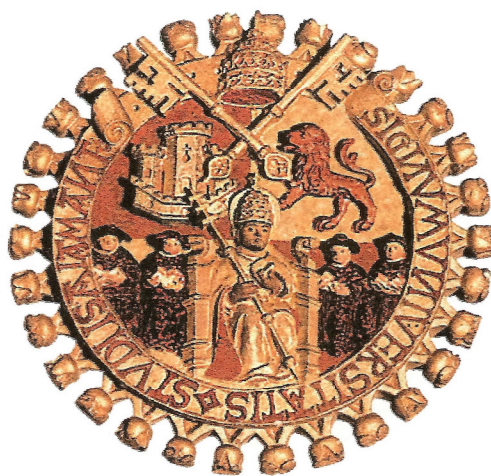


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS TLR2,
TLR4 Y CD14 EN INFECCIONES INVASIVAS
GRAVES EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA**

M^a INMACULADA VIDRIALES VICENTE

2016

DON JUAN JOSE TELLERIA ORRIOLS, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA

DON CARLOS ALBERTO RODRIGUEZ ARIAS, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, OFTALMOLOGÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y FISIOTERAPIA

AMBOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Certifican: Que el trabajo titulado, “ **Estudio de variantes genéticas TLR2, TLR4 y CD14 en infecciones invasivas graves en población pediátrica**” ha sido realizado, bajo la Dirección y codirección, respectivamente de los profesores arriba mencionados, por la Licenciada Doña María Inmaculada Vidriales y reúne, al juicio de ambos, las condiciones de originalidad y el contenido científico suficiente para optar al grado de Doctor.

Para que conste, a los efectos oportunos, se firma el presente en Valladolid a diez de junio de dos mil dieciséis.



Fdo.: Juan José Tellería Orriols



Fdo.: Carlos A. Rodríguez Arias

*“El respeto a la vida es fundamento
de cualquier otro derecho,
incluidos los de la libertad”*

San Juan Pablo II

*“Da el primer paso con fe.
No tienes por qué ver toda la escalera.
Basta con que subas el primer peldaño”*

Martin Luther King

A mi esposo
Carlos

A mis cuatro soles
María, Carlos, Alberto y Antonio

A mis padres
Antonio y Paquita

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Juan José Tellería Orriols, Director de esta tesis en cuyo Laboratorio del IBGM de Valladolid, se ha realizado este trabajo y sin sus sabios consejos no habría finalizado nunca.

A la Doctora M^a Jesús Alonso Ramos del IBGM de Valladolid por ayudarme en los momentos de duda en el laboratorio.

A Rebeca Torres Merino del IBGM de Valladolid por su ayuda en el inicio de la parte experimental del trabajo.

A la Doctora Pilar Rodríguez del Tío, Profesora Titular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, por sus consejos durante el trabajo estadístico.

Al Doctor Rogelio González Sarmiento, Catedrático de Medicina de la Universidad de Salamanca, por su colaboración durante el desarrollo de los Cursos del Doctorado.

A Marga Villamor del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca por su amabilidad al facilitarnos todos los trámites burocráticos.

A mis compañeros del Laboratorio del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, en particular al Doctor Francisco Javier Valentín Cid, por echarme una mano siempre que lo he necesitado.

A mi familia de la que he recibido el estímulo necesario para llevar a buen puerto este proyecto.

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
SISTEMA INMUNITARIO.....	3
Introducción.....	3
Inmunidad innata y adquirida.....	5
Células del sistema inmune.....	8
Neutrófilos.....	8
Fagocitos mononucleares.....	8
Células dendríticas.....	9
Linfocitos B.....	10
Linfocitos T.....	13
Células Natural Killer.....	16
Componentes moleculares del sistema inmune.....	17
Citoquinas.....	17
Complemento.....	21
Inmunoglobulinas.....	22
RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS.....	24
Receptores de reconocimiento de patrones	24
Receptores tipo Toll.....	25
TLR2.....	28
TLR4.....	28
Patrones moleculares de reconocimiento de patógenos	29
SEPSIS E INMUNIDAD	31
Definición de sepsis.....	31
Función inmunitaria en la sepsis.....	34
VULNERABILIDAD GENÉTICA FRENTE A LAS INFECCIONES.....	36
Alteraciones monogénicas.....	37
Alteraciones poligénicas.....	38

	Página
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA INMUNIDAD INNATA.....	39
Polimorfismos del gen TLR2.....	40
Polimorfismos del gen TLR4.....	41
Polimorfismos del gen CD14.....	41
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
PACIENTES.....	53
MÉTODOS.....	55
Selección del polimorfismo a estudiar.....	55
Protocolo de extracción del ADN.....	57
Cuantificación del ADN.....	57
Genotipado.....	58
Genotipado mediante sondas KASP.....	58
Genotipado mediante análisis de restricción.....	60
Sondas utilizadas para el genotipado.....	62
Polimorfismo rs1938228.....	62
Polimorfismo rs1816702.....	63
Polimorfismo rs1898830.....	64
Polimorfismo rs2289318.....	65
Polimorfismo rs3804099.....	66
Polimorfismo rs3804100.....	67
Polimorfismo rs5743704.....	68
Polimorfismo rs5743708.....	69
Polimorfismo rs7674579.....	70
Polimorfismo rs4986790.....	71
Polimorfismo rs2569190.....	71
Análisis estadístico.....	72

	Página
RESULTADOS.....	73
ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.....	75
Polimorfismo rs1938228.....	75
Polimorfismo rs1816702.....	78
Polimorfismo rs1898830.....	86
Polimorfismo rs2289318.....	89
Polimorfismo rs3804099.....	91
Polimorfismo rs3804100.....	93
Polimorfismo rs5743704.....	94
Polimorfismo rs5743708.....	98
Polimorfismo rs7674579.....	100
Polimorfismo rs4986790.....	101
Polimorfismo rs2569190.....	106
DISCUSIÓN.....	111
LA SEPSIS COMO PROBLEMA SOCIOSANITARIO.....	113
CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA.....	116
POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	120
POLIMORFISMOS DE TLR2.....	121
POLIMORFISMO DE TLR4.....	129
POLIMORFISMO DE CD14.....	131
CONCLUSIONES.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXO.....	151

EL SISTEMA INMUNITARIO

INTRODUCCIÓN

La función fisiológica del sistema inmunitario se basa en la defensa contra los microorganismos o contra cualquier sustancia extraña no infecciosa.

Durante siglos se supo que el padecimiento y posterior recuperación de determinadas enfermedades otorgaban a los individuos unas condiciones de salud que hacían poco probable volver a padecerlas. Tucídides en el siglo V AC proclamó que “solo los que se habían recuperado de la Peste de Atenas podían cuidar a los enfermos porque no contraían el padecimiento por segunda vez”⁽¹²²⁾. El término “inmune” aparece por primera vez en un poema escrito por Marco Anneo Lucano sobre el año 60 AC, refiriéndose a la resistencia de una tribu norteafricana al veneno de las serpientes⁽¹³¹⁾. Ya en el siglo XV los chinos intentaron inducir una inmunidad artificial frente a la viruela mediante la variolización⁽¹²⁵⁾.

Aunque la primera descripción clínica de la inmunidad la realizó el médico islámico Al-Razi en el siglo IX en un tratado sobre viruela y sarampión⁽¹⁰²⁾, fue Louis Pasteur con la “Teoría germinal de las enfermedades” el que descubrió que las bacterias causaban enfermedades y que una vez recuperado el cuerpo de la infección este adquiría una capacidad de resistencia a la misma⁽⁵⁸⁾.

En el siglo XVIII Edward Jenner describe por primera vez el concepto de vacunación y en 1796 descubre la vacuna contra la viruela⁽⁶³⁾. En el siglo XIX Metchnikoff descubrió el proceso de fagocitosis y en 1884 formuló “la Teoría fagocitósica de la inmunidad” en la que explica la capacidad del cuerpo humano de

resistir y vencer las enfermedades infecciosas⁽¹³⁾. Ehrlich habla de “la Teoría de la inmunidad de cadena lateral” según la cual las células tienen en su superficie moléculas receptoras específicas (cadenas laterales) que solo se unen a determinados grupos químicos de las toxinas, base de la especificidad del sistema inmunitario. Cuando las células sobreviven se produce un excedente de cadenas laterales que pueden ser liberadas a la sangre en forma de antitoxinas, lo que hoy llamamos anticuerpos (Ac)⁽¹³⁾. Landsteiner fue un médico Austriaco que puso de manifiesto la presencia de antígenos (Ag) y Ac al observar que cuando se mezcla la sangre de varias personas al microscopio, se ve una aglutinación de los hematíes⁽¹⁴⁾.

Aunque la inmunidad representa un papel fundamental en la defensa contra los agentes externos, también existen otros mecanismos inmunitarios que actúan de forma negativa. Es el caso de las enfermedades autoinmunes y las alergias. Además su actuación contribuye de forma poderosa a la patogenia de la propia enfermedad.

El sistema inmunitario es un sistema complejo y difuso, presente en casi todos los tejidos. En él participan células como neutrófilos, linfocitos, mastocitos, macrófagos, etc y también algunos órganos como médula ósea, timo, bazo y sistema linfático y proteínas como las inmunoglobulinas (Ig) y el complemento.

INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA

Tradicionalmente existen dos tipos de respuesta, la innata o no específica y la adquirida, adaptativa o específica, existiendo una relación muy estrecha entre ambas.

La inmunidad innata es la más antigua desde el punto de vista filogenético y constituye la primera línea defensiva frente a patógenos. Se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inflamatoria basada en el reconocimiento de macromoléculas extrañas generalmente, aunque no exclusivamente proteínas, péptidos y carbohidratos. No tiene memoria y su protocolo de actuación es común a todos los patógenos. Identifica lo no propio a través de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) que reconocen estructuras comunes de los patógenos -Patrones moleculares asociados a patógenos- (PAMPs) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMPs).

Un grupo de estos receptores pertenecen a los denominados *Toll-Like Receptor* (TLR) que no necesariamente se encuentran en la superficie celular, sino que algunos son solubles y están en el citosol. En el proceso de la inmunidad innata también intervienen proteínas (defensinas, catelicidinas), proteínas del complemento, pentaxinas, etc⁽¹⁴³⁾.

Es un sistema defensivo que responde de forma inmediata a la agresión, y actúa de forma continua aun cuando ya se ha puesto en marcha el sistema adaptativo.

La inmunidad adaptativa es más tardía. Se caracteriza por el reconocimiento específico del patógeno, lo que permite la puesta en marcha de mecanismos efectores específicos frente a ese agresor. Además tiene memoria, es decir, ante agresiones posteriores del patógeno su respuesta es más rápida y eficaz. A diferencia de la

inmunidad innata, en la adaptativa existe una distribución clonal de los receptores vinculados al reconocimiento específico. Incluye componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales⁽¹⁰⁵⁾.

Durante la maduración de los linfocitos, aparece un receptor de membrana específico que solo reacciona ante una determinada estructura química. Posteriormente existe una selección clonal, de tal forma que los clones con especificidad por los elementos propios se eliminan, mientras que los que presentan especificidad por elementos ajenos proliferan y se diferencian con la finalidad de eliminar este elemento y minimizar los efectos sobre el huésped.

Las células presentadoras de antígenos (APCs), fundamentalmente macrófagos y células dendríticas, son las responsables de la presentación del antígeno a los linfocitos T en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) teniendo así un papel muy importante en la conexión entre la inmunidad innata y adaptativa.

Independientemente del tipo de respuesta, los elementos que entran en juego en la inmunidad son por un lado las células y por otro los factores solubles. Entre las células se encuentran las de origen mieloide, neutrófilos, fagocitos mononucleares y células dendríticas y las de origen linfoide, linfocitos B, T y *Natural Killer* (NK), y entre los factores solubles están las proteínas circulantes y las citoquinas⁽¹⁰⁴⁾.

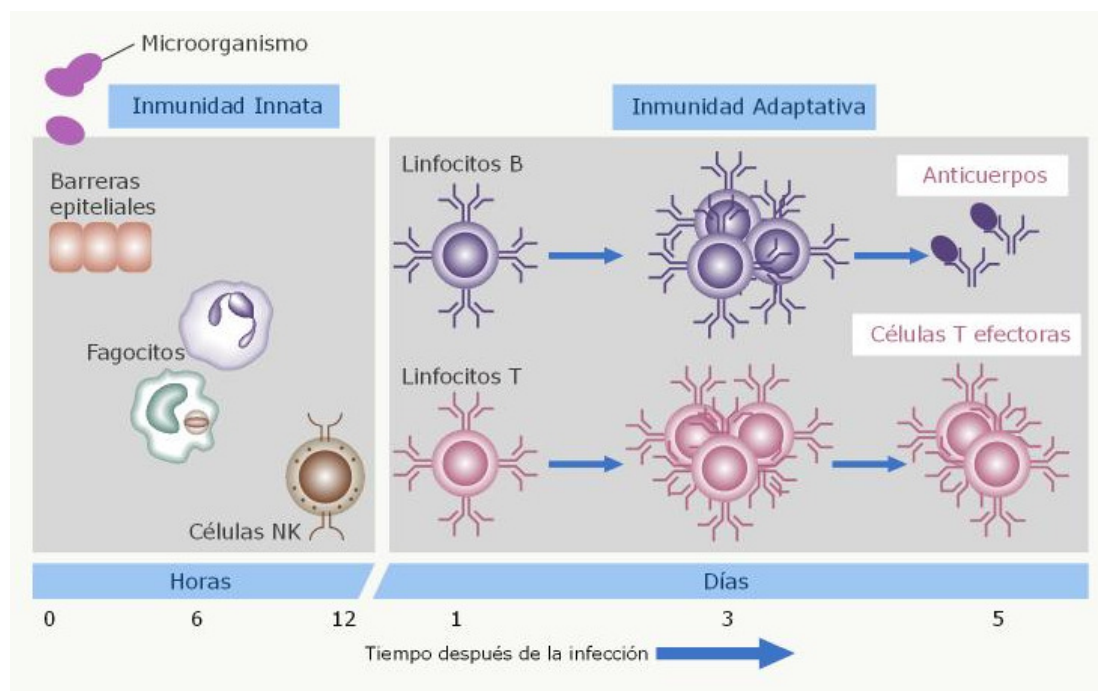


Figura 1. Inmunidad Innata y adaptativa.

<u>COMPONENTES</u>	<u>I. INNATA</u>	<u>I. ADAPTATIVA</u>
FACTORES SOLUBLES	Complemento, proteínas de fase aguda, lisozima.	Anticuerpos.
CÉLULAS	Macrófagos, neutrófilos, Natural Killer.	Linfocitos T y B.
BARRERAS FISICO-QUÍMICAS	Piel y mucosas, cilios, moco.	Piel y mucosas.
CITOQUINAS	IFN α y β , TNF, IL-1, IL-6.	IFN γ , IL-2, IL-3.

Tabla 1. Componentes de la inmunidad.

CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Neutrófilos

Junto con los macrófagos son la primera barrera defensiva. Constituyen la mayoría de los leucocitos circulantes y migran rápidamente al lugar de la inflamación. Cuentan con receptores TLR que una vez identificado el germen permiten fagocitarlo y posteriormente destruirlo. Forman parte de la inmunidad innata y poseen dos tipos de gránulos: unos específicos que contienen enzimas (lisozima, colagenasa y elastasa) y otros azurofílicos que contienen además, sustancias microbicidas⁽¹⁾.

Fagocitos mononucleares

Los monocitos son células efectoras que se encuentran en médula ósea, bazo y sangre periférica. Tienen una vida media corta y contribuyen al recambio de macrófagos y células dendríticas a nivel de los tejidos. Este proceso de transformación está regulado por citoquinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. Así los monocitos en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CFS) e interleukina (IL) IL-4 originan células dendríticas y en presencia de GM-CFS o M-CSF originan macrófagos⁽¹⁵⁾.

Los macrófagos al igual que los neutrófilos pertenecen a la inmunidad innata, y se encargan de la fagocitosis y la eliminación de gérmenes a nivel tisular. Identifican al germen, ya que expresan PRR que reconocen específicamente los PAMPs. Son incluidos dentro de un fagosoma cuya fusión posterior con un lisosoma elimina el germen gracias a la presencia de enzimas hidrolíticos. Los fagocitos también son activados por sustancias propias de los microbios como lipopolisacáridos (LPS)

bacterianos o citoquinas como interferón γ (IFN- γ) liberando especies reactivas de oxígeno, enzimas y óxido nítrico (NO), tóxicos para el agresor.

Los macrófagos también intervienen en la respuesta inflamatoria, potencian la inmunidad adaptativa y participan en la remodelación de tejidos ya que secretan factores de crecimiento de fibroblastos y células endoteliales⁽⁴⁸⁾.

Células dendríticas

Son células mieloides especializadas en la captación, procesamiento, transporte y presentación del Ag a los linfocitos T. Presentan largas extensiones membranosas que recuerdan a las dendritas de las neuronas y son las únicas eficaces en la activación de los linfocitos T vírgenes, debido a la elevada expresión de moléculas MHC coestimuladoras y de adhesión de superficie. Es una población muy heterogénea en cuanto a su localización y función, encontrándose en el tejido linfático, bazo, timo, médula ósea y sangre periférica, parénquimas y mucosas.

En cuanto a su función, las células dendríticas al entrar en contacto con un Ag lo engloba y emigra hacia los ganglios linfáticos. En este proceso de quimiotaxis la célula va madurando, procesa el Ag capturado y presenta los péptidos en la superficie celular, a través de las moléculas del MHC y de coestimuladores de la familia B7, a los linfocitos T vírgenes ya en los ganglios linfáticos. El proceso de presentación incluye el procesamiento intracelular del Ag (fragmentación) y asociación a las moléculas del MHC de clase II⁽¹⁾. Además son capaces de producir una gran cantidad de citoquinas que inducen la diferenciación de los linfocitos T colaboradores-Helper- (LTH) a células efectoras.

También pueden diferenciarse en LTH17 que sintetizan IL-17, que intervienen en la respuesta autoinmune o en células T reguladoras que actúan en los procesos inmunosupresores.

Aunque las células dendríticas son más especializadas, algunos autores sugieren que éstas y los macrófagos pudieran corresponder a la misma población ya que derivan de un precursor común, responden a los mismos factores de crecimiento y no presentan marcadores específicos diferentes⁽⁶⁰⁾.

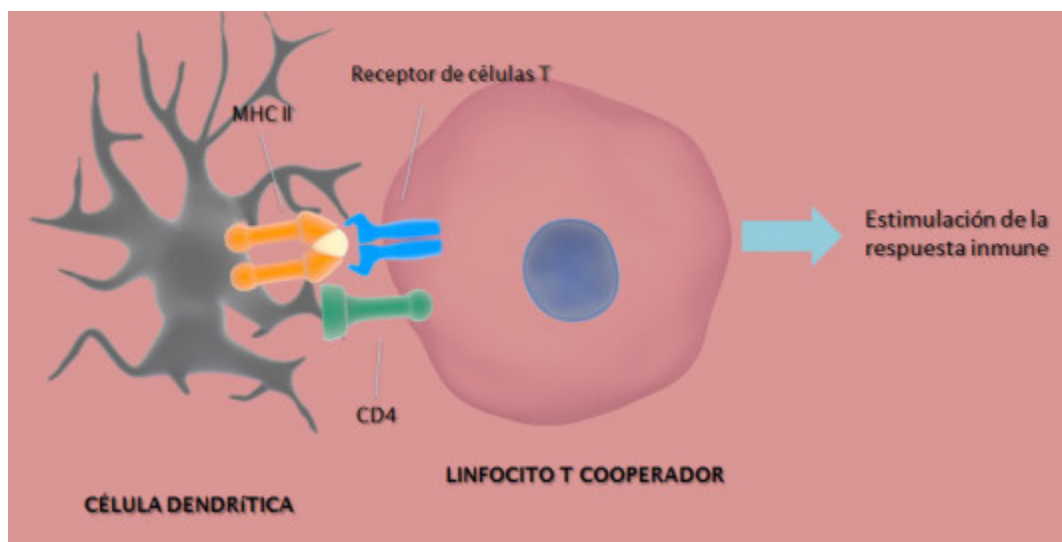


Figura 2. Presentación de antígeno por la célula dendrítica.

Linfocitos B

Constituyen el 10-15% de los linfocitos circulantes e intervienen en la inmunidad adquirida tipo humoral. Expresan en su membrana el receptor de células B (BCR), Igs de membrana que funcionan como receptores de los Ags. También expresan algunos correceptores como el CD19 y CD20 que identifican fenotípicamente a la población. El reordenamiento de los genes que codifican las Igs de membrana es único para cada célula B, originando un clon que produce un Ac específico (Ig secretada).

Cuando los linfocitos B reconocen al Ag a través del BCR, se activan y proliferan, lo que conlleva a la producción de células plasmáticas que son las que producen los Ac específicos.

Estos Ac, las Ig, son glicoproteínas que presentan una región de unión al Ag y otra región variable donde reside la función efectora. Una vez unido al Ag, por un lado lo neutralizan y por otro favorecen el reclutamiento de células efectoras como neutrófilos, macrófagos y células NK, a través de receptores que se unen a su porción constante y activan la vía clásica del complemento⁽⁴⁴⁾.

El BCR es un complejo formado por una inmunoglobulina de membrana y un heterodímero ($Ig\alpha/Ig\beta$ CD79) que controla el ensamblaje del BCR en la membrana y transduce la señal tras la estimulación del Ag⁽¹⁰⁷⁾.

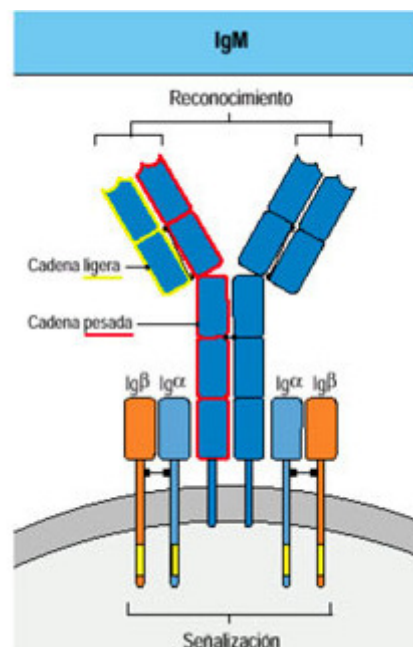


Figura 3. Estructura del BCR CD79.

En la superficie de los linfocitos B se expresan otras moléculas, muchas de ellas comunes a los linfocitos T y otras células del sistema inmunológico, que actúan como correceptores, moléculas de adhesión y coestimuladoras, regulando la función del linfocito B y colaborando en la interacción con otras moléculas del sistema inmune:

- a) *CD19*: se expresa en las células B y células dendríticas foliculares. Regula el desarrollo de las células B y la transducción de señales durante la activación celular.
- b) *CD20*: es una fosfoproteína no glicosilada que se expresa en las células preB y células B. Regulan la activación y crecimiento celular y amplifican la cascada de señalización mediante la formación de canales de calcio.
- c) *CD21*: se expresa en las células B maduras, células dendríticas foliculares, y células epiteliales. En concentraciones bajas de Ag activa a las células B. Interviene en la respuesta inmune innata mediada por el complemento.
- d) *CD22*: Se expresan en la mayoría de las células B maduras (IgM+). Inhibe la señal dependiente del CD19 al acoplarse el Ag al BCR.
- e) *CD23*: Es una lectina tipo 3 que se expresa en células B maduras, células plasmáticas, monocitos y macrófagos, células dendríticas y también en eosinófilos y plaquetas. Por un lado favorece el procesamiento del Ag y por otro incrementa las células B en los folículos⁽⁷⁹⁾.

Linfocitos T

Los linfocitos T son los principales efectores de la inmunidad adaptativa de tipo celular, constituyen el 70-75% de los leucocitos circulantes en sangre periférica y son células que maduran y se diferencian en el timo. Participan directamente en la destrucción de los agentes agresores y además regulan la respuesta inmune. Estas células se identifican por la expresión clonal en la membrana citoplasmática de receptores específicos (TCR). Existen dos tipos de receptores, $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. La función de los linfocitos con receptores $\gamma\delta$ es poco conocida. A diferencia de las Igs que reconocen gran variedad de estructuras químicas, los linfocitos con receptores $\alpha\beta$ solo reconocen péptidos asociados a receptores de membrana de células propias del individuo, las moléculas de MHC.

En la membrana del linfocito T existen otras moléculas implicadas en el reconocimiento específico del complejo TCR-Ag (heterodímeros $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, CD4 y CD8), en el reconocimiento y la posterior respuesta efectora (CD3) y en la traducción de señales y otras moléculas de adhesión, de activación y coestimuladoras⁽²⁾.

El TCR es un heterodímero formado por dos cadenas glicoproteicas unidas por puentes disulfuro. Existen cuatro tipos de cadenas que determinan dos poblaciones diferentes, los linfocitos $T\alpha\beta$ que corresponden al 90% de los linfocitos T en sangre periférica (y son CD4 y CD8 +), y los tipo $\gamma\delta$ que se corresponden con el otro 10% (CD4 y CD8-). Cada cadena tiene una parte extracelular con dominios constantes y variables y una porción intracitoplasmática⁽⁵⁾.

