantidad de cambios microvasculares que pueden empeorar cuando la inflamación activa los factores de coagulación y las plaquetas (66). La IPF refleja la producción y activación de plaquetas, proporcionando información acerca de la reacción medular ante una respuesta temprana a un proceso inflamatorio, con lo que explicaría el hecho que pueda verse aumentada precozmente en pacientes con inflamación sistémica, incluso antes de las manifestaciones clínicas (65).

Más recientemente, y dado su asociación a procesos inflamatorios, las investigaciones respecto a esta magnitud en el contexto de enfermedades cardiovasculares y cirugías mayores, también se han visto potenciadas (67-70).

# 3. HIPÓTESIS

---



Debido al progresivo envejecimiento y complejidad de los pacientes sometidos a CCA, existe el riesgo a una mayor morbi-mortalidad perioperatoria a pesar de la adecuada evaluación y cuidados postoperatorios. Las causas que desencadenan estas complicaciones no están totalmente descritas en la literatura. No obstante, se sabe que existen factores preoperatorios, tales como las comorbilidades que presentan los pacientes cuando son sometidos a CCA, así como también factores intraoperatorios, tales como la circulación extracorpórea y la duración de la misma, el requerimiento transfusional, etc., que influyen en el período postoperatorio inmediato.

La respuesta inflamatoria desencadenada por el propio trauma quirúrgico y por los procedimientos utilizados durante la cirugía, como la circulación extracorpórea y el pinzamiento aórtico, es compleja. En la mayoría de los casos se trata de una respuesta que produce efectos beneficiosos para el paciente, pero en ciertas ocasiones puede llegar a provocar efectos deletéreos. Estos efectos adversos debidos a la exacerbación de la propia respuesta, favorecen el desarrollo de complicaciones durante el postoperatorio. En la respuesta inflamatoria intervienen múltiples mecanismos que involucran diferentes componentes celulares, como las plaquetas, y diversas moléculas con acciones proinflamatorias como las citocinas, proteínas de fase aguda, entre muchas otras.

Una mejor detección de la respuesta inflamatoria tiene especial interés a la hora de planificar y/o desarrollar estrategias para atenuar su impacto. A pesar de los avances técnicos en CCA existen pocas herramientas objetivas disponibles para evaluar el pronóstico en el perioperatorio. El estudio de nuevos biomarcadores, como la fracción de plaquetas inmaduras, y su implantación conjunta al resto de magnitudes de laboratorio en la práctica clínica habitual, podría contribuir en la mejora de resultados de los pacientes sometidos a



CCA, mejorando la predictibilidad de las complicaciones postoperatorias actuando de forma precoz y dirigida.

# 4.

# OBJETIVOS

---



### Objetivo principal

- ~ Evaluar la utilidad de la fracción de plaquetas inmaduras como potencial biomarcador asociado a inflamación en la predicción del desarrollo de respuesta inflamatoria durante el postoperatorio de cirugía cardíaca.

### Objetivos secundarios

- ~ Establecer los valores de referencia en la población adulta de nuestra zona de influencia de la fracción de plaquetas inmaduras.
- ~ Estudiar si la adición de la fracción de plaquetas inmaduras a los *scores* APACHE II y SOFA, aportan una mejora en la predicción de la respuesta inflamatoria postcirugía cardíaca.
- ~ Evaluar la asociación que existe entre la fracción de plaquetas inmaduras, y de otros biomarcadores clásicos de inflamación como proteína C reactiva, procalcitonina e interleucina-6, así como también de la troponina T ultrasensible como biomarcador de daño miocárdico, con el desarrollo de complicaciones cardiovasculares adversas mayores postcirugía cardíaca.



# 5. RESULTADOS

---



## 5.1. Primer estudio

### 5.1.1. Presentación del primer estudio

Cualquier resultado aislado de laboratorio, carece de interés por sí mismo. Para dotarlo de contenido y valor semiológico, se debe comparar con los denominados valores de referencia. Según las recomendaciones internacionales (71), cada laboratorio debería establecer sus propios valores de referencia, atendiendo a las características particulares de la población a la cual el laboratorio da asistencia, así como también, a la metodología empleada para la medición de la magnitud en cuestión.

Ante la falta de valores de referencia de la fracción de plaquetas inmaduras publicados en la bibliografía (para el método de medición empleado y la población a la que el laboratorio proporciona asistencia), se planteó el primer objetivo secundario. De su consecución se publicó el primer estudio que forma parte de esta tesis doctoral.





## 5.1.2. Primera publicación

### Original papers

#### Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN haematology analyser in adult population

Claudia E. Imperiali<sup>\*1</sup>, Ariadna Arbiol-Roca<sup>1</sup>, Lourdes Sanchez-Navarro<sup>1</sup>, Macarena Dastis-Arias<sup>1</sup>, Juan C. Lopez-Delgado<sup>2</sup>, Anna Cortes-Bosch<sup>1</sup>, Ana Sancho-Cerro<sup>1</sup>, Dolors Dot-Bach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Laboratory, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Critical Care Unit, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: cimperialir@bellvitgehospital.cat

#### Abstract

**Introduction:** The Sysmex XN-series haematology analyser has newly adopted a fluorescent channel to measure immature platelet fraction (IPF). To promote the clinical utility of this promising parameter, establishing a reliable reference interval is mandatory. According to previous studies, IPF values may be affected by the employed analyser and the ethnic background of the individual, but no differences seem to be found between individuals' genders. Therefore, this study aimed to define the reference interval for IPF in a Spanish population following Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines.

**Materials and methods:** A total of 153 healthy Caucasian adults from Spain met the inclusion criteria. IPF measurement was performed by means of a Sysmex XN-2000 haematology analyser. A non-parametric percentile method was used to calculate the reference intervals in accordance with CLSI guidelines.

**Results:** The obtained reference interval for IPF on the Sysmex XN-2000 was 1.6–9.6% (90% confidence intervals (CIs) were 1.5–1.8 and 9.3–11.5, respectively). No significant gender difference in IPF reference intervals was observed ( $P = 0.101$ ).

**Conclusions:** This study provides, for the first time, a reference interval for IPF using a Sysmex XN-2000 in a Spanish population, ranging from 1.6 to 9.6%. These data are needed to evaluate platelet production in several conditions such as thrombocytopenia, inflammatory states and cardiovascular diseases, as well as for future research.

**Key words:** platelets; haematology; reference values; immature platelet fraction

Received: September 21, 2017

Accepted: January 7, 2018

#### Introduction

In the last decades, automated haematology analysers have undergone important technological upgrades, such as the introduction of new methods and channels, the optimization of reagents and an improvement in analysis algorithms. This has resulted in an optimization of the analytical characteristics and in an increase in the obtained information. However, this additional information and the potential clinical uses of the new parameters have not been widely studied. This is the case with immature platelet fraction (IPF), which is a new parameter that measures young or immature platelets in peripheral blood. This parameter is

usually expressed as a proportional value of the total platelet count (%-IPF), as well as absolute immature platelet (A-IPF), which is a derived value from the total platelet count and %-IPF.

Immature platelets are the newly released platelets from the bone marrow by megakaryocytes. They have a short lifespan (< 24 hours) (1). The IPF is a helpful and non-invasive biomarker for the diagnosis of thrombocytopenia. It makes a distinction between central failures and peripheral platelet destruction because it is an indicator of megakaryopoietic activity (2,3). Bone marrow activity is

*Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(1):010708

<https://doi.org/10.11613/BM.2018.010708>

©Copyright by Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles in any medium or format and to remix, transform and build upon the material, provided the original work is properly cited and any changes properly indicated.

1

low in patients with central thrombocytopenia, so the IPF would be low. In contrast, in conditions where there is peripheral platelet destruction the bone marrow activity is accelerated and the IPF would be high (2).

Immature platelet fraction can also be an early predictor of bone marrow recovery after chemotherapy and stem cell transplantation (4,5). Generally, IPF values increase several days prior to a rise in the platelet count avoiding unnecessary platelet transfusions (6).

In recent years, several potential uses of IPF have been reported in the literature related to cardiovascular outcomes and inflammatory conditions (7-11). Many studies suggest that a higher proportion of IPF is associated with worse clinical outcomes in patients with cardiovascular diseases and in acute coronary syndromes (7,9). Immature platelets are metabolically and enzymatically more active than mature ones, having a greater prothrombotic activity. In consequence, some authors have hypothesized that IPF values may guide antiplatelet therapy as a marker of platelet turnover. Due to the major prothrombotic activity, a higher proportion of IPF could be associated with an attenuated response to antiplatelet drugs (12).

Recent studies suggest that IPF can provide clinical information about inflammatory conditions (8). In patients with sepsis, the activity of the bone marrow may also result in the release of an increased concentration of myeloid precursors and earlier platelets in peripheral blood. The mechanism inducing the increase in the production of IPF in septic patients could be related to the increase in cytokine production which occurs due to the inflammatory state (13).

At the beginning, IPF was measured by means of staining for RNA assessed by flow cytometry. However, this method had several limitations, such as being very time-consuming, having a high cost and a lack of standardization. Nowadays, automated IPF measurement is integrated into routine haematology analysers. For example, the newly developed Sysmex XN-series haematology analyser adopts a new platelet fluorescent channel (PLT-F) to measure IPF.

Despite the above-mentioned clinical benefits, the provision of reliable reference intervals for IPF is necessary to evaluate its usefulness and avoid misdiagnoses. The International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) recommend that all clinical laboratories should develop their own biological reference intervals (14). However, few laboratories currently follow this recommendation because of its difficulty, great time consumption and high costs.

The reference interval for IPF in a Spanish population employing the Sysmex XN-series have not yet been studied. According to previous studies, IPF values are highly dependent on the analyser used and also on ethnic background, but usually no differences between genders are found (15,16). Given these facts, our hypothesis is that reference intervals performed using the XE-series may not be appropriate for the XN-series. Moreover, the previously reported reference intervals established using the XN-series were developed in an Asian population, hence they too may not be valid for the Spanish population.

For all these reasons, the aim of the present work was to define 95% reference limits for IPF using the Sysmex XN-2000 in an adult Spanish population following CLSI guidelines.

## Materials and methods

### Subjects

The study was performed at Bellvitge University Hospital (Barcelona, Spain) which is a 700-bed teaching hospital specialized in adult patient care. The clinical laboratory is accredited according to the International Standard ISO 15189.

A total of 164 Caucasian volunteers from Spain were enrolled in this study from December 2015 to September 2016. Inclusion criteria for individuals were the following:  $\geq 16$  years old and apparently healthy adults. Exclusion criteria were the following: any acute or chronic disease, pregnancy, donating blood or receiving a blood transfusion in the past year, history of alcoholism, smoking  $> 20$

cigarettes per day and taking any drug known to affect the platelet number or activity (e.g. salicylates). Moreover, to exclude unhealthy individuals, blood, serum and plasma were obtained from each volunteer to assess the complete blood count (CBC), biomarkers for liver and renal function, iron status and coagulation. Subjects were excluded if any laboratory results were outside the reference intervals used in our clinical laboratory. This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital. A completed questionnaire and written informed consent were obtained from each individual.

## Methods

Blood samples were collected in 4 mL tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid ( $K_3EDTA$ ) (Vacuette®, Greiner Bio One®, Kremsmünster, Austria) and stored at room temperature before IPF measurement. All samples were analysed within 2–4 hours of collection. Complete blood count and IPF were measured using a Sysmex XN-2000 (Sysmex, Kobe, Japan) according to the manufacturer's recommendation. The Sysmex XN-series adopts fluorescent flow cytometry with semiconductor diode laser to measure IPF. Briefly, oxazine fluorescent dyes penetrate the platelets and stain the RNA. The stained platelets are passed through a semiconductor diode laser beam and the resulting forward scatter light (volume) and fluorescence intensity (mRNA content) are measured. The mature and immature platelets are identified on the basis of their fluorescence intensity. The IPF is expressed as a proportional value (%-IPF) of the total platelet count to indicate the rate of platelet production.

Throughout the study period, three levels of quality control material (QC-XN-CHECK levels 1, 2 and 3; Streck Laboratories Inc., Omaha, USA) were performed for all routine parameters, fluorescent platelets count and IPF, to control the performance of the overall procedure and the instrument under use.

Within- and between-day imprecision and relative bias were estimated for IPF using the lower QC material. The IPF conventional value was assigned

by the manufacturer. The desirable limits for within- and between-day analytical variations ( $CV_A$ ) and relative bias were defined by Bouro *et al.* (17). The within- and between-day imprecision obtained were 1.6 and 2.6%, respectively (desirable limit: 3.9%) and - 2.6% for relative bias (desirable limit: 11.9%). The metrological characteristics for IPF measurement did not exceed the desirable limits reported (17).

