UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

Tesis Doctoral

Polimorfismos de los genes *TNF-α, LT-α, IL-1RN* y *TNF-R2*. Papel en la susceptibilidad, gravedad y pronóstico de la neumonía adquirida en la comunidad.

José María Ferrer Agüero

Las Palmas de Gran Canaria, 2010

Certificado del Secretario del Departamento

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Facultad de Ciencias de la Salud
Departamento: Ciencias Médicas y Quirúrgicas
Programa de Doctorado: Avances en Medicina Interna

Polimorfismos de los genes *TNF-α, LT-α, IL-1RN* y *TNF-R2*. Papel en la susceptibilidad, gravedad y pronóstico de la neumonía adquirida en la comunidad.

Tesis Doctoral presentada por D. José María Ferrer Agüero
para optar al grado de Doctor
Director
Dr. D. Jordi Solé Violán
Codirector
Dr D. Felipe Rodríguez de Castro

El/la Director/a El/la Codirector/a El/la Doctorando/a

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de marzo de 2010

Dedicatorias

A Julia, mi esposa

Quien con su presencia, paciencia, aliento y compañía me ha dado fuerza y esperanza tantas veces.

A mis padres,

Por la infancia que me dieron y los principios y gustos con que me educaron.

A mis hijos, José María y Miguel

Cuyas vidas, aún en cierne, completan mi existencia.

A mi hermano Luis María,

Quien, con su claridad de ideas y cultura, tanto influyó en mi vida, sin proponérselo.

“EL ELOGIO ES EL ESTÍMULO DEL NECIO, Y ALIMENTO DEL VANIDOSO”.

JOSÉ MARÍA FERRER AGÜERO.

Agradecimientos

Al Dr. JORDI SOLÉ VIOLÁN, quien con su vigor intelectual y su inestimable aporte en conocimientos y formación médicos, me ha guiado escrupulosamente y alentado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Prof Dr. FELIPE RODRÍGUEZ DE CASTRO, el docente por excelencia, de cuyo talante aleccionador y rigor científico en sus publicaciones recogí simientes que dieron su fruto en el presente trabajo.

Al Servico de Inmunología del Hospital Universitario Dr. Negrín, en especial distinción al Prof. CARLOS RODRÍGUEZ GALLEGO, que sin sus ricos conocimientos y sin su generoso aporte , no hubiese sido posible concretar esta Tesis. Merece asimismo todo mi reconocimiento el Personal de dicho Servicio: Isabel García Laorden, Ayose García Saavedra, Nereida Gónzalez Quevedo y Javier Hernández López, que invirtieron su tiempo en ayudarme en esta labor científica.

Al Servicio de MICROBIOLOGÍA, por su valioso apoyo en la custodia y en el procesamiento de las muestras; el trabajo del Personal de su laboratorio, tiene su reflejo en esta Tesis Doctoral. Mi particular reconocimiento a la Dra. ANA BORDES.

A la Dra MARÍA DOLORES FIUZA por su inestimable ayuda en el procesamiento de los datos estadísticos.

A los Doctores JOSÉ LUIS MANZANO y JUAN JOSÉ MANZANO, que contribuyeron, con sus

conocimientos médicos y su dilatada experiencia, a mi formación en esta especialidad.

Al Dr. JOSÉ BOLAÑOS GUERRA, figura del trabajador incansable, siempre entregado a sus enfermos en sus maduros años con el espíritu joven del médico de "La Ciudadela", de Cronin.

Finalmente, en mis recuerdos,

El Rdo. P. JUAN A. FASOLATO, quien me enseñó en mis años jóvenes a reflexionar con sensatez, y por su sabiduría y vida al servicio de los demás.

Al Dr. JORGE O. DZIENISIK, el clínico por excelencia; compañero argentino que fuera mi ideal como médico, y que lo será siempre.

A ISABEL SANZ DÍAZ, la amiga con quien he compartido momentos ora gratos, ora difíciles, cuya presencia siempre ha sido cálida y cercana.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation.

ATS: American Thoracic Society.

BPI: Proteína Ligadora Incrementadora de Permeabilidad.

CARS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Compensadora.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

CID: Coagulación Intravascular Diseminada.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Fc: Fracción cristalizable de la inmunoglobulina

FiO2: Fracción Inspirada de Oxígeno.

FMO: Fracaso Multiorgánico.

GH: Genoma Humano.

IgG: Inmunoglobulina clase G.

IL: Interleucina o interleuquina.

IL-1RN: Antagonista del Receptor de la IL-1.

LBA: Lavado Broncoalveolar.

LBP Proteína Ligadora de LPS.

LTA: Linfotoxina Alfa.

LPS: Lipopolisacárido.

NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad.

NaCl: Cloruro Sódico.

OR: Odds Ratio.

p: Probabilidad.

PaO2: Presión Parcial de Oxígeno.

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PORT: Pneumonia Patient Outcomes Research Team.

PMAP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos.

PSI: Pneumonia Severity Index.

rpm: Revoluciones por minuto.

RRP: Receptores Reconocedores de Patrones.

SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

SNP: Polimorfismos de un Solo Nucleótido.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TLR: Receptores Tipo “Toll”.

ufc: Unidades Formadoras de Colonias.

UCI : Unidad de Cuidados Intensivos .

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

ÍNDICE

Pág.

1.-INTRODUCCIÓN 1

1.1 JUSTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS EN LAS INFECCIONES 3

1.2 ALGUNOS CONCEPTOS PREVIOS 5

1.3 PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA INFECCIÓN 9

1.4 POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN 10

1.4.1. Polimorfismos en el reconocimiento del microorganismo. 10

1.4.1.1 Proteínas ligadoras del lipopolisacárido. 10

1.4.1.2 CD14 11

1.4.1.3 Receptores tipo Toll 11

1.4.1.4 Lectina de unión a manosa 12

1.4.1.5 Receptores de inmunoglobulinas 12

1.4.2. Polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria. 13

1.4.2.1 Factor de Necrosis Tumoral 14

1.4.2.2 Proteínas del shock térmico 15

1.4.2.3 Interleucina-1 e interleucina-6 15

1.4.3. Polimorfismos implicados en la respuesta antiinlamatoria. 16

1.4.3.1 Interleucina-10 16

1.4.3.2 Antagonista del receptor de interleucina-1 17

1.4.3.3 Receptores del Factor de Necrosis Tumoral 17

1.4.4. Otros polimorfismos de interés. 18

1.4.4.1 Enzima convertidora de angiotensina 18

1.4.4.2 Proteínas del surfactante 19

1.4.4.3 Proteínas de la coagulación 19

2.- HIPÓTESIS 21

3.- OBJETIVOS 22

4.- MATERIAL Y MÉTODOS 23

4.1. TIPO DE ESTUDIO 23

4.2. POBLACIÓN 23

4.2.1. **Criterios de inclusión.** 23

4.2.2. **Criterios de exclusión.** 23

4.2.3. **Grupo Control.** 24

4.3. DEFINICIONES 24

4.4. RECOGIDA DE DATOS 25

4.5. ESTUDIO GENÉTICO 27

4.5.1. **Determinantes genéticos.** 27

4.5.2. **Extracción del ADN genómico.** 27

4.5.3. **Genotipado.** 28

4.6. ASPECTOS ÉTICOS. 29

4.7. TAMAÑO MUESTRAL 30

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 31

5.- RESULTADOS 31

5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS POBLACIONES 31

5.1.1. **Grupo Control.** 31

5.1.2. **Grupo de neumonías.** 31

5.2. MICROBIOLOGÍA 32

5.3. ESTRATIFICACIÓN POR GRAVEDAD 37

5.3.1. **Escala de P.S.I.** 37

5.3.2. **Escala de APACHE II.** 38

5.3.3. **Estratificación de la sepsis.** 38

5.4. SUSCEPTIBILIDAD 38

5.5. COMPLICACIONES 38

5.5.1. **Sepsis, sepsis grave y shock séptico.** 38

5.5.2. **Insuficiencia renal aguda.** 39

5.5.3. **Síndrome del distrés respiratorio agudo.** 39

5.5.4. **Bacteriemia.** 39

5.5.5. **Fracaso multiorgánico.** 39

5.5.6. **Mortalidad.** 40

6.- DISCUSIÓN 48

7.- CONCLUSIONES 54

8.- BIBLIOGRAFÍA 55

1.- INTRODUCCIÓN

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es la infección que con mayor frecuencia justifica el ingreso de un paciente en el hospital y la causa más frecuente de muerte de origen infeccioso en países desarrollados (1). La etiología de la NAC varía según los grupos poblacionales y las zonas geográficas estudiadas, las técnicas diagnósticas y los criterios microbiológicos empleados, la aparición de brotes epidémicos y la administración previa de antibióticos. Los patógenos más comunes responsables de NAC son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, microorganismnos atípicos y virus respiratorios. La frecuencia relativa de cada uno de estos patógenos depende fundamentalmente de la gravedad del cuadro clínico. En la mayoría de los estudios epidemiológicos no se puede demostrar una etiología específica en cerca de la mitad de los casos, aunque probablemente la mayoría de estas neumonías de etiología desconocida se deban a *S. pneumoniae* (2-3).

La incidencia de NAC en adultos oscila entre 1,6 y 13,4 casos por cada 1.000 habitantes, con tasas significativamente superiores en las edades extremas de la vida y en varones. Las tasas de hospitalización fluctúan entre un 22% y un 61% de los pacientes, de los que un 6-10% requerirán cuidados intensivos. Además, la NAC también es la causa más frecuente de muerte de origen infeccioso (2-3). Si se consideran sólo los pacientes tratados de forma ambulatoria, la mortalidad no supera el 1%. Por el contrario, en los pacientes hospitalizados por NAC la mortalidad está en torno al 15% de los pacientes ingresados por este motivo, pero puede alcanzar tasas del 25% al 54% en el grupo de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (4,5). De hecho, una de las decisiones más importantes a tomar en los pacientes con NAC atendidos en el Servicio de Urgencias es decidir el lugar donde deben ser tratados. El reconocimiento de los pacientes con una

NAC grave permitiría una adecuada monitorización y un tratamiento precoz de las complicaciones, lo que constituye un aspecto clave a la hora de reducir la mortalidad. Sin embargo, la valoración clínica de la gravedad no es fácil. Muchos autores consideran que la NAC es grave cuando precisa ingreso en UCI, pero ello depende, en gran medida, del juicio clínico del médico que atiende al paciente y de ahí la amplia variación en el porcentaje de NAC ingresadas en la UCI entre los distintos hospitales. Se han desarrollado diferentes sistemas de puntuación y modelos de predicción con la intención de ayudar al clínico a identificar precozmente los casos con un peor pronóstico (3,6-9). Aunque útiles, ninguno de estos sistemas es suficientemente exacto para decidir el ingreso en UCI y deben contemplarse, más bien, como elementos suplementarios a la evaluación clínica de la gravedad (3, 10-11).

El pronóstico de los pacientes con NAC depende de las comorbilidades del paciente, de la naturaleza y gravedad de la infección, del tipo e intensidad de la respuesta del huésped y del grado de disfunción orgánica (1). Las citocinas constituyen un grupo heterogéneo de pequeños polipéptidos solubles que forman parte de una red compleja que regula la respuesta inmune e inflamatoria. Casi el 50% de los pacientes ingresados por NAC desarrollan sepsis grave en algún momento del curso de su enfermedad, en muchos casos incluso en el momento de su ingreso en el hospital (5). La magnitud de la respuesta inflamatoria frente a la infección debe ser proporcionada y permanecer adecuadamente compartimentalizada para evitar el daño tisular y los efectos sistémicos de la misma, como son la disfunción miocárdica, la hipotensión, la hipoperfusión de órganos vitales y la acidosis láctica. En general, los niveles plasmáticos de los mediadores inflamatorios parecen relacionarse con la gravedad de la neumonía o el desarrollo de sepsis y, de hecho, la progresión de una neumonía puede ocurrir por el desequilibrio de la respuesta inflamatoria, incluso en presencia de antibioterapia apropiada.

La presentación clínica de la NAC varía considerablemente. Se desconocen las causas exactas que determinan esta variabilidad pero es probable que en ella estén implicados varios factores relacionados con el microorganismo causante de la infección (capacidad de virulencia, inóculo bacteriano), elementos vinculados a la intervención terapéutica como la rápida administración de un tratamiento antibiótico efectivo y determinadas características del huésped (3-4).

Son varios los factores que pueden explicar esta variabilidad. Factores ligados al patógeno, como su capacidad de virulencia o el tamaño del inóculo y, muy especialmente, aquéllos ligados al huésped como la edad o la presencia de enfermedades subyacentes. Sin embargo, en la práctica clínica seguimos observando que muchas de las muertes por neumonía siguen ocurriendo en sujetos sin factores de riesgo ni enfermedades subyacentes, que la edad es un factor de riesgo, pero que más de la mitad de las muertes por neumonía neumocócica bacteriémica siguen observándose en pacientes con menos de 65 años (6,12) y que la infección por una cepa idéntica de *Streptococcus pneumoniae* puede causar shock séptico, un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y muerte en un determinado paciente, o una infección banal y autolimitada en otro. De hecho, es posible que una NAC evolucione mal a pesar de un tratamiento antibiótico con espectro adecuado y microorganismo sensible (13). Lo que conocemos en la actualidad de la fisiopatología de la NAC explica muchas de las manifestaciones clínicas específicas que observamos en la práctica, pero no aclara suficientemente por qué sólo algunos pacientes sufren este tipo de manifestaciones o complicaciones.

1.1- JUSTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS.

La configuración genética del paciente nos ofrece una explicación para comprender los

motivos de esta gran variabilidad clínica de la NAC. Desde hace tiempo se sospecha que algunos factores genéticos determinan la susceptibilidad y la resistencia a las enfermedades infecciosas graves. Diversos informes procedentes de estudios en modelos animales, en grupos raciales, en casos familiares y en gemelos, han presentado pruebas definitivas de la importancia de la genética en las infecciones graves (14). Las estimaciones de la importancia de la genética del huésped, independientemente de los efectos del medio ambiente, se pueden obtener también mediante estudios en niños adoptados. Sorensen et al (15), publicaron un estudio sobre las causas de muerte prematura en familias con niños adoptados en edad temprana. Encontraron que si los padres biológicos habían muerto por una infección antes de la edad de 50 años, su hijo tenía un riesgo relativo de morir por infección de 5,81; mientras que por el contrario, el fallecimiento de los padres adoptivos por una infección no confería un mayor riesgo al hijo de fallecer por esta causa. Por tanto, la conclusión que se obtiene de este estudio es que la susceptibilidad y la respuesta a la infección tiene una influencia genética sorprendentemente importante. (Tabla 1)

Tabla 1.- Efectos de las causas del fallecimiento sobre adoptados.