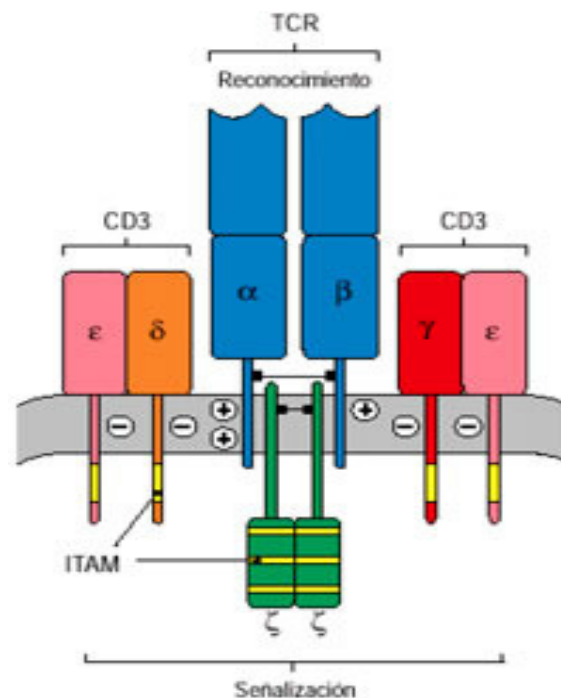


Figura 4. Estructura del TCR.

Determinados péptidos de las regiones hipervariables de las cadenas α y β interaccionan con otros péptidos del complejo MHC-Ag. En cada región variable del TCR existe una secuencia de aminoácidos que es común para todo el clon de estos linfocitos lo que le confiere una identidad biológica.

El complejo CD3 se une de forma no covalente al TCR, permitiendo su expresión de membrana y transduciendo la señal una vez estimulado el linfocito al contacto con el Ag.

La molécula CD4 se expresa en la mayoría de los linfocitos $T\alpha/\beta$, aunque también en otras células como timocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se une al MHC II y por un lado estabiliza la unión de dicho linfocito a la APC y por otro colabora en la transducción de señales transmitidas por el TCR, lo que induce la proliferación celular.

El CD8 se expresa en el 35% de los linfocitos T α/β y al igual que el CD4, su unión a las moléculas del sistema MHC estabiliza la unión con el Ag y amplifica el estímulo colaborando en la transducción de la señal.

Cuando un linfocito T virgen reconoce a un Ag, prolifera y se diferencia en tres tipos de células efectoras cuya función está determinada por el microambiente inmunológico: linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos T inflamatorios (TH1) que participan en la inmunidad celular, y los linfocitos T colaboradores (TH2) que participan en la inmunidad humoral:

Los CTL tienen capacidad de destrucción y son muy importantes en el reconocimiento y eliminación de células propias alteradas, como células tumorales o infectadas por virus, e intervienen en el rechazo a los trasplantes. Estos linfocitos colaboran en la inmunidad innata al secretar citoquinas como Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α), IFN- γ o linfoquinas.

Actúan contra las células mediante dos mecanismos:

- a) Liberan perforinas que originan poros a través de los cuales pasan las granzimas, activando la cascada de las caspasas provocando la apoptosis de la célula.
- b) Se une a la célula diana a través del receptor Fas del CTL lo cual también activa a las caspasas y la posterior apoptosis.

Los TH1 activan a los macrófagos para la eliminación de los agentes microbianos fagocitados, poniéndose en contacto con ellos a través del receptor CD4, potenciado por la secreción de IFN- γ para la eliminación de patógenos intracelulares.

Estos linfocitos también activan a los neutrófilos a través de la secreción de citoquinas y a los linfocitos B⁽¹⁴⁴⁾.

Los TH2 actúan sobre los patógenos extracelulares y parásitos. También inducen en las células B la producción de Ac, sobre todo IgE, promoviendo la degranulación de los mastocitos y eosinófilos, importantes en la reacción alérgica y en la inmunidad frente a helmintos, así como la activación de macrófagos⁽¹⁴⁹⁾.

Células Natural Killer

Son leucocitos y representan entre el 5-15% de los linfocitos de sangre periférica. Estos reconocen los cambios que ocurren en la superficie celular de algunas células infectadas e inducen la apoptosis, independientemente de un reconocimiento antigénico, uniéndose a ellas mediante receptores activadores de la muerte celular.

Estas células establecen un reconocimiento de MHC I no asociado a Ag a través de dos grupos de receptores, Kir y la familia CD94/NKG2A. También desencadenan una respuesta citotóxica en aquellas células que no presentan MHC, como las infectadas por virus o las tumorales.

Fenotípicamente se caracterizan por no presentar CD3, pero expresan otros receptores como CD56, molécula de adhesión importante en la interacción con la célula diana y CD16 que permite el reconocimiento y unión a células diana recubiertas por inmunoglobulinas, receptores que también se encuentran en otras células con actividad citotóxica. También expresan moléculas de adhesión, quimiorreceptores y marcadores de activación comunes a otras poblaciones linfocitarias. Son productoras de citoquinas y

expresan receptores para monoquinas, con lo que contribuyen de forma importante en la regulación de la respuesta inmune⁽⁵³⁾.

COMPONENTES MOLECULARES DEL SISTEMA INMUNE

Citoquinas

Las citoquinas son factores solubles liberados por las células como respuesta a estímulos y son esenciales en la interacción entre las células del sistema inmune. Se unen a los receptores de membrana de las células diana, inducen una señalización que origina un cambio del patrón de expresión de genes, pueden alterar la organización del citoesqueleto o liberar vesículas secretoras.

** Intervienen en el control de la proliferación y movilización de las células hematopoyéticas y de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T que forman parte de la respuesta inmune.

** Favorecen la activación de los macrófagos como respuesta ante patógenos intracelulares.

** Regulan la quimiotaxis hacia el foco inflamatorio así como la magnitud y la duración de la respuesta inmune⁽²⁴⁾.

Las principales citoquinas de la respuesta innata son:

a) *TNF- α* : junto con la IL-1 se considera la citoquina más importante en la respuesta inflamatoria. Las principales células productoras son los monocitos y macrófagos como respuesta a los LPS bacterianos y tras la estimulación de linfocitos T.

También puede ser sintetizado por otras células como linfocitos T y B, células NK, polimorfonucleares, eosinófilos, células de Langherhans y células de Kupffer.

Su actividad biológica la ejerce a través de dos receptores, p55TNRF I y II, que se expresan en casi todas las células. Esta citoquina induce cambios proinflamatorios en las células endoteliales, provocando la expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias procoagulantes y de otras citoquinas. En los macrófagos induce la producción de IL-1 y quimioquinas y regula la expresión de MHC I. Por otro lado, al inhibir la producción de IL-12 en los macrófagos (citoquina proinflamatoria), también puede tener carácter antiinflamatorio.

b)IL-1: puede ser sintetizada por muchas células (monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliales y células de la glía). Existen dos tipos (α y β) que actúan gracias a dos tipos de receptores (IL-1RI e IL-1RII).

El IL-1RI pertenece a la familia de los TLR, implicados en la inmunidad innata mediante el reconocimiento no específico de agentes infecciosos. Reconoce las IL-1 tipo α y β y al unirse forman un complejo de reconocimiento para iniciar la señal de transducción. La IL-1RA es un antagonista del receptor que inhibe las actividades biológicas de los dos tipos de IL-1 al competir por sus receptores.

Su actividad biológica consiste en la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos, induciendo la producción de otras citoquinas y funciones de adhesión linfocitaria.

c) *IL-6*: es una glicoproteína sintetizada por muchas células tras la estimulación con *IL-1* (monocitos, células T activadas, células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos) e intervienen en la regulación de las proteínas de fase aguda.

Tiene actividad proinflamatoria ya que estimula la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas, así como la producción de Ig, y la proliferación y diferenciación de los CTL. También tiene actividad antiinflamatoria ya que en los macrófagos inhibe la producción de *IL-1* y $\text{TNF-}\alpha$ y la producción de *IL-1RA*.

d) *Quimiocinas*: son proteínas de bajo peso molecular que originariamente se identificaron por su capacidad quimioatrayente y proinflamatoria, Son secretadas por las células endoteliales activadas, linfocitos, monocitos y macrófagos.

No solo regulan la quimiotaxis (fundamentalmente *IL-8* y *RANTES*), sino también la adhesión, degranulación, angiogénesis y desarrollo de las células del sistema inmune.

e) *IL-12*: Es una proteína sintetizada por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en las etapas iniciales de la respuesta inmune para activar la inmunidad celular. Promueve la diferenciación de los linfocitos T hacia TH1 para una respuesta adecuada frente agentes microbianos y la secreción de $\text{IFN-}\gamma$ por parte de las células T y NK. Es una molécula importante en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa.

f) *IL-10*: Es una molécula con actividad antiinflamatoria secretada por los TH2, macrófagos y células dendríticas. Bloquea la producción de citoquinas (como *IL-12*, u otras que favorecen el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio) en

monocitos, linfocitos T, neutrófilos y eosinófilos, moléculas coestimuladoras y la expresión de moléculas MHC II en macrófagos y células dendríticas⁽³⁹⁾.

Por otro lado es la citoquina inmunosupresora por excelencia e induce la tolerancia periférica de células T al inhibir la fosforilación del CD28.

En la respuesta inmune también favorece el desarrollo de células B y mastocitos, la producción de Igs (IgG, IgA, IgM), y la actividad de las células NK.

Es muy importante en la limitación de una reacción inmune excesiva y el consecuente daño tisular⁽¹²⁴⁾.

Las principales citoquinas de la respuesta adaptativa son:

a) *IL-2*: Es sintetizada en su mayor parte por los linfocitos T CD4+. Favorece el crecimiento y diferenciación de células B hacia células secretoras de Igs. Además regulan la activación y proliferación de linfocitos T y células NK.

b) *IL-4*: Es una glicoproteína sintetizada por los TH2 activados e induce la proliferación celular. Es una citoquina fundamental en la respuesta inmune frente a parásitos. Regula la proliferación y diferenciación de células B e induce la secreción de IgE, siendo un potente activador de mastocitos. También promueve la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos T efectores y de memoria.

c) *IFN- γ* : Es producido exclusivamente por las células del sistema inmune principalmente por TH1, CTL y células NK. Es esencial para la activación de la capacidad bactericida de los macrófagos, estimula la producción de IL-1 y TNF- α e induce la expresión de moléculas de MHC I y II. Una vez activados los macrófagos

liberan IL-12 que a su vez estimula la liberación de IFN- γ y la diferenciación de los linfocitos T hacia TH1 así como la inhibición de la diferenciación a TH2.

Contribuye de forma significativa en la regulación de los procesos inflamatorios y de la inmunidad adaptativa celular: regula la extravasación de los linfocitos e induce la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas en leucocitos y células endoteliales. Estimula, además, la producción de NO en macrófagos.

Promueve la diferenciación de linfocitos B a célula plasmática productora de IgG, facilita la eliminación de patógenos por monocitos y neutrófilos, estimula la expresión de receptores Fc en células NK, monocitos y macrófagos, así como la secreción de proteínas del complemento por monocitos⁽²⁾.

Complemento

Es un conjunto de proteínas plasmáticas que reaccionan en cascada cuyo fin es la eliminación de agentes patógenos mediante la formación de poros en su superficie, dando lugar a la lisis directa de los mismos. Algunas de sus proteínas tienen actividad quimiotáctica originando una respuesta inflamatoria local que a su vez favorece el reclutamiento y recirculación de APCs y contribuye al inicio de la respuesta adaptativa.

Existen tres vías de activación del complemento: la vía clásica, inducida por complejos Ag-Ac, la vía de lectina de unión a mananos y la vía alternativa que se activa directamente sobre la superficie de los agentes patógenos⁽⁷⁹⁾.

Inmunoglobulinas

Las Igs son glicoproteínas sintetizadas por las células plasmáticas. Están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas iguales (H) y dos ligeras también iguales (L). Cada una presenta una región constante y otra variable. La región constante (Isotipo) es común para la especie y define la función biológica. En cambio la región variable (Idiotipo) es única para cada clon de células B y es la encargada del reconocimiento antigénico.

Existen distintos tipos de cadenas pesadas que son las responsables de la denominación de la Igs: γ (IgG), α (IgA), μ (IgM), δ (IgD) y ϵ (IgE).

Las cadenas ligeras presentan regiones hipervariables con diferente secuencia de aminoácidos en la mitad amino-terminal según el tipo de Ig. Esta región forma parte del lugar de unión específica al Ag. La variabilidad en la parte carboxiterminal es mucho menor, originando dos tipos de cadena, κ y λ .

Las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante dos puentes disulfuro y cada cadena ligera se une a una pesada mediante un puente disulfuro.

Las Igs cuando son sometidas a una ruptura enzimática se dividen en tres fragmentos, dos de ellos capaces de unirse al Ag (Fab) y un tercero (Fc) que aunque no puede unirse al Ag, sí presenta zonas de unión para proteínas del complemento y receptores celulares.

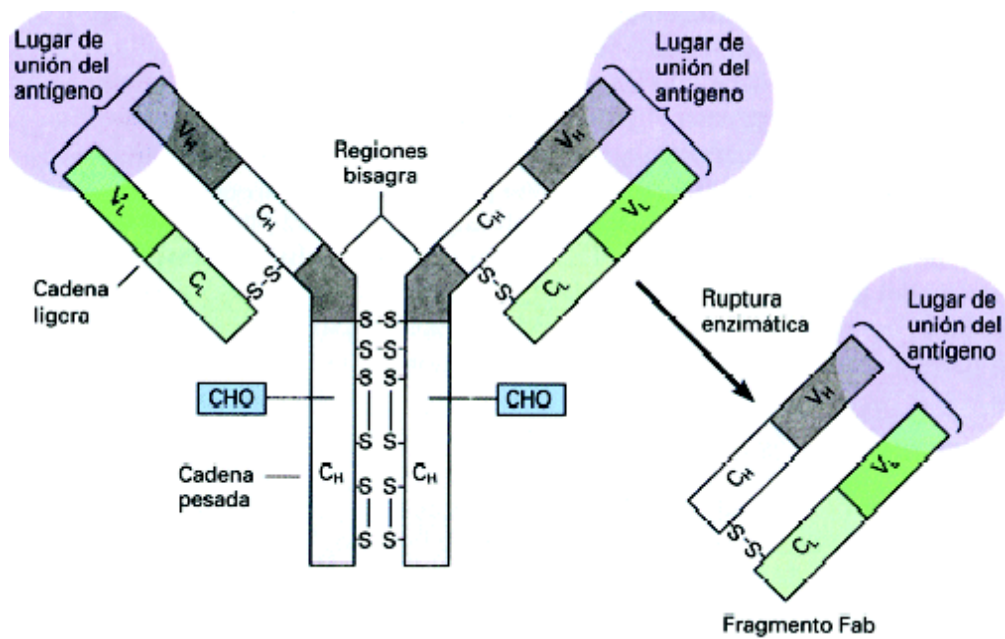


Figura 5. Estructura de una inmunoglobulina.

Una vez unida la Ig al Ag, ésta tiene la capacidad de neutralizar, precipitar o aglutinarlo, pero para su destrucción es necesaria la intervención de otros elementos del sistema inmune (macrófagos, polimorfonucleares, células NK o sistema del complemento).

Cuando un Ag activa por primera vez a los linfocitos B, estos necesitan cierto tiempo para diferenciarse en células plasmáticas y por lo tanto para la síntesis de Igs (predominando la IgM), pero cuando el mismo Ag vuelve a activar al sistema inmune, gracias a las células de memoria, el tiempo que tardan en aparecer las Igs (fundamentalmente IgG) es mucho menor y la respuesta es de mayor intensidad⁽¹²⁷⁾.

RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS

El reconocimiento de los patógenos por parte del sistema inmune innato es el primer paso para que el organismo diferencie “lo propio” de “lo no propio”. Además los receptores específicos del mismo son capaces de reconocer moléculas muy conservadas evolutivamente que se encuentran en la superficie de los agentes patógenos (PAMPs) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMPs). El sistema inmune innato es capaz de responder a estos dos tipos de señales de peligro y daño cuando son detectados por los PRR.

RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Los PRR son receptores no clonales e independientes de la memoria inmunológica, a diferencia de los receptores antigénicos de las células de la inmunidad adaptativa⁽⁸⁷⁾. Aunque su especificidad está determinada genéticamente, identifican tanto PAMPs como DAMPs, dando lugar a una respuesta inmunológica rápida.

Los PRR se expresan en muchos tipos de células del sistema inmune (monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK y células B y T) tanto en la membrana celular como en el citoplasma y vesículas citoplasmáticas, aunque también se han observado en otro tipo de células como fibroblastos y células epiteliales⁽¹⁹⁾.

Cuando un agente infeccioso es reconocido por los PRR origina una cascada de señalizaciones intracelulares que dan lugar a la expresión de genes codificantes de mediadores inmunes (citoquinas, quimiocinas).

En los mamíferos los mejor conocidos son los TLRs que son capaces de reconocer componentes de la pared celular de las bacterias así como proteínas víricas y ácidos nucleicos. Existen otros receptores no TLR capaces de reconocer carbohidratos complejos de bacterias, virus y hongos como los receptores de lectina tipo C (CLR)⁽⁷⁸⁾, los tipo NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) localizados en el citoplasma que reconocen peptidoglicanos bacterianos, los RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene I*) que reconocen ácidos nucleicos virales o los receptores tipo AIM-2 (*Absent in melanoma 2*) que identifican ADN viral⁽⁸⁰⁾.

Receptores tipo Toll

Fueron descritos por primera vez en la *Drosophila melanogaster*, conocida como mosca de la fruta o del vinagre, ligados a la defensa contra infecciones bacterianas y hongos, además de su actividad como moduladores del desarrollo embrionario. Posteriormente estos receptores fueron descubiertos en mamíferos como glicoproteínas transmembrana de tipo I en la membrana plasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) o en la membrana endosomal (TLR3, 7, 8 y 9)⁽⁹⁶⁾. Estos receptores presentan una secuencia extracelular con dominios ricos en leucina que reconocen el Ag y un dominio intracelular homólogo al receptor de la IL-1, TIR (*Toll interleukin I receptor*) indispensable para la señalización. Los ligandos para los diferentes TLR se encuentran recogidos en la tabla 2⁽³⁾.

TLR	LIGANDO
TLR1	Lipoproteínas triacetiladas.
TLR2	Lipoproteínas de bacterias Gram negativas, peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, ácido lipoteicoico, ácido hialurónico y HMGB1.
TLR3	ARN de doble hebra.
TLR4	LPS y peptidoglicanos de bacterias Gram negativas, ácido hialurónico, ácidos grasos libres.
TLR5	Flagelina.
TLR6	Lipoproteínas diacetiladas.
TLR7	ARN de hebra sencilla.
TLR8	ARN de hebra sencilla.
TLR9	ADN rico en CpG no metilado, HMGB1.
TLR10	Desconocido.
TLR11	Profilina.

Tabla 2. Ligandos de los TLR.

Una característica de los TLR es la capacidad que tienen para reconocer gran variedad de ligandos muy diferentes, sobre todo el TLR2. Cuatro de ellos (TLR1, 2, 6, y 10) presentan la misma localización cromosómica, pudiendo ser esta la razón por la que los TLR1, 6 y 10 pueden formar heterodímeros con el TLR2 para el reconocimiento de determinados PAMPs. Los TLR3, 7, 8 y 9 son intracelulares y reconocen ácidos nucleicos microbianos.

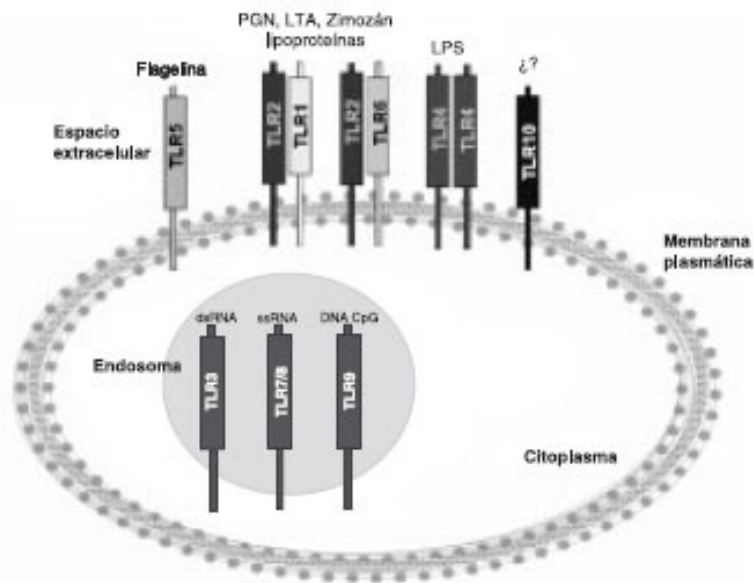


Figura 6. Localización de TLR celulares.

Una vez unido al ligando, los TLR reclutan moléculas adaptadoras tipo:

- a) *MyD88* (*Mieloid differentiation primary response gene 88*), utilizada por todos los TLR salvo el TLR3.
- b) *TRIF* (*TIR domain containing adapter inducing interferon β*), utilizada por TLR3 y 4.
- c) *MAL/TIRAP* (*MyD88 adapter like protein/TIR domain containing adapter protein*), fundamental para la señalización de TLR2 y 4 que actúa como nexo de unión entre MyD88 y el TLR.
- d) *TRAM* (*TRIF related adaptor molecule*) que es el nexo entre TRIF y el TLR.

Estas moléculas adaptadoras activan kinasas (complejo IKK, MAPKs, TBK1, RIP-1) y factores de transcripción como NF- κ B (*nuclear factor κ B*), y AP-1 (*activator protein-1*) que posteriormente inducen la expresión de genes codificantes de citoquinas⁽⁶⁵⁾.

TLR2

Son receptores localizados en la membrana plasmática que reconocen una gran variedad de ligandos microbianos, probablemente por su capacidad de asociación con TLR1 y 6, formando heterodímeros de reconocimiento que le confieren la capacidad de diferenciar entre los diferentes componentes microbianos. Así, la interacción con TLR1 es necesaria para reconocer triacil-lipopéptidos, mientras que la asociación con TLR6 es fundamental para reconocer diacil-lipopéptidos, con lo que estas asociaciones permiten incluso diferenciar los distintos lipopéptidos. Además el receptor CD14 puede actuar aumentando la eficiencia en el reconocimiento de algunos ligandos por parte del TLR2⁽¹⁰⁶⁾.

TLR4

Fue el primer TLR identificado y el más conocido actualmente. Interviene en la función inmunitaria de las infecciones bacterianas producidas fundamentalmente por Gram negativos. Reconoce el LPS de la pared celular de estas bacterias aunque también es capaz de reconocer otros componentes de agentes infecciosos como proteínas de fusión y la cápsula de algunos virus.

El TLR4 no puede reconocer por sí solo al ligando, necesitando un complejo de reconocimiento. Este complejo está formado por dos proteínas, la CD14 (cluster de diferenciación 14) y el LBP (proteína de unión al LPS) que se encuentran ancladas en la

membrana celular. Al no presentar un dominio citoplasmático, no pueden transducir la señal dentro de la célula cuando reconocen al ligando por lo que necesitan presentar el LPS a una proteína de señalización, la MD-2 (proteína de diferenciación mieloide 2) que a su vez se une al TLR4, imprescindible para la respuesta inmunitaria⁽¹¹⁷⁾.

PATRONES MOLECULARES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS

Los agentes infecciosos presentan una gran variedad de PAMPs que no se encuentran en los mamíferos, por lo que el sistema inmunitario reacciona contra ellos al reconocerlos como no propios. Son estructuras que se han conservado a lo largo de la evolución ya que son partes imprescindibles para su viabilidad.

El sistema inmune es capaz de:

****Reconocer PAMPs solubles.**

****Diferenciar entre agentes vivos o muertos mediante la identificación de patrones que indican viabilidad del microorganismo (por ejemplo ARNm).**

****Diferenciar entre los gérmenes que son patógenos que expresan genes codificantes para factores de virulencia.**

Los PAMPs más característicos son:

a) LPS bacteriano: se encuentra en la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Está formado por tres partes: la externa con el Ag O, la central formada por polisacáridos, ambas hidrofílicas y una parte interna e hidrofóbica formada por seis cadenas de ácidos grasos denominada lípido A que es el componente

biológicamente activo y es el que reconoce el TLR4. El LPS es captado por el CD14 de la superficie celular facilitando la activación del TLR4 lo que conlleva a la síntesis de mediadores inflamatorios.

b)Ácido lipoteicoico: se encuentra en la pared celular de las bacterias Gram positivas.

c)Peptidoglicanos: es una estructura básica de la pared celular de las bacterias.

d)Mananos: son polímeros de manosa unidos covalentemente a proteínas (manoproteínas). Pueden encontrarse como componentes estructurales de la pared celular, o periplasmática teniendo un papel destacado en la porosidad de la misma. Inducen la activación de la respuesta TH1 y son reconocidos por numerosos PRRs.

e)βGlucanos: son polisacáridos de glucosa unidos por enlaces β que forman parte de la pared celular de los hongos.

f)Quitinas: formadas por polímeros de N-acetilglucosamina que se encuentran en la parte interna de la pared de los hongos, ya en contacto con la membrana plasmática.

Los gérmenes contienen numerosos PAMPs, que activan por lo tanto a muchos PRR. Una vez interiorizado dentro de los fagolisosomas son degradados liberando otros PAMPs (ARN y ADN) que activan a los PRR intracelulares. Durante la fagocitosis se producen diferentes señales que inducen la liberación de citoquinas y mediadores del sistema inmune⁽²⁵⁾.