In addition, in order to exclude potentially unhealthy individuals, serum was collected in serum gel tubes and plasma in sodium citrate solution tubes (Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH®, Kremsmünster, Austria) to measure all biochemical parameters on a Cobas 8000 (Roche Diagnostics®, Basel, Switzerland) and coagulation parameters on an ACL-TOP 500 CTS (Instrumentation Laboratory Company®, Bedford, USA), respectively.

## Statistical analysis

All calculations to determine reference intervals were based on the CLSI guidelines (document EP28-A3c) (14).

Outliers were detected and removed using the adjusted Tukey's test. The distribution plot was performed to visually inspect the data. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the normality of distribution of the data.

According to the normality of the data, appropriate measures and statistical tests were used. Normally distributed data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The non-normally distributed data were expressed as median and interquartile range (IQR). Significance of between-group differences was tested by the parametric independent t-test and non-parametric Mann-Whitney test.

The IPF median values in males and females were compared using the Mann–Whitney U-test. When the results did not warrant partitioning, data were combined to calculate the reference interval.

The reference interval was calculated using a non-parametric method for lower and upper reference limits as 2.5% and 97.5% of the reference distribution. The 90% confidence intervals (CI) were calculated for lower and upper reference limits.

The values  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using STATA® version 14 (StataCorp LP, Texas, USA).

## Results

Blood samples were obtained from all eligible participants ( $N = 164$ ). Three subjects were excluded due to abnormal total platelet count (in-house reference values: 149–303 and 153–368  $\times 10^9/L$  for males and females, respectively), and one subject due to low haemoglobin concentration (WHO reference values:  $> 130$  and  $> 120$  g/L for male and females, respectively). In total, four participants did not fulfill all the inclusion criteria and were removed from further analysis. In addition, seven extreme values were detected and discarded as outliers. In summary, 153 subjects, comprising 73 males and 80 females, were enrolled for calculating the reference intervals for IPF on a Sysmex XN-2000.

The median age (min, max) of the total group was 37 (19–76) years. The median age of males and females was 31 (19–76) and 41 (20–68) years, respectively ( $P = 0.074$ ).

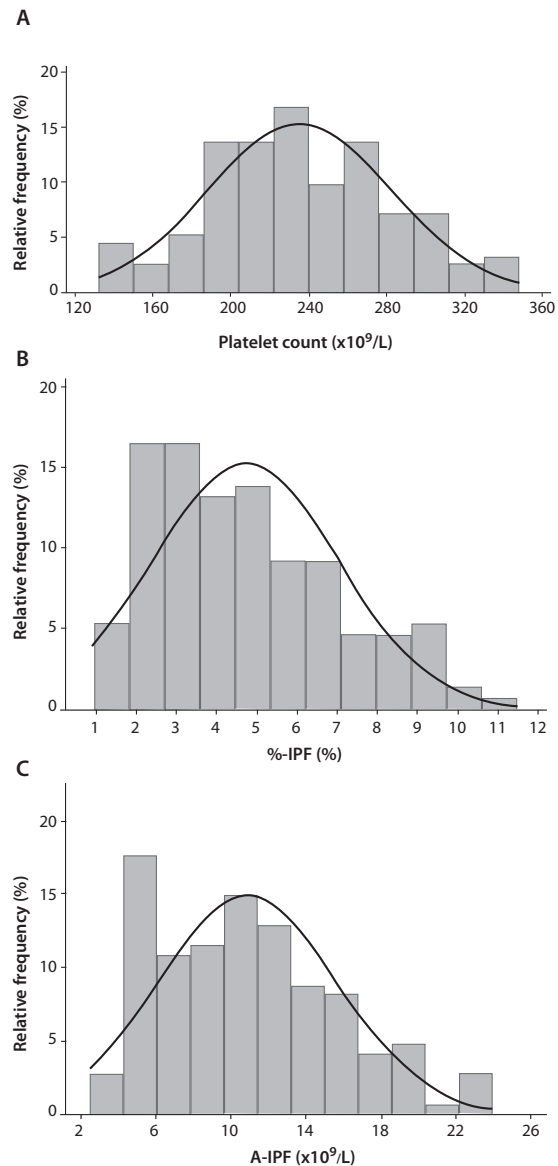
The distribution of the complete reference data for total platelet count, %-IPF and A-IPF, are presented in a scatter plot (Figure 1). The distribution for platelet count was Gaussian ( $P = 0.435$ ) and for %-IPF and A-IPF was non-Gaussian ( $P < 0.001$  and  $P = 0.002$ , respectively), showing left-skewed histograms.

Data for total platelet count, %-IPF and A-IPF from healthy individuals are presented in Table 1. No statistical differences were observed between genders in any of these three parameters.

Finally, the reference interval and 90% corresponding confidence intervals (90%CI) for IPF in total individuals were 1.6 (90%CI: 1.5–1.8) – 9.6 (90%CI: 9.3–11.5)%.

## Discussion

Nowadays, automated haematology analysers have been improved to enable the measurement of immature platelets. In the present research, we



**FIGURE 1.** (A) Distribution of platelet count. (B) Distribution of immature platelet fraction (IPF). (C) Distribution of absolute immature platelet count (A-IPF) in reference individuals ( $N = 153$ ).

show, for the first time, the reference interval for IPF in a Spanish cohort using the Sysmex XN-2000. The reference values estimated were 1.6–9.6%, independent of gender.

**TABLE 1.** Platelet count, immature platelet fraction and absolute number from healthy individuals.

	<b>Total (N = 153)</b>	<b>Male (N = 73)</b>	<b>Female (N = 80)</b>	<b>P value</b>
<b>Platelet count (x10<sup>9</sup>/L)</b>	235 ± 47	230 ± 43	240 ± 50	0.158*
<b>IPF (%)</b>	4.3 (2.9-6.2)	4.1 (2.6-5.9)	4.7 (3.3-6.4)	0.101†
<b>A-IPF (x10<sup>9</sup>/L)</b>	10.23 (6.81-14.16)	9.46 (6.20-13.24)	11.02 (7.59-15.05)	0.071†

Data are expressed as a mean ± standard deviation for platelet count, and as a median (IQR) for IPF and A-IPF. \*Differences between men and women were tested using the t-student's test. †Differences between men and women were tested using the Mann-Whitney U test. IPF - immature platelet fraction. A-IPF - absolute immature platelet count.

To promote the clinical use of IPF, establishing reliable reference interval should be mandatory. To the best of our knowledge, no data are available for IPF adult reference intervals in a Spanish or southern European population in Sysmex XN-series analysers. Therefore, we aimed to define 95% reference limits for IPF and, whenever relevant, establish separate reference intervals according to gender. On the basis of our results and in accordance with previously reported data, we did not confirm statistically significant differences of reference intervals for male *versus* female for IPF (2,15,18,19). Thus, we assume that a gender-specific reference interval would be unnecessary.

The upper reference limit established in this study is somewhat higher than in previously published papers, ranging from 3.2 up to 7.1% (2,15,20). One can remark that all of these studies were performed with a Sysmex XE-series analyser. In comparison with the Sysmex XE, the Sysmex XN seems to be higher in %IPF. This fact was also described by Ko *et al.* (16). According to Van der Linden *et al.* and Ko *et al.*, the higher reference intervals of IPF obtained with the XN compared with the XE series may reflect the fact that both analysers have different metrological characteristics and that IPF measured on the XN series has a better precision and accuracy than when measured on the XE series (5,16). With the introduction of the XN series, the principles, channel, reagent and algorithm to detect IPF have been changed. Given these differences, IPF results will be more specific and this suggests the necessity of new reference intervals for IPF.

Nevertheless, in contrast with our hypothesis, the reference intervals reported previously in a Korean population using the Sysmex XN are similar to the current study, between 1 and 9% (16). These results suggest that IPF values seem to be more affected by the analyser used than the ethnic background of the individuals.

This study was, however, limited by the small number of enrolled reference individuals. Nevertheless, it was enough to establish the reference intervals following the CLSI guidelines. Also, it has to be taken into account that age differences have not been assessed in the establishment of reference intervals. Despite this, previous studies indicate that no differences were found in IPF results when stratifying by age (18,19). Finally, this study did not establish the reference intervals for A-IPF. However, the clinical utilities of immature platelets, expressed as a proportional value (%-IPF), are more widely reported in the literature than A-IPF.

In conclusion and to the best of our knowledge, we have generated the first report on reference intervals of IPF in a Spanish population using the Sysmex XN-2000 haematology analyser. The established reference interval for IPF was 1.6–9.6%, independent of gender. These results may be of benefit to the laboratories using the Sysmex XN-series analyser, making an accurate interpretation of patients' results much easier.

### Acknowledgements

This work has been developed in the context of the PhD program in biochemistry and molecular



biochemistry of the Autonomous University of Barcelona.

#### Potential conflict of interest

None declared.

#### References

- Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1107-17. <https://doi.org/10.1515/ccm-2014-0165>
- Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126:93-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04987.x>
- Ferreira FLB, Colella MP, Medina SS, Costa-Lima C, Fiuza MML, Costa LNG, et al. Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenias. *Sci Rep* 2017;7:3355. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03668-y>
- Yamaoka G, Kubota Y, Nomura T, Inage T, Arai T, Kitanaoka A, et al. The immature platelet fraction is a useful marker for predicting the timing of platelet recovery in patients with cancer after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e208-16. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2010.01232.x>
- van der Linden N, Klinkenberg L, Meex S, Beckers E, de Wit N, Prinzen L. Immature platelet fraction (IPF) measured on Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2014;93:150-6. <https://doi.org/10.1111/ejh.12319>
- Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006;16:101-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00654.x>
- Cesari F, Marcucci R, Gori A, Caporale R, Fanelli A, Casola G, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost* 2013;109:846-53. <https://doi.org/10.1160/TH12-09-0709>
- De Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2013;39:636-43. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2725-7>
- Ibrahim H, Schutt R, Hannawi B, DeLao T, Barker C, Kleiman N. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2122-9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1210>
- Lev EI. Immature Platelets. *Clinical Reference and Research Perspectives. Circulation* 2016;134:987-8. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022538>
- Anetsberger A, Blobner M, Haller B, Schmid S, Umgelter K, Hager T, et al. Immature platelets as a novel biomarker for adverse cardiovascular events in patients after non-cardiac surgery. *Thromb Haemost* 2017;117:1887-95. <https://doi.org/10.1160/TH16-10-0804>
- Freyhofer MK, Gruber S, Grove E, Weiss T, Wojta J, Huber K. Antiplatelet drugs in patients with enhanced platelet turnover: biomarkers versus platelets function testing. *Thromb Haemost* 2015;114:459-68. <https://doi.org/10.1160/TH15-02-0179>
- Enz Hubert RM, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, de Fatima Pereira Gilberti M, de Castro V, et al. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Sci Rep* 2015;5:8019. <https://doi.org/10.1038/srep08019>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory- Approved Guideline third Edition. CLSI document EP28-A3C. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.
- Jung H, Jeon H-K, Kim H-J, Kim S-H. Immature Platelet Fraction: Establishment of a Reference Interval and Diagnostic Measure for Thrombocytopenia. *Korean J Lab Med* 2010;30:451-9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.5.451>
- Ko YJ, Hur M, Kim H, Choi SG, Moon HW, Yun YM. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyser: a comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med* 2015;53:1091-7. <https://doi.org/10.1515/ccm-2014-0839>
- Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, Pacioni A, Carobene A, Ceriotti F, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN haematology analyser. *Clin Chim Acta* 2017;470:125-32. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.004>
- Joergensen MK, Bathum L. Reference intervals for mean platelet volume and immature platelet fraction determined on a sysmex XE5000 hematology analyser. *Scand J Clin Lab Invest* 2016;76:172-6. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1124448>
- Park SH, Park C, Lee B, Kim M, Han M, Cho Y, et al. Establishment of Age- and Gender-Specific Reference Ranges for 36 Routine and 57 Cell Population Data Items in a New Automated Blood Cell Analyser, Sysmex XN-2000. *Ann Lab Med* 2016;36:244-9. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.3.244>
- Seo A, Yuan D, Daniels S, Yuan S, Gallagher M, Wong E. Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count. *Int J Lab Hematol* 2015;37:e1-2. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12237>

## 5.2. Segundo estudio

### 5.2.1. Presentación del segundo estudio

El desarrollo de una respuesta inflamatoria durante el postoperatorio de cirugía cardíaca, sucede de forma fisiológica como respuesta del organismo ante los diversos estímulos adversos a los cuales ha sido sometido el paciente. No obstante, la exacerbación de dicha respuesta contribuye a un peor pronóstico y su temprana detección es crucial para atenuar sus efectos.