Causa de muerte	Padre/Madre fallecido antes de 50 años	Padre/Madre fallecido antes de 70 años
Naturales		
Biológico	1,98	1,49
Adoptivo	0,96	0,96
Infección		
Biológico	5,81	5,00
Adoptivo	0,73	1,00
Vascular		
Biológico	4,52	1,92
Adoptivo	3,02	1,50
Cáncer		
Biológico	1,19	0,87
Adoptivo	5,16	1,49

Sorensen et al. N Engl J Med 1988; 318:727-32

El estudio del genoma humano (GH) ha proporcionado un punto de partida para el análisis sistemático de la diversidad génica en el hombre. El GH completo está formado por unos 3,1 gigabases y, aunque se desconoce el número exacto de genes que contiene, se estiman en torno a los 20.000 o 25.000 genes, si bien sólo la mitad tiene un patrón de secuencia de bases que sugiere una posible función. Una de las características del GH con relevancia médica y social es que, como promedio, dos individuos no relacionados genéticamente, comparten más del 99% de sus secuencias de ADN. Sin embargo, dado que existen más de tres mil millones de pares de bases en el GH, la secuencia de ADN de dos personas difiere en varios millones de bases. A estas variantes nos referimos habitualmente con la denominación de polimorfismos (16,17).

1.2- ALGUNOS CONCEPTOS PREVIOS.

Un polimorfismo genético es, por tanto, una región del genoma que varía entre los individuos de una población. Esta variante alélica debe afectar a una porción significativa de la población normal, generalmente a más del 1% (lo que excluye a las mutaciones espontáneas que pueden ocurrir y extenderse a la descendencia, en el seno de una familia), y puede tratarse de la sustitución de un solo nucleótido, o afectar al número de secuencias cortas repetitivas (microsatélities y minisatélites) de nucleótidos que constituyen más del 50% del GH (16). Particularmente importantes son los llamados polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNP son la forma más importante y frecuente de variación en el GH y la mayoría de las diferencias genéticas entre individuos es de este tipo. La diferencia puede radicar en la sustitución, la inserción o la delección de una base (17). Se cree que hay aproximadamente diez millones de estos polimorfismos en la especie humana, lo que significa que unos diez millones de posiciones a lo largo del genoma (cada 300-500 nucleótidos) tienen variaciones frecuentes.

Para que un polimorfismo sea relevante desde el punto de vista funcional, debe alterar bien la cantidad o la calidad de la proteína que expresa el gen. Estos polimorfismos están habitualmente situados en la región promotora del gen, que es la zona que tiene la información necesaria para activarlo o desactivarlo y que por tanto condicionan el nivel de producción de una proteína, o bien en los exones, que son la región codificante del gen y que al modificar el aminoácido en la proteína que codifica el gen, pueden alterar su función (17-18). Sin embargo, es importante señalar que estos polimorfismos funcionales son los menos frecuentes, pues con diferencia los más comunes son los que se localizan en los intrones, que son las regiones del gen que no se traducen en proteínas (18). De cualquier forma, todos los polimorfismos tienen un valor potencial muy interesante como marcadores genéticos.

Para algunas enfermedades, la mutación en un solo gen es a la vez necesaria y suficiente para producir el fenotipo clínico y provocar la enfermedad (19). En estos casos, los patrones de herencia son sencillos y generalmente es posible rastrear el gen mediante análisis de ligamiento, que comparan la segregación de la enfermedad con la segregación de marcadores genéticos en familias con varios miembros afectos (19). En conjunto, se han identificado más de 200 mutaciones monogénicas importantes y poco frecuentes (no se puede hablar de polimorfismos en sentido estricto) que se asocian con frecuencia a infecciones bacterianas recurrentes, y se detectan en la infancia (20-21).

Sin embargo, la mayoría de los rasgos fenotípicos de las enfermedades comunes están determinados por muchos genes que colaboran en diferentes *loci,* y carecen del patrón de herencia simple (mendeliana) que caracteriza a las enfermedades monogénicas. Estas enfermedades complejas o poligénicas son el resultado de la combinación de diferentes factores genéticos y

ambientales e incluyen enfermedades tan frecuentes como la diabetes, la hipertensión o la arteriosclerosis y, naturalmente, también la susceptibilidad y la respuesta a la infección. Estas enfermedades tienen un patrón de herencia no mendeliano (19).

La mayoría de las evidencias del papel genético en las infecciones procede de los estudios de asociación, en los que se compara la incidencia de mutaciones específicas (frecuencias alélicas) de genes que se sabe o se presume que influyen en la intensidad de la respuesta inflamatoria en una población con infección y una población control extraída del mismo grupo étnico (22-23). Los requisitos que deben cumplir los estudios de casos y controles son básicamente cuatro:

1.- Las poblaciones deben ser étnicamente homogéneas. Un grupo étnico puede estar predispuesto a desarrollar una enfermedad por razones exclusivamente socioculturales. En estas circunstancias, una muestra aleatorizada de casos de la enfermedad contendrá una proporción de ese grupo étnico mayor de la que se encuentra en la población general y, por tanto, existe el riesgo de encontrar aparentes "asociaciones genéticas" que pueden reflejar simplemente diferencias étnicas, y no la existencia de genes de susceptibilidad.

2.- El polimorfismo del gen debe ser importante. Es decir, que la mutación debe ser suficientemente frecuente como para afectar a una porción significativa de la población, y sus efectos han de ser relevantes. Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los SNP no modifican la cantidad o la calidad del producto del gen, por lo que se denominan silentes (no cambia el aminoácido a pesar de cambiar el nucleótido) o conservadores (aunque cambia el aminoácido, éste es sustituido por otro de estructura similar que no modifica la función de la proteína). Por el contrario, los polimorfismos son importantes cuando modifican la regulación del gen (SNP del promotor o del potenciador) o la estructura primaria del gen (SNP de exón). Es preciso tener en cuenta, además, que aunque genes diferentes dentro de un mismo cromosoma pueden determinar la susceptibilidad a la infección de forma independiente, también puede suceder

que la asociación observada entre un gen y una enfermedad sólo esté reflejando lo que está sucediendo en un gen vecino. Existen evidencias de que muchos alelos se segregan en bloque formando haplotipos. Mientras que un SNP representa una variante de un solo nucleótido, un haplotipo representa un grupo de polimorfismos o alelos estrechamente ligados en un cromosoma y que se heredan como una unidad. El Proyecto Internacional sobre Haplotipos se propone identificar los patrones de variación comunes en el GH lo que, a su vez, facilitará la selección de ciertos SNP (tag-SNP), que identifican de manera exclusiva ciertos haplotipos.

3.- El producto del gen candidato debería estar implicado en la fisiopatología de la enfermedad y por tanto, en los estudios de asociación debería proporcionarse, siempre que sea posible, información acerca de la funcionalidad del gen y de qué forma se modifica en las variantes polimórficas.

4.- La definición del fenotipo también es un aspecto clave en cualquier estudio genético cuyo objetivo sea detectar los genes de la enfermedad. Por otra parte, la evolución de ésta debe ser lo suficientemente frecuente o lo suficientemente grave como para permitir las comparaciones. Esto puede ser relativamente fácil en algunas enfermedades, pero es más complicado de establecer en algunos cuadros infecciosos como las neumonías, cuyas manifestaciones clínicas, evolución y etiología pueden ser muy variables.

La defensa del huésped contra los microbios es un proceso extraordinariamente complejo que se fundamenta tanto en componentes innatos como adaptativos. El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de patógenos durante las primeras horas posteriores a la invasión. La protección inmediata frente a microorganismos incluye tres mecanismos: a) el reconocimiento del patógeno; b) la fagocitosis de los microorganismos invasores, y c) el desarrollo de una respuesta inflamatoria (16,18).

1.3- PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA INFECCIÓN.

A lo largo de la evolución, la inmunidad innata ha desarrollado un sistema altamente eficiente de reconocimiento de un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos (PMAP), a través de los receptores reconocedores de patrones (RRP). Entre los principales PMAP se encuentran el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, ácido lipoteicoico y peptidoglicano (Gram-positivos), zymosan (levaduras), secuencias de ADN CpG no metiladas, manosa y ARN bicatenario (virus) (17-18). Por otra parte, hay distintos tipos de proteínas que presentan características de RRP capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, y que se pueden dividir en tres categorías:

a) Las proteínas humorales que circulan en el plasma, como el sistema del complemento y la lectina de unión a manosa (MBL), que se une a sus ligandos en la superficie de muchos microorganismos e inducen la activación del complemento y la fagocitosis de los patógenos.

b) Los receptores endocíticos, como los receptores de la manosa, y los receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas (FcγR), que promueven la fagocitosis.

c) Los receptores señaladores, como los receptores similares a Toll (TLR) y CD-14, expresados fundamentalmente en la superficie de las células epiteliales y en las células presentadoras de antígenos (monocitos/macrófagos y células dendríticas). Al unirse los PMAP a los RRP se activa el NF-κB que es una proteína intracelular que provoca la transcripción de citocinas pro (TNF, IL-1, IL-6) y antiinflamatorias (IL-10), que son los reguladores proteicos clave de la inflamación (18,24).

Cada uno de los escalones de esta respuesta inmune puede verse afectado por los

polimorfismos de los genes que pueden provocar una susceptibilidad o resistencia a la infección.

1.4 POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN.

1.4.1 Polimorfismos implicados en el reconocimiento del microorganismo.

1.4.1.1 Proteínas ligadoras de lipopolisacárido.

Los LPS son componentes estructurales de la pared celular de las bacterias, principalmente de las Gram negativas. Los LPS se consideran como uno de los factores biológicos fundamentales en el inicio del proceso infeccioso e inflamatorio (16). Aunque la endotoxina se puede unir a proteínas transportadoras inespecíficas, son sus uniones con proteínas especificas, como la proteína ligadora de LPS (LBP) o la proteína ligadora incrementadora de permeabilidad (BPI), las implicadas en la activación o neutralización fagocitaria (25-28). Ambas proteínas son estructuralmente muy parecidas, aunque difieren en su función. La LBP facilita la transferencia del LPS al CD14 y a las lipoproteínas de la pared del fagocito, facilitando la activación del mismo. La BPI, producida fundamentalmente por los leucocitos, actúa sobre la pared bacteriana incrementando su permeabilidad y es, por tanto, bactericida para muchos patógenos Gram negativos.

Dos grupos de investigadores (29,30) han estudiado distintos polimorfismos de la LBP y de la BPI con resultados discrepantes. Mientras unos (29) encuentran que uno de los polimorfismos estudiados del gen de la LBP *(Cys98Gly)* se asocia a un riesgo aumentado de sepsis en varones y, probablemente, a un peor pronóstico, los otros autores (30) no pudieron reproducir esos resultados y ni siquiera pudieron identificar uno de los SNP descritos por los anteriores autores.

1.4.1.2 CD14.

La CD14 es una proteína de membrana que se expresa en los macrófagos y monocitos y, en menor proporción, en los neutrófilos. Además de unirse al lípido A del LPS, CD14 también se puede unir al peptidoglicano del *Staphylococcus aureus*, al lipoarabinoman de las micobacterias y a otros componentes de la pared de los estreptococos (31). Se ha descrito un SNP ubicado en la posición *–159* de la región promotora del gen (cromosoma 5), que afecta a una transición citosina-timina, y que en los sujetos homocigotos para el alelo T condiciona mayores niveles circulantes de CD14 soluble y una mayor producción de IFN-γ. El genotipo *CD14 –159 TT* apareció con más frecuencia en una población de pacientes con shock séptico en relación con un grupo control de sujetos sanos, asociándose, además, a una mayor mortalidad (32). Otros autores no han encontrado asociación de este SNP con formas más graves o con peor pronóstico de la infección (33).

1.4.1.3 Receptores tipo Toll.

Existen al menos diez TLR diferentes, con distintas afinidades por diferentes antígenos microbianos. TLR-4 parece ser esencial para el reconocimiento de la endotoxina, mientras que TLR-2 es más importante en el reconocimiento de diversos componentes de *M. tuberculosis* y de los peptidoglicanos de Gram positivos. La activación de los TLR implica un aumento de la expresión de moléculas del CMH, de moléculas coestimuladoras y un aumento de la expresión de genes dependientes de NFκB, como IL-1, IL-6, IL-12 y TNFα. (34). Se han identificado varios SNP de TLR4 y TLR2 (cromosoma 9) que parecen incrementar el riesgo de infecciones bacterianas graves, aunque los resultados son discrepantes (34-35). TLR5 reconoce la proteína flagelina, que constituye un estímulo inflamatorio muy potente y que está presente en la estructura flagelar de muchas bacterias. Recientemente se ha descrito un SNP en un codon de parada (que señaliza la terminación de la síntesis proteica) en la posición *392* del gen de TLR5, que codifica una proteína

incapaz de reconocer la flagelina y, como consecuencia, incrementa la susceptibilidad a la infección por *Legionella pneumophila* (36).

1.4.1.4 Lectina de unión a manosa.

La MBL es una molécula pluripotencial del sistema inmune innato que, tras su unión a diversos azúcares de las superficies microbianas, es capaz de activar el complemento. Además, la MBL puede actuar directamente como opsonina y unirse a receptores específicos expresados en la superficie de varios tipos de células (37-38). Esta proteína está codificada por un gen único (*mbl2*) localizado en el cromosoma 10 y existen tres variantes alélicas estructurales y otras en la región promotora del gen que reducen significativamente sus niveles plasmáticos (16). Algunos autores han encontrado que los polimorfismos de MBL son un factor de riesgo para el desarrollo de sepsis grave (31,39-40). Estos datos han sido corroborados por nuestro grupo que ha estudiado distintos polimorfismos de la MBL en pacientes con NAC y ha encontrado que, las variantes alélicas asociadas a niveles bajos de la proteína tienen un mayor riesgo de desarrollar las formas más graves de la enfermedad (41).

1.4.1.5 Receptores de inmunoglobulinas.

Ciertos agentes etiológicos de la NAC como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, se encuentran protegidos por una cápsula de polisacárido que protege la bacteria de la fagocitosis. Sin embargo si la inmunoglobulina G2 (IgG2) reconoce y se fija al antígeno capsular, la bacteria puede ser fagocitada. El único receptor capaz de interaccionar eficientemente con los anticuerpos IgG2 es el receptor Fcγ IIa (Fcγ-RIIa) (16). A consecuencia de un SNP, se identifican dos alotipos de Fcγ-RIIa que exhiben diferente capacidad para unirse a la IgG2. Los receptores que llevan una arginina en la posición 131 (FCγRIIA-R131) se unen con mucha menos eficacia a las Fc, mientras que

aquéllos que poseen histidina en esta posición (FCγRIIA-H131) presentan una gran afinidad por las Fc de la IgG2. Varios estudios han evaluado la asociación entre los polimorfismos de Fcγ-RIIa y la infección meningocócica o la periodontitis. De hecho, los pacientes homocigotos para FcγRIIa-R131 presentan unas tasas de recurrencia y mayor gravedad de la infección meningocócica.(42-43). La relación entre los genotipos de Fcγ-RIIa y la enfermedad neumocócica también se ha estudiado, pero continúa siendo objeto de controversia. Aunque los niños homocigotos para FcγRIIa-R131 parecen presentar una mayor susceptibilidad a la infección por *S. pneumoniae* (44-45), su papel en adultos es menos claro (46-47). Además, la asociación entre Fcγ-RIIa y NAC causada por otros microorganisms diferentes de *S. pneumoniae* no ha sido documentada.