SEPSIS E INMUNIDAD

Actualmente la sepsis constituye un problema sanitario de gran magnitud, con una incidencia y una mortalidad elevada. Además es uno de los motivos de consulta más prevalente en los servicios de urgencias que requiere ingreso en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), siendo la principal causa de muerte no coronaria en estas unidades. Representa una gran carga económica para el Sistema Sanitario debido a los elevados costes que genera y a las repercusiones a medio y largo plazo en la calidad de vida de los pacientes.

La palabra “sepsis” es un término griego que significa putrefacción y aunque la primera descripción la realizó Homero, fue Pasteur el que estableció la relación entre las bacterias y la enfermedad⁽⁵⁸⁾.

DEFINICIÓN DE SEPSIS

La sepsis puede considerarse una respuesta inmunológica frente a la infección. Una respuesta que aunque su finalidad es defensiva, a veces es desmesurada y origina una lesión tisular en el huésped. Se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica secundaria a la activación de diferentes mediadores inflamatorios. La reacción inflamatoria generalizada no es específica de la infección, por ello se propuso el término de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS).

Durante mucho tiempo se han empleado diferentes términos para referirse a la sepsis, hasta que en 1991 el *American Collage of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) lograron unificar las definiciones de sepsis en adultos en una Conferencia Consenso⁽²⁷⁾.

El *SRIS* se definió como la presencia de al menos dos de los siguientes criterios:

****Temperatura mayor de 38,3°C o menor de 36°C.**

****Frecuencia cardiaca mayor de 90 latidos por minuto.**

****Frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto o presión arterial menor de 32 mm de Hg.**

****Recuento de leucocitos mayor de 12.000/mm³ o menor de 4.000/mm³ o cifra de formas inmaduras (cayados) superior al 10%.**

Se llegó al acuerdo en las siguientes definiciones:

Sepsis: Cuando el *SRIS* se debe a una infección documentada de forma clínica o microbiológica.

Sepsis grave: Cuando además existe disfunción orgánica, hipotensión o aumento del ácido láctico en sangre como consecuencia de la hipoperfusión.

Shock séptico: cuando existe una hipotensión inducida por la sepsis que persiste aun con la reposición vigorosa de fluidos y se acompaña de hipoperfusión o disfunción orgánica. Sería una falta de respuesta al aporte rápido de cristaloides o la necesidad de fármacos vasoactivos para mantener la perfusión arterial igual o mayor de 65 mm Hg.

Sepsis grave de alto riesgo: Cuando existe una sepsis grave con un riesgo de mortalidad hospitalaria muy alto. Se incluyen pacientes con puntuación *APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II)* mayor de 24 puntos en las 24 horas previas y sepsis con fallo de dos o más órganos.

Síndrome de disfunción multiorgánica: Cuando existen funciones orgánicas alteradas en un paciente con una enfermedad aguda, necesitando mantener la homeostasis con intervenciones terapéuticas.

Aunque la sepsis suele seguir esta cronología (sepsis, sepsis grave, shock séptico...), en los extremos de la vida (neonatos y ancianos), en caso de microorganismos muy virulentos, o pacientes inmunodeprimidos, el inicio del cuadro puede ocurrir en cualquiera de los estadios.

Esta definición de sepsis se modificó posteriormente al aparecer nuevos trabajos de investigación. Así en una nueva Conferencia Internacional celebrada en 2001 se incluyeron novedades en cuanto a signos y síntomas de SRIS sugestivos de infección además de un sistema de estadiaje en cuanto a gravedad denominado PIRO (Predisposición, Infección, Respuesta y Disfunción Orgánica)⁽⁹²⁾. Aunque se introdujeron algunos conceptos referentes a la sepsis en pediatría, las definiciones generales no estaban adaptadas a esta población. En una nueva conferencia en 2002 ya se definió el SRIS en niños con los mismos criterios clínicos y de laboratorio que para el adulto pero con valores de normalidad específicos para cada grupo de edad⁽⁶¹⁾. Además se tenía en cuenta algunas peculiaridades de los niños en menores de 1 año incluyendo tanto la taquicardia como la bradicardia y de los 4 criterios para el diagnóstico eran obligados la temperatura corporal y el recuento leucocitario.

Se ha publicado en Febrero de 2016 los acuerdos de la Tercera Conferencia Internacional⁽¹³⁸⁾ en los que:

****Desaparecen los criterios de SRIS en la definición, dando menos importancia a criterios de respuesta inflamatoria y enfatizando otros criterios (metabólicos, cardiovasculares y hormonales).**

****Desaparece el concepto de sepsis grave porque el diagnóstico de sepsis “per se” implica el fallo orgánico.**

**Da mayor importancia a la escala SOFA (*Sepsis related Organ Failure Assessment*) porque se ajusta mejor a la mortalidad hospitalaria.

** Aparece un concepto nuevo (quick-SOFA) para identificar a los pacientes con alto riesgo de tener eventos no deseados fuera de la UCI.

** El estado de shock séptico presenta matizaciones: aunque se mantiene el concepto de pacientes sépticos con mayor mortalidad, se le da más importancia a las alteraciones metabólicas y celulares derivadas del fracaso circulatorio. Además se asocia la necesidad de vasopresores para mantener la presión arterial media igual o mayor a 65 mm de Hg con niveles de lactato iguales o superiores a 2 mmol/l, a pesar de una adecuada reposición volémica.

FUNCIÓN INMUNITARIA EN LA SEPSIS

Cuando una infección se instaura, se produce una reacción rápida del organismo para evitar la progresión de los microorganismos. Esta reacción consiste en una activación de cascadas bioquímicas y celulares que cuando la infección es diseminada es exagerada, siendo nociva para el propio huésped, calificada esta reacción del sistema inmunitario por algunos autores de suicida.

Al comienzo hay una liberación de citoquinas proinflamatorias de forma incontrolada, “tormenta de citoquinas”⁽³¹⁾, que a su vez contribuyen a la activación de las células efectoras inmunes y de nuevo la secreción de más citoquinas. Además, las plaquetas y los polimorfonucleares activados van a agredir las células endoteliales vasculares con la consiguiente rotura y paso de las células inmunes efectoras a través de las paredes vasculares originando un daño isquémico y citotóxico en los tejidos⁽¹³⁰⁾. Simultáneamente comienza una respuesta antiinflamatoria, con el fin de limitar el daño,

segregándose IL-10, IL-11 e IL-13 que intentan disminuir la activación de la cascada que se ha puesto en marcha previamente, reduciéndose las citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 e IFN- γ). Se elevan los niveles de los antagonistas de los receptores de la IL-1 y los receptores solubles del TNF- α . El CD14 también actúa inhibiendo la respuesta inflamatoria. Una respuesta antiinflamatoria excesiva puede derivar en un síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (CARS)⁽⁶⁾ excesivo con depresión de la función inmunitaria e inmunosupresión. Así, la respuesta del huésped es determinante en la sepsis, no solo el agente agresor.

Cuando existe una progresión y aparece el shock séptico se produce una alteración en la microcirculación, con disminución del calibre de los pequeños vasos, activación de factores inflamatorios y de la coagulación, originando hipoperfusión e isquemia. Los leucocitos también están activados y se adhieren a las paredes del endotelio favorecido por la expresión de selectinas, integrinas y receptores de CD18 en la superficie de las células endoteliales. Además el TNF- α y la IL-1 producen un efecto tóxico directo en el endotelio, activan la fosfolipasa A2, los leucotrienos y tromboxanos, aumenta el NO y se produce una activación de procoagulantes endoteliales. Todo ello origina una trombosis capilar, inflamación endotelial y aumento de la permeabilidad vascular dando lugar a una disfunción capilar.

En las primeras fases de la sepsis el organismo presenta un estado hiperdinámico en el que hay un incremento del consumo de oxígeno pero con una capacidad adecuada para extraerlo de las células y utilizarlo. A medida que avanza, el transporte de oxígeno se modifica con lo que se dificulta el metabolismo celular, se rompe el flujo sanguíneo tisular normal y aparece una mala distribución a los diferentes órganos, originando una

situación hipermetabólica donde los requerimientos de oxígeno pueden elevarse hasta un 50%. A la vez se dificulta la extracción del mismo, llevando a la postre a una acidosis que afecta gravemente a todo el organismo. A todo ello contribuye también el daño tisular tóxico, la lesión endotelial, el edema celular o la inhibición de la respiración mitocondrial, favorecedores de la insuficiencia celular para utilizar el oxígeno y el consecuente fallo metabólico.

VULNERABILIDAD GENÉTICA A LAS INFECCIONES

Desde hace mucho tiempo ha llamado la atención en la práctica clínica la variabilidad individual en la susceptibilidad a presentar enfermedades infecciosas e incluso en la gravedad de las mismas⁽¹⁰³⁾. Existen datos históricos que describen cómo en la peste que asoló Europa en el siglo XIV en una misma familia había individuos que no contraían la enfermedad y en cambio otros se afectaban gravemente. Por otro lado, actualmente puede observarse en los hospitales cómo pacientes previamente sanos que contraen neumonías adquiridas en la comunidad presentan un curso fulminante aun con tratamiento antibiótico adecuado mientras que otros tienen una curación espontánea en su domicilio⁽⁸⁹⁾.

Existen muchos factores implicados en la susceptibilidad y en la respuesta a la infección, como el estado de salud previo, situación inmunológica o la virulencia del germen, pero también existe un componente genético que determina las diferentes respuestas del organismo⁽³³⁾. Los genes tienen un papel muy importante en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. La genética epidemiológica, incluyendo estudios en gemelos o grupos raciales, proporciona una fuerte evidencia consistente en que la variación genética contribuye a la susceptibilidad para determinadas infecciones.

Se sabe que los pacientes con inmunodeficiencias primarias presentan una gran vulnerabilidad para padecer múltiples enfermedades infecciosas (un gen, múltiples infecciones), mientras que las infecciones comunes se asocian frecuentemente a una herencia poligénica (una infección, múltiples genes), aunque también se ha descrito la herencia de un gen principal de susceptibilidad (un gen, una infección).

Estudios en ratones *knock-out* (carentes de determinados genes) para el gen del IFN- γ y su receptor, para el de la IL-12 o para el del STAT-1 (transductor de señal y activador de la transcripción), han demostrado la gran susceptibilidad a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*⁽³⁸⁾. En el estudio Prophit⁽³⁷⁾ llevado a cabo en gemelos, se vio que existe una concordancia mayor de tuberculosis en los gemelos homocigotos que en los dizigotos.

ALTERACIONES MONOGÉNICAS

Se han identificado muchas mutaciones monogénicas, poco frecuentes pero importantes, que originan variaciones en el sistema inmunitario y condicionan su capacidad para responder de forma adecuada frente a una infección. Se asocian a infecciones bacterianas recurrentes ya en la infancia e incluso con fenotipos de muy diversa gravedad y pronóstico. Un caso muy significativo es la fibrosis quística en la que se han identificado más de 1.000 mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana que originan fenotipos muy distintos en cuanto a gravedad⁽⁴²⁾.

En el lado opuesto están las mutaciones que dan lugar a determinada resistencia frente a algunos agentes infecciosos. Es el caso de las variaciones genéticas que confieren una protección parcial frente al *Plasmodium falciparum* aunque con un coste

añadido como es el desarrollo de Hemoglobina S (anemia de células falciformes) o el déficit de glucosa -6-fosfato-deshidrogenasa⁽¹⁰⁾.

ALTERACIONES POLIGÉNICAS

Tienen un patrón de herencia complejo con baja heredabilidad, en los que no existe un factor genético único, sino que son numerosos genes los que determinan las manifestaciones clínicas.

Muchos de los genes implicados en la vulnerabilidad frente a las enfermedades infecciosas codifican proteínas que intervienen en el sistema inmunitario. Un número importante de ellos se encuentran en una porción de ADN de unos 4 millones de pares de bases, como el MHC, que se localiza en el cromosoma 6, formado por 128 genes de los cuales el 40% tienen función inmunológica. Además hay otros genes que se localizan en la proximidad que influyen en la respuesta inflamatoria como los que codifican el TNF α o algunas proteínas del complemento que influyen de forma importante en la susceptibilidad a la sepsis⁽⁸⁹⁾.

Existen otros genes en los cromosomas 5, 1 y 9 que también se relacionan con la susceptibilidad a la infección.

POLIMORFISMOS GENETICOS DE LA INMUNIDAD INNATA

El genoma humano está formado aproximadamente por 3,1 gigabases y entre 20.000 y 25.000 genes, aunque solo la mitad de ellos tienen una secuencia de bases que pueden indicar que presenten alguna función. Los seres humanos compartimos más del 99% de las secuencias de ADN y aun así dos individuos pueden diferir en 2 millones de bases. A esta variación es lo que se denomina polimorfismo⁽⁷³⁾. Así un polimorfismo genético es una región del genoma que varía entre los diferentes individuos de una población. Para que una variación pueda considerarse polimorfismo tiene que aparecer al menos en un 1% de la población pudiendo afectar a un solo nucleótido o a secuencias cortas repetitivas de estos. Por lo tanto el polimorfismo podría considerarse una mutación estable que afecta de forma significativa a una población.

Las formas más frecuentes son los denominados “polimorfismos de un solo nucleótido” (SNP) siendo estos los que originan la mayoría de las diferencias genéticas entre los individuos. Existen aproximadamente 10 millones de estos polimorfismos en la especie humana, lo cual significa que cada 300-500 nucleótidos existe una variación frecuente.

Aunque todos los SNP pueden ser importantes como marcadores genéticos, solo una pequeña parte de los mismos pueden originar alteraciones fenotípicas de las proteínas. Los más frecuentes son los que se encuentran en los intrones (secuencias no codificantes situadas entre los exones) de la región promotora del gen (secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para comenzar la transcripción). Menos frecuentes son los que se localizan en la zona de codificación del gen pero que no llegan a alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, siendo los más raros los

que originan un cambio de aminoácido de la proteína y por lo tanto alteraciones funcionales.

Cada uno de los procesos que ocurren en la defensa por parte de la inmunidad innata puede verse alterado por la presencia de polimorfismos de los genes implicados, provocando una mayor o menor susceptibilidad a la infección, y aunque un único SNP pudiera afectar en pequeña medida a las moléculas implicadas en la inmunidad, la presencia de muchos de ellos pueden condicionar la vulnerabilidad a determinados procesos infecciosos⁽⁶⁷⁾.

En este trabajo hemos seleccionado una serie de polimorfismos potencialmente implicados en la respuesta de la inmunidad innata frente a la infección y que se revisan a continuación.

POLIMORFISMOS DEL GEN TLR2

Los TLR2 reconocen el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram positivas, hongos y micobacterias. Se ha descrito que existe una mayor vulnerabilidad para presentar infecciones por *S. aureus* en los ratones con alteraciones de los TLR2 así como un aumento en la susceptibilidad para presentar infecciones graves por este germen en los individuos con determinados polimorfismos de TLR2^(94,111,137).

POLIMORFISMOS DEL GEN TLR4

El TLR4 reconoce el LPS de la pared bacteriana de las bacterias Gram negativas. Se han descrito en humanos diferentes polimorfismos de este gen y los que afectan a la región extracelular del TLR4 a una mayor incidencia y mayor gravedad de sepsis en pacientes críticos^(20,72).

POLIMORFISMOS DEL GEN CD14

El CD14 es una proteína de membrana de algunas células del sistema inmune que junto con el MD-2 y el TLR4 forman un complejo receptor de LPS de las bacterias Gram negativas. Se ha relacionado un polimorfismo de este gen con una mayor susceptibilidad para padecer sepsis en neonatos de bajo peso⁽¹⁶⁾, además de mayor número de infecciones por Gram negativos en pacientes comprometidos⁽¹³⁷⁾, no constatada por otro grupo de investigadores⁽⁸¹⁾.

Dado que los TLR2, TLR4 Y CD14 se encuentran relacionados con la inmunidad innata y la respuesta frente a la infección, las variantes genéticas de estos receptores debería modificar la respuesta frente a diferentes microorganismos.

1° Estudiar variantes genéticas y su influencia en la susceptibilidad frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

2° Analizar polimorfismos de los genes TLR2, TLR4 y CD14 en pacientes pediátricos con infección neumocócica y meningocócica graves.

3° Correlacionar los resultados obtenidos con la gravedad de la infección.

PACIENTES

Se procedió al estudio de 194 pacientes afectados de infección grave por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*.

El estudio se realizó en dos etapas. En la primera se incluyeron 173 individuos con diagnóstico de infección grave, para estudio de los polimorfismos de TLR4 y CD14. En la segunda etapa se incluyeron 179 individuos con infección grave, de los cuales 158 se incluyeron en la etapa anterior, para estudio de polimorfismos del TLR2. El rango de edades comprendía entre 3 días y 2 años y de ellos 92 eran varones y 81 hembras en el primer caso y 95 varones y 84 hembras en el segundo.

Como control se estudiaron 132 individuos sanos en la primera etapa y 100 en la segunda. Se trataba de personas que no padecieron infección grave en la infancia.

Como **criterios de inclusión** se tuvieron en cuenta pacientes afectados de infección grave por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* ingresados en la UCI pediátrica y cuyos representantes legales firmaron el consentimiento informado para autorización del estudio. Como **criterios de exclusión** se tuvo en cuenta la negativa a formar parte del estudio.

Las muestras de los pacientes se recogieron de un banco de muestras del IBGM (Instituto de Biología y Genética Molecular) de la Universidad de Valladolid, muestras que están anonimizadas y eran procedentes de la UCI pediátrica del Hospital del Niño Jesús de Madrid, durante el periodo de 2000-2007. El estudio fue aprobado por el comité ético de dicho hospital de acuerdo con las leyes locales. Así mismo, los controles pertenecían a muestras de voluntarios sanos del mismo Banco de muestras.

Todos los especímenes fueron obtenidos antes de la publicación de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

Los pacientes con sepsis fueron a su vez subdivididos en dos grupos según el germen implicado, uno con diagnóstico de infección meningocócica (n=59 en el primer estudio y n=67 en el segundo), y otro neumocócica (n=114 en el primer estudio y n=112 en el segundo).

El diagnóstico de sepsis meningocócica se hizo mediante el aislamiento de *Neisseria meningitidis* en sangre o LCR, identificación de diplococos Gram negativos en LCR, o sepsis severa y púrpura generalizada sin identificación del germen causante. El fenotipo de este grupo de pacientes fue meningitis (n=8 y n=11), sepsis (n=41 y n=46) y sepsis más meningitis (n=10 y n=10).

El criterio para el diagnóstico de infección neumocócica generalizada fue el aislamiento de diplococos Gram positivos en cultivo o por PCR en líquidos biológicos estériles en condiciones normales (sangre, LCR, líquido pleural o peritoneal) o mediante la detección de antígeno neumocócico por inmunocromatografía en esas mismas muestras (Binnax Now®). El fenotipo de este grupo de pacientes fue: sepsis (n=10 y n=12) meningitis (n=12 y n=8), y neumonía (n=92 y n=92).

MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles mediante el análisis de los polimorfismos de TLR2, TLR4 y CD14.

SELECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS A ESTUDIAR

La selección de los genes se centró en los genes TLR2 (9 polimorfismos), TLR4 (1 polimorfismo) y CD14 (1 polimorfismo) que codifican proteínas que reconocen PAMPs que median la producción de citoquinas necesarias para la inmunidad.

Los SNPs relacionados con TLR4 (rs4986790) y CD14 (rs2569190) estudiados se seleccionaron por su relevancia según publicaciones previas^(4,22,152).

Los SNPs relacionados con la región del gen TLR2 (rs11938228, rs1816702, rs1898830, rs2289318, rs3804099, rs3804100, rs5743704, rs5743708 y rs7674579) se seleccionaron a partir de los datos HapMap, eligiéndose aquellos más representativos de los grupos de ligamiento (figura 7).



Figura 7. Los 25 SNPs en TLR2 ($MAF > 0.01$) y las relaciones entre ellos. Las relaciones de desequilibrio de ligamiento entre los SNPs en las tramas de triángulos de Haploview; los cuadrados pequeños más oscuros denotan mayor desequilibrio de ligamiento (representado por r^2). Los bloques haplotípicos están delimitados por una línea.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN

Las muestras de los pacientes se habían obtenido mediante punción venosa periférica en tubos con EDTA K₃ como anticoagulante que fueron posteriormente congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Una vez descongelada la sangre se añadió una solución de lisis a la muestra.

Para un litro contiene:

- Tris 10 mM pH 7,6: 1,211 g
- ClK 10 mM: 0.745 g
- MgCl₂ + 6H₂O 10 mM: 2,033 g

La solución resultante se centrifugó para eliminar los restos eritrocitarios. A continuación se utilizó el Kit de extracción Ultra Clean (DNA Blood Isolation Kit) de MO BIO Laboratories, Inc® siguiendo las instrucciones del fabricante.

CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La concentración (ng/μl) y calidad del DNA obtenido se determinó mediante un espectrofotómetro (NanoDrop ND1000, Thermo Fisher Scientific, Inc®). Se tomaron como valores adecuados en cuanto a calidad aquellos cuya ratio de absorbancia 260/280 nm era igual o superior a 1,6. En los casos en que no se obtuvieron valores óptimos, se procedió a una segunda extracción.

Una vez obtenido el ADN se hicieron las diluciones correspondientes con agua libre de nucleasas Hypure (Molecular Biology Grade Water®), hasta obtener una concentración adecuada (0,125-5 ng/μl). Posteriormente se congelaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento.

Genotipado

Genotipado mediante sondas KASP

En una segunda etapa se genotiparon las muestras para los polimorfismos correspondientes al TLR2. El genotipado se realizó mediante la tecnología KASP (KBioscience)[®] que se basa en sondas FRET (Fluorescent Resonante Energy Transfer).

Inicialmente se hace una PCR específica de alelo en un termociclador Eppendorf[®]. Para ello se precisan:

*Muestra de DNA a estudiar.

*Dos primers específicos de alelo (uno para cada SNP). Cada uno presenta una secuencia única.

*Un primer reverse.

*Dos oligonucleótidos marcados con el fluoróforo (uno con FAM y otro con HEX) en el extremo 5'. Estos interactúan con los primers específicos de alelos. Este fluorocromo marcado en el extremo 5' (donador) absorbe energía y pasa al estado excitado y al volver a su estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.

*Dos oligonucleótidos que presentan en el extremo 3' un quencher. Sus secuencias son complementarias a las de los oligos marcados con fluoróforos. El quencher del extremo 3' (aceptor) acepta la energía de la fluorescencia liberada por el fluorocromo y la disipa en forma de calor. Inicialmente las moléculas aceptora y donadora se encuentran espacialmente juntas y de esta forma no puede emitirse fluorescencia.

En el caso de los polimorfismos de TLR2 la composición de la solución para la realización de la PCR fueron modificados ligeramente de los aconsejados por el fabricante para placas de 96 pocillos.

Para un volumen total de 8,11µl se añadió:

1° H₂O libre de nucleasas: 1µl.

2° Universal KASP Master mix®:4µl.

3° Sonda: 0,11µl.

4° ADN: 3µl (9-15 ng).

Las condiciones para la PCR para genotipado con sondas FRET fueron: 94°C durante 15 min seguido de 10 ciclos (94°C durante 20 s, 65°C durante 1s- descenso de 0,8°C por ciclo-), seguido de 40 ciclos (94°C durante 20 s, 57°C durante 1 min) y conservar a 4°C.

Mediante dos fluoróforos (FAM que se excita a una λ de 485 nm y emite a 520 nm y HEX que se excita a una λ de 535 nm y emite a 556 nm) se puede observar la distribución de la población alélica. La fluorescencia observada depende del genotipo de cada individuo: los homocigotos presentan la señal de un solo fluoróforo y los heterocigotos de ambos.

En una primera fase de la PCR, una vez separadas las dos hebras de DNA, los primers específicos de alelo hibridan con su parte complementaria de DNA y el primer reverse amplifica la región diana.

En una segunda fase el primer reverse elonga y hace una copia complementaria del alelo, y por último el oligo con el fluorocromo se une a la nueva copia complementaria. En este momento el fluorocromo aceptor está alejado del donador por lo que la señal fluorescente es captada por el lector. Se produce posteriormente la amplificación de las copias con lo que también se amplifica la señal.

Las emisiones fluorescentes del producto de PCR se midieron a 37°C en un Light Cycler 480® de Roche Diagnostics.

El proceso de genotipado fue validado previo al estudio de los polimorfismos mediante el Kit de validación de KBioscience® para comprobar una lectura correcta de la placa.

Genotipado mediante análisis de restricción

En la primera etapa se determinaron los genotipos correspondientes a los polimorfismos rs4986790 (p.D299G / c.-896A>G) situado en la región codificante del gen TLR4 y rs2569190 (c.-159C>T) situado corriente arriba del sitio de inicio de transcripción de CD14. El genotipo se obtuvo mediante análisis de restricción de fragmentos específicos obtenidos mediante PCR en un termociclador GeneAmp9700 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA).

En común, en ambos casos, la mix de reacción fue la siguiente:

*50 ng de DNA.

*Cebadores específicos (10 pm).

*10 µl de PCR Master mix 2x (Promega® Madison WI USA).

*H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl.