Las herramientas diagnósticas de desarrollo de respuesta inflamatoria disponibles hoy en día son escasas. Por este motivo, se planteó como objetivo principal de la tesis, estudiar la utilidad de la fracción de plaquetas inmaduras como potencial biomarcador para predecir la respuesta inflamatoria clínicamente significativa. Para la consecución del objetivo principal así como también del segundo objetivo secundario, se publicó el segundo trabajo que constituye la presente tesis doctoral.





### 5.2.2. Segunda publicació

**Imperiali CE**, Lopez-Delgado JC, Dastis-Arias M, Sanchez-Navarro L. Evaluation of the delta of immature platelet fraction as a predictive biomarker of inflammatory response after cardiac surgery. *J Clin Pathol* 2019;0:1-6.

**doi: 10.1136/jclinpath-2019-206068**



## 5.3. Tercer Estudio

### 5.3.1. Presentación del tercer estudio

Las complicaciones cardiovasculares, concretamente las que se definen como complicaciones cardiovasculares adversas mayores (MACE), pueden presentarse tras una intervención cardíaca incrementando la morbi-mortalidad perioperatoria.

Una vez demostrado el papel de la fracción de plaquetas inmaduras en el desarrollo de respuesta inflamatoria, se planteó también investigar cuál es su asociación con el desarrollo de MACE, las cuales, como se ha visto anteriormente, están directamente relacionadas con la respuesta inflamatoria. De esta forma, se propuso investigar si en nuestra población se encontraba asociación entre el desarrollo de MACE durante el postoperatorio de CCA y las plaquetas inmaduras. Puesto que el desarrollo de MACE es complejo y no puede atribuirse a una única causa, se propuso estudiar también cómo se comportan otros biomarcadores de inflamación más habituales como la PCR, la PCT y la IL-6, además del marcador de daño miocárdico, troponina T ultrasensible. De su consecución se publicó el tercer y último estudio que forma parte de esta tesis doctoral.





Claudia E. Imperiali\*, Juan C. Lopez-Delgado, Macarena Dastis-Arias and Lourdes Sanchez-Navarro

## Biomarker evaluation for major adverse cardiovascular event development in patients undergoing cardiac Surgery

<https://doi.org/10.1515/almed-2020-0031>  
Received March 27, 2020; accepted May 22, 2020

### Abstract

**Objectives:** The postoperative period of cardiac surgery (CS) is associated with the development of major adverse cardiovascular events (MACEs). However, the evaluation of MACE after CS by means of biomarkers is poorly developed. We aimed to evaluate postoperative biomarkers that could be associated with MACE.

**Methods:** Two Hundred and ten patients who underwent CS were enrolled during the study period. The diagnosis of MACE was defined as the presence of at least one of the following complications: acute myocardial infarction, heart failure, stroke presented during intensive care unit (ICU) stay, and 30-day mortality after CS. High-sensitive troponin T (hs-TnT), C-reactive protein, procalcitonin, interleukin-6, and immature platelet fraction (IPF) were measured on ICU admission and after 24 h. The difference between both measurements ( $\Delta$ ) was calculated to assess their association with MACE. Early infected patients (n=13) after CS were excluded from final analysis.

**Results:** The most frequent surgery was single-valve surgery (n=83; 38%), followed by coronary artery bypass graft (n=72; 34%). Postoperative MACE was diagnosed

in 31 (14.8%) patients. Biomarker dynamics showed elevated values at 24 h compared with those at ICU admission in patients with MACE versus no-MACE. Multivariate analysis showed that  $\Delta$ IPF (OR: 1.47; 95% CI: 1.110–1.960; p=0.008) and  $\Delta$ hs-TnT (OR: 1.001; 95% CI: 1.0002–1.001; p=0.008) were independently associated with MACE.

**Conclusions:** These findings suggest that postoperative  $\Delta$ IPF and  $\Delta$ hs-TnT may be useful biomarkers for the identification of patients at risk of MACE development.

**Keywords:** biomarkers; cardiac surgery; outcome.

### Introduction

Cardiac surgery (CS) is a major surgery associated with substantial morbidity and mortality [1]. Despite improvements in anesthesiology, surgical procedures and postoperative care, cardiovascular complications still represent an important cause of postoperative morbidity and mortality [2]. Thus, the occurrence of major adverse cardiovascular events (MACE) as a complication after major surgery is not infrequent [3]. The definition of MACE involves several of those cardiovascular complications: acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and also mortality itself after a cardiovascular procedure [4].

Several risk factors, such as age, gender, and comorbidities, have been used to assess the risk of MACE in patients who undergo surgery. However, MACE is not just a consequence of these risk factors or preexisting comorbidities, many intraoperative variables may influence the development of postoperative complications, and therefore MACE development [5]. The inflammatory response that occurs as a consequence of an intense surgical procedure and prolonged cardiopulmonary bypass might play a key role in the development of adverse cardiovascular events after CS, emphasizing the close relationship between inflammation and outcomes [6,7]. Some biomarkers may have a potential role in MACE prediction: cardiac biomarkers such as high-sensitive troponin I or T (hs-TnI/

\*Corresponding author: Claudia E. Imperiali, Clinical Laboratory, Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat, Passatge Andalusia 3, 4to 3ra, Barcelona, ZIP 08014, Spain; Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, Phone: +34 675 30 10 73, E-mail: cimperialir@bellvitgehospital.cat. <https://orcid.org/0000-0002-7130-922X>

Juan C. Lopez-Delgado: Critical Care Unit, Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. <https://orcid.org/0000-0003-3324-1129>

Macarena Dastis-Arias and Lourdes Sanchez-Navarro: Clinical Laboratory, Hospital Universitari de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. <https://orcid.org/0000-0003-3705-2739> (M. Dastis-Arias). <https://orcid.org/0000-0003-4465-2820> (L. Sanchez-Navarro)

Open Access. © 2020 Claudia E. Imperiali et al., published by De Gruyter This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 Public License.

T) have been demonstrated to be stronger predictors of adverse cardiovascular outcomes [8], whereas some inflammatory biomarkers, such as C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), and interleukin-6 (IL-6), have a controversial association with MACE although it seems that there may be a strong rationale [9–13].

Most recently, immature platelet fraction (IPF), also called reticulated platelets, has been gained interest as a potential predictor of MACE after surgery [5,14,15]. They are metabolically and enzymatically more active than mature platelets and have a greater prothrombotic activity, which is closely related with decompensated inflammatory status [16]. In addition, IPF has recently shown an association between inflammatory response and outcomes after CS [17]. In consequence, it seems likely that IPF may be associated with MACE after CS. The usefulness of the IPF is based on the fact that its measurement has been currently integrated into the routine hematology analyzer, making the IPF value available in a generalized way.

In agreement with previous data we hypothesized that the cardiac and inflammatory biomarkers could be associated with the development of cardiovascular outcome and mortality after CS. Therefore, our study was aimed to evaluate the association between postoperative biomarkers, such as hs-TnT, CRP, PCT, IL-6, and IPF with MACE development in the setting of CS.

## Materials and methods

### Patients

This is a prospective and observational single-center study performed in a third-level university affiliated hospital, from March 2016 to March 2017. The study was approved by the local Ethics Committee of the hospital (Reference No. PR090/16). Written informed consent was obtained from each patient prior to enrollment. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and standards of good clinical practice.

Patients were eligible for the study if they were  $\geq 18$  years old and underwent CS with an intensive care unit (ICU) stay of at least 48 h. CS included the following surgical procedures: coronary artery bypass graft (CABG), valve surgery, aortic surgery, and cardiac tumor resection. Exclusion criteria were as follows: preexisting immunosuppression, hematological and oncological diseases in the last 5 years, and heart transplantation.

The operations were performed throughout the study period by the same group of cardiac surgeons using median sternotomy, standard cardiopulmonary bypass with moderate hypothermia ( $> 34$  °C), and antegrade cardioplegia. A mean aortic pressure of  $> 65$  mmHg was maintained during CS. For revascularization, the internal thoracic

artery (or bilateral if possible) and saphenous vein grafts were used. Bypass graft flow was assessed for each graft by Doppler transit time flowmetry. All patients were transferred to the cardiac ICU postoperatively. All patients received prophylactic antibiotics after surgery based on local protocols. In all patients, decisions regarding postoperative ICU management were made by the attending physician according to local protocols.

Data were extracted from the electronic medical records of each patient and collected in a database for analysis purposes. Preoperative data (i.e., demographic data, comorbidities, and treatment before surgery), operative data, and postoperative variables were routinely collected.

### Methods

The main study outcome was the presence of MACE during the follow-up period. MACE was recorded if any of the described complications were present from ICU admission immediately after surgery to ICU discharge and mortality at 30 days after CS. The diagnosis of MACE was defined as, at least, the presence of one of any of the following complications: acute myocardial infarction, heart failure, stroke, and any all-cause mortality. Acute myocardial infarction, heart failure, and stroke were defined according current definitions and clinical practice [18–24]. Briefly, acute myocardial infarction was defined as the presence of abnormal repolarization on electrocardiogram (i.e., Q waves, ST-segment elevation or depression, new left bundle branch block), imaging evidence of new regional wall motion abnormality and elevation of cardiac biomarkers [18,20]. Stroke was defined as the presence of an acute episode of a focal or global neurological deficit [21,22]. Heart failure was defined as the appearance of a recent deterioration in heart function or the worsening in patients with previous heart failure, and the need of inotropes or vasopressors to keep hemodynamic stability during postoperative period [19,23]. An echocardiography, or invasive monitoring in the most severe cases (i.e., pulmonary artery catheter), was performed at the bedside in order to confirm the diagnosis of postoperative heart failure [24].

**Blood collection and measurement of biomarkers:** Blood samples for the study were taken by central venous catheter at ICU admission postoperatively and then at 24 h postoperatively. Plasmas were collected in 4 mL tubes containing Lithium Heparin (Vacuette®, Greiner Bio One®, Kremsmünster, Austria). After collection, samples were centrifuged at 2000 rpm for 10 min and immediately processed and/or stored at  $-20$  °C until measurement. The hs-TnT and CRP were measured immediately on Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics International, Rotkreuz, Switzerland) using the electrochemical luminescent method and immunoturbidimetric method, respectively. IL-6 and PCT were measured from stored plasma on Cobas 6000 analyzer using the electrochemical luminescent method.

For IPF measurement, samples were collected at ICU admission and 24 h after CS in 4 mL tubes containing tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid (Vacuette®, Greiner Bio One®, Kremsmünster, Austria) and stored at room temperature before measurement. All samples were analyzed within 2–4 h after collection

using Sysmex® XN (Sysmex®, Kobe, Japan) according to the manufacturer's recommendations.

Additionally, preoperative and postoperative data related to renal and hepatic function assessment (creatinine, total bilirubin, and alanine aminotransferase) were measured on Cobas 6000 using spectrophotometry method. Hemoglobin, leucocytes, and platelets concentrations were measured on Sysmex XN analyzer. Hemoglobin was measured by means of sodium lauryl sulfate photometric method and leucocytes and platelets by fluorescence flow cytometry method with semiconductor diode laser.

The Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score was calculated for each patient during the first 24 h of ICU stay.

**Statistical analysis:** Continuous variables are presented as means and standard deviations or medians and interquartile ranges as appropriate. The significance of the differences of the mean between groups was assessed using a Student's t-test if the distributions of the data were normal or the Mann-Whitney U test for variables with skewed distributions. For categorical variables, we used the Pearson  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, where appropriate.

A logistic regression model was performed to examine the association between biomarkers (hs-TnT, CRP, IL-6, PCT, and IPF) and MACE development (outcome variable).

The established risk factors of age, sex, intraoperative transfusion, and aortic cross-clamping time (ACC) were considered to be potential covariates for the model. Only the variables with statistical significance in the univariate model were included in the final model.

A probability of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Stata/MP, version 14 (Stata-Corp LP).

## Results

During the study period, 210 adult patients (n=120) were included. Demographics and preoperative data of all patients and grouped according to MACE development are shown in Table 1.

The median ICU stay was 3 (2–5) days and the mean APACHE II was  $12.9 \pm 4.6$ . At least one outcome event of the MACE definition was diagnosed in 31 (14.8%) patients (Table 2). More than one outcome was occurred in five patients. Two patients showed heart failure (HF) and death. One patient developed HF and myocardial infarction (MI) and another patient presented HF and stroke. Finally, the last patient presented HF, MI, and death.