1.4.2 Polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria.

Al unirse los PMAP a los RRP se inicia una cascada de señalización intracelular y comienza una serie de procesos antimicrobianos y funciones defensivas. En el caso de los TLR, esta señalización se produce a través de proteínas adaptadoras –distintas según los diferentes TLR- de las que se han descrito cinco hasta el momento actual. Una de las más estudiadas es el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88), que se une intracelularmente con una cinasa asociada al receptor de la interleucina (IL)-1 (IRAK); esto induce, a su vez, la activación del factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF-6), que da lugar a que el factor de transcripción nuclear NF-κB se transloque al núcleo celular y active los promotores de genes que codifican una extensa gama de mediadores proinflamatorios [factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), IL-1β, IL-6 e IFN-γ] y antiinflamatorios [IL-10 y el factor de crecimiento transformante-β (TGF)]. La reacción inflamatoria es un componente esencial de los mecanismos de defensa del organismo; es el precio que hay que pagar para resolver la infección. En el hombre, la mayoría de los genes de las citocinas son polimórficos, y existe una evidencia creciente de que la producción de citocinas del paciente

está determinada genéticamente y, como consecuencia, la variabilidad en sus genes determina la complejidad y diversidad de las respuestas individuales frente a la infección.

1.4.2.1 Factor de necrosis tumoral.

El TNFα juega un papel clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria aguda tras un estímulo infeccioso y, por tanto, sus niveles tienen relevancia potencial en la evolución clínica. Por esta razón los polimorfismos de esta citocina han sido los más estudiados, habiéndose descrito más de una docena de SNP en el locus del TNF situado en el cromosoma 6, dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (16,38). El mejor estudiado de todos ellos es el *TNFα-308*, cuyo alelo A (transición de guanina por adenina en la posición *308* antes del comienzo de la transcripción) se asocia a incrementos significativos en la producción de la proteína. Este polimorfismo se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir diversas enfermedades infecciosas (48-49), si bien, una vez más, otros autores no han encontrado una asociación significativa entre este SNP y un incremento del riesgo de NAC o un peor pronóstico de la misma (50). Para explicar esta discrepancia, ha de tenerse en cuenta que este polimorfismo se encuentra en elevado *desequilibrio de ligamiento* con otros SNP de la región del promotor y de otros polimorfismos de genes vecinos, muchos de los cuales también tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria (37). Este es el caso del alelo A de la linfotoxina alfa *(LTA+250 A)* que casi siempre se asocia con un alelo G en la posición *TNFα-308* (51). El genotipo *LTA+250 AA* o *"TNF-β2"* (transición de guanina por adenina en el primer intrón), se ha asociado a niveles aumentados de TNF y a un mayor riesgo de shock séptico en pacientes hospitalizados por NAC (52). Por el contrario, la insuficiencia respiratoria en ausencia de shock se relacionó estrechamente con el genotipo *LTA+250 GG* , lo que sugiere que las disfunciones orgánicas utilizadas para establecer la existencia de sepsis grave pueden no tener la misma base genética que el shock séptico y que, por tanto, la sepsis grave no

puede definirse exclusivamente como una fase previa del desarrollo del shock séptico (52). La proximidad de los genes de TNF y de LTA a otros genes inmunológicamente importantes en la región adyacente del cromosoma 6, como los *loci* de HLA, del complemento y de las HSP, pueden complicar todavía más el análisis de los estudios de asociación.

1.4.2.2 Proteínas del shock térmico

Las HSP se expresan en respuesta al shock térmico y otros estímulos -como la endotoxina y otros mediadores de la sepsis grave- induciendo una respuesta proinflamatoria (53). Tres genes codifican proteínas de la familia HSP (HSP70): *HSPA1A*, *HSPA1B* y *HSPA1L*. Se ha encontrado una asociación significativa, mayor incluso que la mencionada anteriormente para *LTA+250*, entre el alelo A de *HSPA1B +1267* y el desarrollo de shock séptico en pacientes con NAC (54). Una vez más, estos dos polimorfismos están en *desequilibrio de ligamiento* y un análisis de haplotipos sugiere que el mayor riesgo de shock séptico existe cuando hay una adenina en las posiciones *+250* y *+1267* de LTA y HSPA1B, respectivamente. Lo que vuelven a subrayar estos datos es la importancia de conocer todos los polimorfismos relevantes en la respuesta inflamatoria más que la interpretación aislada de alguno de ellos.

1.4.2.3 Interleucina 1 e Interleucina 6.

La IL-1 también es una potente citocina proinflamatoria, liberada por los macrófagos en una fase temprana de la sepsis, que incrementa las concentraciones plasmáticas del factor de activación de las plaquetas, de las prostaglandinas y del óxido nítrico. Los polimorfismos *IL1β+3953* y *–511* influyen en los niveles de IL-1β, y aunque los estudios de asociación han mostrado hallazgos dispares, parece incuestionable el papel de los polimorfismos genéticos de la familia de genes de IL-1 en la sepsis (55-57). Por otra parte, la IL-6 es un marcador de gravedad y pronóstico de la

sepsis, aunque su relación causal no está del todo clara (58-59). El genotipo GG del polimorfismo *IL-6-174* se ha asociado a una mejor supervivencia en un estudio reciente en pacientes con sepsis grave (56), aunque esta asociación fue independiente de la respuesta sistémica de IL-6, lo que de nuevo sugiere que otros polimorfismos genéticamente relacionados con éste, puedan ser la causa primaria de los hallazgos. En un trabajo reciente de nuestro grupo, realizado en 822 pacientes con NAC, no observamos ninguna asociación entre el polimorfismo *-174G/C* de IL-6 y la susceptibilidad o gravedad de la NAC (60).

1.4.3 Polimorfismos implicados en la respuesta antiinflamatoria.

La evolución de la respuesta inflamatoria depende de varios factores, incluida la patogenicidad y la duración del estímulo, y también del equilibrio entre respuesta inflamatoria y antiinflamatoria. Las citocinas antiinflamatorias son responsables de la regulación a la baja de la inmunidad celular y humoral, que provoca un periodo de relativa inmunosupresión denominado inmunoparálisis o síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS). Los polimorfismos genéticos responsables de un CARS intenso o prolongado, pueden asociarse a las mismas consecuencias dramáticas que una respuesta inflamatoria incontrolada.

1.4.3.1 Interleucina 10.

La IL-10 es una proteína antiinflamatoria muy potente que suprime la función de los macrófagos e inhibe indirectamente la actividad de las células B (18). El gen humano de la IL-10 es altamente polimórfico. En la región del promotor se han descrito dos microsatélites *CA* y tres SNP en posiciones *–1082 (G/A); -819 (C/T)* y *-592 (C/A)*, que forman al menos tres haplotipos distintos (17). El haplotipo *GCC* del gen de IL-10 produce más IL-10 que el *ACC* y parece tener una menor

prevalencia en pacientes con fracaso multiorgánico (FMO) (61). Por otra parte, el efecto del haplotipo sobre la producción de la citocina parece depender de las características del patógeno. Se ha descrito una mayor frecuencia del alelo G de *IL-10-1082* en pacientes fallecidos con NAC (62), aunque, una vez más, otros estudios han encontrado resultados discrepantes (61, 63).

1.4.3.2 Antagonista del receptor de la Interleucina 1.

El antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN) representa el oponente antiinflamatorio fisiológico de la IL-1 y, por consiguiente, parece tener un efecto protector frente a los efectos adversos de una respuesta inflamatoria excesiva. Existe una región polimórfica en el intrón 2 del gen de IL-1RN que contiene un número variable de repeticiones en tándem. Los alelos de esta parte del gen de IL-1RN se denominan A1, A2, A3, A4 y A5, según el rango de frecuencias que presentan en la población sana. (64) Se ha sugerido que cuanto menor sea el número de secuencias repetidas, mayor es la producción de la proteína tras la estimulación con LPS. El alelo *IL-1RNA2* (dos repeticiones en tándem de la secuencia de pares de bases) se asocia a una mayor producción de IL-1RN y es más frecuente en pacientes con sepsis grave (57,64-65), aunque no parece implicar un peor pronóstico (64). Sin embargo, los individuos homocigotos para *LTA+250 A* e *IL-1RNA2* permiten identificar un grupo de individuos con una elevada mortalidad por sepsis (64).

1.4.3.3 Receptores del Factor de Necrosis Tumoral.

Los receptores 1 y 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR1 y TNFR2) modulan la actividad biológica del TNF-α y de la LT-α. Ambos receptores activan diferentes vías de transducción de señales, lo que explica que su función sea tan diversa y compartida. La señalización del TNFR2 no está bien caracterizada, pero se sabe que modula señales que promueven la reparación tisular y la angiogénesis. Además, se ha observado en cultivos celulares que el TNFR2 juega un papel en la

apoptosis, en la activación celular y en la migración de los neutrófilos (66). En estas circunstancias, el TNFR2 puede contribuir a incrementar la respuesta inflamatoria mediada por el TNFR1 (67).

Varios estudios han encontrado una asociación entre el SNP *TNFRSF1B +676* y la susceptibilidad a varias enfermedades inflamatorias como el lupus eritematoso sistémico (68), artritis reumatoide (69), y la enfermedad de Crohn (70). Un estudio reciente ha observado una asociación entre el SNP *TNFRSF1B-+676* y la respuesta al infliximab (71). El SNP *TNFRSF1B +676* es el resultado del cambio de una metionina por una arginina en el codon 196 *(M196R)* localizado en estrecha proximidad al lugar donde está localizada la diana de reconocimiento de la enzima de restricción, y ello resulta crucial para el corte y liberación del dominio externo del TNFR2, con la consiguiente pérdida de expresión y por tanto podría condicionar los niveles de TNFR2 soluble (72-73). Además, la variante *TNFR2-196R* codificada por el alelo G, se ha demostrado que tiene una menor capacidad de inducir la señalización del NF-κB vía TNFR2, conduciendo a una menor inducción de NF-κB y por tanto de genes involucrados en funciones anti-apoptóticas y proinflamatorias (67). En la actualidad, solo un estudio (74) ha investigado el papel del polimorfismo del receptor TNFR2 *(+676* y *+1663)* en 213 pacientes con sepsis grave. Los autores encontraron una correlación positiva entre el incremento de los niveles solubles de TNFR1 y TNFR2 y la disfunción orgánica, pero el SNP *TNFRSF1B* no influyó en los niveles solubles de TNFR2 ni en la susceptibilidad o pronóstico de la sepsis.

1.4.4 Otros polimorfismos de interés.

1.4.4.1 Enzima convertidora de la angiotensina.

La inserción/delección (I/D) de 250 pares de bases en el gen de la enzima conversora de la angiotensina *(ACE-DD)* se asocia con unos niveles disminuidos de bradikinina y sustancia P, lo que

disminuye el reflejo tusígeno e incrementa el riesgo de aspiración (16,75). Se ha descrito que el alelo ACE D es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de neumonía en pacientes ancianos (76), y para SDRA (75).

1.4.4.2 Proteínas del surfactante.

Las proteínas del surfactante (SP) son miembros de la familia de las colectinas secretadas por los neumocitos tipo II. Durante las infecciones pulmonares agudas, estas moléculas de la inmunidad innata pueden destruir, opsonizar y/o estimular la fagocitosis de los microorganismos y modular la inflamación pulmonar. Se conocen distintos polimorfismos en los genes de SP-A, B, C y D. El genotipo *SP-B +1580 CC* supone una variación timina/citosina en la posición *1580* en el exón 4, lo que condiciona un cambio de treonina a isoleucina en la cadena de aminoácidos de la proteína y determina una disminución de SP-B funcional (77,78). Recientemente se ha demostrado una significativa relación entre este SNP y el riesgo de shock séptico e insuficiencia respiratoria en pacientes con NAC (79).

1.4.4.3 Proteínas de la coagulación.

Inflamación y coagulación están íntimamente relacionadas. El factor tisular, producido por la adhesión de neutrófilos y por el daño celular, activa la cascada de la coagulación y estimula la respuesta inflamatoria. La proteína C activada inhibe este proceso a diferentes niveles, y existen mutaciones en el gen que la codifica que pueden determinar el riesgo de desarrollar una coagulación intravascular diseminada (80). También se ha estudiado un polimorfismo altamente prevalente del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), cuyos niveles elevados en suero determinan un estado de hipercoagulabilidad (81-82). Los individuos homocigotos para la ausencia de una guanina adicional (4G) tienen unos niveles de PAI-1 más elevados que los heterocigotos o con otros SNP, y

tienen un mayor riesgo de desarrollar shock séptico y muerte en ciertas infecciones (83-85). Otro SNP, esta vez en el gen del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina *(TAFI Thr325Ile)*, también se ha relacionado con mala evolución en algunas infecciones (86).

Como hemos visto hasta ahora, son varios los estudios que han investigado polimorfismos de un solo nucleótido en genes candidatos asociados con susceptibilidad, gravedad o pronóstico en pacientes con NAC. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido contradictorios y con frecuencia no se han podido reproducir los resultados iniciales. Resultados discrepantes han sido publicados para el TNF-α *(G-308A)*, TNF-α *(G-238A)*, y LTA (*A+252G*), que han sido asociados a la gravedad de la enfermedad y al pronóstico en algunos estudios (87-89) pero no en otros. (61,74,90). Asimismo, existe controversia acerca del papel que representan los SNP del gen *TNFRSF1B +676* y el de la IL1RN VNTR86pb (57,64,74).

Varios problemas metodológicos pueden explicar muchas de estas discrepancias, incluyendo el limitado poder estadístico, el estudio de poblaciones heterogéneas con factores de confusión no reconocidos, la definición inapropiada del fenotipo a estudio, la presencia de *desequilibrio de ligamiento* y la estratificación de la población (17-18).

2.- HIPÓTESIS

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar, en una amplia y étnicamente homogénea cohorte de pacientes con NAC, si los polimorfismos en los genes que codifican moléculas inflamatorias o antiinflamatorias [(*TNF -238* y *-308*, *LTA +252, IL6 -174*, *IL1RN 86bp* número variable de repeticiones en tandem y *TNFRSF1B +676 (TNFR2 M196Re)*] se asocian a la susceptibilidad, gravedad o pronóstico de la enfermedad.