Las condiciones específicas para cada uno de los polimorfismos fueron las siguientes:

- 1- Estudio del polimorfismo rs4986790 (p.D299G / c.896A>G).

Cebadores:

5'-ACTTAGACTACTACCTCGGTG-3'

5'-ATTTGAGTTTCAATGTGGGAAAC-3'

PCR: 94°C durante 4 min, seguido de 35 ciclos (94°C durante 30 s, 53°C durante 30 s, 72°C durante 30 s), seguido de 5 min a 72°C y conservar a 4°C.

El producto obtenido se digirió durante 1 hora con el enzima HphI (Fermentas® Burlington, Canada).

- 2- Estudio del polimorfismo rs2569190 (c.-159C>T):

Cebadores:

5'-TCACCTCCCCACCTCTCTT-3'

5'-CCTGCAGAATCCTTCCTGTT-3'

PCR: 94°C durante 4 min, seguido de 35 ciclos (94°C durante 30 s, 59°C durante 30 s, 72°C durante 30 s), seguido de 5 min a 72°C y conservar a 4°C.

El producto obtenido se digirió durante 1 hora con el enzima HaeIII (Roche®; Mannheim, Alemania).

Finalmente en ambos casos se identificaron los alelos mediante electroforesis en agarosa al 2%.

Sondas utilizadas para el genotipado

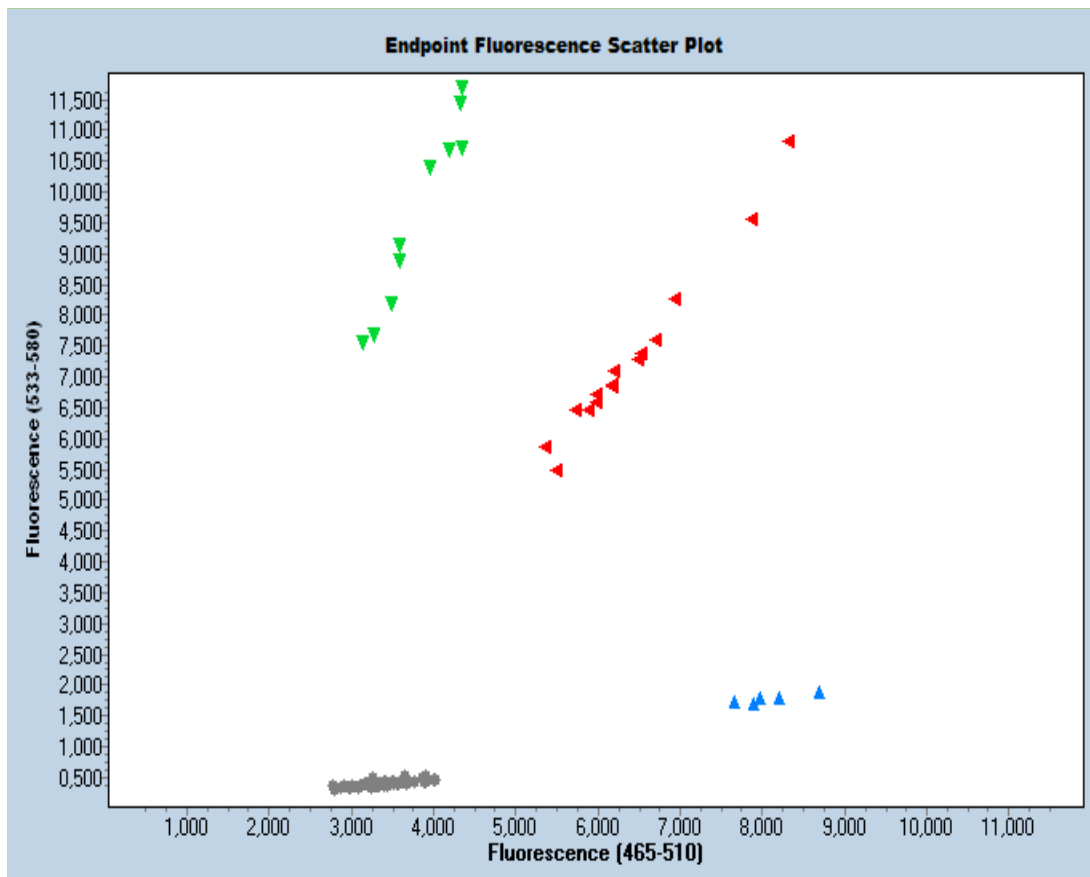
Se utilizaron las siguientes sondas para cada uno de los polimorfismos:

1. Polimorfismo rs1938228 (C>A) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153700794). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM AGTGTGTTGCTGGTATAGGGATAGA~~A~~AAATGAACATTGGATCAGAATAGCA

HEX AGTGTGTTGCTGGTATAGGGATAGA~~C~~AAATGAACATTGGATCAGAATAGCA

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homozigoto C/C ▲ Heterozigoto C/A ▲ Homozigoto A/A

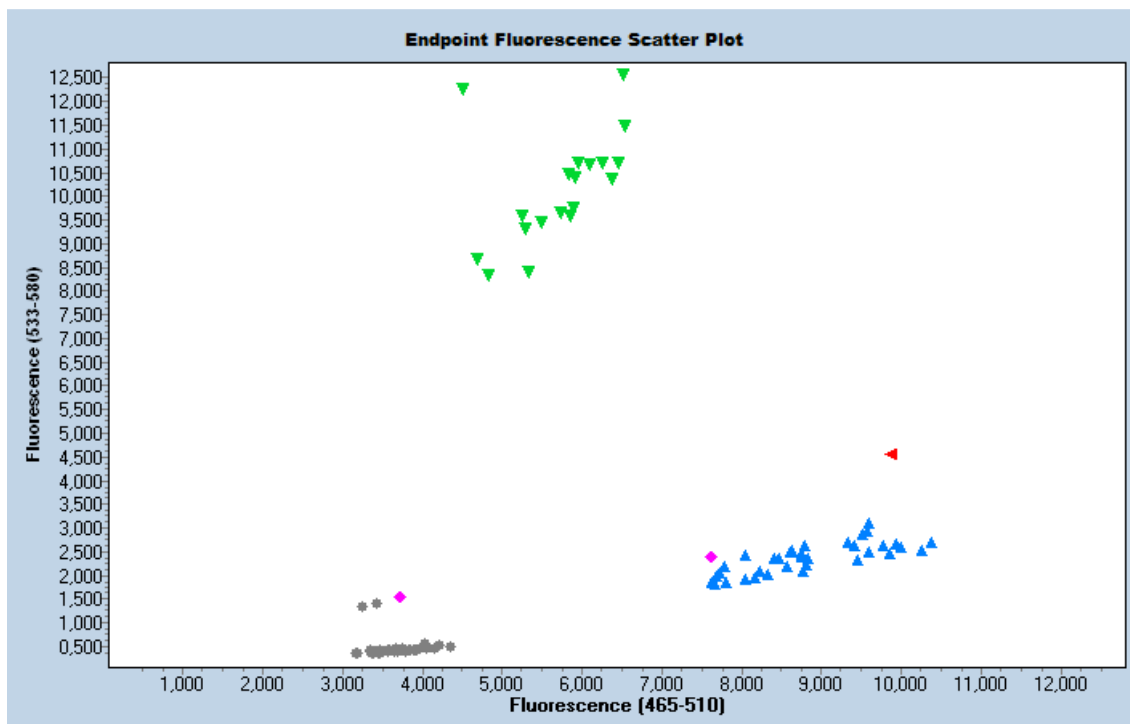
Gráfica 1. Polimorfismo rs11938228 (C>A) del gen TLR2.

2. Polimorfismo rs1816702 (T>C) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153688371). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM GTAACCTAGAATTACAATGGACTG**C**CGAGACCAGCTCGGTCGTGGAGACCC

HEX GTAACCTAGAATTACAATGGACTG**T**GAGACCAGCTCGGTCGTGGAGACCC

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Heterozigoto T/C ▲ Homozigoto C/C

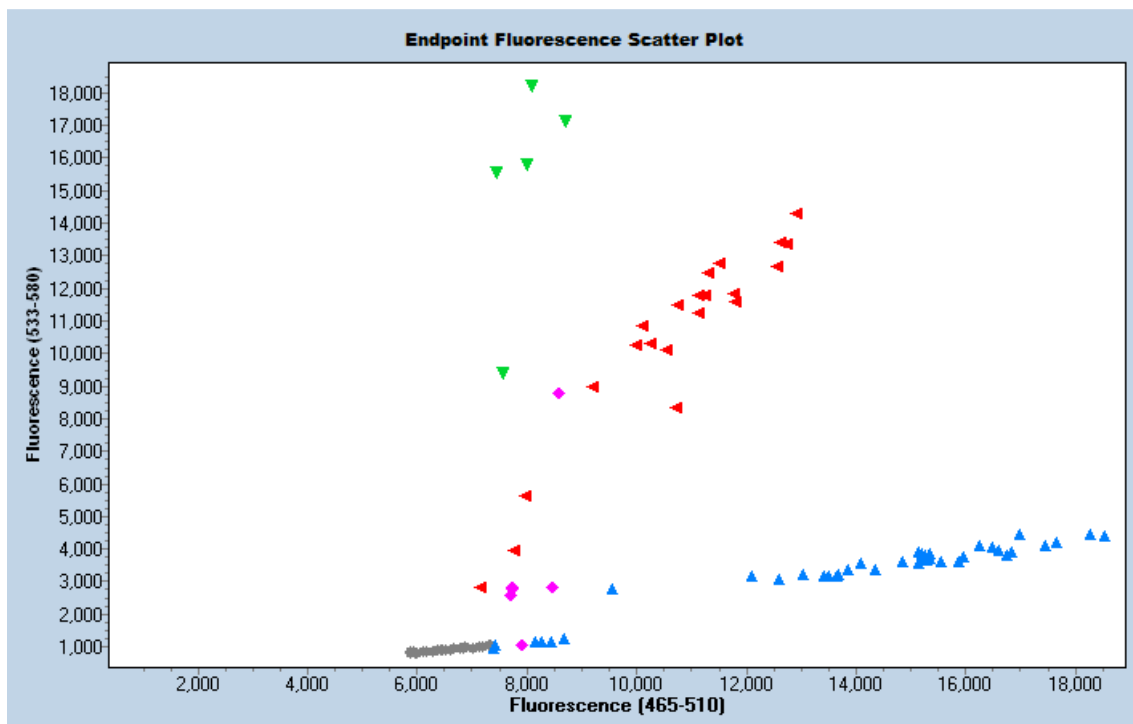
Gráfica 2. Polimorfismo rs1816702 (T>C) del gen TLR2.

3. Polimorfismo rs1898830 (A>G) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153687301). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM ATAGTAAAATAAATCCAGAGAAATC**A**GAACAGGGGAAATAATAATATAAGA

HEX ATAGTAAAATAAATCCAGAGAAATC**G**GAACAGGGGAAATAATAATATAAGA

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homozigoto G/G ▲ Heterozigoto G/A ▲ Homozigoto A/A

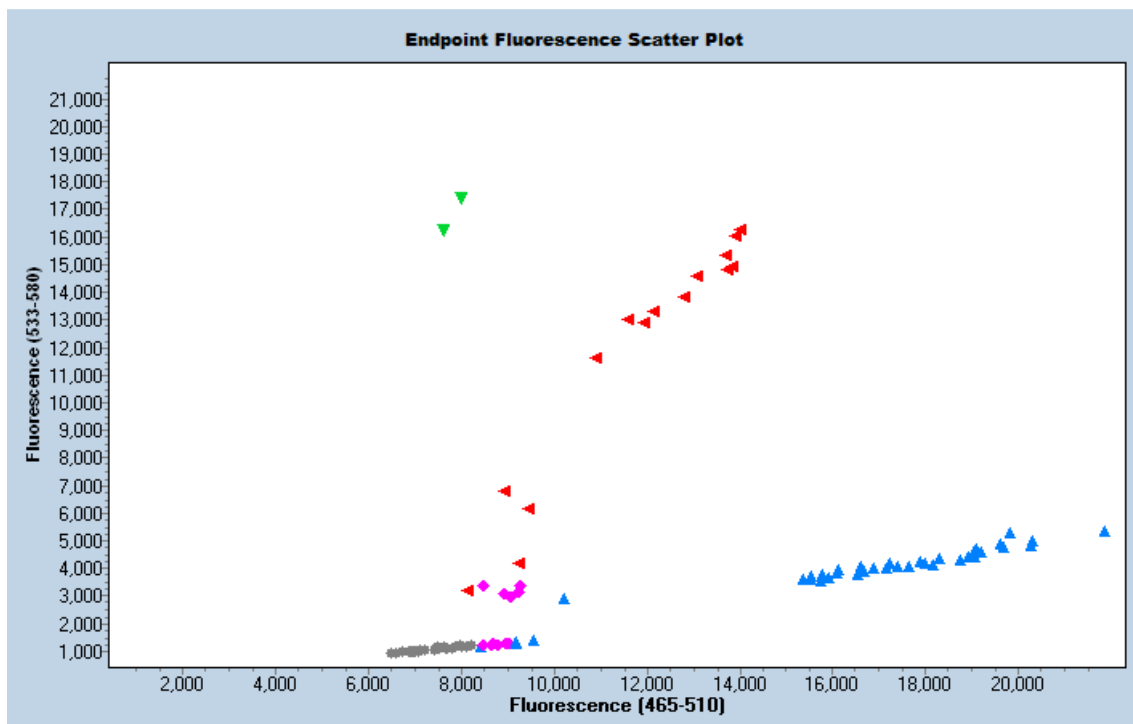
Gráfica 3. Polimorfismo rs1898830 (A>G) del gen TLR2.

4. Polimorfismo rs2289318 (C>G) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153712582). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM ATCTAGAAGCCTCCCTAACAAGATG**C**TTTCAGCTTTCATGAATTCTGCATCC

HEX ATCTAGAAGCCTCCCTAACAAGATG**G**TTTCAGCTTTCATGAATTCTGCATCC

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homozigoto C/C ▲ Heterozigoto C/G ▲ Homozigoto G/G

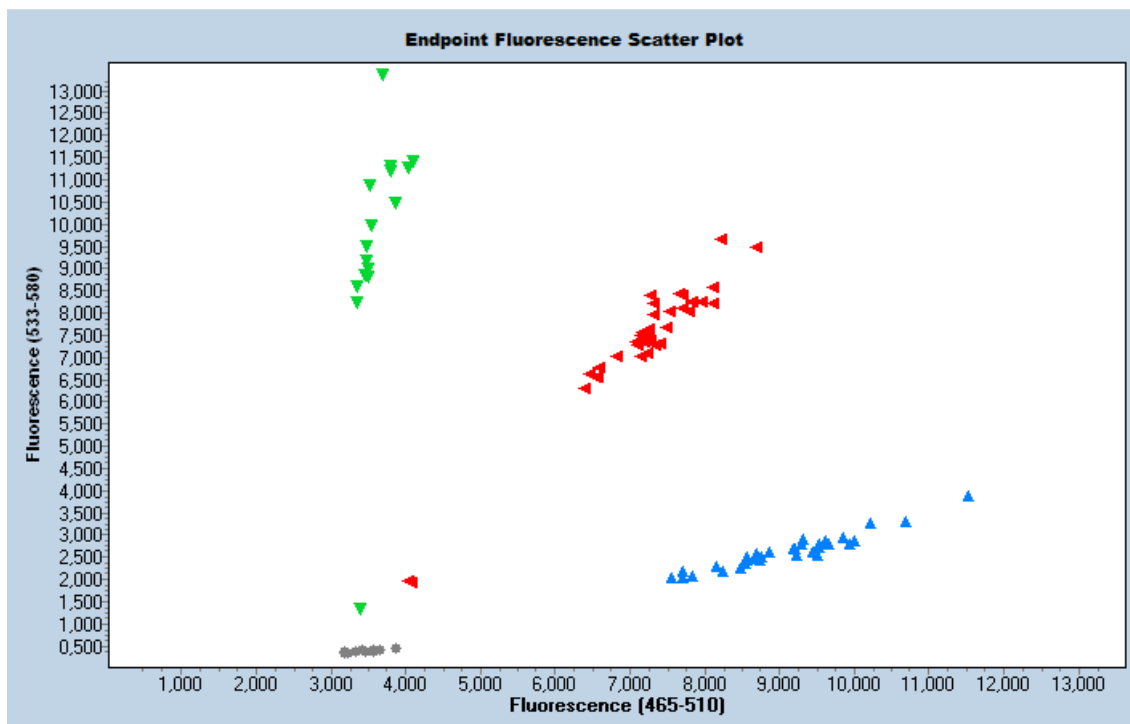
Gráfica 4. Polimorfismo rs2289318 (C>G) del gen TLR2.

5. Polimorfismo rs3804099 (T>C) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153703504). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM CAAAAAGTTTGAAGTCAATTCAGAA**T**GTAAGTCATCTGATCCTTCATATGA

HEX CAAAAAGTTTGAAGTCAATTCAGAA**C**GTAAGTCATCTGATCCTTCATATGA

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homozigoto C/C ▲ Heterozigoto C/T ▲ Homozigoto T/T

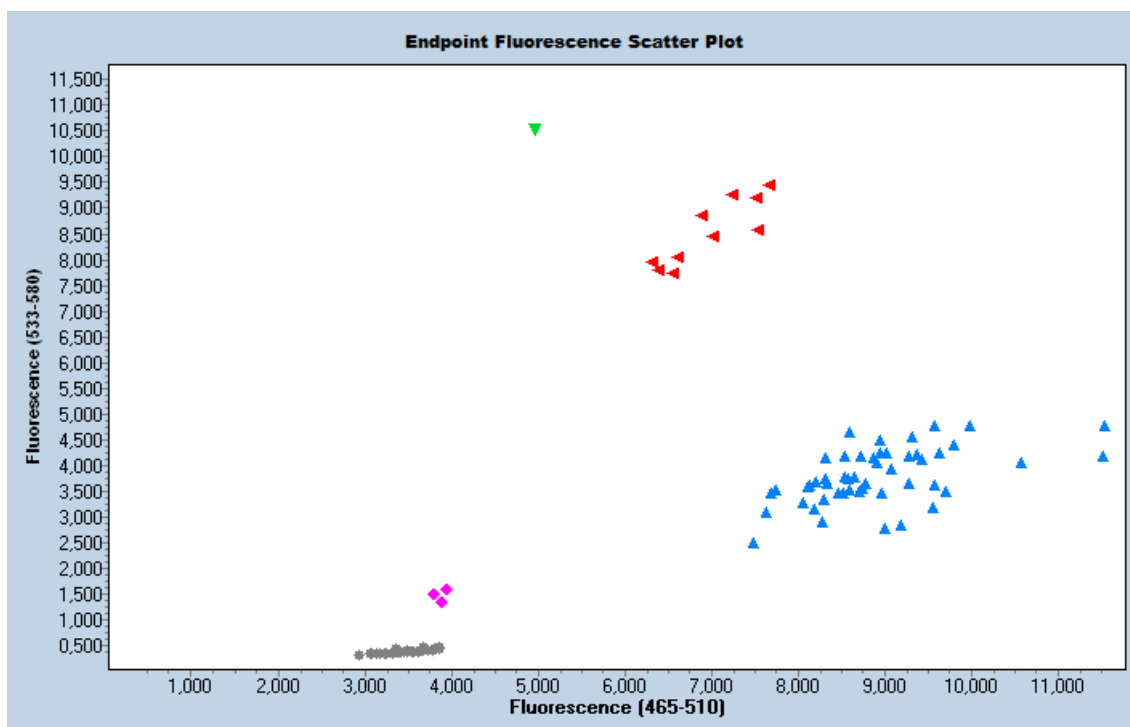
Gráfica 5. Polimorfismo rs3804099 (T>C) del gen TLR2.

6. Polimorfismo rs3804100 (T>C) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153704257). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM ACTTATCCAGCACACGAATACACAG**T**GTAACAGGCTGCATTCCCAAGACAC

HEX ACTTATCCAGCACACGAATACACAG**C**GTAACAGGCTGCATTCCCAAGACAC

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homocigoto C/C ▲ Heterocigoto C/T ▲ Homocigoto T/T

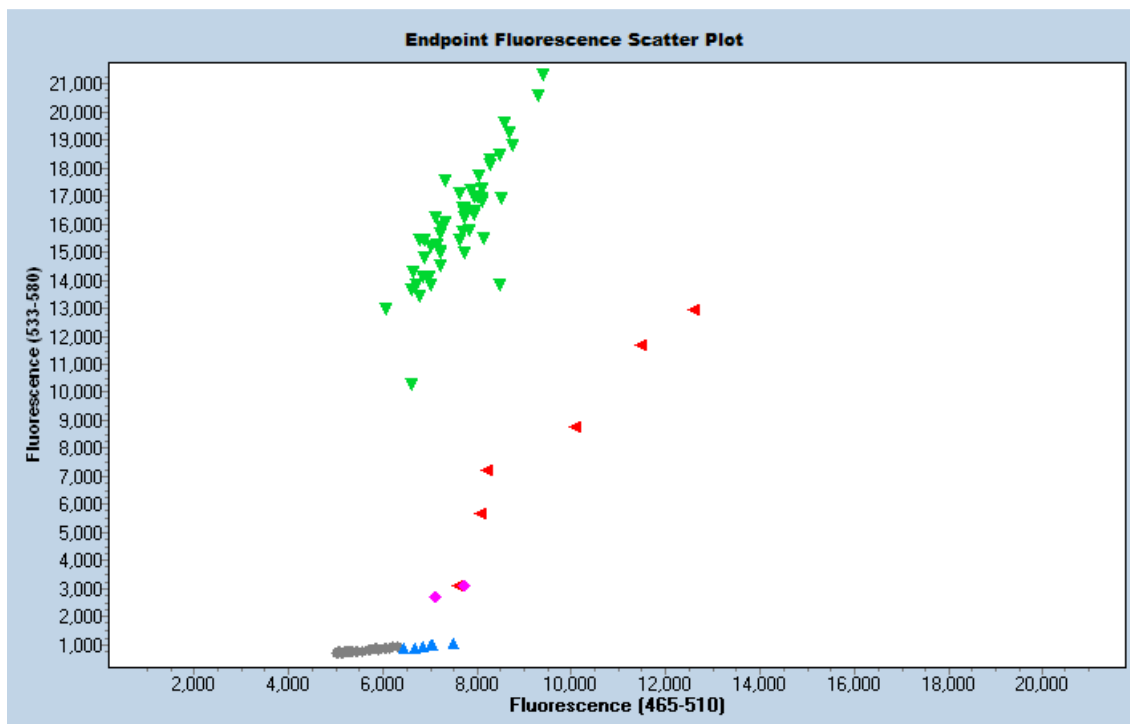
Gráfica 6. Polimorfismo rs3804100 (T>C) del gen TLR2.

7. Polimorfismo rs5743704 (C>A) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153704799). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM GCCTGGCTCCAGGCCAAAAGGAAGC▲CAGGAAAGCTCCCAGCAGGAACATC

HEX GCCTGGCTCCAGGCCAAAAGGAAGC■CAGGAAAGCTCCCAGCAGGAACATC

El tipo de gráfica obtenida fue:



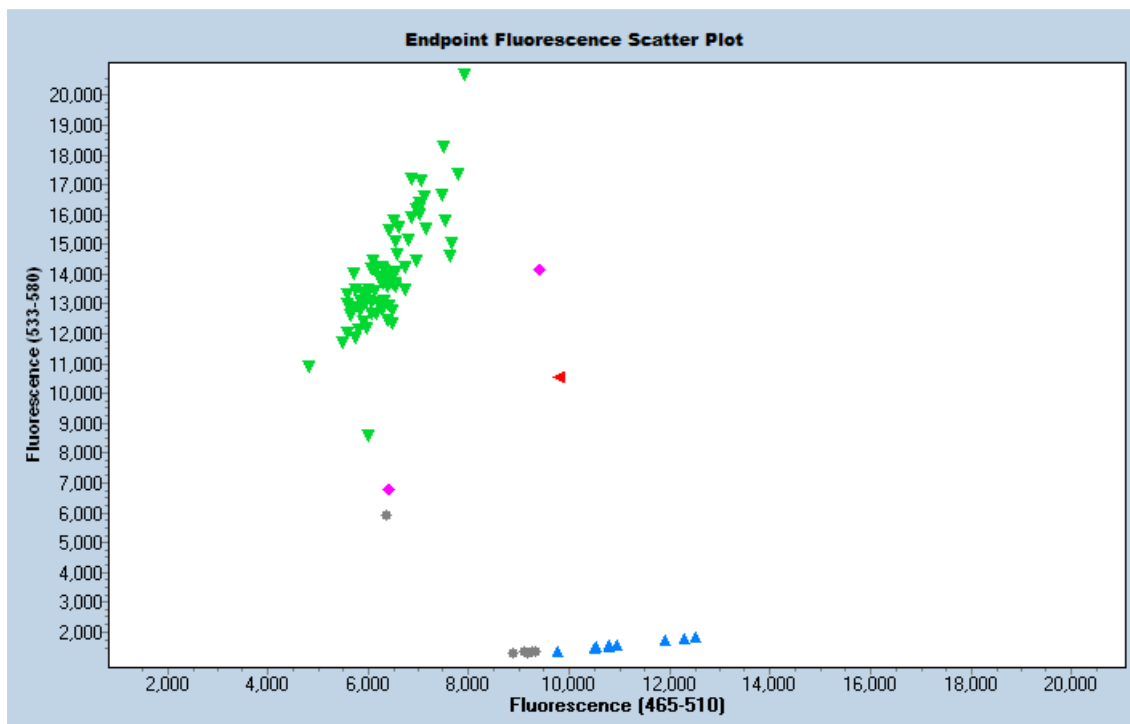
Gráfica 7. Polimorfismo rs5743704 (C>A) del gen TLR2.