The most frequent surgery was single-valve surgery (n=83; 38%), followed by CABG (n=72; 34%), mixed procedures (CABG plus valve: n=22; 10.5%), double valve (n=17; 8%), aortic surgery (n=11; 5.3%), and miscellaneous, which mainly included myxoma extraction (n=5; 2.4%). The remaining surgical parameters are shown in Table 3.

**Table 1:** Baseline characteristics of all patients and subgroups.

Characteristics	Patients (n=210)	No MACE (n=179)	MACE (n=31)	p-Value
Male sex, n (%)	137 (65)	120 (67)	17 (57.8)	0.188
Age, years (min–max)	70 (28–86)	70 (28–86)	71 (72–85)	0.566
BMI, kg/m <sup>2</sup> , mean $\pm$ SD	30 $\pm$ 4.8	29 $\pm$ 4.9	27.6 $\pm$ 3.5	0.120
Laboratory parameters				
Hemoglobin, g/L, mean $\pm$ SD	132 $\pm$ 16	132 $\pm$ 19	131 $\pm$ 18	0.847
Leukocytes, $\times 10^9$ , mean $\pm$ SD	8.0 $\pm$ 2.3	8.1 $\pm$ 2.3	7.4 $\pm$ 1.9	0.173
Platelets count, $\times 10^9$ /L, mean $\pm$ SD	218 $\pm$ 63	222 $\pm$ 63	188 $\pm$ 52	0.009
Creatinine, $\mu$ mol/L, mean $\pm$ SD	94 $\pm$ 31	94 $\pm$ 32	95 $\pm$ 25	0.413
Total bilirubin, $\mu$ mol/L, mean $\pm$ SD	10 $\pm$ 6	9.7 $\pm$ 5.2	12.7 $\pm$ 10.9	0.332
ALT, U/L, median (IQR)	18.6 (13.8–25.8)	18.6 (13.8–25.2)	20.4 (15–28.8)	0.447
Comorbidity and therapy				
Diabetes mellitus, n (%)	85 (40.5)	73 (40.8)	12 (38.7)	0.828
Hypertension, n (%)	165 (78.6)	141 (78.8)	24 (77.4)	0.866
Dyslipidemia, n (%)	138 (65.7)	119 (66.5)	19 (61.3)	0.574
COPD, n (%)	19 (9.5)	15 (8.4)	4 (12.9)	0.418
NYHA class III and IV, n (%)	73 (34.8)	58 (32.4)	15 (48.4)	0.198
Previous MI, n (%)	61 (29)	49 (27.4)	12 (38.7)	0.199
Previous stroke, n (%)	22 (10.5)	16 (8.9)	6 (19.4)	0.080
Aspirin, n (%)	104 (49.5)	90 (50.3)	14 (45.2)	0.599
Beta-blocker, n (%)	112 (53.3)	95 (53.1)	17 (54.8)	0.856
Statin, n (%)	134 (63.8)	114 (64)	20 (64.5)	0.960

Data are presented as No (%) or mean  $\pm$  SD or median (IQR) according with data distribution. Years are presented as a mean (minimum–maximum). BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; NYHA, New York heart association; MI, myocardial infarction.



**Table 2:** Outcome events presented after CS.

Event	n (%)
MI, n (%)	6 (2.9)
Stroke, n (%)	2 (0.95)
HF, n (%)	22 (10.5)
Death 1-month, n (%)	7 (3.3)
At least one MACE, n (%)	31 (14.8)

Data are presented as number (%). Abbreviations: MI, myocardial infarction; HF, heart failure; CS, cardiac surgery; MACE, major adverse cardiovascular event.

## Biomarkers

Biomarkers (hs-TnT, CRP, IL-6, PCT, and IPF) were measured immediately at ICU admission and 24 h after CS. IL-6 and PCT at 24 h were measured only in 137 (65.2%) of the total patients due to a lack of plasma separation or not refrigerated immediately after extraction, which can affect IL-6 stability [25]. Measurement of the remaining biomarkers was routinely performed at both times. The delta of each biomarker was calculated for each patient. It was defined as the difference between day 1 after CS and the day of ICU admission. For IPF (%), the difference is expressed in percentage points.

Biomarker dynamics showed elevated values in patients with MACE compared to those without MACE. However, not all biomarkers were significantly higher in patients with MACE than those without MACE (Table 4). Only the delta of PCT, hs-TnT, and IPF was statistically significantly higher in MACE compared to no-MACE. The relative percentage change of each biomarker was 661% for PCT, -3.8% for hs-TnT, and 18% for IPF in no-MACE and 2.975%, 48%, and 37.5%, respectively, in MACE. Since the presence of infection could cause higher biomarker concentrations, especially of CRP, IL-6, PCT, and IPF, the data were analyzed excluding patients who developed infection during the first 3 days after CS (Table 4). In total, 13 patients presented with infection. The most frequent infection was pneumonia (n=10; 79.9%), followed by mediastinitis (n=1; 7.7%), surgical wound infection (n=1, 7.7%), and urinary tract infection (n=1; 7.7%). Furthermore, the remaining postoperative laboratory results related to renal, hepatic, and hemogram parameters, are shown in Table 5.

## Logistic regression

The univariate analysis exposed differences between patients with and without MACE with respect to ACC time, transfusion of hemoderivatives, delta of troponin and delta

**Table 3:** Surgical data of total patients and in patients with and without MACE.

Surgical parameters	Total (n=210)	No MACE (n=179)	MACE (n=31)	p-Value
Surgical procedure, n (%)				
CABG	72 (34.2)	64 (35.8)	8 (25.8)	0.075
Valve surgery	83 (39.5)	74 (41.3)	9 (29)	
Double valve	17 (8.1)	13 (7.3)	4 (12.9)	
Mixed procedures	22 (10.5)	15 (8.4)	7 (22.6)	
Aortic surgery	11 (5.2)	8 (4.5)	3 (9.7)	
Miscellaneous	5 (2.4)	5 (2.8)	0	
Elective surgery, n (%)	155 (73.8)	135 (75.4)	20 (64.5)	0.184
Operating time, min, mean $\pm$ SD	277 $\pm$ 88	272.5 $\pm$ 84	305.9 $\pm$ 106	0.085
CPB time, min, mean $\pm$ SD	103 $\pm$ 38	100.6 $\pm$ 36	114.3 $\pm$ 46	0.115
ACC time, min, mean $\pm$ SD	61.8 $\pm$ 37	58.2 $\pm$ 36	82.7 $\pm$ 36	0.004
Intraoperative blood cells transfusion, n (%)	38 (18.1)	26 (14.5)	12 (38.7)	0.001
Number of blood cells, n (%)				0.008
1	20 (9.5)	14 (7.8)	6 (19.4)	
2	15 (7.1)	9 (5)	6 (19.4)	
3	2 (1)	2 (1.1)	0	
4	1 (0.5)	1 (0.06)	0	
Intraoperative platelets transfusion, n (%)	24 (11.4)	15 (8.4)	9 (29)	0.001
Number of platelet pools, n (%)				<0.001
1	19 (9.1)	14 (7.8)	5 (16.1)	
2	5 (2.4)	1 (0.6)	4 (12.9)	

Data are presented as number (%), mean  $\pm$  SD. Abbreviations: CABG, Coronary artery bypass grafting; CPB, Cardiopulmonary Bypass; ACC, aortic-cross clamping; MACE, major adverse cardiovascular event.

Table 4: Biomarkers concentrations in patients with and without MACE.

	Time		All patients				Excluding early infection				
	n	Total patients	no MACE <sup>a</sup>	MACE <sup>b</sup>	p-Value	n	Total patients	no MACE <sup>c</sup>	MACE <sup>d</sup>	p-Value	
PCT, median (IQR), µg/L	0	210	0.057 (0.037–0.09)	0.056 (0.034–0.09)	0.08 (0.046–0.16)	0.025	197	0.056 (0.035–0.09)	0.055 (0.034–0.090)	0.08 (0.045–0.101)	0.064
	24	137	0.501 (0.233–1.68)	0.425 (0.19–1.09)	2.46 (0.67–5.34)	<b>&lt;0.001</b>	128	0.43 (0.216–1.635)	0.415 (0.186–1.08)	2.175 (0.69–4.64)	<b>0.002</b>
Delta of PCT, µg/L	137	0.414 (0.149–1.547)	0.373 (0.136–1.01)	2.054 (0.624–5.25)	<b>&lt;0.001</b>	128	0.387 (0.141–1.409)	0.362 (0.131–0.955)	1.937 (0.645–4.60)	<b>0.001</b>	
IL-6, median (IQR), ng/L	0	210	183.2 (112.9–315)	177.5 (108.7–282.9)	228.8 (153.5–621)	<b>0.010</b>	197	181.3 (111.8–291.8)	174.4 (106.2–282.75)	218.7 (159–404.5)	<b>0.032</b>
	24	137	160.2 (104.3–241.5)	156.1 (102.2–228.1)	241.5 (107.2–508.6)	0.057	128	156.1 (103–234.2)	156.1 (102.2–227.3)	161.1 (104.3–421.4)	0.502
Delta of IL-6, ng/L	137	23.2 (–158.6–59.7)	–5.53 (–142.4 to 59.7)	–87.4 (–382.6 to 172.8)	0.462	128	–15.3 (–142.6 to 59.7)	–5.5 (–130.4 to 59.7)	–64.4 (–215.4 to 51.5)	0.614	
CRP, median (IQR), mg/L	0	210	2.3 (1–4.5)	2.3 (1–4.6)	2.5 (0.8–4.1)	0.998	197	2.3 (1–4.5)	2.3 (1–4.5)	2.2 (0.8–4.1)	0.802
	24	210	148.4 (103.4–201)	146.1 (103.4–196.5)	167.6 (97.5–227.6)	0.348	197	149.1 (96.4–199.6)	147.4 (97.5–196.1)	164.4 (88.5–225.9)	0.542
Delta of CRP, mg/L	210	145.3 (93.8–199)	142.4 (94.7–192)	163 (90.3–223)	0.5	197	145.6 (92.3–200.8)	142.4 (92.9–192.1)	172.9 (80.4–222.5)	0.057	
hs-TnT, median (IQR), ng/L	0	210	415 (250.5–795)	390 (241–708)	626 (387–1631)	<b>0.001</b>	197	400 (249–730)	387 (240–706)	576 (369–1344)	<b>0.013</b>
	24	210	409 (265–719)	375 (249–579)	926 (490–1580)	<b>&lt;0.001</b>	197	388 (255–674)	366 (246–374)	828 (423–1244)	<b>&lt;0.001</b>
Delta of hs-TnT, ng/L	210	–14.8 (–246 to 133)	–31.9 (–248 to 72)	139 (–45.5 to 583)	<b>0.003</b>	197	–18.8 (–246.3 to 115)	–35.4 (–249 to 72)	120 (–6 to 461)	<b>0.006</b>	
IPF, median (IQR), %	0	210	4 (2.6–5.4)	3.9 (2.6–5.4)	4 (2.7–5.4)	0.547	197	3.9 (2.6–5.3)	3.9 (2.6–5.4)	4 (3.2–5.3)	0.696
	24	210	4.7 (3.2–6.6)	4.6 (3.1–6.5)	5.5 (4.1–9.1)	<b>0.025</b>	197	4.6 (3.1–6.5)	4.6 (3.1–6.5)	5.3 (4.1–7.1)	0.151
Delta of IPF PP	210	0.7 (0–1.5)	0.6 (0–1.4)	1 (0.1–2.5)	<b>0.048</b>	197	0.5 (0–1.3)	0.5 (–0.1–1.3)	1 (0.1–1.9)	<b>0.014</b>	

Data are presented as median (IQR). Abbreviations: PCT, Procalcitonin; IL-6, interleukin-6; CRP, C Reactive Protein; hs-TnT, high sensitive Troponin; IPF, immature platelet fraction; PP, percentage points. <sup>a</sup>N=179, <sup>b</sup>N=172, <sup>c</sup>N=25. At 24 h after CS for PCT, IL-6 and their delta values: <sup>a</sup>N=118, <sup>b</sup>N=19, <sup>c</sup>N=114, <sup>d</sup>N=14.