3.- OBJETIVOS

3.1 Establecer si los polimorfismos localizados en los genes que codifican moléculas inflamatorias *(TNF-α -238, TNF-α -308, LT-α +252)* o antiinflamatorias *(IL-1 RN 86 pb VNRT , TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocian a una mayor susceptibilidad a la NAC. .

3.2 Determinar si los polimorfismos de los genes *TNF-α -238*, *TNF-α -308*, *LT-α +252, IL-1 RN 86 pb VNRT* o *TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocian a una mayor gravedad de la NAC.

3.3 Evaluar si los polimorfismos de los genes *TNF-α -238*, *TNF-α -308*, *LT-α +252, IL- 1 RN 86 pb VNRT* o *TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocian a peor pronóstico de la NAC.

4.- MATERIAL Y MÉTODO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

Estudio prospectivo realizado desde Enero de 2002 hasta Septiembre de 2007 en los siguientes hospitales españoles: Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín" de Las Palmas de Gran Canaria, Hospital Clínico y Universitario de Valencia y Hospital Universitario de La Princesa de Madrid. Se estudiaron todos los pacientes ingresados de forma consecutiva con el diagnóstico de NAC.

4.2 POBLACIÓN .

4.2.1. Criterios de inclusión.

Se incluyeron todos los pacientes adultos que ingresaron en los diferentes hospitales con el diagnóstico de NAC. Este diagnóstico se estableció si el paciente presentaba signos y síntomas de infección de las vías aéreas inferiores, junto con la existencia de un infiltrado radiológico de nueva aparición, y en ausencia de diagnósticos alternativos durante el seguimiento. Para cumplir el requisito de NAC, los pacientes no debían haber estado hospitalizados en los los diez días previos al episodio actual.

4.2.2. Criterios de exclusión.

Se excluyeron todos los pacientes con inmunodepresión grave, tales como inmunodeficiencias primarias, neutropenia significativa (<1,0 x 10^9 /L), o portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), trasplantados de médula ósea o de órgano sólido, o tratados con esteroides

sistémicos a dosis superiores a 20 mg de prednisona al día o su equivalente durante dos o más semanas. Los pacientes con NAC como episodio terminal de una enfermedad crónica y progresiva, tuberculosis, o neumonía obstructiva por neoplasia también fueron excluidos.

4.2.3. Grupo control.

El grupo control estaba constituído por donantes de sangre y/o médula ósea no relacionados genéticamente, procedentes de cada uno de los hospitales participantes en el estudio y que pertenecían al mismo grupo étnico.

4.3 DEFINICIONES.

La etiología de la neumonía se consideró de *presunción* si en una muestra de esputo válida se observaba una bacteria predominante. Se consideró *definitiva* cuando se obtenía un hemocultivo positivo para una bacteria u hongo patógenos sin otro foco aparente de infección; cuando se recuperaba un patógeno de muestras obtenidas con punción transtorácica o en líquido pleural; cuando se producía una seroconversión con aumento de al menos cuatro veces el título inicial de IgG para *Chlamydophila pneumoniae, Chlamydophila psittaci, Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* y virus respiratorios; cuando se obtenía un título inicial de IgM > 1:32 para *C. pneumoniae*, 1:80 para *C. burnetii*, y cualquier título para *M pneumoniae*; un antígeno urinario positivo para *Legionella pneumophila* o para *S pneumoniae*; recuentos > 10^3 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml en muestras de catéter telescopado o biopsia pulmonar y de > 10^4 ufc/ml en lavado broncoalveolar (LBA).

El diagnóstico de neumonía neumocócica no bacteriémica se basó en los resultados negativos de los hemocultivos extraídos antes de recibir tratamiento antibiótico en el hospital y al menos uno

de los siguientes criterios: 1) Claro predominio de cocos lanceolados Gram positivos agrupados en cadenas o en parejas, sin otros microorganismos en muestras de esputo o aspirados traqueobronquiales, que contuvieran más de 20 neutrófilos y menos de 10 células epiteliales escamosas por campo de bajo aumento; crecimiento significativo de *S pneumoniae* en el cultivo, sin otros patógenos probables; 2) líquido pleural con aislamiento de *S pneumoniae*; 3) antígeno urinario positivo para *S pneumoniae*; 4) crecimiento bacteriano de > 10^3 ufc/ml de *S pneumoniae* en especímenes de catéter telescopado, o biopsia pulmonar, y/o > 10^4 ufc/ml en LBA.

La neumonía neumocócica bacteriémica se definió como tal cuando hubiera al menos un hemocultivo positivo para *S pneumoniae*.

El diagnóstico de NAC grave se estableció cuando se cumplieran al menos dos de los siguientes criterios menores de la American Thoracic Society (ATS): Frecuencia respiratoria mayor de 30/minuto; insuficiencia respiratoria grave (PaO2/FiO2 < 250); afectación bilateral o afectación multilobular en la radiografía de tórax; presión arterial sistólica menor de 90 mm Hg; presión arterial diastólica menor de 60 mmHg; o al menos uno de los siguientes criterios mayores: necesidad de ventilación mecánica; incremento del tamaño de los infiltrados radiológicos sin respuesta clínica; necesidad de drogas vasoactivas durante más de 4 horas; creatinina sérica mayor de 2 mg/dl o incremento de más de 2 mg/dl en un paciente con enfermedad renal previa o fracaso renal agudo con necesidad de diálisis (3). Además, los pacientes fueron clasificados en función de su gravedad (sepsis, sepsis severa, shock séptico, fracaso multiorgánico) (91)

4.4 RECOGIDA DE DATOS

Los datos demográficos, clínicos y de laboratorio de pacientes y de controles fueron

recogidos, bien por entrevista directa con el paciente o mediante revisión de la historia clínica, usando una hoja de recogida de datos previamente diseñada a tal efecto. Se estableció la presencia o ausencia de los siguientes factores: lugar de residencia (asilo, domicilio o sin hogar), tabaquismo (paquetes/año), consumo de alcohol (g/día) u otras drogas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, bronquiectasias, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, enfermedad renal o hepática crónicas, enfermedad neurológica, sospecha de aspiración, disfunciones deglutorias, uso previo de betalactámicos, uso de glucocorticoides u otras drogas inmunosupresoras, infección por el VIH, enfermedad autoinmune, esplenectomía, neumonía o infecciones respiratorias previas, y hospitalizaciones en los últimos tres meses.

También se registraron las complicaciones que aparecieron en los siguientes 30 días de la presentación de la NAC. Estas incluyeron cualquier empeoramiento de las enfermedades de base del paciente y/o la presencia de shock (presión arterial sistólica menor de 90 mm Hg no corregida por líquidos intravenosos, o que requería medicación vasopresora); coagulación intravascular diseminada(CID); insuficiencia renal (creatinina sérica mayor de 1,5 mg/dl y/o urea mayor de 40 mg/dl en pacientes con función renal previa normal); insuficiencia respiratoria aguda grave ($PaO_2/FiO_2 < 300$ mm Hg, o < 200 mm Hg cuando se trataba de pacientes con EPOC); y metástasis sépticas (meningitis, empiema, artritis séptica, endocarditis, pericarditis purulenta, otitis). También se registró la necesidad de traslado del paciente a la UCI, la necesidad de ventilación mecánica y la mortalidad hospitalaria y atribuible. La duración del tratamiento antibiótico (oral e intravenoso), su adecuación de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (92) y la duración de la estancia hospitalaria también fueron recogidas.

La gravedad de la NAC en el momento de su presentación se evaluó mediante la regla de predicción de mortalidad a los 30 días desarrollada por Pneumonia Outcomes Research Team

(PORT) (9). En los pacientes con NAC grave y en los controles ingresados en UMI, se registró el Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE-II) Score (93) a su ingreso.

Al alta hospitalaria, se registraron tanto los días de estancia (hospitalaria y/o UCI) como la supervivencia o éxitus (relacionado o no con la neumonía). Se consideró enfermedad fatal a corto plazo a aquellos casos de enfermedad crónica grave o con mala calidad de vida previa en los que la neumonía formaba parte de un proceso terminal, siguiendo los criterios de McCabe y Jackson, (fallecimiento probable durante su estancia en el hospital) (94).

4.5 ESTUDIO GENÉTICO.

4.5.1. Determinaciones genéticas.

La extracción de ADN así como el tipaje de los genes *TNF-α, LT-α, IL-1 RN* y *TNF R2* se realizaron en la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria.

4.5.2. Extracción de ADN genómico.

De cada individuo a estudio se obtuvo una muestra de entre 5 y 10 ml de sangre periférica, que se procesó según protocolo el protocolo estándar de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) por fenol-cloroformo (modificado de Blin y Stafford) (95).

Para el aislamiento y lavado de los leucocitos, a la sangre total de cada individuo se le añadieron 50 mL de tampón de lisis de células rojas (SLR), y se centrifugó a 1.800 revoluciones por miuto (rpm) durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado

dos veces más.

Los leucocitos se lisaron resuspendiendo el precipitado resultante en 4 ml de solución de lisis e incubando en agitación a 42ºC hasta el día siguiente. Tras este paso, se añadieron 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se puso en agitación 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a continuación 10 minutos a 3000 rpm. La fase superior resultante se pasó a otro tubo y se repitió el proceso, desechándose la fase inferior. Para el siguiente paso, se añadieron 4 ml de cloroformo-isoamílico a la fase superior y se puso en agitación a temperatura ambiente durante 7 minutos, tras lo cual se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm. De nuevo se rescató la fase superior y se repitió el proceso. Se añadieron 200 ml de NaCl 3M y 4 ml de isopropanol, mezclando suavemente por inversión hasta la aparición del precipitado. Dicho precipitado se extrajo a otro tubo y se lavó durante 30 minutos en etanol al 70% frío, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Una vez seco, se añadieron 500 ml de té 1/0.1 y se puso a rotar en agitador orbital en días sucesivos hasta su resuspensión.

A los ADN así resuspendidos se les midió tanto su concentración como su pureza mediante espectrofotometría, ajustándose la concentración a 100 ng/L mediante adición de tampón TE (TRIS/EDTA) 1/0.1.

4.5.3 Genotipado.

Para la determinación de las variantes de los genes *TNF -238 (rs 361525), TNF -308 (rs 1800629) y LTA +252 (rs909253)* se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real según metodología previamente publicada (96). El genotipado para el *TNFRSF1B +676 (M196R; rs1061622)*, y el *VNTR de 86 pares de bases en el intrón 2 de IL1RN*, se

realizó llevando a cabo modificaciones menores de procedimientos descritos con anteriorodad (97-99). La exactitud del genotipado de los diferentes SNPs se confirmó mediante secuenciación directa en un secuenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Los alelos de el *VNTR 86bp* se denominan según la frecuencias observadas en sujetos sanos. Los alelos 1, 2, 3, 4 y 5 presentan cuatro repeticiones, dos repeticiones, cinco repeticiones, tres repeticiones y seis repeticiones de un fragmento de 86 pares de bases (pb).

La amplificación se realizó en un termociclador 9600 (Perkin Elmer) según el siguiente protocolo: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95ºC; 36 ciclos de 60s a 95ºC, 60s a 63ºC y 60s a 72ºC; 15 minutos de extensión final a 72ºC.

Para la identificación de las secuencias amplificadas, el volumen total de amplificado fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2%, junto con un marcador de peso molecular, y teñido con bromuro de etidio. Las bandas resultantes se visualizaron con luz ultravioleta.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica. Se obtuvo el consentimiento informado del paciente o de sus familiares. Los datos obtenidos en este estudio se adhieren a los principios enunciados en la Declaración de Helsinki.

4.7 TAMAÑO MUESTRAL.

El cálculo del tamaño muestral necesario para detectar diferencias significativas entre el

grupo de casos y controles, desconociendo la frecuencia de los genotipos en el grupo de casos, se realizó mediante un contraste bilateral de homogeneidad entre la frecuencia en el grupo de controles (Pco) y en el grupo de casos (Pca). Si consideramos un error tipo I (a = 5%) y un error tipo II (B = 20%), el tamaño muestral debe ser:

$$N> [(Za/2 + Zb) V(Pco(1-Pco)] + [Pca (1-Pca) 2 / Pca - Pco]^2$$

Lo que representa 350 individuos en cada grupo de casos y controles.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las frecuencias génicas y genotípicas observadas se determinaron por recuento directo en cada grupo de estudio. El equilibrio de Hardy-Weinberg para cada SNP, así como el *desequilibrio de ligamiento* (LD,D') fueron calculados mediante la versión 3,11 del software Arlequin. Las variables cuantitativas se expresan mediante medias aritméticas ± SEM. La distribución de los genotipos se comparó usando el test χ^2 o el test exacto de Fisher cuando era necesario, y se calcularon los odds ratios (OR) con los intervalos de confianza (IC) al 95%. La relación entre la gravedad y el pronóstico y los genotipos se evaluó mediante modelos binarios de regresión logística. La edad, el sexo, el hospital de procedencia y las comorbilidades fueron incluídas como variables independientes en el análisis multivariante. Las tasas de supervivencia se estimaron usando el método Kaplan-Meier, y su comparación con los genotipos fue realizado por medio de test log-rank. Se llevó a cabo análisis multivariante ajustado por edad, sexo, hospital de procedencia y comorbilidades empleando el modelo proporcional de Cox. El análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS 15,0 (SPSS, Inc, Chicago, Ill).

5.- RESULTADOS

5.1 DESCRIPCION DE LAS POBLACIONES.

5.1.1 Grupo control.

El grupo control estaba constituido por 1413 voluntarios sanos. Su edad media era de 49,04 ± 17,40 años. El número de pacientes varones era de 804 (56,9 %). La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo de controles se muestra en las tablas 1 y 2. Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados en el grupo control se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg. Se observó que los polimorfismos *TNF -308, -238* y el *LTA +252* se encontraban en *desequilibrio de ligamiento* (LD) en el grupo control (D' para los pares de SNP *TNF -238/-308*, *TNF -238/LTA +252* y *TNF -308/LTA +252* fueron 0,87, 0,79 y 0,85 respectivamente ($p<0,001$ para los tres análisis).

5 .1.2 Grupo de neumonías.

Este grupo estaba constituido por 1162 pacientes de raza caucásica y de origen español. La edad media era de 63,73 ± 17,82 años. El número de varones era de 763 pacientes, que corresponde a un 65,6 % de la población.

Las características demográficas de los pacientes se describen en las Tablas 3 y 4. En 265 (22,8%) de los pacientes el cuadro clínico fue de suficiente gravedad como para precisar el ingreso en la UCI, y 245 (21% de la población estudiada) requirió ventilación mecánica.

Los pacientes con NAC desarrollaron durante su ingreso las complicaciones descritas en la Tabla 4.