8. Polimorfismo rs5743708 (G>A) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153705165). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM ATTCCCCAGCGCTTCTGCAAGCTGC**A**GAAGATAATGAACACCAAGACCTAC

HEX ATTCCCCAGCGCTTCTGCAAGCTGC**G**GGAAGATAATGAACACCAAGACCTAC

El tipo de gráfica obtenida fue



▲ Homozigoto G/G ▲ Heterozigoto G/A

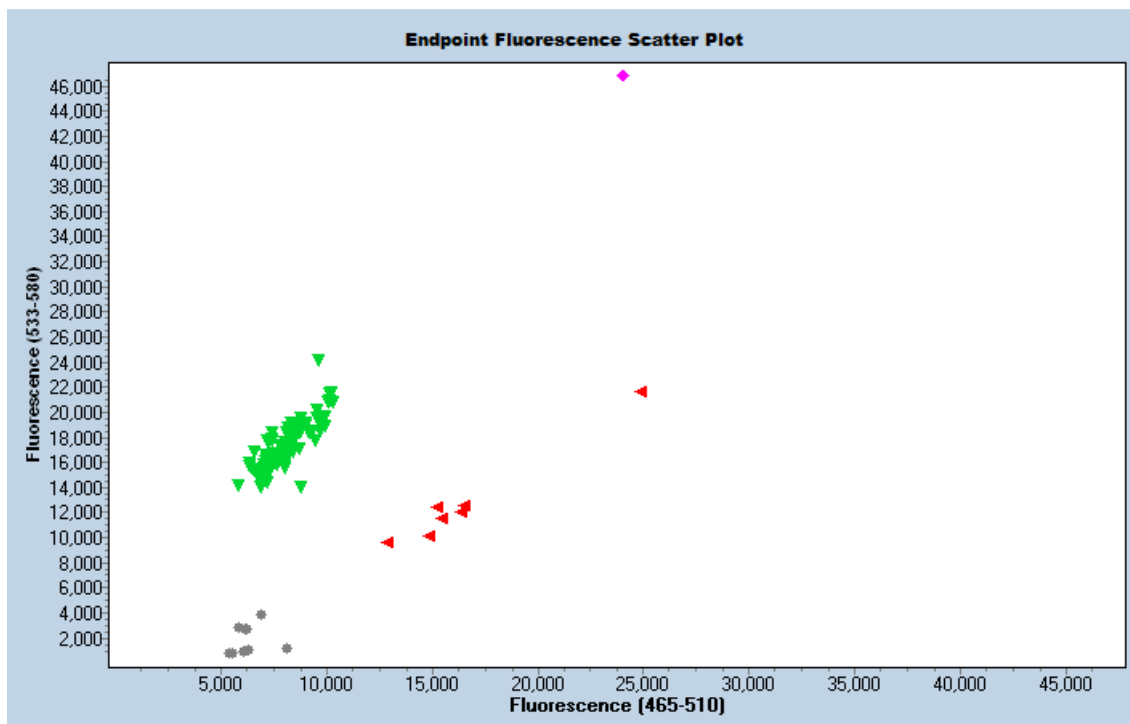
Gráfica 8. Polimorfismo rs5743708 (G>A) del gen TLR2.

9. Polimorfismo rs7674579 (G>T) del gen TLR2 del cromosoma 4 (4:153693582). Utilizamos las siguientes sondas:

FAM ATCTGGAGGATCAGGCTACTCTTTT**G**CTTCGAAATAATGAGGGGGTGCAGA

HEX ATCTGGAGGATCAGGCTACTCTTTT**T**CTTCGAAATAATGAGGGGGTGCAGA

El tipo de gráfica obtenida fue:



▲ Homocigoto T/T ▲ Heterocigoto T/G

Gráfica 9. Polimorfismo rs7674579 (G>T) del gen TLR2.

10. Polimorfismo TLR4-p.D299G (rs4986790) del cromosoma 2.

Utilizamos las siguientes sondas:

5' ACTTAGACTACTACCTCGGTG 3'

5' GATTTGAGTTTCAATGTGGGAAAC 3'

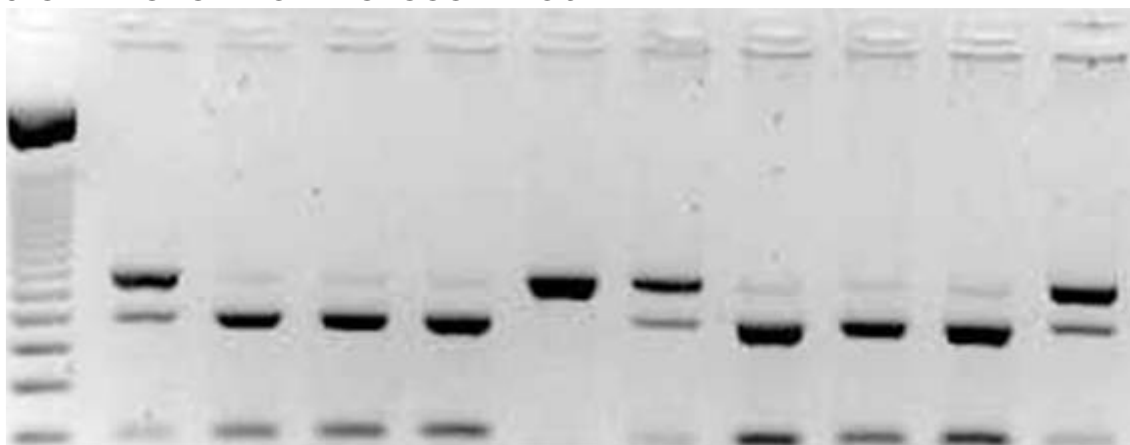


Figura 8. Electroforesis en agarosa. Digestión del polimorfismo TLR4-p.D299G (rs4986790) con la enzima NcoI. La enzima digiere en presencia del alelo D (Asp).

11. Polimorfismo CD14c.-159 C>T (rs2569190) del cromosoma 5.

Utilizamos las siguientes sondas:

5' CTGCAGAATCCTTCCTGTT 3'

5' TCACCTCCCCACCTCTCTT 3'

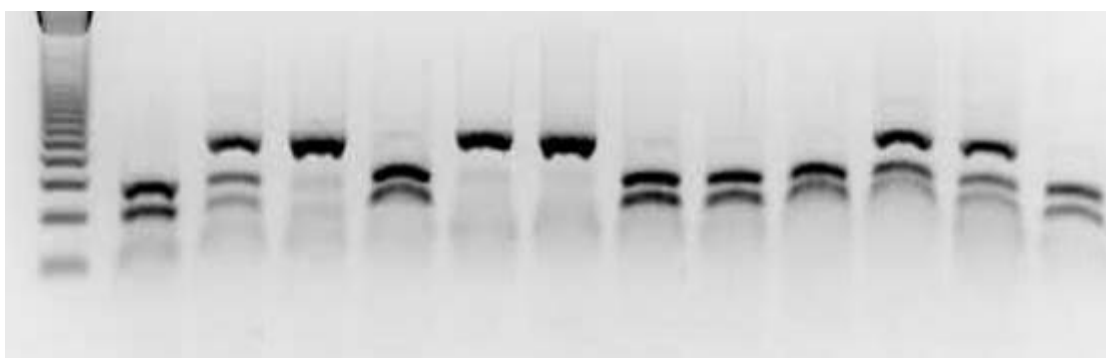


Figura 9. Electroforesis en agarosa. Digestión del polimorfismo CD14c.-159 C>T (rs2569190) con la enzima de restricción AvaII (Thermo Fisher®). La enzima digiere en presencia del alelo T.

Análisis estadístico

Se ha calculado si la distribución genotípica para todos los polimorfismos estudiados y todos los grupos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg comparando los valores obtenidos con los esperados mediante el test de χ^2 .

El estudio se realizó mediante un programa informático, paquete estadístico Statgraphics® centurión XVII.

Para todos los polimorfismos se estudiaron las variantes genéticas entre pacientes con infección neumocócica frente a controles, meningitis neumocócica frente a controles, sepsis neumocócica frente a controles y pacientes con neumonía y sepsis asociada frente a controles. También entre pacientes con infección meningocócica frente a controles, sepsis meningocócica frente a controles, y meningitis con sepsis asociada frente a controles.

La comparación entre los resultados obtenidos de cada uno de los polimorfismos y la presencia de infección neumocócica o meningocócica se realizó utilizando tablas de contingencia 3x2 para el análisis de distribución genotípica y tablas de 2x2 (χ^2) para el análisis de la distribución alélica y de la dominancia alélica, comparando los portadores de un alelo frente a los no portadores del mismo.

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS

Los datos del análisis de cada uno de los polimorfismos de las muestras de los pacientes estudiados se encuentran reflejados en el Anexo.

En el análisis de resultados mostramos para cada uno de los polimorfismos la tabla de distribución genotípica, frecuencias alélicas y los modelos de dominancia alélica. Además los que han resultado estadísticamente significativos se representan las tablas de frecuencias así como una gráfica de barras.

POLIMORFISMO rs1938228 DEL GEN TLR2

Los resultados del análisis del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 (variante intrónica corriente arriba situada en posición NM_001318789.1:c-16-2098C>A) en pacientes con infección neumocócica se muestran en la tabla 3. No se encontró diferencia significativa en la distribución genotípica y frecuencia alélica ni en la dominancia de alelos cuando los comparamos con los controles.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CA	AA	C	A	C	A
Neumonía y Sepsis	92	41	37	14	119	65	78	51
Sepsis	12	5	5	2	15	9	10	7
Meningitis	8	4	2	2	10	6	6	4
Control	100	51	40	9	142	58	91	49
Total	212	101	84	27	286	138	185	111

Tabla 3. Distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

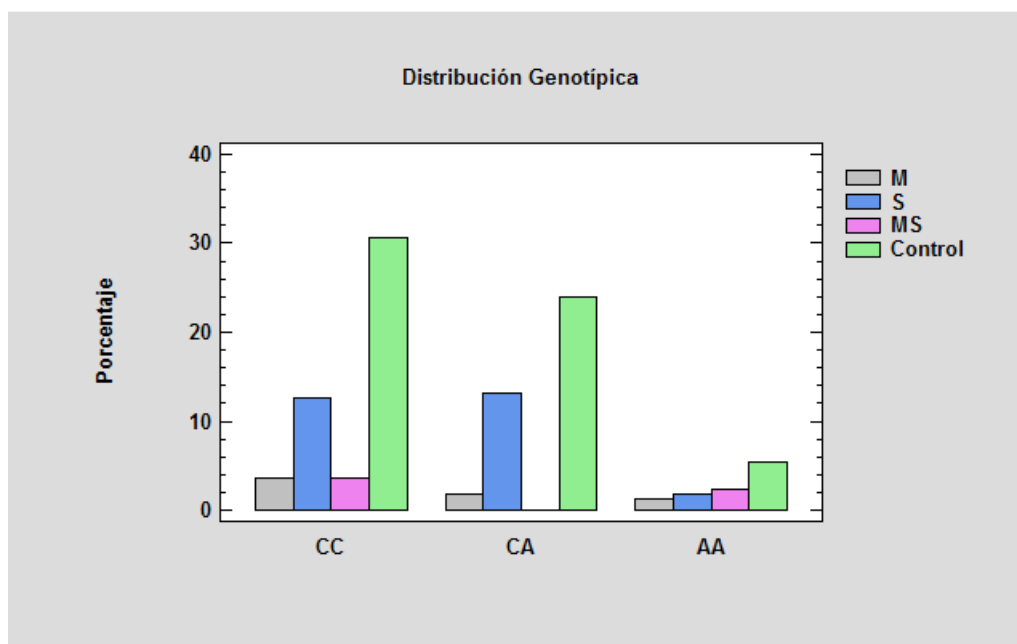
Los resultados obtenidos al analizar este polimorfismo en pacientes con infección meningocócica se encuentran en la tabla 4. No encontramos diferencia significativa en cuanto a la frecuencia alélica y el modelo de dominancia alélica entre los afectados de infección meningocócica y controles pero sí en cuanto a la distribución genotípica ($p=0,0186$) siendo el causante de la significación el grupo de pacientes que presentaban Meningitis asociada a Sepsis. No se encontró ningún paciente heterocigoto para los genotipos estudiados y el genotipo homocigoto para el alelo A fue significativamente más frecuente (40%) que en los controles (9%).

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CA	AA	C	A	C	A
Meningitis	11	6	3	2	15	7	9	5
Sepsis	46	21	22	3	64	28	43	25
Meningitis y Sepsis	10	6	0	4	12	8	6	4
Control	100	51	40	9	142	58	91	49
Total	167	84	65	18	233	101	149	83

Tabla 4. Distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

	CC	CA	AA	Total
Meningitis	6	3	2	11
	54,55%	27,27%	18,18%	6,59%
Sepsis	21	22	3	46
	45,65%	47,83%	6,52%	27,54%
Meningitis-Sepsis	6	0	4	10
	60,00%	0,00%	40,00%	5,99%
Control	51	40	9	100
	51,00%	40,00%	9,00%	59,88%
Total	84	65	18	167
	50,30%	38,92%	10,78%	100,00%

Tabla 5. Frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 10. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis).

La distribución de los genotipos en los controles sanos se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,082$; $p=0,774$), siendo similares a la descrita en la población africana.

POLIMORFISMO rs1816702 DEL GEN TLR2

La tabla 6 muestra el análisis comparativo de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 (variante intrónica situada en la posición NM_001318787.1:c.-301+383T>C) en los pacientes con infección neumocócica. Hemos encontrado diferencias significativas en estos pacientes con respecto al grupo control tanto en la distribución genotípica ($p=0,0107$) como en la distribución alélica ($p=0,009$) y en el modelo de dominancia de ambos alelos ($p=0,0115$). La significación estadística es a expensas del grupo que presenta Neumonía y Sepsis. El porcentaje de genotipos CC es significativamente menor en los pacientes

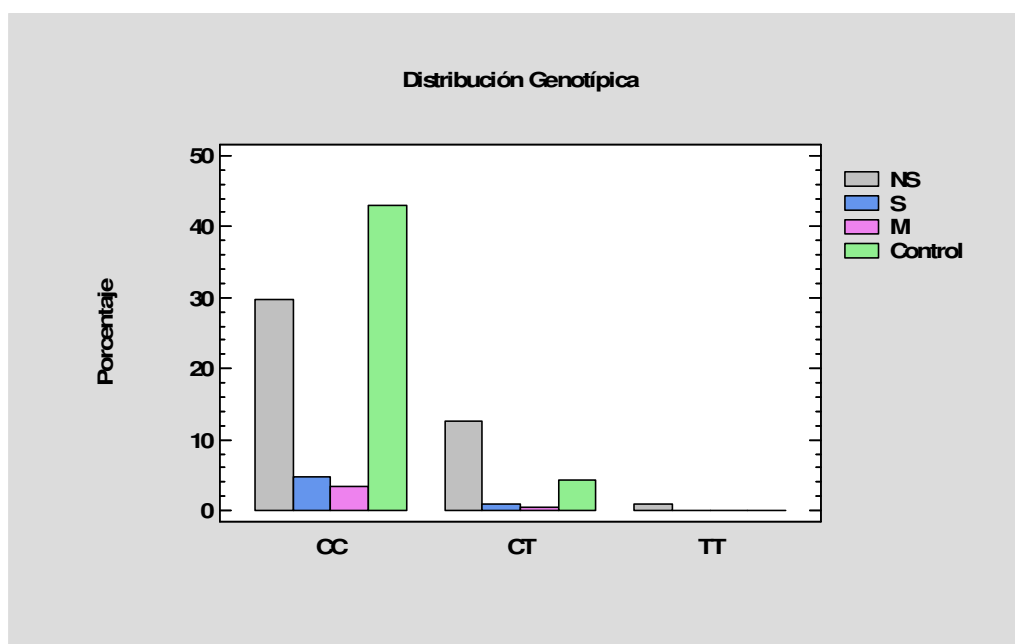
(68,48%) que en grupo control (91%). Además existe una significación estadística ($p=0,0115$) para el modelo de dominancia del alelo T.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CT	TT	C	T	C	T
Neumonía y Sepsis	92	63	27	2	153	31	90	29
Sepsis	12	10	2	0	22	2	12	2
Meningitis	8	7	1	0	15	1	8	1
Control	100	91	9	0	191	9	100	9
Total	212	171	39	2	381	43	210	41

Tabla 6. Distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

	CC	CT	TT	Total
Neumonía y Sepsis	63	27	2	92
	68,48%	29,35%	2,17%	43,40%
Sepsis	10	2	0	12
	83,33%	16,67%	0,00%	5,66%
Meningitis	7	1	0	8
	87,50%	12,50%	0,00%	3,77%
Control	91	9	0	100
	91,00%	9,00%	0,00%	47,17%
Total	171	39	2	212
	80,66%	18,40%	0,94%	100,00%

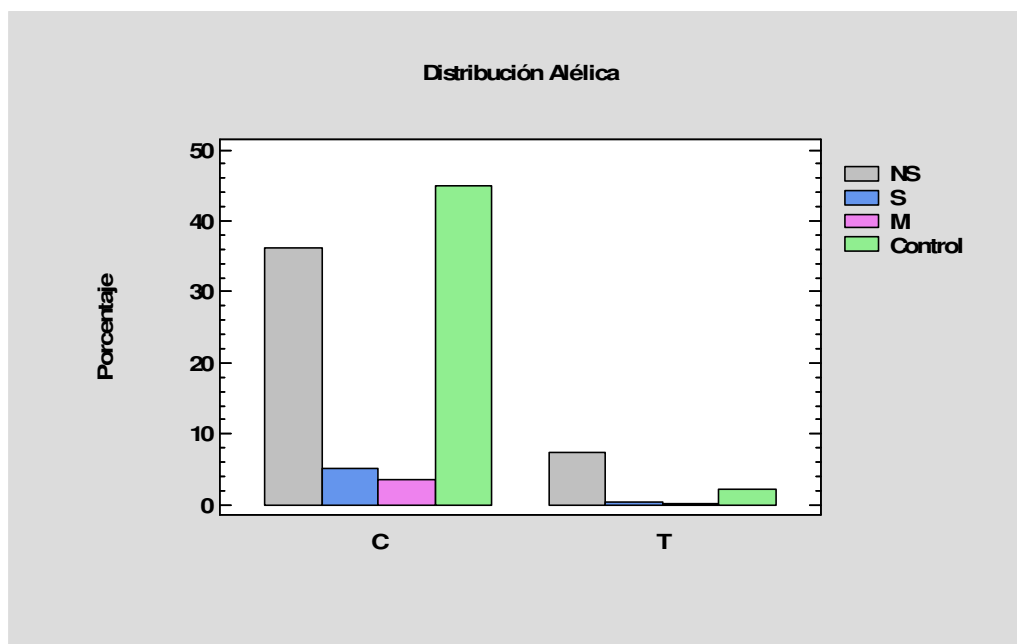
Tabla 7. Tabla de frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 11. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

	C	T	Total
Neumonía-Sepsis	153	31	184
	83,15%	16,85%	43,40%
Sepsis	22	2	24
	91,67%	8,33%	5,66%
Meningitis	15	1	16
	93,75%	6,25%	3,77%
Control	191	9	200
	95,50%	4,50%	47,17%
Total	381	43	424
	89,86%	10,14%	100,00%

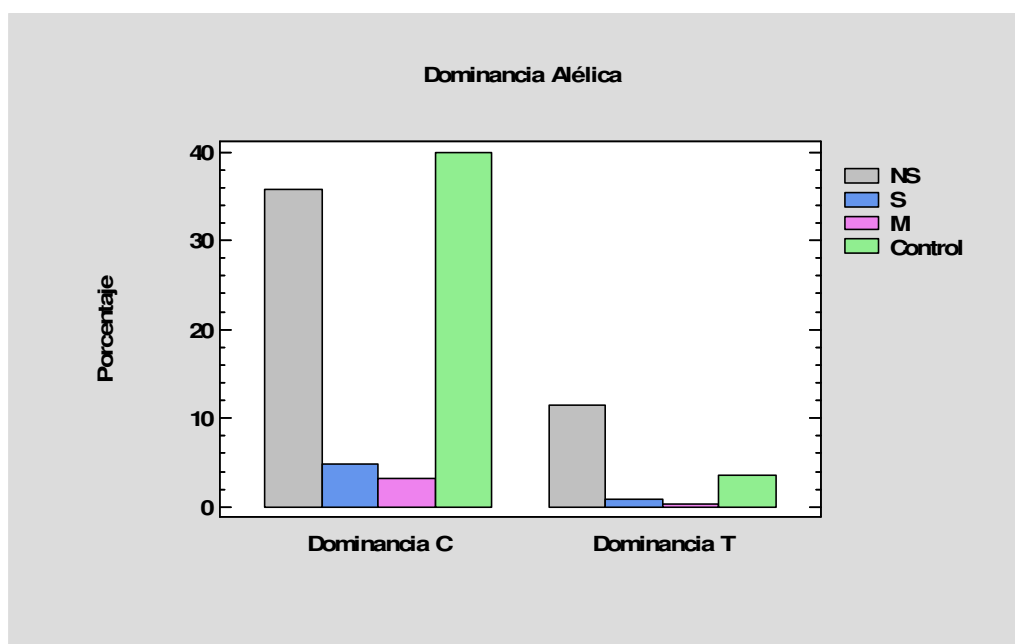
Tabla 8. Tabla de frecuencias alélicas del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 12. Correspondiente a la distribución alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

	Dominancia C	Dominancia T	Total
Neumonía-Sepsis	90	29	119
	75,63%	24,37%	47,41%
Sepsis	12	2	14
	85,71%	14,29%	5,58%
Meningitis	8	1	9
	88,89%	11,11%	3,59%
Control	100	9	109
	91,74%	8,26%	43,43%
Total	210	41	251
	83,67%	16,33%	100,00%

Tabla 9. Tabla de Frecuencias para el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 13. Correspondiente al modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

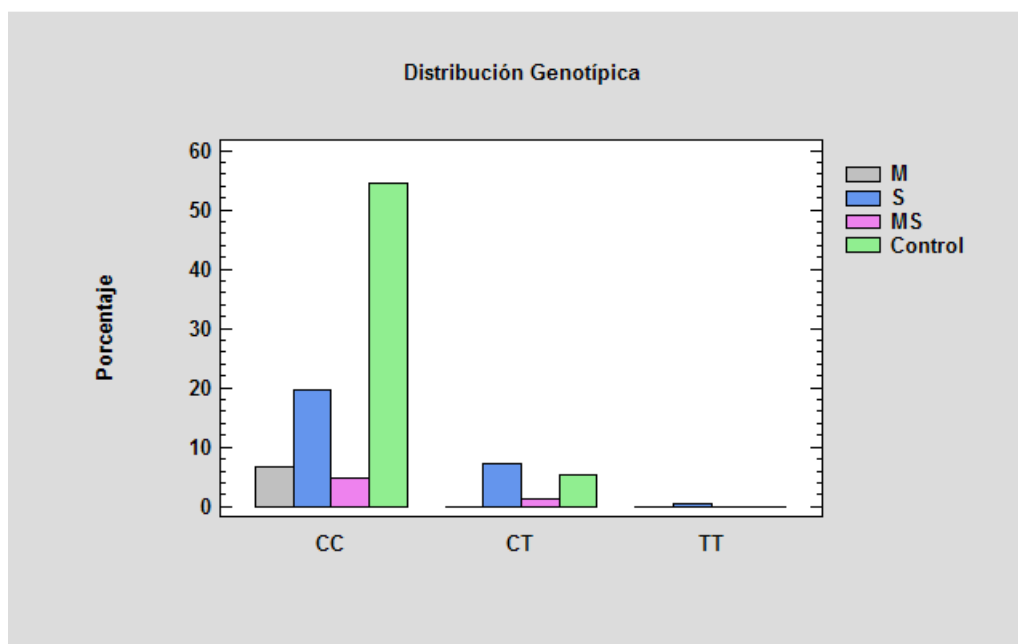
El análisis comparativo de las distribuciones genotípicas y alélicas así como la dominancia alélica de este polimorfismo en los pacientes con infección meningocócica se muestra en la tabla 10. Se encontró una diferencia significativa con respecto al grupo control en la distribución genotípica ($p=0,04$), frecuencia alélica ($p=0,0059$) y en el modelo de dominancia alélica ($p=0,03$). El responsable de la asociación es el grupo de Sepsis en el que el porcentaje de homocigotos para el alelo C es significativamente menor (71,74%) que en el grupo control (91%), habiendo además una mayor dominancia del alelo T en el grupo de pacientes.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CT	TT	C	T	C	T
Meningitis	11	11	0	0	22	0	11	0
Sepsis	46	33	12	1	78	14	45	13
Meningitis y Sepsis	10	8	2	0	18	2	10	2
Control	100	91	9	0	191	9	100	9
Total	167	143	23	1	309	25	166	24

Tabla 10. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

	CC	CT	TT	Total
Meningitis	11	0	0	11
	100,00%	0,00%	0,00%	6,59%
Sepsis	33	12	1	46
	71,74%	26,09%	2,17%	27,54%
Meningitis-Sepsis	8	2	0	10
	80,00%	20,00%	0,00%	5,99%
Control	91	9	0	100
	91,00%	9,00%	0,00%	59,88%
Total	143	23	1	167
	85,63%	13,77%	0,60%	100,00%

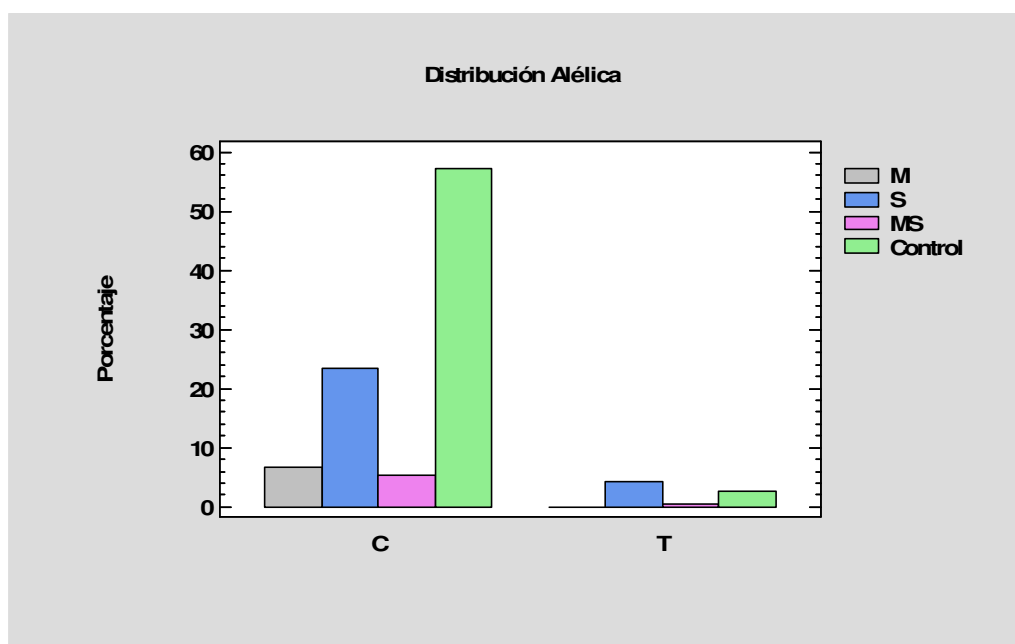
Tabla 11. Tabla de frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 14. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis).