**Table 5:** Postoperative laboratory results.

Postoperative (ICU admission)	Patients (n=210)	No MACE (n=179)	MACE (n=31)	p-Value
Hemoglobin, g/L, mean ± SD	106 ± 15	107 ± 15	101 ± 15	0.129
Leukocytes, ×10 <sup>9</sup> /L, mean ± SD	13.1 ± 5.5	13.0 ± 5.6	13.0 ± 4.6	0.590
Platelets count, ×10 <sup>9</sup> /L, mean ± SD	164 ± 57	168 ± 58	143 ± 46	0.022
Creatinine, μmol/L, mean ± SD	79 ± 32	79 ± 34	81 ± 23	0.250
Total bilirubin, μmol/L, mean ± SD	15 ± 9	15 ± 8	19 ± 11	0.038
ALT(U/L), median, IQR	17 (13–25)	16 (13–24)	20 (14–31)	0.066
Postoperative (24 after CS)				
Hemoglobin, g/L, mean ± SD	101 ± 14	101 ± 13	98 ± 16	0.405
Leukocytes, ×10 <sup>9</sup> /L, mean ± SD	14.4 ± 4.3	14.1 ± 4.1	16.3 ± 5.1	0.019
Platelets count, ×10 <sup>9</sup> /L, mean ± SD	166 ± 54	169 ± 56	148 ± 48	0.073
Creatinine, μmol/L, mean ± SD	90 ± 50	87 ± 47	112 ± 61	0.004
Total bilirubin, μmol/L, mean ± SD	13 ± 9	12 ± 9	17 ± 14	0.013
ALT, U/L, median, IQR	19 (15–29)	18(14–25)	34 (22–102)	<0.001

Data are presented as number (%) or mean ± SD or median (IQR) according with data distribution. Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; MACE, major adverse cardiovascular event.

of IPF. In contrast, age and sex were not different (Table 6). After accounting for ACC time and transfusion of hemoderivatives, the association of delta of IPF and delta of hs-TnT with the occurrence of MACE remained significant. On the one hand, the delta of IPF demonstrated the strongest independent association with a highest OR of 1.47 (CI: 1.11–1.96). On the other hand, the delta of hs-TnT also shows an independent association with an OR of 1.001 (CI: 1.0002–1.001). This result represents the risk of developing MACE was found to be increased by 10% for a rise of the delta of hs-TnT of 100 ng/L (Table 6).

## Discussion

Despite surgical advances and improvements in the postoperative management of CS patients, cardiovascular complications after CS are an important issue that can worsen patients' outcomes. In this prospective study, with more than 200 patients who underwent CS, we found that

the delta of IPF, and the delta of hs-TnT to a lesser extent, are both associated with postoperative MACE development, independently of the presence of established risk factors.

Our findings may demonstrate the potential usefulness of IPF and hs-TnT to detect increased risk of MACE development after CS. This result was in concordance with previous studies. Multiples studies have shown the association of hs-TnI/T with MACE [26–28]. To date, only one published study found a relationship between IPF and MACE, but this study was performed in non-CS patients [5]. To the best of our knowledge, there is no study showing this association in CS patients until now.

CS may exacerbate or enhance the inflammatory response, which has important clinical implications leading to postoperative heart failure. Many biochemical and molecular mechanisms are involved in the pathogenesis of the inflammatory response: nitric oxid alteration generation, increased levels of proinflammatory cytokines, and endothelium dysfunction, among others. As a consequence,

**Table 6:** Logistic regression model of variables associated with MACE occurrence.

Variables	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p-Value	OR (95% CI)	p-Value
Sex	1.67 (0.77–3.63)	0.191	–	–
Age	1.02 (0.98–1.06)	0.380	–	–
ACC time	1.02 (1.01–1.03)	0.001	1.02 (1.01–1.03)	0.003
Transfusion of hemoderivates	2.77 (1.45–5.32)	0.002	1.97 (0.90–4.28)	0.089
ΔIPF	1.55 (1.17–2.07)	0.002	1.47 (1.11–1.96)	0.008
ΔPCT	1.10 (0.97–1.24)	0.124	–	–
Δhs-TnT	1.001 (1.0002–1.002)	0.010	1.001 (1.0002–1.001)	0.008

Abbreviations: OR, Odds ratio; CI, confidence interval; ACC time, Aortic cross-clamping; ΔIPF, delta of immature platelet fraction; ΔPCT, delta of procalcitonin; Δhs-TnT, delta of high-sensitive troponin T.

the inflammatory response after CS may increase the risk of a postoperative cardiac event as well a variety of organs dysfunction [29].

Since an inflammatory response could be involved in the pathogenesis of cardiovascular outcomes after CS, we hypothesized that inflammatory biomarkers such as PCT, CRP, IL-6, and IPF could be associated with MACE development.

As expected, on the one hand, we found that some laboratory parameters related with renal, hepatic, and also leukocytes, are higher during postoperative period in patients who developed MACE compared to those who did not. MACE is closely linked with inflammatory response. Likewise, this inflammatory response contributes to the pathogenesis of organ failure [29].

On the other hand, in our study, we found that at least one of the criteria of MACE was present in 31 patients. No differences were found between types of surgical procedures and MACE development. Regarding biomarkers, all studied biomarkers demonstrated higher values in the MACE group, with statistically significant differences in delta values for PCT, hs-TnT, and IPF. No differences between groups were found for the deltas of IL-6 and CRP. It is well-known that PCT, IL-6, CRP, and also IPF are strongly related with infections; hence, we also examined the results after excluding patients who developed an infection during the first 3 days after surgery.

The behavior of the deltas of different biomarkers were the same even after excluding patients with early postoperative infections. Regarding IL-6, a recent study performed in adult CS found a significant association with IL-6 levels and mortality following CS [30]. In contrast with our study, they studied 1-year mortality.

Despite differences in CRP, the delta not being statistically significant, its behavior showed the same trend (positive) in both groups. CRP results were lower at ICU admission compared to CRP levels 24 h after surgery, which may be related to the kinetics of this acute-phase protein. Early postoperative CRP levels start to increase within 2 h and achieve their peak after 48 h [31].

A major surgical procedure always triggers a significant inflammatory response, and CRP increases after CS as a response to inflammation induced by surgery trauma in an unspecific way, which may ultimately explain why we did not find differences between groups. CRP does not represent a useful biomarker in this setting because of its elevation after an uncomplicated course.

Some studies have reported higher PCT levels in patients with complications after CS. Liu et al. [32] found a PCT peak within 24 h postoperatively, noting that PCT concentrations and PCT clearance were significantly

higher in the non-survivor group compared with survivor group after CS. Clementi et al. [13] found that PCT concentrations measured at 48 h after CS were significantly higher in renal and respiratory outcomes and in septic patients, and in agreement with our study, they did not find differences in cardiovascular outcomes either between patients who died during hospitalization, at 30 days or at 6 months.

Troponin T or I are cardiac biomarkers that reflect the pathophysiological mechanism of MACE from a direct myocardial injury point of view. In a large cohort of coronary artery disease patients, elevated hs-TnI levels were associated with an increased risk of MACE [8]. Another study conducted by Mauermann et al. [26] examined the association of troponin changes from first and second postoperative days in CS patients with all-cause mortality and cardiac morbidity, finding that an increase of more than 10% in troponin levels was significant associated with the endpoint. All these findings are in accordance with our study, which were found even after cross-clamping time multivariate analysis adjustment.

Research on IPF has recently focused on the potential association with clinical outcomes in patients with cardiovascular diseases and major surgery. While IPF production is known to be promoted by low platelet concentration in blood, its role in inflammatory conditions is still less understood and the mechanism for increased IPF levels after surgery have not been well explored so far. Growing evidence supports the fact that the pathophysiological mechanism through which IPF increases after inflammatory stimuli is related with thrombopoietin regulation in response to acute-phase mediators. IL-6 increases thrombopoietin transcription from the liver and consequently thrombopoietin rises causing a reactive platelet production [33].

Previous studies demonstrated the association of IPF with inflammatory response complications but only one of these was performed in CS patients [17]. IPF levels may be useful as a biomarker for the early identification of patients at risk of inflammatory response development after CS. The role of IPF in infection has been widely studied. Previous research revealed its utility especially in septic patients. Park et al. [34] found that IPF has high sensitivity and accuracy in the discrimination of septic from nonseptic patients. Moreover, Koyama et al. [35] reported that immature platelet count is associated with major mortality in septic patients. However, publications regarding IPF association with complications after surgery are scarce. Our data are in agreement with a study performed by Anetsberger et al. [5]. These authors found that high postoperative IPF levels are associated with an increased risk of major adverse

cardiovascular as well as thromboembolic events in patients who underwent non-CS.

### Limitations of the study

The first limitation of our study is related to the sample size. The sample size limited the number of variables that could be examined to determine the independent association of biomarkers with MACE. Second, follow-up data from PCT and IL-6 at 24 h after surgery are lacking in an important number of patients due to the stability of IL-6 over the course of time. Third, only two biomarkers measurement were performed postoperatively (at ICU admission and at 24 h after CS), no further measurements were performed. However, we think that the delta between these two times could provide reliable and more early information than other intervals as, for example, ICU admission and 48 h after CS.

Finally, preoperative IPF measurement was not performed. However, a previous study performed in non-cardiac surgeries, which investigated the association with IPF and MACE, did not find significant differences in preoperative IPF results between groups [5].

### Conclusions

In summary, increased levels of the deltas of IPF and hs-TnT between 0 h and at 24 h after CS were associated with worse clinical outcomes related with adverse cardiovascular events during ICU stay and mortality at 30 days in our population. Our research shows that the deltas of IPF and hs-TnT remain associated with MACE development even after intraoperative factor adjustment, such as cross-clamping time and transfusion of hemoderivatives. Our data suggest that IPF and troponin postoperative measurement would be helpful for MACE assessment in patients undergoing CS. These data are of potential interest as IPF is an easily and inexpensively obtained routine laboratory test that is readily incorporated into clinical practice.

**Acknowledgments:** This work has been developed in the context of the PhD program in biochemistry and molecular biochemistry of the Autonomous University of Barcelona.

**Research funding:** This study was supported by grant from Fundació JL Castaño – SEQC-ML “Beca Post-Residencia 2016”.

**Author contributions:** Claudia E. Imperiali, Juan C. Lopez-Delgado, Lourdes Sanchez-Navarro and Macarena Dastis-Arias designed the research. Claudia E. Imperiali

performed experiments and analyzed data. Claudia E. Imperiali and Juan C. Lopez-Delgado wrote the manuscript. All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

**Competing interests:** Authors state no conflict of interest.  
**Informed consent:** Informed consent was obtained from all individuals included in this study.

**Ethical approval:** The study was approved by the local ethics committee of the hospital (Reference No. PRO90/16).

### References

- Hill A, Nesterova E, Lomivorotov V, Efremov S, Goetzenich A, Benstoem C, et al. Current evidence about nutrition support in cardiac surgery patients-what do we know? *Nutrients* 2018;10: 597.
- Devereaux PJ, Goldman L, Cook DJ, Gilbert K, Leslie K, Guyatt GH. Perioperative cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review of the magnitude of the problem, the pathophysiology of the events and methods to estimate and communicate risk. *Can Med Assoc J* 2005;173:627–34.
- Sabate S, Mases A, Guilera N, Canet J, Castillo J, Orrego C, et al. Incidence and predictors of major perioperative adverse cardiac and cerebrovascular events in non-cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2011;107:879–90.
- Myles PS. Meaningful outcome measures in cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 2014;46:23–27. PMID: 24779115 PMCID: PMC4557506.
- Anetsberger A, Blobner M, Haller B, Schmid S, Umgelter K, Hager T, et al. Immature platelets as a novel biomarker for adverse cardiovascular events in patients after non-cardiac surgery. *Thromb Haemost* 2017;117:1887–95.
- Corral-Velez V, Lopez-Delgado JC, Betancur-Zambrano NL, Lopez-Sune N, Rojas-Lora M, Torrado H, et al. The inflammatory response in cardiac surgery: an overview of the pathophysiology and clinical implications. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2015;13: 367–70.
- Shaefer S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, et al. Vasoplegia after cardiovascular procedures-pathophysiology and targeted therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2018;32:1013–22.
- Wong YK, Cheung CY, Tang CS, Hai JSH, Lee CH, Lau KK, et al. High-sensitivity troponin I and B-type natriuretic peptide biomarkers for prediction of cardiovascular events in patients with coronary artery disease with and without diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2019;18:171.
- Kelly D, Khan SQ, Dhillon O, Quinn P, Struck J, Squire IB, et al. Procalcitonin as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Biomarkers* 2010;15:325–31.
- Brocca A, Virzi GM, de Cal M, Giavarina D, Carta M, Ronco C. Elevated levels of procalcitonin and interleukin-6 are linked with postoperative complications in cardiac surgery. *Scand J Surg* 2017;106:318–24.
- Twine CP. The relationship between CRP and MACE: controversial and confounded. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2017;54:234.
- Zhang LJ, Li N, Li Y, Zeng XT, Liu MY. Cardiac biomarkers predicting MACE in patients undergoing noncardiac surgery: a meta-analysis. *Front Physiol* 2018;9:1923.