5.2 MICROBIOLOGÍA.

No se pudo identificar el microorganismo responsable en 521 individuos, lo que corresponde al 45,9% de las NAC. Los microorganismos más frecuentes fueron: *Streptococcus pneumoniae* 288 casos (26%, 46,9% de las NAC documentadas), *Pseudomonas aeruginosa* 26 casos (2,4%), *Legionella pneumophila* 19 casos (1,6%), *Staphylococcus aureus* 19 casos (1,6%), *Haemophilus influenzae* 17 casos (1,4%), *Klebsiella pneumoniae* 15 casos (1,2%), *Chlamydophila pneumoniae* 12 casos (1,0%), *Escherichia coli* 8 casos (0,5%) y virus influenza A 6 casos (0,5%). Cabe destacar además que en 107 neumonías el aislamiento se produjo en hemocultivos, lo que corresponde al 9,2% de las mismas. Dentro de las neumonías neumocócicas, 63 casos (21,8%) fueron bacteriémicas. La etiología fue mixta en 18 individuos (1,5%).

El tratamiento antibiótico empírico se ajustó a las normativas sugeridas por la ATS/IDSA en el 95% de los pacientes. La mortalidad de estos pacientes fue del 4,16% en comparación con el 7,17% en el grupo de pacientes cuyo tratamiento antibiótico no siguió dichas normativas.

No se observaron diferencias en cuanto a la proporción de tratamiento antibiótico apropiado cuando se estratificó a los pacientes en base a la gravedad de la enfermedad o al pronóstico: 95,2% y 93,0% para los pacientes con sepsis grave y shock séptico respectivamente; insuficiencia respiratoria 95,6%, ARDS 97,7% y mortalidad a los 90 días 98,6%.

Tabla 1.- Frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados en pacientes con NAC y en Grupo Control.

	NAC	Controles
TNF -238	**N=1135**	**N=1172**
G/G	976 (85,9)	1016 (86,69)
G/A	151 (13,30)	153 (13,05)
A/A	8 (0,71)	3 (0,26)
TNF -308	**N=1136**	**N=1152**
G/G	856 (75,35)	870 (75,52)
G/A	258 (22,1)	260 (22,57)
A/A	22 (1,94)	22 (1,91)
LTA +252	**N=1120**	**N=1228**
A/A	566 (50,54)	621 (50,57)
A/G	471 (42,05)	511 (41,61)
G/G	83 (7,41)	96 (7,82)
TNFRSF1B	**N=1107**	**N=1071**
T/T	677 (61,16)	636 (59,38)
T/G	379 (34,24)	381 (35,57)
G/G	51 (4,61)	54 (5,04)
IL1RN VNTR	**N=1152**	**N=1223**
1/1	576 (50,00)	587 (48,00)
½	416 (36,11)	481 (39,33)
1/3	31 (2,69)	30 (2,45)
¼	6 (0,52)	12 (0,98)
1/5	2 (0,17)	1 (0,16)
2/2	107 (9,29)	97 (7,93)
2/3	9 (0,78)	11 (0,90)
2/4	3 (0,26)	3 (0,25)
3/3	2 (0,17)	1 (0,08)

N: Número de pacientes (%), NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad.
TNF: Factor de Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina-α; *TNFRSF1B:* Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral-α; *IL1RN VNTR*: Número Variable de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de IL-1.

Tabla 2- . Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en pacientes con NAC y en el Grupo Control.

	NAC	Controles
TNF -238	**N= 2270**	**N= 2344**
G	2103(92,64)	2185 (93,21)
A	167 (7,35)	159 (6,78)
TNF -308	**N= 2272**	**N= 2304**
G	1970 (8,67)	2000 (90,74)
A	302 (13,29)	304 (13,79)
LTA +252	**N= 2240**	**N= 2456**
A	1603 (71,55)	1753 (71,78)
G	637 (28,43)	703 (28,62)
TNFRSF1B	**N= 2214**	**N= 2142**
T	1733 (78,27)	1653 (77,17)
G	481 (21,68)	489 (22,82)
IL1RN VNTR	**N= 2304**	**N= 2446**
1	2107 (77,55)	1698 (6,94)
2	642 (23,62)	289 (11,81)
3	44 (1,61)	43 (1,75)
4	9 (0,33)	15 (0,61)
5	2 (0,0)	1 (0,04)

N: Número de pacientes (%). NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad.
TNF*:* Factor de Necrosis Tumoral-α; LTA: Linfotoxina-α; TNFRSF1B*:* Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral-α; *IL1RN VNTR:* Número Variable de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de IL-1.

Tabla 3. Datos demográficos y clínicos de pacientes con NAC.

Características	n (%)
Edad	63,73 ± 17,82 *
Sexo	
Varón	763 (65,6)
Mujer	399 (34,3)
Co-morbilidad†	
No	390 (33,5)
EPOC	332 (28,5)
Asma	58 (4,9)
Neoplasia	128 (11,0)
Cardiopatía isquémica	125 (10,7)
Diabetes	264 (22,7)
Insuficiencia renal	92 (7,9)
Insuficiencia hepática	67 (5,7)
Enfermedad neurológica	157 (13,5)
Enfermedad autoinmune	33 (2,8)
Enfermedad psiquiátrica	8 (0,6)
Ingreso UCI	
No	897 (77,2)
Sí	265 (22,8)
Índice gravedad neumonía	
I-III (bajo)	523 (45,0)
IV-V (moderado-alto)	639 (55,0)

* media ± desviación estándar.

† Algunos pacientes presentaban más de una comorbilidad. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad.

Tabla 4. Datos demográficos y clínicos de pacientes con NAC.

Características	n (%)
Insuficiencia renal aguda	
No	874 (75,3)
Sí	288 (24,7)
Insuficiencia respiratoria aguda	
No	394 (33,9)
Sí	768 (66,1)
SDRA	
No	1115 (96,0)
Sí	47 (4,0)
Bacteriemia	
No	1055 (90,8)
Sí	107 (9,2)
SEPSIS	
Sepsis no grave	837 (72,0)
Sepsis grave	160 (13,8)
Shock séptico	165 (14,2)
SDMO	
No	1021 (87,9)
Sí	141 (12,1)
Mortalidad 28 días	
No	1104 (95,0)
Sí	58 (5,0)
Mortalidad a 90 días	
No	1082 (93,1)
Sí	80 (6,9)

NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad ; SDRA: Síndrome de Distres Respiratorio Agudo; SDMO: Síndrome de Disfunción Multiorgánica; Sepsis no graves: pacientes sin sepsis grave ni shock séptico.

5.3 ESTRATIFICACIÓN POR GRAVEDAD.

5.3.1 Escala de Gravedad de la Neumonía [Pneumonia Severity Score (PSI)].

La gravedad de la NAC al ingreso, evaluada según la puntuación PSI se muestra en la Tabla 5. La puntuación media de los pacientes era de 97,3 puntos, con un rango de 19 a 218 puntos.

Tabla 5.- Distribución de los pacientes con NAC según los rangos del Índice de Gravedad de la Neumonía, al ingreso hospitalario.

RANGO PSI*	NÚMERO
1	72 (6,3%)
2	179 (15,8%)
3	263 (23,2%)
4	422 (37,2%)
5	199 (17,6%)

Los valores son expresados en número y porcentaje (%) de individuos.

*PSI: Pneumonia Severity Score.
Clase 1 y Clase 2: ≤ 70 puntos.
Clase 3: 71-90 puntos.
Clase 4: 91-130 puntos.
Clase 5: > 130 puntos.

5.3.2 Escala APACHE II.

La puntuación APACHE II en los 265 pacientes que fueron ingresados en UCI, ofreció una media de 21.6 puntos y un rango de 8 a 42 puntos.

5.3.3 Estratificación de la sepsis.

Del total de 1.162 pacientes con NAC, 837 (72,2 %) no presentaban signos de sepsis grave, 160 (13,8%) presentaban sepsis grave y , 165 (14,2%) presentaron shock séptico.

5.4 SUSCEPTIBILIDAD.

Para evaluar la posible susceptibilidad al desarrollo de NAC, se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas observadas en los pacientes con NAC con aquéllas observadas en el Grupo Control. Para determinar el correcto análisis de las poblaciones se determinó que las poblaciones se encontraran en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas ni genotípicas entre el grupo de pacientes y de controles (Tablas 1 y 2).

5.5 COMPLICACIONES.

5.5.1 Sepsis, sepsis grave y shock séptico.

Se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de pacientes que desarrollaron estas complicaciones frente a los que no las desarrollaron. No se observaron diferencias significativas en lo concerniente a los polimorfismos *TNF-α-238, TNF-α-308, LT-α +252, IL-1 RN 86 pb VNRT o TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* (Tablas 6 y 7).

5.5.2 Insuficiencia renal aguda.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas o alélicas entre los pacientes que desarrollaron insuficiencia renal y los que no la desarrollaron (Tablas 8 y 9).

5.5.3 Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de pacientes que desarrolló SDRA frente a los que no lo desarrollaron, no se apreciaron diferencias significativas (Tablas 8 y 9). Sin embargo, se observó que los pacientes portadores del alelo G del *TNFRSF1B +676* presentaban mayor riesgo de desarrollar SDRA, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (p = 0,085, OR = 1,68, IC 95% 0,88-3,21).

5.5.4 Bacteriemia.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos o alelos de los pacientes que presentaron bacteriemia, en comparación con los que no presentaron esta complicación (Tablas 8 y 9).

5.5.5 Fracaso multiorgánico.

La distribución de frecuencias genotípicas y alélicas en el grupo de pacientes que presentó Fracaso Multiorgánico no fue significativamente diferente de las observadas en los pacientes que no desarrollaron esta complicación (Tablas 8 y 9). Sin embargo, se observó que los individuos

homocigotos para el alelo *LTA +252A* tenían una tendencia a presentar mayor riesgo de disfunción multiorgánica (p = 0,048, OR= 1,44, IC 95% 0,99-2,12). Asimismo los pacientes portadores del alelo G del *TNFRSF1B +676* presentaban mayor riesgo de desarrollar disfunción multiorgáni ca(tabla 9), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (p = 0,048, OR = 1,43, IC 95% 0,98-2,07).

5.5.6 Mortalidad.

Se comparó la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de pacientes supervivientes y fallecidos. No se observaron diferencias significativas para los polimorfismos *TNF-α -238, TNF-α -308, LT-α + 252,* e *IL-1 RN 86 pb VNRT* (Tabla 8).

Al analizar el SNP *TNFRSF1B +676* con respecto a la mortalidad a los 28 días, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los genotipos del *TNFRSF1B +676 G/T* (p = 0,0129 en el análisis 3 x 2). Sin embargo, se apreció un efecto protector frente a un desenlace fatal del genotipo heterocigoto en comparación con el homocigoto para los alelos T y G (p = 0,006, OR = 0,39, IC 95% 0,17-0,8) y p = 0,026, OR = 0,55. IC 95% 0,30-0,95 para la morta lidad a 28 y 90 días respectivamente. Se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se cuencial a los 15, 28 y 90 días en toda la población de pacientes con NAC, teniendo en cuenta los tres diferentes genotipos del *TNFRSF1B +676* (figura 1). El análisis de regresión de Cox ajustado por edad, sexo, hospital de procedencia y comorbilidad mostró que los pacientes con genotipo GT tenían menor mortalidad en comparación con aquellos pacientes con genotipo GG+TT (p = 0,02; HR 0,53; 95% IC 0,31-0,90 para la supervivencia a los 90 días; p = 0,01; HR 0,41; IC 95% 0,21-0,81 para la supervivencia a los 28 días y p = 0,049; HR 0,48; IC 95% 0,23-0,997 para la supervivencia a los 15 días) (Fig. 2).

Tabla 6.- Asociación entre genotipo y gravedad de la enfermedad.

	SEPSIS		
	Sepsis no grave	Sepsis grave	Shock séptico
TNF -238 ***(N = 1135)***			
G/G	694 (85)	138 (86,25)	144 (90)
G/A	117 (14,4)	20 (12,5)	14 (8,75)
A/A	4 (0,5)	2 (1,25)	2 (1,25)
TNF -308 ***(N = 1136)***			
G/G	610 (77,6)	124 (77,5)	122 (76,2)
G/A	188 (23,9)	35 (21,8)	35 (21,8)
A/A	18 (2,2)	1 (0,6)	3 (1,8)
LTA +252 ***(N = 1120)***			
A/A	400 (49,7)	79 (50,3)	87 (54,7)
A/G	343 (42,6)	64 (40,7)	64 (40,2)
G/G	61 (7,5)	14 (8,9)	8 (5,0)
TNFRSF1B +676 ***(N = 1107)***			
T/T	478 (60,8)	104 (65,0)	95 (59,0)
T/G	272 (34,6)	50 (31,2)	57 (35,4)
G/G	36 (4,5)	6 (3,7)	9 (5,5)
IL1RN VNTR 86pb ***(N = 1152)***			
1/1	423 (51,0)	72 (45,0)	81 (49,3)
1/2	300 (36,2)	61 (38,1)	55 (33,5)
1/3	14 (1,6)	11 (6,8)	6 (3,6)
1/4	3 (0,3)	1 (0,6)	2 (1,2)
1/5	2 (0,2)	0 (0)	0 (0)
2/2	77 (9,2)	13 (8,1)	17 (10,3)
2/3	5 (0,6)	1 (0,6)	3 (1,8)
2/4	2 (0,2)	1 (0,6)	0 (0)
3/3	2 (0,2)	0 (0)	0 (0)

Número y porcentaje de pacientes. N: pacientes con datos disponibles. *TNF:* Factor de Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina-α; *TNFRSF1B:* Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral-α*; IL1RN VNTR*: Número Variable de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de la IL-1.

Tabla 7.- Asociación entre alelos y gravedad de la enfermedad.

	SEPSIS		
	Sepsis no grave	Sepsis grave	Shock séptico
TNF -238 *(N= 2270)*			
G	1515 (93,49)	296 (92,5)	302 (100,6)
A	125 (7,66)	24 (7,5)	18 (6)
TNF -308 *(N= 2272)*			
G	1408 (98,32)	283 (88,4)	179 (55,93)
A	224 (15,64)	37 (11,56)	41 (12,81)
LTA +252 *(N= 2240)*			
A	1143 (71,08)	222 (70,7)	238 (74,84)
G	465 (28,92)	92 (29,29)	80 (25,15)
TNFRSF1B +676 *(N= 2214)*			
T	1228 (78,11)	258 (80,62)	247 (76,7)
G	344 (22,51)	62 (19,37)	75 (23,29)
IL1RN VNTR 86pb *(N= 2304)*			
1	1165 (70,35)	217 (67,81)	225 (68,62)
2	161 (97,28)	89 (27,81)	92 (28,04)
3	23 (1,38)	12 (3,75)	9 (2,75)
4	5 (0,3)	2 (0,62)	2 (0,6)
5	2 (0,12)	0 (0)	0 (0)

Los datos representan número y porcentaje de pacientes.
N : número de pacientes con datos disponibles.
Nomenclatura de genes*: TNF:* Factor de Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina- α; *TNFRSF1B:* Receptor-2 del Factor de Necrosis Tumoral-α*; IL1RN VNTR*: Número Variable de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de la IL-1.