	C	T	Total
Meningitis	22	0	22
	100,00%	0,00%	6,59%
Sepsis	78	14	92
	84,78%	15,22%	27,54%
Meningitis-Sepsis	18	2	20
	90,00%	10,00%	5,99%
Control	191	9	200
	95,50%	4,50%	59,88%
Total	309	25	334
	92,51%	7,49%	100,00%

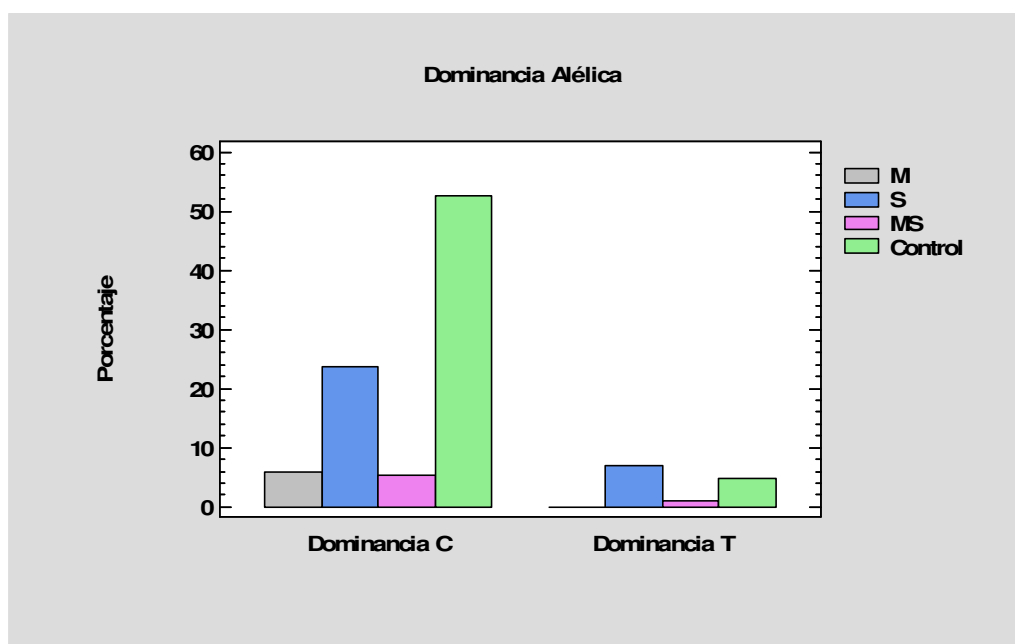
Tabla 12. Tabla de frecuencias alélicas del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 15. Correspondiente a la distribución alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis) S (Sepsis) MS (Meningitis y Sepsis).

	Dominancia C	Dominancia T	Total
Meningitis	11	0	11
	5,79%	0,00%	5,79%
Sepsis	45	13	58
	23,68%	6,84%	30,53%
Meningitis-Sepsis	10	2	12
	5,26%	1,05%	6,32%
Control	100	9	109
	52,63%	4,74%	57,37%
Total	166	24	190
	87,37%	12,63%	100,00%

Tabla 13. Tabla de frecuencias para el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 16. Correspondiente al modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis) S (Sepsis) MS (Meningitis y Sepsis).

La distribución de los genotipos en nuestros controles no se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,222$; $p=0,637$) siendo similar a la población española.

POLIMORFISMO rs1898830 DEL GEN TLR2

La distribución genotípica, frecuencias alélicas así como el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1898830 del gen TLR2 (variante intrónica situada en la posición NM_001318787.1:c.-372-616A>G) en los pacientes con infección neumocócica se encuentran recogidas en la tabla 14. No se encontró diferencia significativa en el estudio realizado con respecto al grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		AA	AG	GG	A	G	A	G
Neumonía y Sepsis	92	38	41	13	117	67	79	54
Sepsis	12	4	6	2	14	10	10	8
Meningitis	8	2	4	2	8	8	6	6
Control	100	51	43	6	145	55	94	49
Total	212	95	94	23	284	140	189	117

Tabla 14. Distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1898830 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

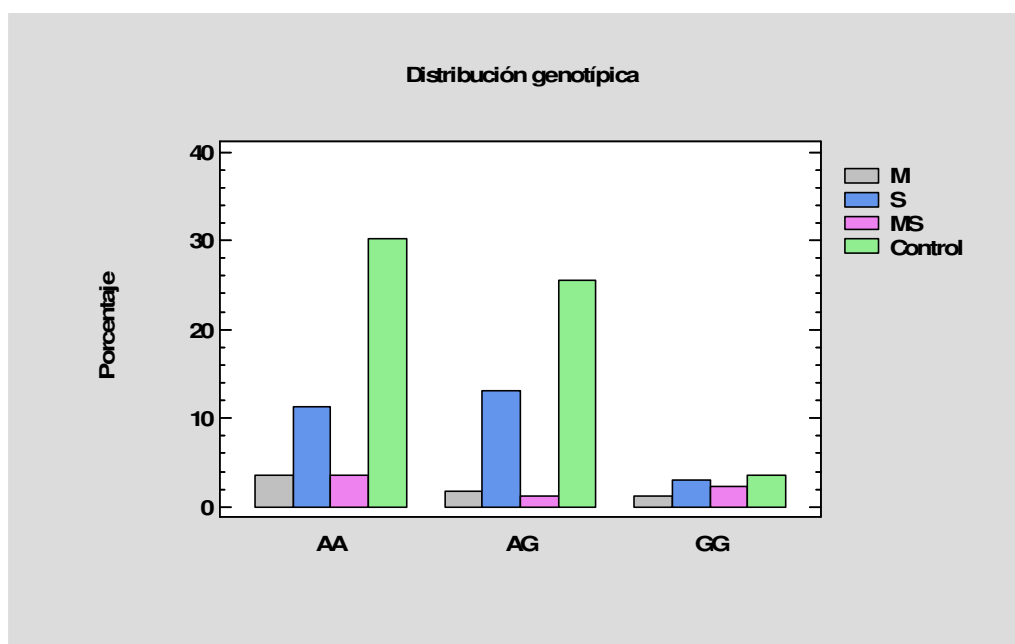
La tabla 15 recoge el análisis comparativo de este polimorfismo en los pacientes afectados de infección meningocócica. Encontramos una diferencia muy significativa en cuanto a la distribución genotípica ($p=0,008$) con respecto al grupo control en el grupo de Meningitis y Sepsis. Aunque el grupo era pequeño ($n=10$), no constatamos ningún paciente heterocigoto para los alelos estudiados y el porcentaje de homocigotos para el alelo G (40%) es significativamente mayor que en los controles (6%).

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		AA	AG	GG	A	G	A	G
Meningitis	11	6	3	2	15	7	9	5
Sepsis	46	19	22	5	60	32	41	27
Meningitis y Sepsis	10	6	0	4	12	8	6	4
Control	100	51	43	6	145	55	94	49
Total	167	82	68	17	232	102	150	85

Tabla 15. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs1898830 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

	AA	AG	GG	Total
Meningitis	6	3	2	11
	54,55%	27,27%	18,18%	6,59%
Sepsis	19	22	5	46
	41,30%	47,83%	10,87%	27,54%
Meningitis-Sepsis	6	0	4	10
	60,00%	0,00%	40,00%	5,99%
Control	51	43	6	100
	51,00%	43,00%	6,00%	59,88%
Total	82	68	17	167
	49,10%	40,72%	10,18%	100,00%

Tabla 16: Tabla de frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs1898830 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 17. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs1898830 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis).

La distribución de los genotipos de los controles sanos cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,614$; $p=0,433$) siendo similares a la población española.

POLIMORFISMO rs2289318 DEL GEN TLR2

La tabla 17 muestra el análisis comparativo de la distribución genotípica, frecuencias alélicas, así como el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2289318 del gen TLR2 (varante intrónica 500B corriente abajo en posición NM_173662.2:c.765-6C>G) en pacientes con infección neumocócica. No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		GG	GC	CC	G	C	G	C
Neumonía y Sepsis	92	58	32	2	148	36	90	34
Sepsis	12	7	5	0	19	5	12	5
Meningitis	8	3	5	0	11	5	8	5
Control	100	59	39	2	157	43	98	41
Total	212	127	81	4	335	89	208	85

Tabla 17. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2289318 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

El análisis comparativo de la distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica de este polimorfismo en infección meningocócica se encuentra recogido en la tabla 18. No encontramos diferencia significativa entre los diferentes grupos y los controles.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		GG	GC	CC	G	C	G	C
Meningitis	11	9	2	0	20	2	11	2
Sepsis	46	35	11	0	81	11	46	11
Meningitis y Sepsis	10	6	4	0	16	4	10	4
Control	100	59	39	2	157	43	98	41
Total	167	109	56	2	274	60	165	58

Tabla 18. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2289318 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

La distribución de los genotipos en los controles sanos fue similar a la población de Finlandia y se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=2,414$; $p=0,120$).

POLIMORFISMO rs3804099 DEL GEN TLR2

Las tablas 19 y 20 hacen referencia a las distribuciones genotípicas, frecuencias alélicas y al modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs3804099 del gen TLR2 (variante exónica en la posición NM_001318789.1:c.597T>C, sin cambio de aminoácido NP_001305716.1:p.Asn199) en los grupos de infección neumocócica y meningocócica respectivamente. No se han encontrado diferencias significativas en ninguno de los dos grupos de pacientes con respecto al grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Neumonía y Sepsis	92	30	40	22	100	84	70	62
Sepsis	12	6	5	1	17	7	11	6
Meningitis	8	3	4	1	10	6	7	5
Control	100	26	52	22	104	96	78	74
Total	212	65	101	46	231	193	166	147

Tabla 19. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs3804099 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Meningitis	11	4	3	4	11	11	7	7
Sepsis	46	11	27	8	49	43	38	35
Meningitis y Sepsis	10	4	4	2	12	8	8	6
Control	100	26	52	22	104	96	78	74
Total	167	45	86	36	176	158	131	122

Tabla 20. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs3804099 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió en la distribución genotípica de los controles sanos ($\chi^2=0,173$; $p=0,677$). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron similares a las de la población española e italiana.

POLIMORFISMO rs3804100 DEL GEN TLR2

Los resultados del análisis que hemos realizado del polimorfismo rs3804100 del gen TLR2 (variante exónica en la posición NM_001318789.1:c.1350T>C sin cambio de aminoácido, NP_001305716.1:p.Ser450) en pacientes con infección neumocócica se encuentran reflejados en la tabla 21. No encontramos diferencias significativas con respecto al grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Neumonía y Sepsis	92	74	17	1	165	19	91	18
Sepsis	12	11	1	0	23	1	12	1
Meningitis	8	8	0	0	16	0	8	0
Control	100	85	15	0	185	15	100	15
Total	212	178	33	1	389	35	211	34

Tabla 21. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs3804100 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

Los estudios genéticos realizados en nuestro trabajo de este polimorfismo en el grupo de infección meningocócica se muestran en la tabla 22. No pudo realizarse el análisis estadístico de la distribución genotípica ya que no constatamos ningún

homocigoto para el alelo C en ninguno de los grupos. No hubo diferencias significativas con respecto al grupo control ni en el estudio de las frecuencias alélicas ni en el modelo de dominancia alélica.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Meningitis	11	11	0	0	22	0	11	0
Sepsis	46	43	3	0	89	3	46	3
Meningitis y Sepsis	10	8	2	0	18	2	10	2
Control	100	85	15	0	185	15	100	15
Total	167	147	20	0	314	20	167	20

Tabla 22. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs3804100 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

La distribución genotípica de los controles sanos no se desviaba del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,657$; $p=0,417$) y fueron similares a la población española e italiana.

POLIMORFISMO rs5743704 DEL GEN TLR2

Los resultados del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 (variante exónica en posición NM_001318787.1:c.1892C>A con cambio de aminoácido, NP_001305716.1:p.Pro631His) en pacientes con infección neumocócica se encuentran registrados en la tabla 23. No pudo realizarse el estudio estadístico de la distribución genotípica porque no se encontró ningún individuo homocigótico para el alelo A.

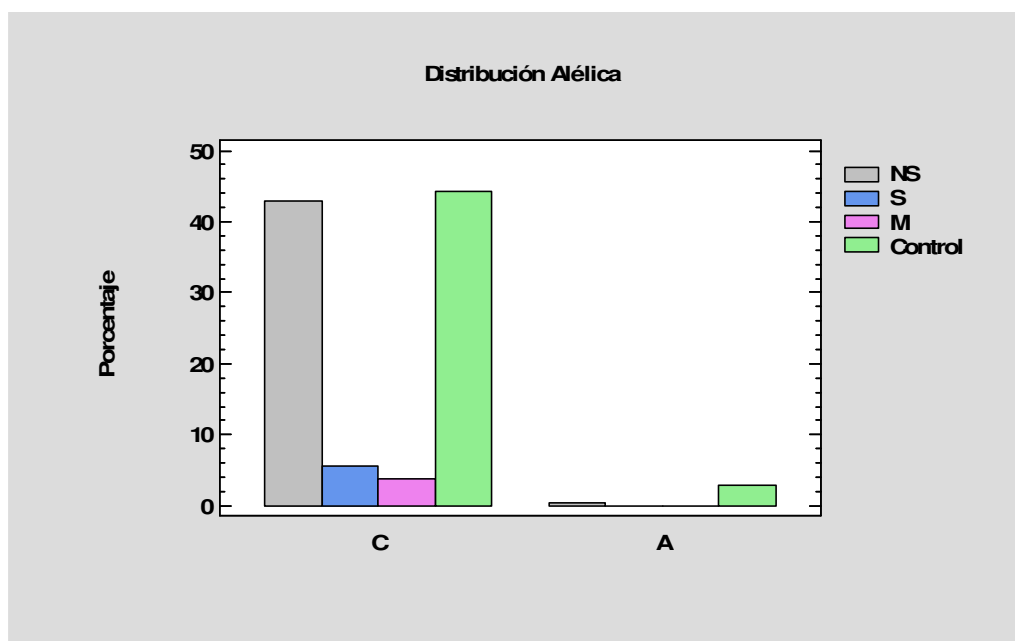
Encontramos una diferencia significativa en la distribución alélica ($p=0,032$) y modelo de dominancia alélica ($p=0,047$) con respecto al grupo control en el grupo de Neumonía y Sepsis. Existe un porcentaje significativo menor de pacientes que presentan genotipos con alelo A (2,13%) respecto al grupo control (10,71%).

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CA	AA	C	A	C	A
Neumonía y Sepsis	92	90	2	0	182	2	92	2
Sepsis	12	12	0	0	24	0	12	0
Meningitis	8	8	0	0	16	0	8	0
Control	100	88	12	0	188	12	100	12
Total	212	198	14	0	410	14	212	14

Tabla 23. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

	C	A	Total
Neumonía-Sepsis	182	2	184
	98,91%	1,09%	43,40%
Sepsis	24	0	24
	100,00%	0,00%	5,66%
Meningitis	16	0	16
	100,00%	0,00%	3,77%
Control	188	12	200
	94,00%	6,00%	47,17%
Total	410	14	424
	96,70%	3,30%	100,00%

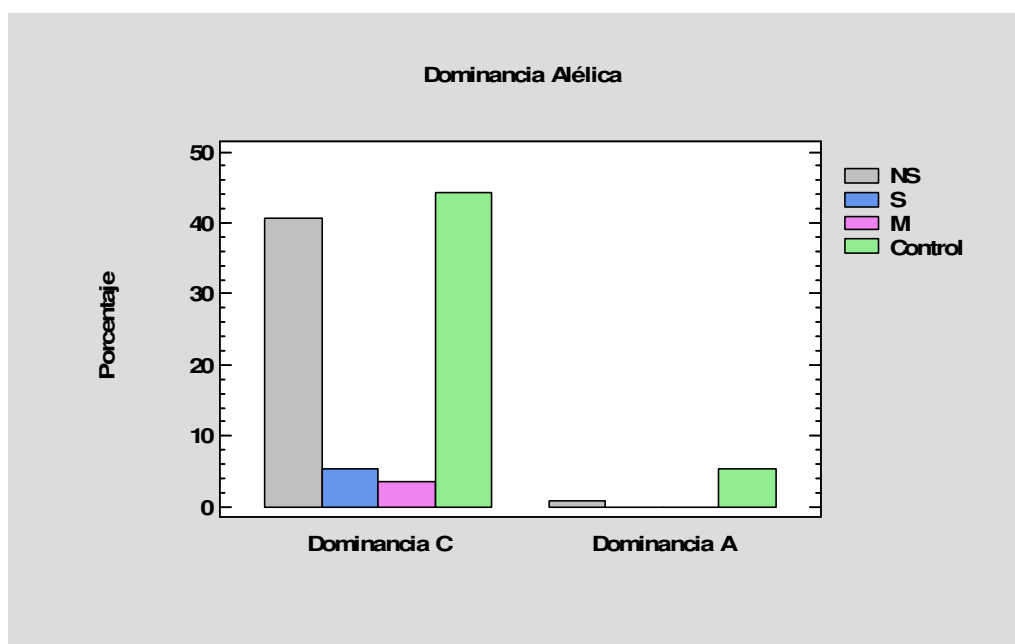
Tabla 24. Tabla de frecuencias alélicas del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 18. Correspondiente a la distribución alélica del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

	Dominancia C	Dominancia A	Total
Neumonía-Sepsis	92	2	94
	97,87%	2,13%	41,59%
Sepsis	12	0	12
	100,00%	0,00%	5,31%
Meningitis	8	0	8
	100,00%	0,00%	3,54%
Control	100	12	112
	89,29%	10,71%	49,56%
Total	212	14	226
	93,81%	6,19%	100,00%

Tabla 25. Tabla de frecuencias para el modelo de dominancia alélica para el polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 19. Correspondiente al modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

Los resultados obtenidos en el análisis de este polimorfismo en los pacientes con infección meningocócica se muestran en la tabla 26. No pudo realizarse la estadística en el estudio de la distribución genotípica porque no se encontró ningún individuo homocigoto para el alelo A. Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas y en el modelo de dominancia alélica entre el grupo de pacientes y el grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		CC	CA	AA	C	A	C	A
Meningitis	11	11	0	0	22	0	11	0
Sepsis	46	43	3	0	89	3	46	3
Meningitis y Sepsis	10	9	1	0	19	1	10	1
Control	100	88	12	0	188	12	100	12
Total	167	151	16	0	318	16	167	16

Tabla 26. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

La distribución de los genotipos en los controles sanos se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,407$; $p=0,523$) y fueron similares a la población española.

POLIMORFISMO rs5743708 DEL GEN TLR2

Los resultados del análisis del polimorfismo rs5743708 del gen de TLR2 (variante exónica en posición NM_001318787.1:c.2258G>A, con cambio de aminoácido, NP_001305716.1:p.Arg753Gln) se muestran en las tablas 27 y 28 para las infecciones neumocócicas y meningocócicas respectivamente. No pudo realizarse la estadística de la distribución genotípica en ninguno de los dos casos porque no encontramos ningún individuo homocigótico para el alelo A. Además no hubo diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control en el estudio de frecuencias alélicas y modelo de dominancia de alelos.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		GG	GA	AA	G	A	G	A
Neumonía y Sepsis	92	89	3	0	181	3	92	3
Sepsis	12	12	0	0	24	0	12	0
Meningitis	8	8	0	0	16	0	8	0
Control	100	98	2	0	198	2	100	2
Total	212	207	5	0	419	5	212	5

Tabla 27. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs5743708 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		GG	GA	AA	G	A	G	A
Meningitis	11	11	0	0	22	0	11	0
Sepsis	46	45	1	0	91	1	46	1
Meningitis y Sepsis	10	9	1	0	19	1	10	1
Control	100	98	2	0	198	2	100	2
Total	167	163	4	0	330	4	167	4

Tabla 28. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs5743708 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

La distribución de los genotipos en los controles sanos no se desvía del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,01$; $p=0,919$) y fueron similares a la población europea.

POLIMORFISMO rs7674579 DEL GEN TLR2

La distribución genotípica, frecuencia alélica y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs7674579 del gen TLR2 (variante intrónica situada en NM_001318787.1:c-301+5594G>T) de los pacientes con infección neumocócica y meningocócica se encuentran reflejadas en las tablas 29 y 30. No pudo realizarse el análisis estadístico para la distribución genotípica en ninguno de los dos casos ya que no apareció ningún individuo homocigótico para el alelo G. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia alélica y el modelo de dominancia alélica respecto al grupo control al hacer el análisis de los pacientes.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TG	GG	T	G	T	G
Neumonía y Sepsis	92	86	6	0	178	6	92	6
Sepsis	12	11	1	0	23	1	12	1
Meningitis	8	8	0	0	16	0	8	0
Control	100	91	9	0	191	9	100	9
Total	212	196	16	0	408	16	212	16

Tabla 29. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs7674579 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TG	GG	T	G	T	G
Meningitis	11	11	0	0	22	0	11	0
Sepsis	46	45	1	0	91	1	46	1
Meningitis y Sepsis	10	10	0	0	20	0	10	0
Control	100	91	9	0	191	9	100	9
Total	167	157	10	0	324	10	167	10

Tabla 30. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs7674579 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió en los genotipos de los controles sanos ($\chi^2=0,222$; $p=0,637$) siendo similar a la población caucásica.

POLIMORFISMO rs4986790 DEL GEN TLR4

El análisis comparativo de la distribución genotípica, frecuencias alélicas así como el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 (variante exónica en la posición NM_003266.3:c.776A>G con cambio de aminoácido, NP_003257.1:p.Asp259Gly) de los pacientes con infección neumocócica se muestran en la tabla 31. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en estos grupos respecto a los controles. Se observa una distribución diferente al comparar el grupo de Neumonía y Sepsis con los controles, siendo más frecuente el alelo G en los primeros

aunque no alcanzó la significación estadística ($p=0,082$). Habría que realizar el estudio con un número de muestra mayor para contrastar estos resultados.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		AA	AG	GG	A	G	A	G
Neumonía y Sepsis	92	76	13	3	165	19	89	16
Sepsis	10	9	1	0	19	1	10	1
Meningitis	12	9	3	0	21	3	12	3
Control	132	120	12	0	252	12	132	12
Total	246	214	29	3	457	35	243	32

Tabla 31. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección neumocócica.