13. Clementi A, Virzi GM, Mucino-Bermejo MJ, Nalesso F, Giavarina D, Carta M, et al. Presepsin and procalcitonin levels as markers of adverse postoperative complications and mortality in cardiac surgery patients. *Blood Purif* 2019;47:140–8.
14. Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, DeLao T, Barker CM, Kleiman NS. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2122–9.
15. Lev EI. Immature platelets: clinical relevance and research perspectives. *Circulation* 2016;134:987–8.
16. Liu QH, Song MY, Yang BX, Xia RX. Clinical significance of measuring reticulated platelets in infectious diseases. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e9424.
17. Imperiali CE, Lopez-Delgado JC, Dastis-Arias M, Sanchez-Navarro L. Evaluation of the delta of immature platelet fraction as a predictive biomarker of inflammatory response after cardiac surgery. *J Clin Pathol* 2019;0:1–6.
18. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Joint ESC/ACC/AHA/WHF task force for the redefinition of myocardial infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J Am Coll Cardiol* 2007;2850:25252173–3895; *Circulation* 2007;116:2634–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397>.
19. Lomivorotov VV, Efremov SM, Kirov MY, Fominskiy EV, Karaskov AM. Low-cardiac-output syndrome after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017;31:291–308.
20. Bianchi CF. Working toward an evidence-based cutoff recommendation for myocardial infarction detection after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018;155:1055.
21. Gaudino M, Rahouma M, Di Mauro M, Yanagawa B, Abouarab A, Demetres M, et al. Early versus delayed stroke after cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e012447.
22. Cropsey C, Kennedy J, Han J, Pandharipande P. Cognitive dysfunction, delirium, and stroke in cardiac surgery patients. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2015;19:309–17.
23. Perez Vela JL, Martin Benitez JC, Carrasco Gonzalez M, de la Cal Lopez MA, Hinojosa Perez R, Sagredo Meneses V, et al. Clinical practice guide for the management of low cardiac output syndrome in the postoperative period of heart surgery. *Med Intensiva* 2012;36(4):e1–44.
24. Amabili P, Benbouchta S, Roediger L, Senard M, Hubert MB, Donneau AF, et al. Low cardiac output syndrome after adult cardiac surgery: predictive value of peak systolic global longitudinal strain. *Anesth Analg* 2018;126:1476–83.
25. Gong Y, Liang S, Zeng L, Ni Y, Zhou S, Yuan X. Effects of blood sample handling procedures on measurable interleukin 6 in plasma and serum. *J Clin Lab Anal* 2019;33:e22924. <https://doi.org/10.1002/jcla.22924>.
26. Mauermann E, Bolliger D, Fassel J, Grapow M, Seeberger EE, Seeberger MD, et al. Association of troponin trends and cardiac morbidity and mortality after on-pump cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2017;104:1289–97.
27. Mauermann E, Bolliger D, Fassel J, Grapow M, Seeberger EE, Seeberger MD, et al. Postoperative high-sensitivity troponin and its association with 30-day and 12-month, all-cause mortality in patients undergoing on-pump cardiac surgery. *Anesth Analg* 2017;125:1110–7.
28. Humble CAS, Huang S, Jammer I, Bjork J, Chew MS. Prognostic performance of preoperative cardiac troponin and perioperative changes in cardiac troponin for the prediction of major adverse cardiac events and mortality in noncardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2019;14:e0215094.
29. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002;97:215–252.
30. Everett AD, Alam SS, Owens SL, Parker DM, Goodrich C, Likosky DS, et al. The association between cytokines and 365-day readmission or mortality in adult cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 2019;51:201–209.
31. Santonocito C, De Loecker I, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A, et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesth Analg* 2014;119:624–9.
32. Liu H, Luo Z, Liu L, Yang XM, Zhuang YM, Zhang Y, et al. Early kinetics of procalcitonin in predicting surgical outcomes in type A aortic dissection patients. *Chin Med J* 2017;130:1175–81.
33. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005;115:3339–47.
34. Park SH, Ha SO, Cho YU, Park CJ, Jang S, Hong SB. Immature platelet fraction in septic patients: clinical relevance of immature platelet fraction is limited to the sensitive and accurate discrimination of septic patients from non-septic patients, not to the discrimination of sepsis severity. *Ann Lab Med* 2016;36:1–8.
35. Koyama K, Katayama S, Muronoi T, Tonai K, Goto Y, Koinuma T, et al. Time course of immature platelet count and its relation to thrombocytopenia and mortality in patients with sepsis. *PLoS One* 2018;13:e0192064.



# 6. DISCUSIÓN

---





Los pacientes sometidos a cirugía cardíaca cada vez son más complejos, situación que comporta una mayor susceptibilidad a sufrir complicaciones en el postoperatorio a pesar de los grandes avances que se han producido en este ámbito.

Las alteraciones hemodinámicas favorecen el desarrollo de estas complicaciones. Los mecanismos fisiopatológicos que provocan estas alteraciones subyacen en la respuesta inflamatoria. Por tanto, la respuesta inflamatoria que desarrolla el paciente tras la cirugía, condicionará, en cierta medida, su evolución.

Una adecuada respuesta inflamatoria comporta efectos beneficiosos que marcará el éxito de la cirugía. Sin embargo, una respuesta inflamatoria exacerbada comportará acciones perjudiciales para el paciente. Las herramientas que disponen los profesionales responsables de los cuidados postoperatorios de estos pacientes para la detección de la respuesta inflamatoria exacerbada, son escasas. Muchas de las evaluaciones pronósticas de uso habitual no contemplan variables tan importantes como el tiempo de circulación extracorpórea, así como la administración de hemoderivados, entre otras.

Esta tesis representa el primer estudio que evalúa la asociación de la fracción de las plaquetas inmaduras con el desarrollo de respuesta inflamatoria exacerbada en pacientes sometidos a cirugía cardíaca y su utilidad como biomarcador predictor de la misma. Del mismo modo, representa también el primer estudio que evalúa la asociación de esta magnitud biológica en el desarrollo de eventos cardiovasculares mayores (MACE) en el contexto de CCA. También representa el primer estudio que establece valores de referencia en nuestra población para el método de medida empleado, indispensable para la correcta interpretación de los resultados.

En este apartado se llevará a cabo una discusión general del contenido de esta tesis. Se resumirán y discutirán los resultados obtenidos de las tres publicaciones realizadas de forma secuencial para la consecución de los objetivos planteados.

## 6.1. Primer estudio: elaboración de valores de referencia de la fracción de plaquetas inmaduras

Para llevar a cabo este estudio, se incluyeron 153 individuos de referencia que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. 73 de ellos fueron hombres y 80, mujeres. Al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de IPF entre ambos sexos, se establecieron los límites de referencia de forma conjunta. Los valores obtenidos correspondientes al percentil 2,5 y 97,5 fueron de 1,6 y 9,6 %, respectivamente.

De acuerdo a la bibliografía consultada, no se encontró ninguna publicación referente a valores de referencia de IPF en población española empleando el sistema de medida Sysmex serie XN. Este hecho fue la principal causa que nos motivó para establecerlos en nuestro propio laboratorio. Por un lado, atendiendo a la premisa de que dichos valores son altamente dependientes del sistema de medida empleado, y por otro, debido a la posible variación entre diferentes etnias, e incluso, poblaciones.

De los estudios publicados previamente, la mayoría fueron realizados principalmente en el analizador Sysmex serie XE. Con la introducción de la nueva serie de Sysmex, la XN, Ko et al. llevó a cabo una comparación de los valores de IPF entre ambas que mostró que la serie XN presentaba valores más elevados (63). La introducción de la serie XN comportó diferentes cambios a nivel de canales, reactivos e incluso algoritmos para la medición de las plaquetas inmaduras. Este hecho supuso una mejora metrológica que podría justificar esta variación y la necesidad de establecer nuevos valores de referencia de la magnitud (63). Este hallazgo justifica porqué los valores de referencia de IPF publicados y establecidos en la serie XE, son más bajos a los obtenidos en nuestro estudio (62, 64, 72).

Sin embargo, pese a que está descrito que las diferencias entre etnias también pueden suponer diferencias en los valores de referencia de IPF, un estudio realizado en población coreana y con la misma serie de analizadores, XN, demostró una gran similitud con nuestros valores publicados (63). Pese a que sólo se trata de un estudio, estos resultados podrían llevarnos a pensar en que la variación en los valores de referencia publicados viene dada, principalmente, por las diferencias entre los sistemas de medida, independientemente del origen de la población. Un estudio previo realizado por Jung et al. en el Sysmex XE (73), observaron que en esta serie de analizadores sí destacaban las diferencias entre etnias. Sin embargo, este mismo comportamiento no se ha podido corroborar en la serie XN.

A priori, el hecho de que clásicamente existan diferentes intervalos de referencia para el recuento de plaquetas para ambos sexos, nos lleva a pensar que estas diferencias se mantengan en el caso de IPF. Sin embargo, en concordancia con estudios previos, nuestro trabajo tampoco ha confirmado esta hipótesis ya que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas que justificaran la necesidad de elaboración independiente de valores de referencia de IPF para hombres y mujeres (62, 74, 75). Al tratarse de una fracción de número respecto al recuento total de plaquetas, dicha fracción se mantiene estable entre ambos sexos aunque la concentración de plaquetas pueda variar.

El hecho de haber proporcionado valores de referencia que se puedan emplear en nuestra población y condiciones de trabajo, brinda información importante a la hora de interpretar los resultados de los pacientes y resulta una herramienta esencial para esta tesis doctoral e investigaciones futuras.

## 6.2. Segundo estudio: evaluación de la fracción de plaquetas inmaduras como biomarcador de predicción de respuesta inflamatoria

El segundo estudio se recoge en el segundo manuscrito publicado que forma parte de esta tesis doctoral.

Como se ha comentado ampliamente a lo largo de esta tesis, la respuesta inflamatoria clínicamente significativa o exacerbada (RI) que sucede durante el postoperatorio de CCA, es compleja y difícil de predecir, por lo que no siempre es posible aplicar estrategias tempranas que permitan atenuar el desarrollo de complicaciones futuras.

En este segundo apartado, nos planteamos estudiar la asociación entre la fracción de plaquetas inmaduras y la RI, concretamente, evaluar si dicha magnitud es de utilidad para predecir el desarrollo de la RI tras una CCA. Asimismo, nos planteamos estudiar si la combinación de este biomarcador con los *scores* clásicamente utilizados en UCI (APACHE II y SOFA), mejoraría la capacidad de éstos para la predicción de RI. Para ello, se incluyeron 327 pacientes que ingresaron en el servicio de UCI del Hospital Universitari de Bellvitge, durante el postoperatorio de CCA, entre noviembre de 2015 y julio de 2017. Se trata de un estudio observacional y prospectivo, donde los pacientes se siguieron desde el ingreso en UCI postcirugía, hasta el alta de dicha unidad.

Se registró la presencia de RI en aquellos pacientes que requirieron fármacos vasoactivos durante, al menos, 48 horas con la finalidad de mantener una adecuada presión arterial media.

Como ya se ha comentado, no existe una definición consenso de RI en el contexto de CCA. Por este motivo, se decidió definir RI desde un punto de vista más pragmático, basada en una

respuesta fisiopatológica como es la hipotensión. La RI comporta, entre muchas otras cosas, una disfunción endotelial que conlleva a una vasodilatación (76). Bajo esta premisa, Weis et al. sugirió que la dependencia de vasoconstrictores es un síntoma de una RI severa, encontrando que en estos pacientes, el requerimiento de fármacos vasoactivos fue de 48 horas (77). Pese a que este estudio se ha llevado a cabo con una definición fundamentada, la falta de consenso en la definición de RI, representa una limitación del estudio.

A cada paciente incluido en el estudio, se le realizó la medición del porcentaje de plaquetas inmaduras al ingreso inmediato en UCI y a las 24 horas. Además, se calculó la puntuación APACHE II y SOFA durante las primeras 24 horas.

Con los dos resultados de IPF obtenidos, se calculó la diferencia entre el valor obtenido a las 24 horas menos el obtenido al ingreso en UCI, delta de IPF ( $\Delta$ IPF). Esta diferencia fue expresada en puntos porcentuales (pp).