Tabla 8.- Asociación entre genotipo y complicaciones de la NAC.

	IRnA		SDMO		SDRA		Bacteriemia	
	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí
TNF -238 (N = 1135)								
G/G	736 (86,5)	237 (84,6)	857 (85,9)	119 (86,2)	880 (86,4)	39 (84,8)	888 (86,2)	84 (83,2)
G/A	111 (13)	39 (13,9)	134 (13,4)	17 (12,3)	132 (13)	6 (13)	134 (13)	17 (16.8)
A/A	4 (0,5)	4 (1,4)	6 (0,6)	2 (1,4)	7 (0,7)	1 (2,2)	8 (0,8)	0 (0)
TNF -308 (N = 1136)								
G/G	632 (74,3)	223 (79,4)	747 (74,8)	109 (78,9)	769 (75,4)	40 (87)	780 (75,7)	74 (73,3)
G/A	192 (23,4)	56 (19,9)	230 (23,0)	28 (20,2)	231 (22,6)	6 (13)	229 (22,2)	27 (26,7)
A/A	20 (2,4)	2 (0,7)	21 (2,1)	1 (0,7)	20 (2)	0 (0)	22 (2,1)	0 (0)
LTA +252 (N = 1120)								
A/A	42 (50,1)	145 (52,5)	487 (49,4)	79 (58,5)*	508 (50,5)	27 (58,7)	518 (50,9)	46 (46,5)
A/G	355 (42,3)	112 (40,6)/	421 (42,7)	50 (37,0)	423 (42)	18 (39,1)	421 (41,4)	49 (49,5)
G/G	64 (7,6)	19 (6,9)	77 (7,8)	6 (4,4)	75 (7,5)	1 (2,2)	78 (7,7)	4 (4)
TNFRSF1B +676 (N = 1107)								
T/T	502 (61,1)	174 (61,9)	602 (62,2)	75 (53,5)	621 (62,6)	22 (48,9)	613 (61,2)	62 (60,8)
T/G	281 (34,2)	95 (33,8)	322 (33,2)	57 (40,7) †	328 (33,1)	20 (44,4)	344 (34,4)	33 (32,4)
G/G	39 (4,7)	12 (4,3)	43 (4,4)	8 (5,7) †	43 (4,3)	3 (6,7)	44 (4,4)	7 (6,9)
IL1RN VNTR 86pb (N = 1152)								
1/1	444 (51,4)	130 (45,8)	504 (49,8)	72 (51,0)	517 (50)	19 (40,4)	522 (50)	52 (50)
½	306 (35,4)	108 (38)	366 (36,2)	50 (35,4)	372 (35,9)	19 (40,4)	374 (35,.8)	40 (38,5)
1/3	21 (2,4)	10 (3,5)	26 (2,2)	5 (3,5)	27 (2,6)	4 (8,5)	27 (2,6)	4 (3,8)
¼	4 (0,5)	2 (0,7)	5 (2,5)	1 (0,7)	4 (0,4)	1 (2,1)	6 (0,6)	0 (0)
1/5	2 (0,2)	0 (0)	2 (0,1)	0 (0)	2 (0,2)	0 (0)	2 (0,2)	0 (0)
2/2	77 (8,9)	30 (10,6)	97 (9,5)	10 (7,08)	100 (9,7)	3 (6,4)	99 (9,5)	8 (7,7)
2/3	5 (0,6)	4 (1,4)	6 (0,5)	3 (2,1)	9 (0,9)	0 (0)	9 (0,9)	0 (0)
2/4	3 (0,3)	0 (0)	3 (0,2)	0 (0)	2 (0,2)	1 (2,1)	3 (0,3)	0 (0)
3/3	2 (0,2)	0 (0)	2 (0,1)	0 (0)	2 (0,2)	0 (0)	3 (0,2)	0 (0)

Nº de pacientes y porcentajes; IRnA: Insuficiencia Renal Aguda; SDMO: Síndrome de Disfunción Multiorgánica; SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo; *TNF:* Factor de Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina-α; *TNFRSF1B:* Receptor 2 de TNF-α; *IL1RN VNTR*: Nº de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de IL-1. * *A/A vs A/G + G/G*; p = 0,048, OR= 1,44, IC 95% 0,99-2,12.

Tabla 9.- Asociación entre alelos y complicaciones de la NAC.

	IRnA		SDMO		SDRA		Bacteriemia	
	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí
TNF -238 *(N= 2270)*								
G	1583 (93)	313 (55,8)	1848 (92,67)	255 (92,39)	1892 (93,02)	84 (91,19)	1810 (87,86)	185 (91,73)
A	119 (6,99)	47 (8,39)	146 (7,32)	21 (7)	146 (7,16)	8 (8,69)	150 (7,8)	17 (8,41)
TNF -308 ***(N= 2272)***								
G	1463 (85,95)	502 (89,32)	1724 (86,42)	246 (89,13)	1769 (86,71)	86 (94,11)	1789 (86,76)	175 (86,63)
A	239 (14,04)	60 (10,67)	272 (13,61)	30 (10,86)	271 (13,28)	6 (6,52)	273 (13,23)	27 (13,36)
LTA +252 *(N= 2240)*								
A	1197 (71,25)	402 (72,82)	1395 (70,3)	208 (77)	1439 (7,.52)	72 (78,25)	1457 (71,.63)	141 (71,21)
G	483 (28,81)	150 (27,17)	575 (29,19)	62 (26,6)	573 (28,47)	20 (21,73)	577 (28,36)	57 (28,84)
TNFRSF1B +676 *(N= 2214)*								
T	1285 (78,16)	443 (78,82)	1526 (78,9)	207 (73,92)	1570 (79,13)	64 (71,11)	1570 (78,42)	157 (76,9)
G	359 (21,83)	119 (21,34)	408 (21,09)	73* (26,07)	414 (20,86)	26 (28,88)	432 (21,57)	47 (23)
IL1RNVNTR *(N = 2304)*								
1	1211 (74,39)	380 (66,91)	1407 (7,27)	200 (70,92)	1439 (7.1)	62 (65,95)	1453 (69,58)	148 (71,17)
2	468 (28,8)	172 (30,28)	569 (28,14)	73 (25,87)	583 (28,11)	26 (26,67)	584 (28,49)	56 (26,92)
3	30 (21,84	14 (2,5)	36 (1,78)	8 (2,83)	40 (1,93)	4 (4,25)	40 (1,91)	4 (1,92)
4	7 (0,4)	2 (0,35)	8 (0,39)	1 (0,35)	6 (0,28)	2 (2,12)	9 (0,43)	0 (0)
5	2 (0,2)	0 (0)	2 (0,09)	0 (0)	2 (0,09)	0 (0)	2 (0,09)	0 (0)

Datos representan número de pacientes y porcentajes.
N : número de pacientes con datos disponibles. IRnA: Insuficiencia Renal Aguda; SDMO: Síndrome de Disfunción Multiorgánica; SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo; *TNF:* Factor Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina-α; *TNFRSF1B:* Receptor 2 de TNF-α; *IL1RN VNTR*: Número Variable de Repeticiones en Tandem en el Antagonista del Receptor de IL-1
* p = 0,048, OR = 1,43, IC 95% 0,98-2,07

Tabla 10.- Asociación entre genotipo y mortalidad.

	Mortalidad 28 días		Mortalidad 90 días	
	No	Sí	No	Sí
TNF -238 (N = 1135)				
G/G	927 (85,9)	49 (85,9)	908 (85,9)	68 (86,0)
G/A	144 (13,3)	7 (12,2)	142 (13,5)	9 (11,3)
A/A	7 (0,6)	1 (1,7)	6 (0,5)	2 (2,5)
TNF -308 (N = 1136)				
G/G	812 (75,2)	44 (77,1)	794 (75,1)	6 (78,4)
G/A	245 (22,7)	13 (22,8)	24 1(22,8)	17 (21,)
A/A	22 (2,0)	0 (0)	22 (2,0)	0 (0)
LTA +252 (N = 1120)				
A/A	539 (50,7)	27 (47,3)	527 (50,6)	39 (49,3)
A/G	446 (41,9)	25 (43,8)	436 (41,8)	35 (44,3)
G/G	78 (7,3)	5 (8,7)	78 (7,4)	5 (6,3)
TNFRSF1B +676 (N = 1107)				
T/T	635 (60,4)	42 (73,6)	622 (60,5)	55 (69,6)
T/G	369 (35,1)	10 (17,5)	361 (35,1)	18 (22,7)
G/G	4 (4,3)	5(8,7)	45 (4,3)	6 (7,5)
IL1RN VNTR 86pb (N = 1152)				
1/1	545 (49,8)	31 (53,4)	537 (50,0)	39 (48,7)
½	393 (35,9)	23 (39,6)	381 (35,5)	35 (43,7)
1/3	30 (2,7)	1 (1,7)	29 (2,7)	2 (2,5)
2/4	5 (0,4)	1 (1,7)	5 (0,4)	1 (1,2)
1/5	2 (0,4)	0 (0)	2 (0,1)	0 (0)
2/2	105 (9,5)	2 (3,4)	104 (9,7)	3 (3,7)
2/3	9 (0,8)	0 (0)	9 (0,8)	0 (0)
2/4	3 (0,2)	0 (0)	3 (0,2)	0 (0)
3/3	2 (0,1)	0 (0)	2 (0,1)	0 (0)

Los datos expresan número de pacientes y porcentajes .
N : número de pacientes con datos disponibles. Nomenclatura de genes: *TNF:* Factor de Necrosis Tumoral-α; LTA: Linfotoxina- α; *TNFRSF1B:* Receptor- 2 del Factor de Necrosis Tumoral-α; *IL1RN VNTR*: Número Variable de Repeticiones en Tandem en Antagonista del Receptor de Interleukina-1 *‡ *T/G vs T/T + G/G*; p = 0,006, OR = 0,39, IC 95% 0,17-0.8 y p = 0,026, OR = 0,55, IC 95% 0,30-0,95 para mortalidad a los 28 días y a los 90 días respectivamente.

Tabla 11.- Asociación entre alelos y mortalidad.

	Mortalidad 28 días		Mortalidad 90 días	
	No	Sí	No	Sí
TNF -238 *(N= 2270)*				
G	1998 (92,2)	105 (54,12)	1958 (92,7)	145 (92,78)
A	158 (7,33)	9 (4,63)	154 (7,29)	13 (8,29)
TNF -308 *(N= 2272)*				
G	1869 (86,6)	101 (88,59)	1839 (86,99)	141 (89,24)
A	289 (13,39)	13 (11,4)	285 (17,73)	17 (10,75)
LTA +252 *(N= 2240)*				
A	1524 (71,73)	79 (64,29)	1490 (71,5)	113 (71,58)
G	602 (27,84)	35 (30,7)	592 (28,43)	45 (28,54)
TNFRSF1B +676 *(N= 2214)*				
T	1639 (78,04)	94 (82,45)	1605 (78,06)	128 (81,64)
G	461 (21,9)	20 (17,54)	451 (21,93)	30 (18,41)
IL1RN VNTR 86pb *(N= 2304)*				
1	1520 (69,92)	87 (75)	1491 (69,54)	116 (72,12)
2	615 (28,1)	27 (23,27)	601 (2,84)	44 (27,5)
3	43 (1,96)	1 (0,86)	42 (1,95)	2 (1,25)
4	8 (0,36)	1 (0,86)	8 (0,37)	1 (0,62)
5	2 (0,03)	0 (0)	2 (0,09)	0 (0)

Los datos expresan Nº de pacientes y porcentajes; *TNF:* Factor de Necrosis Tumoral-α; *LTA:* Linfotoxina- α; *TNFRSF1B:* Receptor-2 de TNF-α; *IL1RN VNTR*: Número de Repeticiones en Tandem del Antagonista del Receptor de IL-1.

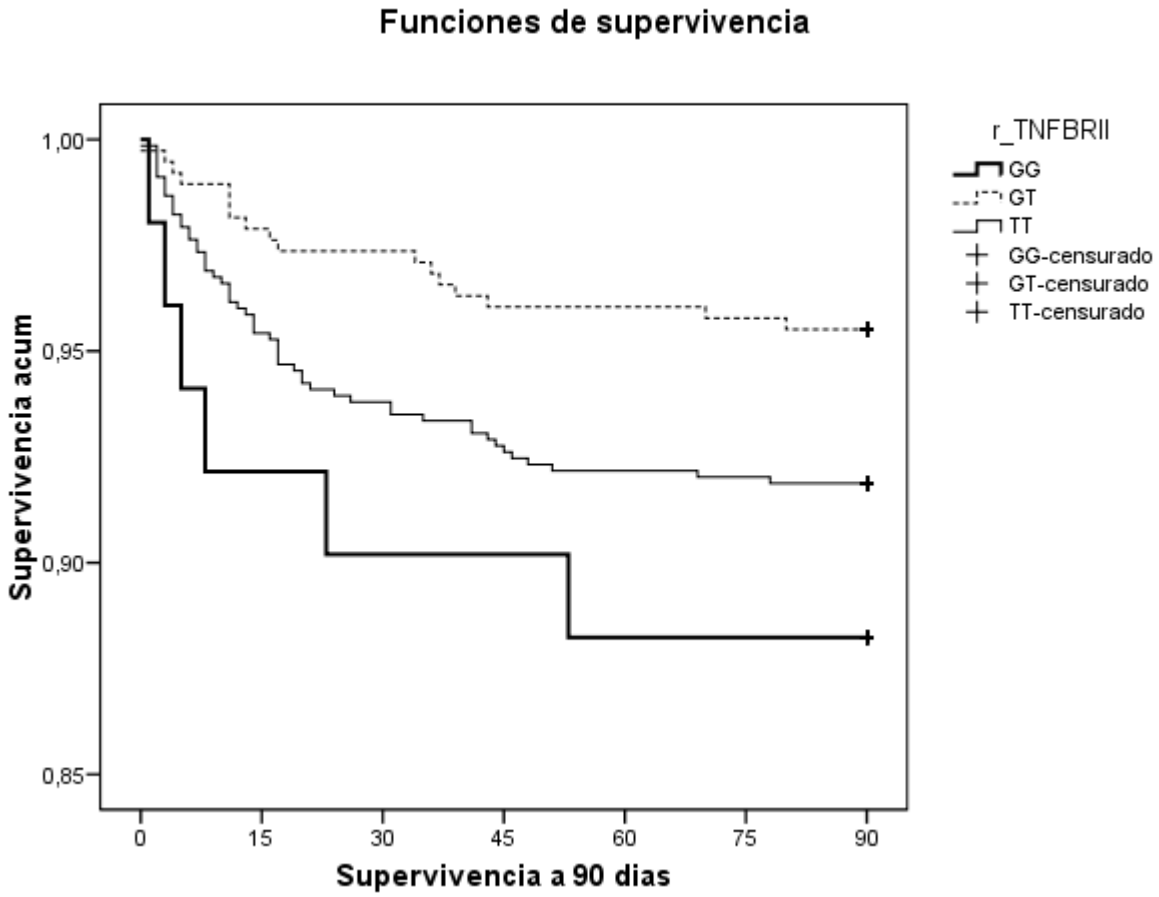

Figura 2.- Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en función del genotipo *TNFRSF1B* +676 *G/T* . Los individuos con genotipo G/T están representados por una línea de puntos, aquéllos con genotipo T/T representados con línea fina y los portadores de genotipo G/G por una línea gruesa.