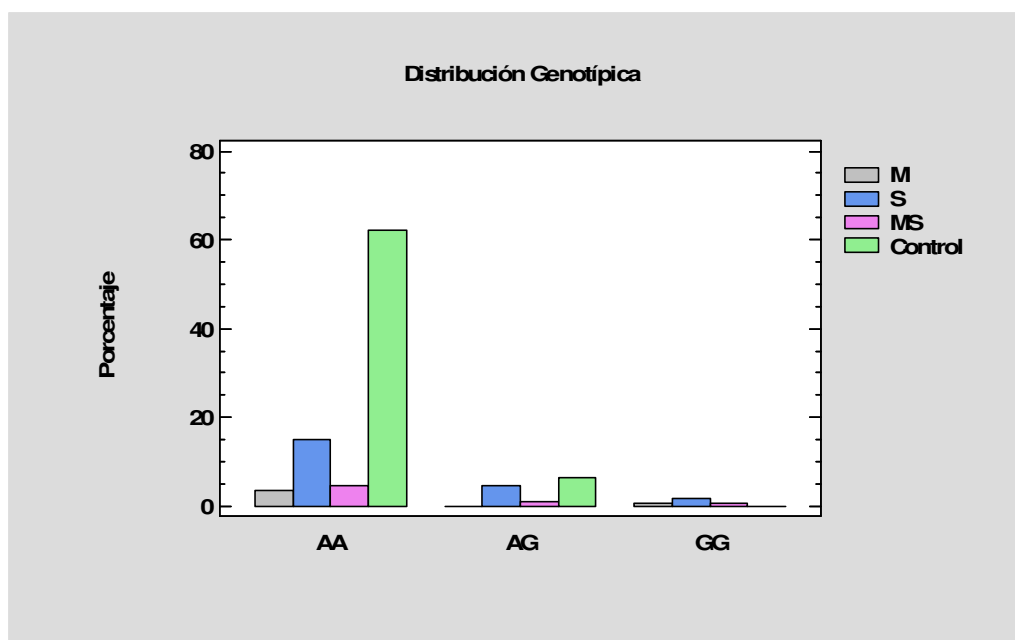
En la tabla 32 se muestra el análisis genético de este polimorfismo en los pacientes con infección meningocócica. Existe diferencia significativa en cuanto a la distribución genotípica ($p=0,024$), frecuencia alélica ($p=0,0009$) y modelo de dominancia alélica ($p=0,0365$) entre los pacientes y los controles, a expensas del grupo de Sepsis, debido a la menor porcentaje de pacientes homocigóticos para el alelo A (70,73%) respecto al grupo control (90,91%).

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		AA	AG	GG	A	G	A	G
Meningitis	8	7	0	1	14	2	7	1
Sepsis	41	29	9	3	67	15	38	12
Meningitis y Sepsis	10	9	0	1	18	2	9	1
Control	132	120	12	0	252	12	132	12
Total	191	165	21	5	351	31	186	26

Tabla 32. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica.

	AA	AG	GG	Total
Meningitis	7	0	1	8
	87,50%	0,00%	12,50%	4,19%
Sepsis	29	9	3	41
	70,73%	21,95%	7,32%	21,47%
Meningitis-Sepsis	9	0	1	10
	90,00%	0,00%	10,00%	5,24%
Control	120	12	0	132
	90,91%	9,09%	0,00%	69,11%
Total	165	21	5	191
	86,39%	10,99%	2,62%	100,00%

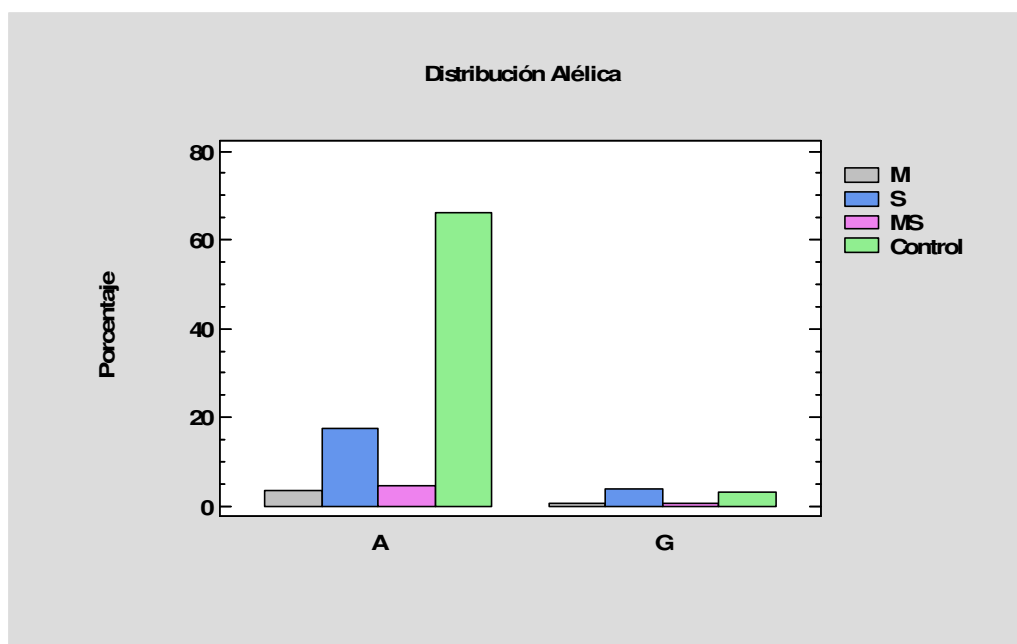
Tabla 33. Tabla de frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 20. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis).

	A	G	Total
Meningitis	14	2	16
	87,50%	12,50%	4,19%
Sepsis	67	15	82
	81,71%	18,29%	21,47%
Meningitis-Sepsis	18	2	20
	90,00%	10,00%	5,24%
Control	252	12	264
	95,45%	4,55%	69,11%
Total	351	31	382
	91,88%	8,12%	100,00%

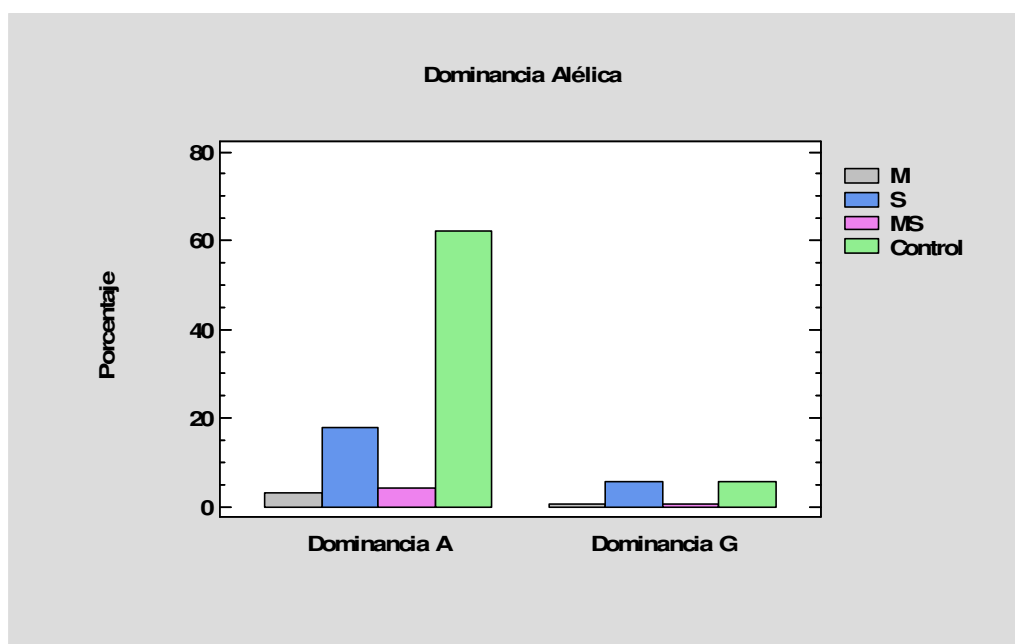
Tabla 34. Tabla de frecuencias alélicas del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 21. Correspondiente a la distribución alélica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica. M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis).

	Dominancia A	Dominancia G	Total
Meningitis	7	1	8
	87,50%	12,50%	3,77%
Sepsis	38	12	50
	76,00%	24,00%	23,58%
Meningitis-Sepsis	9	1	10
	90,00%	10,00%	4,72%
Control	132	12	144
	91,67%	8,33%	67,92%
Total	186	26	212
	87,74%	12,26%	100,00%

Tabla 35: Tabla de frecuencias para el modelo de dominancia alélica para el polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección meningocócica.



Gráfica 22. Correspondiente al modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección neumocócica. M (Menigitis), S (Sepsis), MS (Menigitis y Sepsis).

La distribución de los genotipos en los controles sanos no se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,299$; $p=0,584$) siendo similar a la población española.

POLIMORFISMO rs2569190 DEL GEN CD14

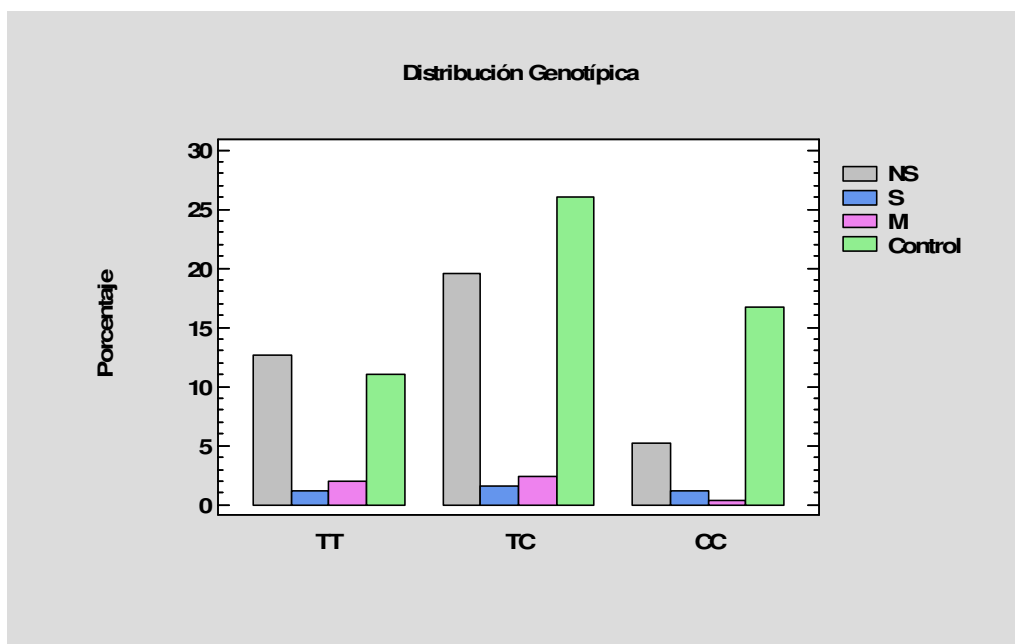
La tabla 36 muestra el análisis comparativo de la distribución genotípica, frecuencias alélicas así como el modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2569190 del gen CD14 (variante 5' en UTR en la posición NM_003266.3:c.776A>G con cambio de aminoácido, NP_003257.1:p.Asp259Gly). Existen diferencias significativas con respecto al control en el estudio de la distribución genotípica ($p=0,043$), pero no en cuanto a la frecuencia alélica ni en el modelo de dominancia de alelos. Se observa un mayor porcentaje significativo de homocigotos para el alelo T (33,7%) en los pacientes con Neumonía y Sepsis respecto al grupo control (20,41%).

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Neumonía y Sepsis	92	31	48	13	110	74	79	61
Sepsis	10	3	4	3	10	10	7	7
Meningitis	12	5	6	1	16	8	11	7
Control	132	27	64	41	118	146	91	105
Total	246	66	122	58	254	238	188	180

Tabla 36. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2569190 del gen CD14 en pacientes con infección neumocócica.

	TT	TC	CC	Total
Neumonia-Sepsis	31	48	13	92
	33,70%	52,17%	14,13%	37,40%
Sepsis	3	4	3	10
	30,00%	40,00%	30,00%	4,07%
Meningitis	5	6	1	12
	41,67%	50,00%	8,33%	4,88%
Control	27	64	41	132
	20,45%	48,48%	31,06%	53,66%
Total	66	122	58	246
	26,83%	49,59%	23,58%	100,00%

Tabla 37. Tabla de frecuencias de la distribución genotípica del polimorfismo rs2569190 del gen CD14 en pacientes con infección neumocócica.



Gráfica 23. Correspondiente a la distribución genotípica del polimorfismo rs2569190 del gen CD14 en pacientes con infección neumocócica. NS (Neumonía y Sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis).

El análisis comparativo de las frecuencias genotípicas estudiadas para este polimorfismo en pacientes con infección meningocócica se encuentran reflejadas en la tabla 38. No se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo de pacientes con el grupo control.

GRUPO	N	DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA			FRECUENCIAS ALÉLICAS		DOMINANCIA ALÉLICA	
		TT	TC	CC	T	C	T	C
Meningitis	8	2	3	3	7	9	5	6
Sepsis	41	10	25	6	45	35	35	30
Meningitis y Sepsis	10	2	8	0	12	10	10	9
Control	132	27	64	41	118	146	91	105
Total	191	41	100	50	182	200	141	150

Tabla 38. Distribución genotípica, frecuencias alélicas y modelo de dominancia alélica del polimorfismo rs2569190 del gen CD14 en pacientes con infección meningocócica.

La distribución de los genotipos de los controles sanos cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,049$; $p=0,824$). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron similares a las de la población europea.

A modo de resumen, en las tablas 39 y 40 se reflejan las significaciones estadísticas de cada uno de los polimorfismos para las infecciones neumocócicas y meningocócicas respectivamente.

	Neumonía y Sepsis			Sepsis			Meningitis		
	DG	FA	DoA	DG	FA	DoA	DG	FA	DoA
rs1938228	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs1816702	*	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs1898830	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs2289318	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs3804099	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs3804100	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs5743704	-	*	*	-	ns	ns	-	ns	ns
rs5743708	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs7674579	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs4986790	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs2569190	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 39. Significación estadística en los pacientes con enfermedad neumocócica. DG (distribución genotípica), FA (frecuencia alélica), DoA (dominancia de alelo).

ns (no significativo); * (p<0.05); ** (p<0.01); *** (p<0.005)

	Meningitis			Sepsis			Meningitis y Sepsis		
	DG	DA	DoA	DG	DA	DoA	DG	DA	DoA
rs1938228	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
rs1816702	ns	ns	ns	*	**	*	ns	ns	ns
rs1898830	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
rs2289318	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs3804099	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs3804100	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs5743704	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs5743708	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs7674579	-	ns	ns	-	ns	ns	-	ns	ns
rs4986790	ns	ns	ns	*	***	*	ns	ns	ns
rs2569190	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 40. Significación estadística en los pacientes con enfermedad meningocócica. DG (distribución genotípica), FA (frecuencia alélica), DoA (dominancia de alelo).

ns (no significativo); * (p<0.05); ** (p<0.01); *** (p<0.005)

LA SEPSIS COMO PROBLEMA SOCIOSANITARIO

La sepsis es un problema sanitario de gran importancia que requiere unas medidas específicas para poder ser identificada de forma precoz, estableciendo así un tratamiento adecuado para disminuir su mortalidad. En el año 2002 varias sociedades científicas pusieron en marcha la campaña “Sobrevivir a la sepsis” [<http://www.survivingsepsis.org/>] cuyo fin era concienciar del problema y disminuir la mortalidad. De ahí surgió una primera guía en el año 2004 para el manejo de la sepsis tanto en adultos como en niños que fue actualizada posteriormente en 2008⁽⁴³⁾. A partir de esta iniciativa, la Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias (SEMES) junto con la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMYUC) por un lado⁽⁹¹⁾ y la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos junto con la Sociedad Española de Urgencias Pediátricas por otro, elaboraron sendos documentos con la misma filosofía.

Existe una gran variabilidad en cuanto a la incidencia y mortalidad de la sepsis en los diferentes estudios. En términos generales el 10,4% de los individuos que acuden a urgencias presentan un cuadro infeccioso, la mayoría de origen respiratorio y alrededor del 20% de ellos son ingresados en el hospital, cumpliendo criterios de sepsis entre el 5 y 10%⁽⁶⁴⁾.

A nivel mundial se diagnostican entre 47 y 300 casos de sepsis por 100.000 habitantes y año, con una mortalidad entre 28-50%, lo que corresponde a 18/19 millones de casos al año en el mundo con 1.400 muertos diarios^(55,98). En España existen aproximadamente 45.000 casos anuales de los que mueren alrededor de 13.000, cifras acorde con las anteriores^(11,77). Actualmente el diagnóstico de sepsis está aumentando a

un ritmo de 7-9% anual debido al mayor número de pacientes con enfermedades crónicas, inmunodeprimidos, o sometidos a procedimientos invasivos, así como al aumento de la expectativa de vida, lo que contrasta con el descenso de su mortalidad gracias a que se diagnostica y trata más precozmente.

A pesar de los avances en el conocimiento y tratamiento de la sepsis, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil⁽¹⁵²⁾. No existen muchos estudios epidemiológicos en niños, aunque la incidencia global es de 56 a 60 casos/100.000 niños, son los menores de 1 año los más susceptibles (entre 500 y 900 casos/100.000 habitantes). La sepsis neonatal aparece en el 1% de los recién nacidos (RN) a término y en más del 20% de los RN de bajo peso, con una mortalidad que oscila entre el 3-40%⁽⁴⁾. Los factores que influyen en la susceptibilidad del RN y especialmente del prematuro de muy bajo peso a la sepsis son probablemente, la inmadurez de sistema inmunitario (estudios en neonatos sugieren una función anormal de los neutrófilos)⁽⁹³⁾, la necesidad muchas veces de soportes adicionales (respiradores, nutriciones artificiales...), la exposición al entorno, y las propias respuestas inflamatorias, además de la predisposición genética. A partir del año de vida disminuye la incidencia (alrededor de 20 casos/100.000 habitantes) con una mortalidad global entre el 9 y 12,4%⁽¹⁵⁰⁾. En España los resultados son similares y alrededor del 23% de los pacientes ingresados en la UCI Pediátrica tienen sepsis. Al igual que en adultos, el número de casos va en aumento fundamentalmente en niños con enfermedades crónicas e inmunodeprimidos (alrededor del 50% tienen enfermedades subyacentes).

La causa más frecuente de sepsis (hasta en un 50% de los casos) es la neumonía, seguida por las infecciones del tracto urinario e intrabdominales⁽¹⁴⁶⁾, siendo los hemocultivos positivos solo en un tercio de los casos. En adultos el *Staphylococcus*

aureus y el *Streptococcus pneumoniae* son las bacterias Gram positivas más frecuentemente aisladas mientras que *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, especies de *Klebsiella* y *Pseudomona aeruginosa* son los Gram negativos que predominan⁽¹¹⁹⁾. Durante la infancia la causa más frecuente de sepsis es la meningocócica^(22,70) aunque en los recién nacidos de los países industrializados se aísla más frecuentemente el *Streptococcus beta hemolítico del grupo A*, lo que contrasta con la mayor incidencia de bacterias Gram negativas en los países más desfavorecidos. En niños de 0 a 6 años el riesgo de infección neumocócica invasiva está asociado a recién nacidos de bajo peso, fundamentalmente debido a niveles bajos de Ac maternos, mientras que durante la primera infancia parece estar relacionado con el contacto con otros niños.

El *Streptococcus pneumoniae* y la *Neisseria meningitidis* son unos patógenos humanos importantes capaces de causar sepsis, neumonía y meningitis⁽²⁸⁾, con una alta morbilidad. Además son los causantes principales de meningitis, estando la mayoría de las veces precedida de la colonización nasofaríngea asintomática (100% de los casos de neumococo y 18% en los meningococos). Aunque existen similitudes entre ambos patógenos, las interacciones con el huésped son diferentes. Así la enfermedad neumocócica invasiva se ha asociado con pacientes inmunocomprometidos y con un foco de infección a distancia, mientras que en el caso de la enfermedad meningocócica se ha asociado a pacientes que conviven con fumadores⁽⁵⁶⁾.

Tiene gran importancia la expresión de los genes que regulan la respuesta fisiológica al agente infeccioso. La susceptibilidad a la sepsis así como su curso clínico son muy heterogéneos dependiendo de los pacientes, incluso del área geográfica donde residen y al menos en parte está influenciado por factores genéticos. A estas conclusiones llegaron hace más de 20 años Sorensen y cols⁽¹³⁴⁾. En su trabajo llegaron a

la conclusión que el riesgo relativo de morir por una infección es de 5,8 veces mayor si el padre biológico había fallecido por esta enfermedad en los primeros 50 años de vida.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

Los estudios genéticos presentan unas particularidades que afectan a la interpretación de los resultados. Aunque existen dos estrategias para la identificación de genes que se relacionan con la susceptibilidad a padecer una enfermedad (análisis de ligamiento y estudios de asociación), en el caso de las infecciones, la mayoría de las evidencias proceden del análisis de asociación. En éstos se compara la incidencia de determinada mutación que pudiera estar relacionada con una determinada enfermedad en individuos afectados y en sanos⁽⁴¹⁾. Teniendo en cuenta que cuanto mayor es el número de polimorfismos a estudio mayor es la probabilidad de la existencia de asociaciones que ocurren al azar, los niveles de significación estadística deben corregirse.

Por otro lado, la validación de los resultados de este tipo de análisis puede hacerse mediante la constatación de hallazgos similares en trabajos de otros autores. La ausencia de reproducibilidad puede deberse a dificultades metodológicas (originando falsos negativos o falsos positivos) o incluso a factores biológicos de las enfermedades complejas, donde el efecto de la variante genética sobre el fenotipo puede ser escaso o ser dependiente de la interacción con otros genes o con factores ambientales⁽³⁰⁾. Puede ocurrir también que existan variables relacionadas tanto con la enfermedad como un factor de riesgo analizado originando un sesgo que puede llevar a conclusiones erróneas⁽¹¹⁵⁾.

La relación entre un polimorfismo y una enfermedad es más consistente cuando el tamaño de la muestra es grande, el gen se localiza en una zona de ligamiento

relacionada (por ejemplo en caso de infección en una región relacionada con la respuesta inflamatoria) o si se ha demostrado esa relación en modelos animales⁽³⁶⁾.

Los estudios genéticos de asociación de casos y controles deben cumplir los siguientes requisitos:

1. La población a estudio (casos y controles) debe pertenecer al mismo grupo étnico, ya que una etnia concreta puede tener por una parte una mayor probabilidad a padecer una determinada enfermedad solo por razones socioculturales y por otra parte diferente frecuencia alélica para un polimorfismo determinado. Si el grupo es heterogéneo en cuanto a su etnia existe el riesgo de encontrar asociaciones genéticas por la presencia de este grupo, no por la existencia de genes de susceptibilidad, siendo este uno de los errores más frecuentes en estudios de casos y controles⁽⁷⁴⁾. En nuestro trabajo todos los pacientes y controles son de raza caucásica y de origen español.

2. El polimorfismo debe ser importante, es decir debe modificar la regulación del gen (SNP promotor) o la estructura primaria del mismo (SNP de exón). Aunque determinados genes por sí mismos pueden estar relacionados con la mayor susceptibilidad a padecer infecciones, puede ocurrir a veces que lo que está reflejando es lo que sucede en un gen vecino, ya que muchos alelos se segregan en bloque formando haplotipos dentro de los cuales se encuentran varios genes.

3. La proteína relacionada con dicho gen debe estar implicada en la patogenia de la enfermedad. Los genes a estudio deben seleccionarse con arreglo a la evidencia de que exista probabilidad de asociación con la enfermedad, a partir de estudios previos que constaten la relación de estos con su patogenia (estudios en modelos animales, en enfermedades familiares...)⁽⁶⁹⁾. Nosotros hemos basado nuestra búsqueda en

publicaciones previas relacionadas con algunas de las proteínas implicadas en la inmunidad innata.

4. Definición del fenotipo de una enfermedad y de su evolución, que debe ser lo suficientemente homogénea o grave en los pacientes para que sea posible su comparación. En nuestro caso se incluyeron los pacientes ingresados en la UCI pediátrica con diagnóstico clínico y microbiológico de infección grave por neumococo o meningococo.

5. En cuanto al procesamiento de las muestras, debe ser minucioso ya que se ha descrito un porcentaje de error en este tipo de estudios del 1-3% llevando a obtener conclusiones falsas⁽¹¹⁸⁾. Para evitar errores de contaminación de muestras, se extremaron las medidas de esterilidad. Además en el proceso de genotipado se utilizaron en cada placa al menos tres pocillos control (blancos) y pocillos vacíos. En algunas placas se mezclaron muestras de pacientes y controles y se repitió el análisis genético cuando el grado de discriminación alélica era confuso. Ningún polimorfismo de los estudiados se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg y las frecuencias genotípicas fueron similares a las descritas en nuestra población según la información obtenida del HapMap (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi).

6. En cuanto a la interpretación de resultados estadísticamente significativos, la relación entre el polimorfismo estudiado y la enfermedad puede ser:

** Verdadera y directa cuando existe una asociación real entre la variante genética y la enfermedad, siendo esta un factor de riesgo. Para ello el polimorfismo seleccionado tiene que alterar la proteína codificada por el gen y además tiene que tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Si se seleccionan genes con poca

probabilidad de asociación y la relación es estadísticamente significativa, los resultados deben interpretarse con cautela⁽³⁰⁾. Además una asociación entre polimorfismo y enfermedad puede ser consecuencia de interacciones entre diferentes variantes genéticas o con factores ambientales que modifican la expresión de algunos genes y pudieran influir en la propia patología. Existen estudios que relacionan ciertas mutaciones en los genes que codifican para los receptores TLR2, TLR4 y CD14 con la susceptibilidad a infecciones bacterianas y a desarrollo de sepsis^(12,28,145).