### ***Relación entre el $\Delta$ IPF y el desarrollo de RI***

Para estudiar la asociación entre  $\Delta$ IPF y el desarrollo de RI, se llevó a cabo un modelo de regresión logística con finalidad predictiva ajustado por las siguientes variables de control: edad, sexo, dislipemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cirugía electiva o emergente, hemoglobina pre y postoperatoria, requerimiento transfusional intraoperatorio, tiempo de CEC, tiempo de pinzamiento aórtico y concentración de plaquetas postcirugía.

Las variables que resultaron ser estadísticamente significativas en el modelo de regresión logística univariante, fueron: la edad del paciente, el tiempo de CEC y la transfusión de hemoderivados. El tiempo de CEC fue la única variante que se mantuvo significativa en el

modelo multivariante. En el modelo final se observó cómo el  $\Delta$ IPF mantenía la asociación con la RI de forma significativa tras ser ajustado por la variable de control (OR: 1,26; p=0,038).

Para llevar a cabo este estudio se calculó el valor del delta de IPF. Se decidió utilizar esta forma de expresión de los resultados debido a que, tanto los valores obtenidos en el ingreso inmediato en UCI tras la cirugía y a las 24 horas del mismo, estaban comprendidos dentro del intervalo de referencia publicado en el primer estudio, tanto en el grupo de pacientes que desarrollaron RI como en el que no lo desarrollaron. Sin embargo, al analizar las diferencias entre ambos días consecutivos observamos que el incremento de IPF era de 35,5% en los pacientes que desarrollaron RI y de sólo 10,2% en aquellos que no. Como profesionales de laboratorio tenemos que tener presente el concepto de valor de referencia del cambio (VRC). A modo general, este valor indica si un cambio entre dos valores consecutivos de una misma magnitud en un paciente, es clínicamente significativo y no atribuible a la variación biológica o analítica. En 2017, Buoro et al. (78) establecieron que el VRC de IPF en el analizador Sysmex XN es de 24,8%, encontrándose por debajo de la diferencia hallada en el grupo de RI, y por encima en el grupo de pacientes que no desarrollaron RI. Nuestros resultados respaldan la importancia que tiene analizar la cinética observada con al menos dos resultados consecutivos y no sólo un resultado aislado, ya que de esta forma podría llevarnos a una interpretación equivocada.

Como se ha comentado previamente, la CEC desencadena una RI específica mediante diferentes mecanismos. En este segundo estudio, confirmamos que en nuestra población, la duración de la CEC, resultó ser un predictor independiente del riesgo de desarrollar una RI (OR=1,01; p=0,029), coincidiendo con estudios previos (77, 79). Tras ajustar el modelo de regresión por esta importante variable de control, el delta de IPF continuó mostrando asociación estadísticamente significativa tal y como nos los planteamos en nuestra hipótesis.



Las plaquetas juegan un papel clave en el desarrollo de la RI: su funcionalidad se ve incrementada por la activación del complemento, la cascada de coagulación, etc. Por otro lado, las citocinas proinflamatorias, como la IL-6 que es una de las primeras en elevarse tras un estímulo inflamatorio, pueden estimular la producción de trombopoyetina, favoreciendo aún más la síntesis y liberación plaquetar (60). Esta cadena de acontecimientos puede explicar la relación a nivel molecular que existe entre la RI y la IPF.

### ***Adición del $\Delta$ IPF a los scores APACHE II y SOFA***

Ambos *scores* fueron diseñados como herramientas para establecer el pronóstico de un paciente en términos de mortalidad y disfunción orgánica. Pese a no ser específicos para evaluar la RI durante el postoperatorio de CCA, son ampliamente utilizados en UCI. Como ya se ha visto, la RI puede dar lugar a complicaciones mayores e, incluso, la muerte del paciente cuando ésta es descontrolada. Atendiendo a nuestros resultados, los pacientes que desarrollaron una RI, mostraron mayores complicaciones y más días de estancia en UCI. Sin embargo, las puntuaciones APACHE II y SOFA, no presentaron un área bajo la curva (AUC) óptima para predecir el desarrollo de RI (AUC: 0,629 y 0,676, respectivamente). En base a los resultados obtenidos de  $\Delta$ IPF, se estudió si la adición del  $\Delta$ IPF mejoraría la capacidad predictora de los mismos. En ambos casos, el AUC se incrementó con la incorporación de  $\Delta$ IPF, no obstante, sólo en el caso de APACHE II, la mejora es estadísticamente significativamente (0,629 vs. 0,728;  $p=0,010$ ).

Como conclusión de este segundo estudio, podemos afirmar que el delta de plaquetas inmaduras se asocia con la respuesta inflamatoria clínicamente significativa y es un predictor independiente del desarrollo de la misma. Además, la combinación del *score* APACHE II con ésta magnitud, mejora significativamente su utilidad como predictor de RI.

### 6.3. Tercer estudio: utilidad de diferentes biomarcadores para la evaluación del desarrollo de MACE tras cirugía cardíaca

El último estudio se recoge en la tercera publicación que completa el compendio que constituye esta tesis doctoral.

En este estudio se evaluó la asociación de diferentes biomarcadores con el desarrollo de MACE durante la estancia en UCI, en pacientes postoperados de cirugía cardíaca. Como se ha visto anteriormente, el desarrollo de eventos cardiovasculares mayores guardan una estrecha relación con la respuesta inflamatoria que manifiesta el paciente tras el trauma quirúrgico. Por este motivo, nos propusimos evaluar el papel que juegan en el desarrollo de MACE diferentes biomarcadores de inflamación como la concentración de PCR, PCT e IL-6, así como también, la IPF. Por otro lado, también se incluyó en el estudio la medición de la concentración de TnT-hs como marcador de daño miocárdico.

En una cohorte de 210 pacientes que requirieron una CCA, se midieron los biomarcadores anteriormente mencionados, al ingreso inmediato en UCI y a las 24 horas postcirugía. Además, se registró la presencia de MACE durante todo el período de estancia en UCI, así como también, la mortalidad a un mes. Con cada pareja de resultados obtenida para cada una de las magnitudes analizadas, se calcularon las diferencias (deltas) y se estudiaron si existían diferencias estadísticamente significativas en cada grupo de pacientes (MACE/noMACE). Posteriormente, con aquellos biomarcadores que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, se llevó a cabo una regresión logística ajustada por las siguientes variables de control: sexo, edad, tiempo de pinzamiento aórtico y transfusión de hemoderivados intraoperatorios.

Del total de pacientes incluidos en el estudio, 31 (14,8%) mostraron al menos un criterio diagnóstico de MACE. Se observó que únicamente las medias del delta de PCT, IPF y TnT-hs presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Dado que la presencia de infecciones puede elevar la concentración de los biomarcadores, para evitar este posible sesgo derivado del desarrollo de infecciones, se recalcularon los resultados excluyendo a los pacientes que presentaron algún tipo de infección temprana. Los resultados obtenidos fueron concordantes y los biomarcadores que se mantuvieron significativos fueron los mismos.

Referente a los resultados de la regresión logística, únicamente el delta de IPF y el delta de TnT-hs junto con tiempo de pinzamiento aórtico y la necesidad de transfusión de hemoderivados, resultaron ser estadísticamente significativos en el análisis univariante, por lo que en el modelo final sólo se contemplaron estas dos variables de ajuste. El modelo multivariante mostró asociación entre el delta de IPF y TnT-hs y el desarrollo de MACE, incluso tras ser ajustado.

Los resultados obtenidos mostraron que un aumento del delta de TnT-hs de 100 ng/L, representa un incremento de un 10% del riesgo de sufrir un evento cardiovascular mayor (OR=1,001; p=0,008). En concordancia con estudios previos, como el llevado a cabo por Mauermann et al. (80), donde examinaron la asociación entre los incrementos en la concentración de troponina durante el primer y segundo día tras CCA y la morbi-mortalidad, encontraron que un incremento de más de un 10% estaba asociado con el desarrollo del evento. La troponina es un biomarcador cardíaco capaz de reflejar el mecanismo fisiopatológico del desarrollo de MACE desde el punto de vista del daño que sufre el miocardio. En cambio, la IPF como se ha demostrado en nuestro segundo estudio, es una magnitud que se asocia al desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada, que

indirectamente puede repercutir en el desarrollo de MACE a través de los diferentes mecanismos involucrados en la cascada inflamatoria. Un estudio reciente llevado a cabo en una cohorte de población sometidos a cirugía no cardíaca, demostró que las plaquetas inmaduras se asociaban a un incremento del riesgo de sufrir un evento cardíaco mayor así como también a un evento tromboembólico (70). A pesar de la escasa bibliografía existente hasta la fecha, se postula como una prometedora magnitud en este contexto por su implicación en mecanismos claves del desarrollo de MACE. Por un lado, son enzimáticamente y metabólicamente más activas que las plaquetas maduras, confiriéndoles una mayor capacidad protrombótica (81). Por otro lado, debido a la relación existente entre el aumento de la producción de trombotocina en respuesta a citocinas proinflamatorias, por consiguiente, a un incremento de la IPF (82). Finalmente, se postula que las plaquetas inmaduras son más resistentes a la acción de fármacos antiagregantes, asociándose a la mayor presencia de eventos isquémicos (83).

Como limitaciones de este estudio cabe destacar que no todos los biomarcadores se pudieron medir a las 24 horas tras la cirugía. En el caso de la IL-6 y la PCT, al tratarse de dos magnitudes que se midieron exclusivamente para este estudio y no de forma habitual como el resto de biomarcadores requerían una conservación previa para mantener su estabilidad hasta su posterior medición. En muchos casos, estas muestras no se pudieron conservar de forma inmediata provocando las pérdidas de seguimiento a las 24 horas. Tal y como se comenta en el manuscrito, deberían llevarse a cabo estudios más extensos para confirmar los resultados.



# 7. CONCLUSIONES

---



Las conclusiones de los tres trabajos expuestos a lo largo de esta tesis doctoral, son las que se describen a continuación:

1. Los valores de referencia de IPF establecidos en los equipos Sysmex, de la serie de analizadores XN, no requieren separación en función del género y son diferentes de los proporcionados en modelos anteriores de los mismos equipos de la serie XE.
2. Los valores de referencia de IPF establecidos en esta tesis pueden ser incorporados a otros laboratorios clínicos que utilicen Sysmex XN como sistema de medida.
3. El  $\Delta$ IPF se asocia a la respuesta inflamatoria postcirugía cardíaca y es un predictor independiente de riesgo de desarrollo de la misma.
4. La adición del  $\Delta$ IPF al *score* APACHE II mejora de forma significativa su capacidad de predicción de la respuesta inflamatoria postcirugía cardíaca.
5. La IPF cumple criterios para ser considerado un biomarcador predictor de respuesta inflamatoria en pacientes sometidos a cirugía cardíaca.
6. El  $\Delta$ IPF y el  $\Delta$ TnT-hs se asocia de forma independiente con el desarrollo de MACE durante el postoperatorio de cirugía cardíaca.
7. Los resultados del  $\Delta$ PCR y  $\Delta$ IL-6 no muestran diferencias entre el grupo de pacientes que desarrollaron MACE y el grupo que no lo desarrolla. El resultado del  $\Delta$ PCT, pese a ser superior en el grupo de pacientes que desarrollaron MACE, el análisis logístico no muestra asociación entre ambos.



8. Los resultados obtenidos de los biomarcadores evaluados no varían tras excluir los pacientes que presentaron infecciones postoperatorias precoces.
  
9. La incorporación de la medición de la IPF en el seguimiento del postoperatorio de CCA es una herramienta útil para detectar aquellos pacientes con respuesta inflamatoria exacerbada que puede dar lugar a complicaciones mayores.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---



## Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares 2020 [19/05/2020]. Available from: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/).
2. Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Endovascular. Registro de intervenciones de la SECTCV 2019 [05/05/2010]. Available from: <http://sectcv.es/portal-cientifico/#Documentos>.
3. Hill A, Nesterova E, Lomivorotov V, Efremov S, Goetzenich A, Benstoem C, et al. Current Evidence about Nutrition Support in Cardiac Surgery Patients-What Do We Know? *Nutrients*. 2018;10(5):597.
4. Rodríguez R, Torrents A, Garcia P, Ribera A, Permanyer G, Moradi M, et al. Cirugía cardíaca en el anciano. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:1159-68.
5. Guida P, Mastro F, Scrascia G, Whitlock R, Paparella D. Performance of the European System for Cardiac Operative Risk Evaluation II: a meta-analysis of 22 studies involving 145,592 cardiac surgery procedures. *J Crit Care*. 2014;148(6):3049-57.
6. Cuerpo G, Carnero M, Hornero-Sos F, Polo-López L, Centella-Hernández T, Gascón P, et al. Cirugía cardiovascular en España en el año 2018. Registro de intervenciones de la Sociedad Española de Cirugía Torácica-Cardiovascular. *Cir Cardio*. 2019;26:248-64.
7. Hornero-Sos F, Centella-Hernández T, Polo-López L, López-Menéndez J, Mestres-Lucio C, Bustamante-Munguira J, et al. Recomendaciones de la SECTCV para la cirugía

cardiovascular. 2019 actualización de los estándares en organización, actividad profesional, calidad asistencial y formación en la especialidad. *Cir Cardio*. 2019;26.