- Supervivencia a los 90 días: long rank χ^2 ; p = 0,016. Regresión de Cox* (p = 0,02, HR = 0,53, IC 95% 0,31-0,9).
- Supervivencia a los 28 días: Regresión de Cox* (p = 0,01; HR,0,41; IC 95% 0,21-0,81).
- Supervivencia a los 15 días: Regresión de Cox* (p = 0,049; HR,0,48; IC 95% 0,23-0,99).

Estos datos están ajustados para las variables independientes edad, género, hospital de procedencia y comorbilidades.

6.- DISCUSIÓN

Los síndromes de sepsis, sepsis grave y shock séptico, se observan con frecuencia en la NAC y son causa de elevada mortalidad. Su fisiopatología es compleja y es el resultado de la interacción entre el patógeno responsable de la infección y la respuesta del huésped. La defensa innata del huésped se asocia inherentemente a los fenómenos de la inflamación y de la coagulación. El LPS de las bacterias gram negativas, es detectado por los RRP e inducen la activación del factor de transcripción nuclear NF-κB, y de los promotores de genes que codifican una extensa gama de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Puesto que la desregulación del sistema de inmunidad innata parece ser el elemento crucial a la hora de explicar la magnitud de la respuesta inflamatoria de los pacientes con NAC, los estudios genéticos que evalúan la susceptibilidad y el pronóstico de la NAC se han centrado en genes involucrados en la respuesta inflamatoria y antiinflamatoria.

El resultado más sobresaliente del presente estudio fue comprobar que, en comparación con los supervivientes, los pacientes fallecidos presentaban una frecuencia significativamente menor de individuos heterocigotos para el SNP *TNFRSF1B* +676 *T/G*, sugiriendo por tanto que este polimorfismo tiene un papel importante en la fisiopatología de la NAC. Hasta el momento, éste ha sido el primer trabajo que ha estudiado el protagonismo que tienen los alelos del gen *TNFRSF1B* en pacientes afectos de NAC (74). Por otra parte, los resultados de este estudio no nos han permitido corroborar las asociaciones positivas que se han encontrado en otros estudios entre los polimorfismos de los genes *TNF, LTA,* y *IL1RN* y la susceptibilidad, gravedad o pronóstico de la NAC.

Estudios originales en ratas han desvelado el papel esencial que desempeñan las citocinas en la sepsis (100). Sin embargo, en humanos, se han obtenido resultados conflictivos en cuanto a la repercusión que tienen diversos polimorfismos como *TNF, LTA,* y *IL1RN* en la sepsis. Así, *TNF -308* y *-238* han sido asociados a la gravedad de la enfermedad y al pronóstico en algunos estudios (48,52,88, 101) pero no en otros (74,90,102-103). También existe controversia en lo que concierne al papel de *LTA +252* (54,62,65,102) e *IL6 -174* (56,59-60,62). El alelo *IL1RN*2* también se ha asociado a una mayor susceptibilidad y peor pronóstico de la sepsis (57,64-65).

En el presente estudio, al contrario de lo esperado, se observó una asociación no significativa entre el hecho de ser homocigoto para el alelo *LTA +252 A* y el desarrollo de disfunción multiorgánica. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la frecuencia de individuos homocigotos para el alelo *IL1RN*2* entre los pacientes fallecidos en comparación a los supervivientes.

Hasta el momento presente, sólo se han publicado tres estudios en pacientes con NAC que hayan evaluado el papel de estos genes. Waterer et al (54) llevó a cabo dos estudios en un pequeño número de pacientes y encontró que los pacientes homocigotos para el alelo *LTA* +252*A* presentaban un mayor riesgo de shock séptico. Por el contrario, la insuficiencia respiratoria, en ausencia de shock se relacionaba muy estrechamente con el hecho de ser homocigoto para el alelo *LTA* +252*G* (52). Gallagher et al (62) no encontraron ninguna asociación entre los polimorfismos *TNF -308* e *IL6 -174* y la susceptibilidad o la gravedad de la NAC. Existen posibles explicaciones para estas discrepancias que incluyen el escaso poder estadístico de la muestra, la heterogeneidad de la población estudiada con diversos factores de confusión no reconocidos, la estratificación de la población y la imprecisión en la definición del fenotipo. Estas limitaciones, evidentes en muchos de los estudios mencionados anteriormente, hacen que la interpretación de los datos sea problemática.

En comparación con los estudios previos, el presente estudio tiene varios puntos fuertes. Primero, dispone de una amplia cohorte de pacientes con NAC y por tanto ello reduciría la probabilidad de error tipo I. Segundo, su diseño prospectivo ayuda a minimizar los problemas en la identificación del fenotipo. Tercero, el hecho de ser un estudio multicéntrico que incluyó, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, sujetos adultos, de raza caucásica y de origen español, hace que la muestra sea homogénea. Cuarto, los datos genéticos se compararon no sólo entre pacientes y controles sanos, sino también, y más importante aún, entre los propios pacientes según presentaran o no el fenotipo a estudio. Quinto, mientras que la mayoría de los estudios mencionados anteriormente incluyen una población mixta de pacientes graves con sepsis, nosotros hemos estudiado pacientes hospitalizados con el único diagnóstico de NAC. Por último, hemos evaluado la repercusión que tienen las variantes genéticas en la gravedad y pronóstico de la NAC una vez controladas las diversas variables de confusión que pueden influir en la mortalidad.

Cuando evaluamos en un estudio secuencial la relación existente entre el riesgo de muerte y los genotipos *TNFRSF1B +676*, observamos una asociación significativa en lo concerniente a la mortalidad a los 15 días, 28 días y 90 días.

Los receptores TNFR1 y TNFR2 son mediadores de la actividad biológica de TNF-α y LT-α. Ambos receptores activan distintas vías de transducción de señales, lo que explica su función tan diversa y a la vez compartida (66). La señalización de TNFR2 no está bien caracterizada, pero se ha demostrado que es capaz de mediar señales que promueven la reparación tisular y la angiogénesis(66). Además, también se ha observado en cultivos celulares que TNFR2 desempeña un papel destacado en diversos mecanismos como la apoptosis, la activación celular y la migración

de los leucocitos polimorfonucleares (66-67). Bajo ciertas circunstancias, TNFR2 puede también contribuir a potenciar la respuesta inflamatoria mediada por TNFR1 (66-67).

Varios estudios han observado una asociación entre los genotipos del *TNFRSF1B +676* y la susceptibilidad a diversas enfermedades inflamatorias en humanos tales como el lupus eritematoso sistémico (68), la artritis reumatoide (69) o la enfermedad de Crohn (70). El SNP *TNFRSF1B +676* resulta de una modificación de nucleótidos en el codon 196 *(M196R)* que origina un cambio de metionina por arginina. Este codón está localizado en estrecha proximidad con la diana de reconocimiento de la enzima de restricción. Ello resulta crucial para el corte y liberación del dominio externo del TNFR2, con la consiguiente pérdida de expresión y por tanto podría condicionar los niveles de TNFR2 soluble (72-73). Por otra parte, la variante *TNFR2-196R*, codificada por el alelo G, ha demostrado tener una menor capacidad para inducir la señalización de NF-κB vía TNFR2, lo que resultaría en una menor inducción de los genes dependientes de NF-κB involucrados en funciones antiapoptóticas y proinflamatorias (67). Nuestro estudio sugiere un efecto protector del hecho de ser heterocigoto para el SNP *TNFRSF1B +676* en lo que concierne al pronóstico de la NAC. Sin embargo, los sujetos homocigotos para el alelo *TNFRSF1B +676T* presentan una tendencia hacia un menor riesgo de desarrollar disfunción multiorgánica. Un incremento en la actividad de NF-κB se ha asociado con un peor pronóstico en pacientes con sepsis (24). En el mismo sentido, en nuestra experiencia las inmunodeficiencias primarias mediadas por TLR, tales como las deficiencias en IRAK-4 y MyD88, que comportan una disminución de la activación de NF-κB, confieren una alta susceptibilidad a desarrollar infecciones invasoras por *S. pneumoniae* y *S. aureus*, y en menor medida por *P. aeruginosa* (105-106). Sin embargo, los pacientes que presentan estas inmunodeficiencias primarias muestran una escasa respuesta inflamatoria clínica y biológica durante el curso de la infección, y de hecho, estas condiciones han sido referidas como septicemia sin sepsis (104-105). El papel protector que repesenta ser portador

heterocigoto de *TNFRSF1B +676* en lo concerniente al pronóstico de la sepsis podría, por tanto ser debido a un efecto balanceado de las consecuencias deletéreas de una excesiva o defectuosa activación NF-κB conferidas respectivamente por el genotipo homocigoto de los alelos salvajes o mutantes (105).

Hasta la fecha, solo un estudio (74) ha investigado el papel del polimorfismo del receptor *TNFR2 (+676* y *+1663).* Este estudio fue realizado en 213 pacientes con sepsis grave. Los autores encontraron una correlación positiva entre los niveles incrementados de TNFR1 y TNFR2 soluble y la disfunción orgánica, pero no se observó ninguna influencia entre el polimorfismo *TNFRSF1B* y los niveles de TNFR2 soluble, ni tampoco en la susceptibilidad o pronóstico de la sepsis. Posibles razones para explicar esta discrepancia con los datos de Gordon y col.(74), son el estudio de un fenotipo diferente en ambos estudios y el pequeño tamaño muestral en el estudio de Gordon.

A pesar de los puntos fuertes que presenta nuestro estudio, y que ya han sido mencionados anteriormente, hay que reconocer que tiene algunas limitaciones. Primero, aunque en este estudio se han seguido las recommendaciones establecidas para el tratamiento de la sepsis y shock séptico, no se ha seguido un protocolo específico. Segundo, se determinaron sólo cinco polimorfismos de cuatro mediadores. La importancia funcional de muchos de estos polimorfismos aún queda por dilucidar y muchos SNP pueden representar simplemente marcadores genómicos de otras variantes genéticas más relevantes desde el punto de vista funcional, y que se encuentran en *desequilibrio de ligamiento* con el polimorfismo estudiado. Tercero, nuestro estudio podría carecer de la suficiente potencia estadística para detectar diferencias significativas para los fenotipos y genotipos menos frecuentes, particularmente en pequeños subgrupos de pacientes. Sin embargo, se debe hacer notar que un número substancial de pacientes (325: 28%) desarrollaron formas graves de sepsis. Ello nos permite tener un tamaño muestral suficiente para detectar odds ratios de 1,49, 1,38, 1,29 y 1,28 para

los alelos del *TNF -238A, TNF -308A, LTA +25 G* e *IL1RN*2* respectivamente, con un umbral de significación de 0,05 y con un poder estadístico del 80%. Estos son los alelos que han sido involucrados en la gravedad de la sepsis, en general con OR superiores a los descritos en este estudio. Además, cuando analizamos la asociación entre el genotipo *TNFRSF1B +676 G/T* con la mortalidad a los 28 días, el poder estadístico para el OR observado, con un umbral de significación del 5%, fue del 93%.

Aún con estas limitaciones, este estudio es único en el hecho de tener una población étnicamente homogénea de pacientes ingresados en el hospital por NAC y en el que se evalúan los factores asociados a la gravedad y al pronóstico, desde el mismo momento del ingreso en el hospital.

En conclusión, nuestro estudio no apoya la existencia de un papel importante de los controvertidos polimorfismos del *TNF*, *LTA*, e *IL1RN* en la NAC y en la sepsis, al menos en nuestra población. Sin embargo, sugiere un importante papel del SNP *TNFRSF1B +676* en el pronóstico de la NAC, que ayudaría potencialmente identificar a un subgrupo de pacientes que podrían beneficiarse de nuevas estrategias terapéuticas. Los hallazgos de este estudio sientan las bases para generar nuevas hipótesis en futuros estudios en los que pueden ser consideradas nuevas intervenciones como el tratamiento inmunomodulador frente al TNF-α y LT-α.

7.- CONCLUSIONES

7.1 Los polimorfismos de los genes *TNF-α -238*, *TNF-α -308*, *LT-α +252*, *IL-1 RN 86 pb VNRT* o *TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocian a una mayor susceptibilidad a la NAC.

7.2 Los polimorfismos de los genes *TNF-α -238*, *TNF-α -308*, *LT-α +252, IL-1 RN 86 pb VNRT* o *TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocian a una mayor gravedad de la NAC.

7.3 Los polimorfismos de los genes *TNF-α -238*, *TNF-α -308*, *LT-α +252,* e *IL-1 RN 86 pb VNRT* no se asocian a un peor pronóstico de la NAC.

7.4 Los polimorfismos del gen *TNFRSF 1B+676 (TNF R2 M196R)* se asocia a un peor pronóstico de la NAC. El genotipo *TNFRSF1B +676 G/T* se asocia con una mayor mortalidad a los 28 días. El reconocimiento del polimorfismo *TNFRSF1B +676 G/T* ayudaría a identificar un subgrupo de pacientes que podrían beneficiarse potencialmente de tratamiento inmunomodulador frente al TNF-α y LT-α .

8.- BIBLIOGRAFÍA

1.- Rello J. Demographics, guidelines and clinical experience in severe community-acquired pneumonia. Critical Care 2008, 12(Suppl 6): S2:1-9

2.- Mandell LA. Epidemiology and etiology of CAP. Inf. Dis Clin North Am 2004; 18:761-776.

3.- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis 2007; 44(Suppl 2):S27-72.

4.- Pachón J., Alcántara Ballón JD, Cordero Matía E, Camacho Espejo A, Lama Herrera C, Rivero Román A, et al. Estudio y tratamiento de las neumonías de adquisición comunitaria en adultos. Med Clin. 2009; 133(2):63-73

5.- Dremsizov T, Clermont G, Kellum JA, Kalassian KG, Fine MJ, Angus DC. Severe sepsis in CAP: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? Chest 2006; 129:968-978

6.- Spindler C, Ortqvist A. Prognostic score systems and community-acquired bacteriemic pneumococcal pneumonia. Eur Respir J 2006; 28:816-828

7.- Rello J, Rodríguez A, Lisboa T, Gallego M, Lujan M, Wunderink R. PIRO score for community-acquired pneumonia: A new prediction rule for assessment of severity in intensive care unit patients with community-acquired pneumonia. Crit Care Med 2009; 37:456-462

8.- Charles PG, Wolfe R, Whitby M, et al. SMART-COP: a tool for predicting the need of intensive respiratory or vasopressor support for community-acquired pneumonia. Clin Infect dis 2008, 47:375-384.

9.- Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med 1997; 336:243-250.

10.- Angus DC, Marrie TJ, Obrosky DS, et al. Severe community-acquired pneumonia: use of intensive care services and evaluation of American and British Thoracic Society Diagnostic criteria. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166:717-23.

11.- Ewig S, Ruiz M, Mensa J, et al. Severe community-acquiered pneumonia. Assesment of severity criteria. Am J Resp Crit Care Med 1998; 158:1102-1108.

12.- Felkin DR, Schuchat A, Kolczak M, et al. Mortality from invasive pneumococal pneumonia in the era of antibiotic resistance: 1995-1997. Am J Public Health 2000; 90:223-9

13.- Menéndez R, Torres A. Treatment failure in community-acquired pneumonia. Chest 2007; 132:1348-55

14.- Segal S, Hill A. Genetic susceptibility to infectious disease. TRENDS in microbiology 2003; 11:445-448

15.- Sorensen TI, Nielsen GG, Anderson PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adults adoptees. N Engl J Med 1988; 318:727-732

16.- Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphisms in sepsis. Crit Care Med 2004; 32:569-579.

17.- Papathanassoglou E, Giannakopoulou M, Bozas E. Genomic variations and susceptibility to sepsis. AACN Adv Crit Care 2008; 17(4):394-422

18.- Holmes Ch., Russell J., Walley K. Genetic polimophisms in sepsis and septic shock. Chest 2003; 124:1103-1115

19.- Yende S; Kammerer C; Angus D. Bench-to-bedside review: Genetics and proteomics. Deciphering gene association studies in critical illness. Critical Care 2008; 10:227

20.- Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of priciple and paradigm. Journal of Clinical Investigation 2009; 119:2506.

21.- Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. Science 2007; 317:617-619.

22.- Dahlman I, Eaves I, Kosoy R, Morrison VA, et al. Parameters for reliable results in genetic association studies in common diseases. Nat Genet 2002; 30:149-50

23.- Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. Intensive Care Med 2006; 32:1706-1712

24.- Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, et al. Role of NF-κB in the mortality of sepsis. J Clin Invest 1997; 100:972-985.

25.- Schumann RR, Leogs R, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science 1990; 249:1429-1431

26.- Tobias PS, Soldau K, Iovine NM et al. Lipopolysaccharide(LPS)-binding proteins BPI and LBP from different complex types with LPS. J Biol Chem 1997; 272:18682-18685

27.- Weiss J, Muello K, Victor M, et al. The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope. J Immunol 1984; 132:3109-3115

28.- Elsbach P, Weiss J. Role of bactericidal/permeability-increasing protein in host defense. Curr Opin Immunol 1998; 10:45-49

29.- Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D et al. Gene variants of the bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein in septic patients: gender-specific predisposition to sepsis. Crit Care Med 2001; 29:684-5

30.- Barber RC, O´Keefe GE. Characterization of a single nucleotide polymorphism in the lipopolysaccharide-binding protein and its association with sepsis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167:1316-20

31.- Sutherland A, Walley K, Russell J. Polymorphisms in CD-14, mannose-binding lectin, and toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. Crit Care Med 2005; 33:638-644

32.- Gibot S, Cariou A, Drouet L ,et al. Association between a genomic polymorphism within CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. Crit Care Med 2002; 30:969-973.

33.- Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, et al. The common C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolyssacaride receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. Genes Immun 2000; 1:405-407

34.-Albiger B, Dahlberg S, Normak-Enriques B, Normak S. Role of the immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. J. Int Med 2007; 261:511-528

35.- Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. Crit Care Med 2002; 30:S1-11

36.- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, et al. A common dominant TLR 5 stop codon polymorphism abolishes flagelling signaling and is associated to leggionnaires´ disease. J Exp Med 2003; 198:1563-1572

37.- Wunderink RG, Waterer GW. Genetics of community-acquired pneumonia. Semin Respir Crit Care Med 2005; 25:553-562.

38.- Waterer GW, Wunderink RG. Genetic susceptibity to pneumonia. Clinics in Chest Medicine 2005; 26:29-38

39.- Garred P, Strom J, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome in patients with SIRS. J Inf Dis 2003; 188:1394-1403

40.- Gordon AC, Waheed U, Hansen TK et al. Manose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence and outcome. Shock 2006; 25: 88-93

41.- Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de Castro F et al. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity and outcome of pneumonia in adults. J Allergy Clin Immunol. 2008; Aug, 122(2):368-74. Epub 2008 Jun 25.

42.- Van der Pol W, van der Winkel JG. IgG receptor polymorphisms. Risk factors for disease. Immunogenetics 1998; 48:222-232

43.- Van der Sorge NM, van der Pol WL, van der Winkel JGJ. Fc [gamma]R polimorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. Tissue antigens 2003; 61(3):189-202

44.- Sanders LAM, van der Winkel JG, Rijkers GT, et al. Fcγ receptor IIa (CD32) heterogeinity in patients with recurrent bacterial respiratorytract infections. J Infect Dis 1994; 170:854-61

45.- Yuan FF, Wong M, Pererva N, et al. Fc gamma RIIA polymorphism in *S. pneumonia* infection. Immun Cell Biol 2003; 81:192-5.

46.- Yee AM, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between FcgammaRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis 2000; 30:25-28

47.- Moens L, Van Hoeyweld E, Verhaegen J, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X. Fc-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. Clin Immunol 2006; 118:20-23

48.- Appoloni O, Dupont E, Vandercryus M, et al. Association of TNF-2 allele with plasma TNF alfa levels and mortality from septic shock. Am J Med 2001; 110:486-488

49.- O´Keefe GE, Hybki D, Munford RS. The G/A single nucleotide polymorphism and the – *308* position in the TNF alfa promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. J Trauma 2002; 52: 817-825

50.- Stuber F, Udalova IA, Book M, et al. *(-)308 TNF* polymorphism is not associated with survival in sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. J Inflamm. 1995; 46:42-50.

51.- Waterer GW, Quasney MW, Cantor RA, et al. Increased risk of death from community-acquired pneumonia (CAP) associated with the A allele of the *TNFα-238* polymorphism. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:A380

52.- Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, et al. Septic shock and respiratory failure in CAP have different TNF polymorphism associations. Am J Resp Crit Care Med 2001; 163:1599-604

53.- Basu S, Sivastrava PK. Heat shock proteins. The fountainhead of innate and adaptative responses. Cell Stress Chaperones 2000; 5:443-51

54.- Waterer GW, El Bahlawan L, Quasney MW, et al. Heat shock protein 70-2+*1267 AA* homozigotes have an increased risk of septic shock in adults with CAP. Crit Care Med 2003; 31:1367-71

55.- Dinarello CA, Wolff SM. The role of IL-1 in disease NEJM 1993; 328:106-113

56.- Read RC, Camp NJ, Di Giovine FS, et al. An IL-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease. J nfect Dis 2000; 182:1557-60

57.- Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic PGs in IL-1 gene family cytokins influences outcome of septic patients. Crit Care Med 2002; 30:1046-50

58.- Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, et al. Increased plasma levels of IL-6 in sepsis. Blood 1989; 74:1704-10

59.- Balding J, Healy CM, Livingstone WJ, et al. Genomic polymorphic profiles in an Irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity and outcome of disease? Genes Immun 2003; 4:533-540

60.- Martín-Loeches Carrondo I. Polimorfismo de IL-6 en neumonía adquirida en la comunidad. Asociación pronóstica y mortalidad. Tesis Doctoral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria 2007

61.- Reid CL, Perrey C, Pravica V, et al. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Med. 2002; 30:2216-21

62.- Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community-acquired pneumonia. Thorax 2003; 58:154-6

63.- Stuber F. Another definite candidate gene for genetic predisposition of sepsis: Interleukin-10. Crit Care Med 2003; 31:314-315

64.- Arnalich F, López-Maderuelo D, Codoceo R, et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. Clin Exp Immunol 2002; 127:331-336

65.- Fang XM, Schröder S, Hoeft A, Stüber F. Comparison of two polymorphisms of the interleu kin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. Crit Care Med 1999; 27:1330-4

66.- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol 2008; 214:149-60

67.- Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, et al. The Met-196 -> Arg variation of human tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-κB signaling and target gene expression. J Biol Chem 2005; 280:5994-6004

68.- Horiuchi T, Kiyohara C, Tsukamoto H, et al. A functional *M196R* polymorphism of tumour necrosis factor receptor type 2 is associated with systemic lupus erythematosus: a case-control study and a meta-analysis. Ann Rheum Dis 2007; 66:320-4

69.- Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Mattey DL. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2005; 7:R1227-34

70.- Waschke KA, Villani AC, Vermeire S et al. Tumor necrosis factor receptor gene polymor phisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. Am J Gastroenterol 2005; 100: 1126-33

71.- Rooryck C, Barnetche T, Richez C, Laleye A, Arveiler B, Schaeverbeke T . Influence of *FCGR3A-V212F* and *TNFRSF1B-M196R* genotypes in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab therapy. Clin Exp Rheumatol 2008; 26:340-2

72.- Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS._Tumour necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumour necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumour necrosis factor concentration. Am J Pathol 1993; 143:1724-30

73.- Herman C, Chernajovsky Y. Mutation of proline 211 reduces shedding of the human p75 TNF receptor. J Immunol 1998; 160:2478-87

74.- Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, et al. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. Genes Immun 2004; 5:631-40

75.- Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion PG is associated with susceptibility and outcome in acute distress respiratory syndrome. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166:646-50

76.- Morimoto S, Okaishi K, Onishi M, et al. Deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene as a risk for pneumonia in elderly patients. Am J Med 2002; 112:89-94

77.- Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, et al. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of *SP-B Thr131Ile* with ARDS. Clin Genet 2000; 58:181-91

78.- Quasney MW, Waterer GW, Dahmer MK, et al. Association between surfactant protein B *+1580* polymorphism and the risk of respiratory failure in adults with community-acquired pneumonia. Crit Care Med 2004; 32:1115-9

79.- Gong MN, Wei Z, Xu LL, et al. Polymorphism in the surfactant protein-B gene; gender and risk of direct pulmonary injury and ARDS Chest 2004; 125:203-11

80.- Tom van der Poll. Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. Review. Critical Care 2008; 12(Suppl 6): S3

81.- Hermans PW, Hibberd ML, Booy R, et al. For the Meningococcal Research Group: *4G/5G* in the promoter PG in the PAI-1 gen and outcome of meningococcal disease. Lancet 1999; 354:556-560

82.- Hermans PW, Hazelzet JA. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polimorphism and sep sis. Clin Infect Dis 2005; 41:S453-S458

83.- Geishofer G, Binder A, Müller M, et al. For the Central Meningoccocal Genetic Study Group: *4G/5G* promoter PG in the plasminogen activator inhibitor type 1 gene in children with menin gococcaemia. Eur J Pediatr 2005; 165:486-90

84.- Haralambous E, Hibberd ML, Hermans PW, Ninis N, Nadel S, Levin M. Role of the functional plasminogen activator inhibitor type I *4G/5G* promoter PG in susceptibility, severity and outcome in meningococcal disease in Caucasian children. Crit Care Med 2003; 31:2788-93

85.- Westerndorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE. Variation in plasminogen activator inhibitor type 1 gen and risk of meningococcal septic shock. Lancet 1999; 354:561-63

86.- Kremer Hovinga JA, Franco RF, Zago MA, et al. A functional single nucleotid PG in the thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene associates with poor outcome of meningococcal disease. J Thromb Haemost 2004; 2:54-7

87.- Nadel S, Newport MJ, Booy R, et al. Variation in the TNF-alfa gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. J Infect Dis 1996; 174:878-880

88.- Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. JAMA 1999; 282:561-8

89.- Tang GJ, Huang SL, Hien HW, et al. TNF gene PG and septic shock in surgical infection. Crit Care Med 2000; 28:2733-36

90.- Stuber F, Udalova IA, Book M et al. *-308* tumor necrosis factor (*TNF*) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. J Inflamm 1995; 46:42-50

91.- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Commitee. American College of Chest Physicians/Society of Critcal Care Medicine. Chest 1992; 101:1644-55

92.- Alfageme I, Aspa J, Bello S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of community- acquired pneumonia. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). Arch Bronconeumol 2005; 41(5):272-89

93.- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II, a severity of disease classification system. Crit Care Med 1985; 13:818-829

94.- Weinstein MC, O'Brien B, Hornberger J, et al. Principles of good practice for decision analytic modeling in health-care evaluation: report of the ISPOR Task Force on good research practices-modeling studies. Value in Health 2003; 6:9-17

95.- Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res 1976; 3:2303-2308

96.- Bestmann L, Helmy N, Garofalo F, et al. Light Cycler PCR for the Polymorphisms -*308* and -*238* in the TNF-alpha gene and for the *TNFB1/B2* Polymorphism in the LT-alpha Gene. In: Dietmaier W, Wittwer C, Sivasubramanian N, eds. Rapid cycle real-time PCR methods and applications (genetics and oncology) New York, LLC: Springer-Verlag 2002; 93-105

97.- Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. Eur J Immunol 1998; 8:2598-602

98.- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res 2001; 17:E88-8

99.- Bridges SL Jr, Jenq G, Moran M, Kuffner T, Withworth WC, McNicoll J. Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes: definition of novel haplotypes and racial/ethnic differences. Arthritis Rheum 2002; 46:2045-50

100.- Dinarello CA. The use of cytokine knockouts to study host defense against infection. In Fantuzzi G. ed. Cytokine Knockouts. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey 2003; 11-31

101.- Menges T, König IR, Hossain H, et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumour necrosis factor. Crit Care Med 2008; 36:1456-62

102.- Jessen KM, Lindboe SB, Petersen AL, et al. Common TNF-alpha, IL-1 beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. BMC Infect Dis. 2007; 7:108

103.- Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-κB activation and worse outcomes in sepsis. Am J Resp Crit Care Med 2006; 173:1335-41

104.- Ku CL, von Bernuth H, Picard C, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immu nity. J Exp Med 2007; 204:2407-22

105.- von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. Science 2008; 321(5889):691-6