8. Britannica E. *Encyclopædia Britannica*; 2010 [13/09/2020]. Available from: <https://www.britannica.com/science/artificial-heart/images-videos#/media/1/37130/120768>.

9. Gómez-Caro A, Ramon-Badia J, Ausin P. Asistencia respiratoria extracorpórea en la insuficiencia respiratoria grave y el SDRA. Situación actual y aplicaciones clínicas. *Arch Bronconeumol*. 2010;46:531-7.

10. Nearman H, Klick JC, Eisenberg P, Pesa N. Perioperative complications of cardiac surgery and postoperative care. *Crit Care Clin*. 2014;30(3):527-55.

11. Wang W, Bagshaw SM, Norris CM, Zibdawi R, Zibdawi M, MacArthur R, et al. Association between older age and outcome after cardiac surgery: a population-based cohort study. *J Cardiothorac Surg*. 2014;9:177.

12. MacCallum NS, Finney SJ, Gordon SE, Quinlan GJ, Evans TW. Modified criteria for the systemic inflammatory response syndrome improves their utility following cardiac surgery. *Chest*. 2014;145(6):1197-203.

13. Ekeloef S, Oreskov JO, Falkenberg A, Burcharth J, Schou-Pedersen AMV, Lykkesfeldt J, et al. Endothelial dysfunction and myocardial injury after major emergency abdominal surgery: a prospective cohort study. *BMC Anesthesiol*. 2020;20(1):67.

14. Berg KS, Stenseth R, Pleym H, Wahba A, V V. Mortality risk prediction in cardiac surgery: comparing a novel model with the EuroSCORE. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55:313-21.

15. Roques F, Nashef SA, Michel P, Gauducheau E, de Vincentiis C, Baudet E, et al. Risk factors and outcome in European cardiac surgery: analysis of the EuroSCORE multinational database of 19030 patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;15:816-22.
16. Rivera-Fernandez R, Nap R, Vazquez-Mata G, Reis Miranda D. Analysis of physiologic alterations in intensive care unit patients and their relationship with mortality. *J Crit Care*. 2007;22(2):120-8.
17. Schneider AG, Lipcsey M, Bailey M, Pilcher DV, Bellomo R. Simple translational equations to compare illness severity scores in intensive care trials. *J Crit Care*. 2013;28(5):885 e1-8.
18. Curiel-Balsera E, Mora-Ordoñez J, Castillo-Lorente E, Benitez-Parejo J, Herruzo-Avilés A, Ravina-Sanz J, et al. Mortality and complications in elderly patients undergoing cardiac surgery. *J Crit Care*. 2013;28(4):397-404.
19. Lopez-Delgado J, Esteve F, Javierre C, Perez X, Torrado H, Carrio M, et al. Short-term independent mortality risk factors in patients with cirrhosis undergoing cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013;16:332-8.
20. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*. 2002;97(1):215-52.
21. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.

22. Landis RC. 20 Years On: Is It Time to Redefine the Systemic Inflammatory Response to Cardiothoracic Surgery? *J Extra Corpor Technol.* 2015;47(1):5-9.
23. Corral-Velez V, Lopez-Delgado JC, Betancur-Zambrano NL, Lopez-Sune N, Rojas-Lora M, Torrado H, et al. The inflammatory response in cardiac surgery: an overview of the pathophysiology and clinical implications. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2015;13(6):367-70.
24. Stoppelkamp S, Veseli K, Stang K, Schlensak C, Wendel HP, Walker T. Identification of Predictive Early Biomarkers for Sterile-SIRS after Cardiovascular Surgery. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135527.
25. Shaefi S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, et al. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures-Pathophysiology and Targeted Therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2018;32(2):1013-22.
26. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;21(2):232-44.
27. Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care.* 2016;20(1):387.
28. Raja SG, Berg GA. Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence. *J Card Surg.* 2007;22(5):445-55.
29. Verrier ED, Boyle EM, Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(3):915-22.

30. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res.* 1996;32(5):822-9.
31. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
32. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in risk assessment : validity and validation. 2001.
33. Bauçà-Rosselló JM. Biomarcadores y apnea obstructiva del sueño. Implicaciones en el síndrome coronario agudo [Doctorado]. Universitat de les Illes Balears. 2018:73.
34. de Lemos JA, Morrow DA. Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application? *Circulation.* 2002;106(23):2868-70.
35. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
36. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Anal Chim Acta.* 2015;853:95-115.
37. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
38. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
39. Wong HL, Pfeiffer RM, Fears TR, Vermeulen R, Ji S, Rabkin CS. Reproducibility and correlations of multiplex cytokine levels in asymptomatic persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(12):3450-6.



40. Aziz N. Measurement of Circulating Cytokines and Immune-Activation Markers by Multiplex Technology in the Clinical Setting: What Are We Really Measuring? For Immunopathol Dis Therap. 2015;6(1-2):19-22.
41. Fink-Neuboeck N, Lindenmann J, Bajric S, Maier A, Riedl R, Weinberg AM, et al. Clinical impact of interleukin 6 as a predictive biomarker in the early diagnosis of postoperative systemic inflammatory response syndrome after major thoracic surgery: A prospective clinical trial. Surgery. 2016;160(2):443-53.
42. de Mendonca-Filho HT, Pereira KC, Fontes M, Vieira DA, de Mendonca ML, Campos LA, et al. Circulating inflammatory mediators and organ dysfunction after cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass: a prospective observational study. Crit Care. 2006;10(2):R46.
43. Brocca A, Virzi GM, de Cal M, Giavarina D, Carta M, Ronco C. Elevated Levels of Procalcitonin and Interleukin-6 are Linked with Postoperative Complications in Cardiac Surgery. Scand J Surg. 2017;106(4):318-24.
44. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet. 1993;341(8844):515-8.
45. Muller B, White JC, Nylén ES, Snider RH, Becker KL, Habener JF. Ubiquitous expression of the calcitonin-receptor-like receptor 1 gene in multiple tissues in response to sepsis. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(1):396-404.

46. Julian-Jimenez A, Candel-Gonzalez E, Gonzalez-del-Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:177-90.
47. Meisner M. Update on procalcitonin measurements. *Ann Lab Med*. 2014;34(4):263-73.
48. Meisner M, Rauschmayer C, Schmidt J, Feyrer R, Cesnjevar R, Bredle D, et al. Early increase of procalcitonin after cardiovascular surgery in patients with postoperative complications. *Intensive Care Med*. 2002;28(8):1094-102.
49. Reith HB, Mittelkotter U, Debus ES, Kussner C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg*. 1998;15(3):260-5.
50. Tillett WS, Francis T. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med*. 1930;52(4):561-71.
51. Macleod CM, Avery OT. The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood : Iii. Immunological Properties of the C-Reactive Protein and Its Differentiation from Normal Blood Proteins. *J Exp Med*. 1941;73(2):191-200.
52. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23-36.
53. Abernethy TJ, Avery OT. The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood : I. Distribution of the Reactive Protein in Patients' Sera and the Effect of Calcium on the Flocculation Reaction with C Polysaccharide of Pneumococcus. *J Exp Med*. 1941;73(2):173-82.

54. Brenner DR, Scherer D, Muir K, Schildkraut J, Boffetta P, Spitz MR, et al. A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(9):1729-51.
55. Yi G, Joo HC, Yoo KJ. Impact of preoperative C-reactive protein on midterm outcomes after off-pump coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;61(8):682-6.
56. Santonocito C, De Loecker I, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A, et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesth Analg.* 2014;119(3):624-9.
57. Khuseyinova N, Imhof A, Trischler G, Rothenbacher D, Hutchinson WL, Pepys MB, et al. Determination of C-reactive protein: comparison of three high-sensitivity immunoassays. *Clin Chem.* 2003;49(10):1691-5.
58. Monaghan PJ, Lord SJ, St John A, Sandberg S, Cobbaert CM, Lennartz L, et al. Biomarker development targeting unmet clinical needs. *Clin Chim Acta.* 2016;460:211-9.
59. Hoffmann J. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(8):1107-17.
60. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3339-47.
61. Arellano Rodrigo E. Role of reticulated platelets in the clinical evaluation of thrombocytopoiesis. *Med Clin.* 2009;133(3):95-7.

62. Jung H, Jeon H, Kim H, Kim S. Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* 2010;30(5):451-9.
63. Ko Y, Hur M, Kim H, Choi S, Moon H, Yun Y. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyzer: a comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(7):1091-7.
64. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2004;126(1):93-9.
65. De Blasi R, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2013;39(4):636-43.
66. Kirschenbaum L, McKeivitt D, Rullan M, Reisbeck B, Fujii T, Astiz M. Importance of platelets and fibrinogen in neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32:1904-9.
67. Eikelboom JW, Warkentin TE. Immature platelet count: part of the cardiologist's complete blood count? *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(20):2130-2.
68. Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, DeLao T, Barker CM, Kleiman NS. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(20):2122-9.
69. Lev EI. Immature Platelets: Clinical Relevance and Research Perspectives. *Circulation.* 2016;134(14):987-8.

70. Anetsberger A, Blobner M, Haller B, Schmid S, Umgelter K, Hager T, et al. Immature platelets as a novel biomarker for adverse cardiovascular events in patients after non-cardiac surgery. *Thromb Haemost.* 2017;117(10):1887-95.
71. CLSI document C28-A3c:2008. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, 3rd ed. Wayne, PA, 2008;28:61.
72. Seo A, Yuan D, Daniels S, Yuan S, Gallagher M, Wong E. Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(1):e1-2.
73. Jung H, Jeon H-K, Kim H-J, Kim S-H. Immature Platelet Fraction: Establishment of a Reference Interval and Diagnostic Measure for Thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* 2010;30:451-9.
74. Joergensen MK, Bathum L. Reference intervals for mean platelet volume and immature platelet fraction determined on a sysmex XE5000 hematology analyzer. *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(2):172-6.
75. Park SH, Park C, Lee B, Kim M, Han M, Cho Y, et al. Establishment of Age- and Gender-Specific Reference Ranges for 36 Routine and 57 Cell Population Data Items in a New Automated Blood Cell Analyzer, Sysmex XN-2000. *Ann Lab Med.* 2016;36(3):244-9.
76. Omar S, Zedan A, Nugent K. Cardiac vasoplegia syndrome: pathophysiology, risk factors and treatment. *Am J Med Sci.* 2015;349(1):80-8.
77. Weis F, Kilger E, Beiras-Fernandez A, Nassau K, Reuter D, Goetz A, et al. Association between vasopressor dependence and early outcome in patients after cardiac surgery. *Anaesthesia.* 2006;61(10):938-42.

78. Buoro S, Seghezzi M, Manenti B, Pacioni A, Carobene A, Ceriotti F, et al. Biological variation of platelet parameters determined by the Sysmex XN hematology analyzer. *Clin Chim Acta*. 2017;470:125-32.
79. Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, et al. Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1068-74.
80. Mauermann E, Bolliger D, Fassl J, Grapow M, Seeberger EE, Seeberger MD, et al. Association of Troponin Trends and Cardiac Morbidity and Mortality After On-Pump Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017;104(4):1289-97.
81. Brown AS, Martin JF. The megakaryocyte platelet system and vascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1994;24 Suppl 1:9-15.
82. Cotton JM, Hong Y, Hawe E, Mathur A, Humphries SE, Brown AS, et al. Rise of circulating thrombopoietin following cardiothoracic surgery is potentiated in patients with coronary atherosclerosis: correlation with a preceding increase in levels of interleukin-6. *Thromb Haemost*. 2003;89(3):538-43.
83. Lev EI. Immature Platelets. Clinical Reference and Research Perspectives. *Circulation*. 2016;134(14):987-8.