** Verdadera e indirecta cuando este polimorfismo se asocia a otra variante que verdaderamente tiene relación directa con la patogenia de la enfermedad (desequilibrio de ligamiento). La variante estudiada no sería el causante sino un marcador de enfermedad.

** Falso positivo bien sea por la presencia de sesgos o el azar.

Cuando los resultados son negativos puede deberse a que el polimorfismo estudiado no tiene relación con la enfermedad, a la presencia de sesgos (falsos negativos) o a que la proteína codificada por ese gen no tenga la suficiente repercusión funcional, o la tenga solo cuando interactúa con otros genes o factores ambientales. Debido a la existencia de varios polimorfismos en un mismo gen, la ausencia de asociación de alguna variante no descarta que exista relación entre el gen y la enfermedad.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La capacidad del huésped para reconocer a los microorganismos patógenos y responder adecuadamente es esencial para su supervivencia. Un retraso en la detección de los agentes microbianos contribuye a la evolución hacia infecciones graves con una exagerada respuesta sistémica que puede conducir a un daño tisular, disfunción sistémica e incluso la muerte. Algunos individuos parecen estar predispuestos a determinadas infecciones, existiendo una evidencia inequívoca que demuestra que factores genéticos pueden ser importantes determinantes del aumento de la susceptibilidad para el desarrollo de infecciones graves^(76,145).

El sistema inmune innato es la primera línea defensiva frente a patógenos invasores y representa un papel importante en la respuesta aguda del huésped. Estos patógenos son reconocidos por los TLRs gracias a que presentan en su superficie PAMPs.

Es sabido que existe una variabilidad genética en cuanto a la susceptibilidad para contraer determinadas enfermedades y su respuesta a la terapia. También se ha comprobado una asociación entre genes que codifican determinados receptores de patógenos y sepsis. Varios estudios sugieren que pacientes diagnosticados de sepsis con un tratamiento adecuado y precoz presentan una evolución clínica diferente. El polimorfismo de los genes que codifican por los mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria a la enfermedad podría ser la causa de esta diferencia^(57,136-137).

Se han identificado diferentes polimorfismos que afectan al dominio extracelular del gen de TLR4, así como de los genes de CD14 y TLR2.

POLIMORFISMOS DE TLR2

El TLR2 reconoce un amplio espectro de ligandos asociados a patógenos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, como porinas del meningococo o el LPS de especies de *Bordetella* o *Legionella*. Algunos estudios han encontrado relación entre los polimorfismos de TLR2 y la infección por Gram positivos^(94,111,137) o la susceptibilidad a la infección neumocócica^(109,155), otros han sugerido el efecto protector del polimorfismo Pro631His por su mayor frecuencia de una variante alélica en los controles⁽¹³³⁾, mientras que otros no han encontrado diferencias significativas entre los controles y el *S. Pneumoniae*⁽¹⁰⁹⁾ y *S. aureus*⁽¹⁰²⁾. Además también reconoce patrones moleculares de virus, parásitos, micobacterias y hongos⁽¹²¹⁾. Algunos polimorfismos se han relacionado con hepatitis C, lepra, tuberculosis, infección estafilocócica⁽¹⁴²⁾ y por *Citomegalovirus*⁽¹⁴¹⁾. Estudios realizados en tuberculosis en diferentes grupos étnicos han encontrado resultados contradictorios⁽¹²⁸⁾. Estudios in vitro del polimorfismo Arg677Trp presente en la población asiática y africana pero no en la caucásica demostraron que es capaz de inhibir tanto el *M. tuberculosis* como el *M. leprae* a través de la producción de NF- κ B⁽²⁶⁾. En otro estudio de casos y controles, sobre este polimorfismo, en la población tunecina, en pacientes con tuberculosis, los investigadores encontraron que la frecuencia de pacientes que presentaban el alelo T era significativamente mayor al del grupo control (94% versus 31%; p<0,001) y aunque el mecanismo inhibitor del polimorfismo no está claro, ellos sugieren que el hecho de que la lipoproteína 19-kDa de la micobacteria active el TLR2 a través del heterodímero TLR2/TLR1, esta variante pudiera afectar a la asociación de los dos TLR⁽¹⁴²⁾.

En investigaciones con ratones *knock-out* se observó que determinadas variantes genéticas del TLR2 predisponían a sepsis y/o meningitis producidas por algunos agentes infecciosos, incluyendo el *S. pneumoniae*^(46,140). Otros autores observaron en este tipo de ratones que la infección por bacterias Gram negativas no estimulaba la respuesta del TNF- α ⁽¹³⁷⁾. Sugirió entonces, que los polimorfismos que afectan a la expresión del gen de TLR2 pueden disminuir la respuesta del huésped frente a microorganismos Gram positivos originando un mayor riesgo de infección por los mismos⁽⁴⁾.

La interacción entre el *S. pneumoniae* y los TLR2 durante en la sepsis induce la activación plaquetaria contribuyendo a las complicaciones trombóticas que ocurren en este proceso⁽⁸⁴⁾.

En nuestro estudio hemos analizado 9 polimorfismos del gen de TLR2. No hemos encontrado diferencias significativas con respecto al control en 5 de ellos en ninguno de los grupos estudiados. El rs2289318 y el rs1898830 se han asociado a alteración de la función pulmonar en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), así como con la presencia de mayor porcentaje de células inflamatorias en el esputo inducido, sugiriendo los autores que representa un papel importante en la severidad y progresión de la enfermedad⁽²⁹⁾. Se ha publicado un trabajo en el que se describe una asociación con la Enfermedad de Behçet en población china⁽⁵²⁾.

Tampoco encontramos diferencia significativa en el análisis del polimorfismo rs3804099. En un estudio realizado en 535 RN pretérmino de raza caucásica, 79 de ellos con sepsis, los investigadores observaron una asociación entre este polimorfismo y sepsis producida por Gram positivos (*Staphilococcus coagulasa negativo*), no encontrando diferencia significativa en la frecuencia de ningún alelo al compararlo con el grupo control⁽⁴⁾, aunque Esposito y cols. en un estudio similar de RN pretérmino no

encontraron diferencias significativas para este polimorfismo entre los controles y los pacientes con sepsis⁽⁴⁹⁾. También se ha relacionado con una alta tasa de mortalidad por sepsis con disfunción multiorgánica en pacientes que sufrieron un accidente cerebro vascular de tipo isquémico⁽¹¹⁶⁾. Zhang y cols. en un estudio in vitro estimulando células mononucleares de sangre periférica con *Legionella pneumophila* en individuos sanos chinos que presentaban este polimorfismo, los niveles de MyD88 eran significativamente menores que en los controles, concluyendo que presentaban una menor respuesta de la inmunidad innata⁽¹⁵⁶⁾. Por otro lado, se ha descrito un riesgo disminuido para el desarrollo de hepatocarcinomas en individuos homocigotos para el alelo T⁽⁸²⁾, asociándose también a una mayor susceptibilidad para el desarrollo de carcinoma colorectal⁽¹³²⁾.

No se encontraron diferencias significativas entre nuestros pacientes y los controles en el estudio del polimorfismo rs3804100. Esposito y cols. en un grupo de RN pretérmino que presentaban sepsis por microorganismos Gram negativos y Gram positivos entre los que no se encontraban neumococos ni meningococos, no encontraron significación estadística entre los pacientes con este polimorfismo y el grupo control⁽⁴⁹⁾.

Los genes que afectan a la respuesta inflamatoria representan un papel importante en la fibrosis quística. Haerynck y cols. estudiaron el impacto de esta variante genética en la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística, demostrando que algunas de ellas, entre las que se encuentra este polimorfismo, se relacionaban de forma significativa con mayor gravedad en la función pulmonar⁽⁶⁸⁾. Otros autores han encontrado una relación entre la nefronía lobar aguda y esta variación genética en TLR2 teniendo una respuesta inflamatoria mayor que los pacientes con pielonefritis aguda, concluyendo que la presencia de este polimorfismo puede proteger al huésped de infecciones graves del tracto urinario⁽³⁵⁾. Existen muchos y diferentes

estudios en los distintos grupos étnicos sobre la influencia de variantes genéticas de TLR2 en el aumento de susceptibilidad para la tuberculosis. Se ha encontrado un mayor riesgo para padecerla en pacientes homocigotos para el alelo C del polimorfismo rs3804100 y un descenso del mismo en los pacientes que presentan el genotipo AG del polimorfismo rs4833095 de TLR1⁽¹²⁸⁾.

En el estudio del polimorfismo rs5743708 no se encontraron diferencias significativas en nuestros pacientes con respecto al grupo control. Este polimorfismo se ha identificado en el 3% de donantes de sangre sanos de raza blanca. Se ha relacionado con una menor activación celular en respuesta a lipoproteínas, en pacientes con shock séptico por Gram positivos⁽⁹⁴⁾, aunque estudios posteriores no pudieron confirmar su asociación con la gravedad en adultos⁽¹⁴⁷⁾. En el gen que codifica el receptor TLR2, el cambio de Arg por Gln en la posición 753, según algunos autores, condiciona una mayor susceptibilidad a la infección estafilocócica⁽¹⁴²⁾. Van Well y cols. han estudiado SNPs de respuesta inmune en diferentes patógenos, en relación con características clínicas que sugieren gravedad (como pérdida de audición por inflamación coclear), en meningitis tanto neumocócica como meningocócica, en una población pediátrica y observaron que la asociación entre este polimorfismo y el rs4986790 se relaciona de forma significativa con la sordera en ambos tipos de meningitis⁽¹⁵¹⁾. En un grupo de pacientes neonatos con sepsis en los que se aislaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control⁽⁴⁹⁾. Ogus y cols. hallaron que la frecuencia del alelo 753Q del gen TLR2 en la población turca era de 1.7% en portadores homocigotos y 6% en pacientes heterocigotos, sugiriendo diferencias étnicas en la frecuencia de este alelo⁽¹¹⁴⁾. En este artículo se asocia el polimorfismo con un riesgo aumentado de desarrollo de tuberculosis, 6 y 1,6 veces más para los portadores de los genotipos AA y GA

respectivamente. En otro trabajo sobre tuberculosis observaron que en un grupo de pacientes asiáticos, la presencia del alelo A incrementaba el riesgo de padecerla, mientras que el mismo confería protección en el grupo de hispanicos^(128,154) y caucásicos⁽⁶⁶⁾. Haerynck y cols. en pacientes con fibrosis quística vieron que este polimorfismo se asociaba a mayor gravedad de la enfermedad pulmonar⁽⁶⁸⁾. El análisis de esta variante en un grupo de pacientes de origen caucásico con endocarditis, no demostró ninguna significación con respecto al grupo control⁽⁶²⁾. Se ha publicado una mayor susceptibilidad para sufrir una peritonitis bacteriana espontánea en pacientes con cirrosis hepática cuando está presente este polimorfismo de TLR2, al igual que el rs5743704⁽¹¹³⁾. Otros investigadores observaron la existencia de mayor frecuencia de colonización bacteriana por *S. aureus* y *M. catarrhalis* en niños de 3 meses de vida sanos cuando presentan el polimorfismo rs5743708 del TLR2 y el rs4986790 de TLR4 que en controles sanos, sugiriendo que estas variantes genéticas pudieran favorecer las infecciones respiratorias en niños⁽¹⁴⁸⁾. Otros autores determinaron la distribución genotípica del rs5743708 en RN asociándolos a la edad gestacional, encontrando que los pacientes más prematuros se relacionaba de forma significativa con este polimorfismo y que la posible modificación de la respuesta inmune en estos niños haya contribuido al nacimiento prematuro⁽⁸⁶⁾.

Se ha demostrado que existen formas solubles de TLR2 en plasma y leche materna que regularían la activación celular⁽⁹⁰⁾. Debido a que el descenso de TLR2 soluble conduce a un aumento en la respuesta inflamatoria al lipopéptido bacteriano, la infusión de TLR solubles en pacientes portadores de rs5743708 podría ser beneficioso en la prevención y tratamiento de infecciones por Gram positivos o tuberculosis⁽¹⁴²⁾.

Otros estudios en población pediátrica han encontrado asociación entre esta variante genética y mayor riesgo de infección recurrente⁽⁸⁸⁾, infección del tracto urinario⁽¹³⁹⁾, nacimientos prematuros⁽⁸⁶⁾ y fiebre reumática aguda⁽²¹⁾.

El análisis comparativo del polimorfismo rs7674579 entre los pacientes con infección neumocócica y meningocócica y el grupo control no mostró diferencia significativa.

En el caso del polimorfismo rs11938228 no encontramos diferencia significativa en la infección neumocócica a estudio pero en pacientes con infección meningocócica grave (Meningitis asociada a Sepsis) encontramos una diferencia significativa con respecto a los controles en la distribución genotípica, con un porcentaje de pacientes homocigotos para el alelo A (40%) muy superior a los controles (9%), no encontrando pacientes heterocigotos. Esposito y cols. lo analizaron en RN pretérmino con sepsis por otros gérmenes Gram positivos (*Staphylococcus coagulasa negativo*, *S. aureus*, *Enterobacterias*, *S. agalactiae*) y Gram negativos (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomona aeruginosa*) y no encontraron diferencias significativas respecto al grupo control, al igual que Abu-Maziad y cols^(4,49). Un grupo de investigadores han documentado una asociación significativa en pacientes daneses, entre este polimorfismo, el rs3804099 y rs11938228, la EII, y la respuesta al tratamiento con anti-TNF⁽¹⁸⁾.

Al analizar el polimorfismo rs1816702, hemos observado una diferencia significativa en pacientes con infección grave tanto neumocócica (grupo de Neumonía y Sepsis) como meningocócica (grupo de Sepsis), encontrando un mayor porcentaje de pacientes heterocigotos (CT), 27% y 24% respectivamente, frente al 9% de los controles. En un estudio en el que se analizó este polimorfismo en RN pretérmino con sepsis por bacterias Gram negativas y Gram positivas, no se encontró diferencia

estadísticamente significativa⁽⁴⁹⁾. Existen otros trabajos que relacionan esta variante con patología no infecciosa. Así, en un estudio sobre EII sugieren que la combinación de éste con la susceptibilidad a factores ambientales puede explicar la herencia en estos pacientes, sugiriendo que la composición microbiana del huésped y factores intestinales aumentan el riesgo de EII en individuos susceptibles genéticamente⁽¹⁸⁾. También se ha asociado a mayor riesgo de trombosis en pacientes afroamericanos y euroamericanos con lupus eritematoso sistémico, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en hispanos⁽⁸³⁾. En individuos con EPOC se ha documentado una mayor afectación pulmonar así como un mayor número de células inflamatorias en el esputo inducido con respecto al grupo control, lo que sugiere que tiene un importante papel en la gravedad y progresión de la enfermedad⁽²⁹⁾. Un grupo de investigadores estudiaron, en pacientes norteamericanos con arteriosclerosis, la influencia de esta variante genética sobre los niveles de receptores en la superficie de los monocitos asociándose a mayor porcentaje de CD14+/TLR2+ en la superficie de los monocitos respecto al grupo control⁽²³⁾.

En el análisis del polimorfismo rs1898830 encontramos diferencia estadísticamente significativa en el grupo de Meningitis asociado a Sepsis, con un porcentaje de individuos homocigotos para el alelo G (40%) muy por encima de los controles (6%). Aunque la asociación es muy significativa ($p=0,008$), la muestra es muy pequeña ($n=10$) por lo que creemos que para darle mayor peso a este resultado habría que ampliar el número de pacientes a estudio. En la literatura se ha relacionado este polimorfismo con infección tuberculosa latente en una población china⁽¹⁵⁴⁾. En un trabajo sobre la infección por *Citomegalovirus*, el genotipo AG se ha identificado menos frecuentemente en niños con infección congénita respecto al grupo control⁽¹⁴¹⁾.

Los pacientes que no presentan el alelo A en el estudio del polimorfismo rs5743704 tienen mayor riesgo de tener neumonía asociada a sepsis que el grupo control.

Aunque no encontramos diferencias significativas en la distribución genotípica entre el grupo control y los pacientes estudiados con respecto al polimorfismo rs5743704, sí se ve que hay diferencias en cuanto a la frecuencia alélica en el grupo que presenta Neumonía y Sepsis. Este polimorfismo se ha relacionado con una susceptibilidad tres veces mayor a padecer candidiasis vulvovaginal recurrente, por una menor activación de NF- κ B⁽⁵⁴⁾. En un grupo de pacientes con infecciones de la piel producida por microorganismos Gram positivos y negativos, se encontró asociación entre la susceptibilidad a padecerla y la presencia de esta variante genética⁽¹³⁵⁾.

Nuestros datos sugieren que algunos polimorfismos de TLR afectan a la capacidad de respuesta inmunológica frente a *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* al igual que el grupo de Massari⁽¹⁰⁰⁾. Las porinas y otras proteínas de membrana del meningococo estimulan la respuesta inmune a través de los TLR2 y además una alteración en la dimerización de éste y el TLR1 puede llevar a una alteración en la respuesta a las porinas PorB⁽¹⁰¹⁾. Por otro lado se ha demostrado que es necesario una alta concentración de bacterias Gram positivas para activar las células a través de TLR2⁽⁴⁷⁾, lo que concuerda con la significación en el caso de sepsis grave asociada a neumonía⁽¹⁵⁷⁾. Con concentraciones bacterianas bajas, la activación de los macrófagos por el LPS es TLR4/CD14 dependiente, pudiendo ser bloqueada esta activación por anticuerpos específicos, pero a altas concentraciones activa el complemento siendo independiente del CD14⁽⁷¹⁾.

Los RN presentan un sistema inmune inmaduro habiéndose constatado una disminución de la respuesta de las células mononucleares a la liberación de citoquinas ante el estímulo del LPS bacteriano⁽⁹³⁾.

El TLR2 puede considerarse el receptor más importante para los productos de las bacterias Gram positivas y podrían ayudarnos a comprender las respuestas normales y anormales de la inmunidad innata frente a una gran variedad de patógenos⁽¹⁴²⁾. Futuros estudios deben dirigirse hacia los aspectos de especificidad de estos TLR, así como su interacción con otros receptores (TLR1, TLR6 y CD14) y modelos de señalización para infecciones bacterianas.

POLIMORFISMO DE TLR4

El TLR4 es un receptor presente en la membrana de las células del sistema inmune innato que reconoce el LPS de las bacterias Gram negativas. La activación de los macrófagos por el LPS meningocócico es dependiente de TLR4 y la sustitución Asp259Gly se asocia a cambios funcionales en la respuesta inmune⁽¹⁰¹⁾ ya que altera el dominio extracelular del receptor. Según algunos autores este polimorfismo conlleva una menor respuesta frente a la infección neumocócica y meningocócica^(31,51).

Aunque algunos estudios no han encontrado asociación entre el polimorfismo rs4986790 y la enfermedad meningocócica^(120,49), otros confirman la asociación con mayor incidencia de infecciones Gram negativas en pacientes con sepsis⁽²⁸⁾, así como a una progresión más rápida⁽¹¹⁾ y una mayor mortalidad⁽⁷²⁾.

Existen estudios contradictorios. Mientras que algunos le asocian a mayor susceptibilidad para desarrollar un shock séptico después de una infección en pacientes quemados⁽²⁰⁾, otros en un estudio de cohorte en pacientes con traumatismo, documentan

que existe menor riesgo de desarrollo de sepsis⁽¹²⁹⁾ o incluso que no existe ningún tipo de asociación⁽¹²⁰⁾. Lorenz y cols. y Agnese y cols., comparando el shock séptico en adultos con donantes sanos observaron que el TLR4 Asp259Gly solo se encontraba en los pacientes y que también tenían mayor prevalencia de infecciones por Gram negativos^(7,95), mientras que Biebl y cols. no encontraron asociación entre este polimorfismo y la enfermedad meningocócica masiva en los supervivientes tras la sepsis⁽²²⁾. Por otro lado, se ha asociado un genotipo heterocigoto de esta variante con un aumento en la mortalidad en niños con enfermedad meningocócica^(50,126), mientras que otros no han corroborado esta asociación⁽⁹⁾. Sirminova y cols. no han encontrado asociación entre las variantes “comunes” y enfermedad meningocócica, pero sí en las menos frecuentes⁽¹³³⁾.

No hemos encontrado asociación entre la variante genética rs4986790 y los pacientes con infección neumocócica, aunque el grupo de pacientes con sepsis meningocócica, el porcentaje de homocigotos para el alelo A es significativamente menor (70%) que en el grupo control (90%).

En un estudio con células mononucleares de sangre periférica de niños, no hubo diferencia en la respuesta con respecto al grupo control cuando se enfrentaban al *virus respiratorio sincitial*⁽⁴⁵⁾. Algunos polimorfismos de TLR4 se han asociado con mayor susceptibilidad a la malaria en niños africanos⁽¹⁰⁸⁾ y a padecer tuberculosis en pacientes asiáticos⁽¹²⁸⁾.

POLIMORFISMO DE CD14

El CD14 tiene especial relevancia en el inicio y perpetuación de la respuesta inflamatoria durante la sepsis. Esta proteína de anclaje del complejo receptor TLR4, es soluble, teniendo la capacidad de unirse al LPS de los Gram negativos, siendo los Ac frente a él capaces de bloquear la activación de los macrófagos en la infección meningocócica⁽⁷⁾. Además el CD14 es un receptor de alta afinidad, llave para las endotoxinas bacterianas que se encuentran en su pared celular. Diferentes estudios han confirmado que interacciona no solo con el LPS de los Gram negativos, sino también con otros ligandos microbianos como el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano de las bacterias Gram positivas⁽¹⁵⁷⁾. El polimorfismo promotor rs2569190 incluido en nuestro estudio ha sido previamente asociado con shock y mortalidad en pacientes con sepsis y su forma soluble se encuentra en una concentración más baja que en los controles⁽⁵⁹⁾. El genotipo TT se ha relacionado con una mayor expresión de CD14 en monocitos in vitro tras la exposición al LPS bacteriano⁽⁸⁾ y los adultos con sepsis ingresados en la UCI se ha descrito que tienen una menor mortalidad^(40,97). Otros investigadores no han podido confirmar la relación con el pronóstico^(81,155). En un estudio en prematuros con sepsis observaron que existía una asociación positiva entre el genotipo CC y mayor gravedad de esta⁽⁴⁹⁾, otros también lo han asociado a mayor susceptibilidad para la sepsis en neonatos de bajo peso⁽¹⁶⁾. También se ha asociado con una mayor susceptibilidad para infecciones por *Chlamydia pneumoniae* y desarrollo de sepsis, siendo considerado como factor de riesgo para la infección generalizada⁽¹²³⁾.

En nuestro estudio el 86,4% de pacientes con neumonía asociada a sepsis portan el alelo T de la variante genética del CD14, mientras que en el grupo control es significativamente menor (68,9%).

La especificidad del CD14 para reconocer el ligando sugiere que la disminución de la respuesta ligada al alelo T de este polimorfismo promotor puede dañar el reconocimiento y la unión de las diferentes endotoxinas microbianas o el LPS bacteriano al CD14, desencadenando una cascada de señalización mediada por los receptores TLR que promueve la síntesis de mediadores inflamatorios del huésped. Los p valores obtenidos son significativos para la infección neumocócica y no para la meningocócica. Esto puede deberse al pequeño número de casos de pacientes con infección meningocócica.

Hemos estudiado la correlación entre polimorfismos de los genes de receptores TLR2, TLR4 y CD14, encontrando asociaciones entre enfermedad neumocócica y meningocócica graves en alguno de ellos. Nuestros datos confirman el papel de la protección de la inmunidad innata frente a infecciones bacterianas invasivas. Así, la variabilidad genética de los genes TLR2, TLR4 y CD14 se asocia a un riesgo aumentado de desarrollo de enfermedad invasiva grave en pacientes con infecciones causadas por *S.pneumoniae* o *N.meningitidis*. Para prevenir el desarrollo de sepsis grave en pacientes de riesgo se han propuesto estrategias de vacunación para adquirir una potente respuesta humoral frente a los patógenos. Por otro lado el estudio de las condiciones genéticas del paciente frente a los procesos inflamatorios abre el camino al desarrollo de herramientas de diagnóstico y nuevos enfoques terapéuticos para tratar la sepsis grave en el futuro.

Debido a los resultados contradictorios que hemos encontrado en la literatura, el impacto funcional de los polimorfismos y las diferencias epidemiológicas entre los diferentes grupos étnicos, la predicción de la sepsis y su evolución a través del sistema de genotipado debe ser reevaluada y estudiada con múltiples polimorfismos.

1ª.- El estudio de los polimorfismos rs1938228, rs1898830 del gen TLR2 en pacientes con infección neumocócica, rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con infección meningocócica y rs2289318, rs7674579 del gen TLR2, en pacientes con ambas infecciones, que no mostró significación estadística, confirma los hallazgos de otros autores, por lo que su relevancia en estas infecciones es escasa o nula.

2ª.- El estudio de los polimorfismos rs4986790 del gen TLR4 en pacientes con infección neumocócica y rs3804099, rs3804100, rs5743708 del gen TLR2, en pacientes con ambas infecciones, que fueron estadísticamente no significativos, apoyan la controversia de los resultados de la literatura, por lo que se debería aumentar el tamaño muestral para confirmar o refutar su implicación en las infecciones neumocócica y meningocócica.

3ª.- En los pacientes que presentan infección neumocócica, la homocigosis para el alelo C del polimorfismo rs5743704 del gen TLR2 y para el alelo T del polimorfismo rs2569190 del gen CD14, se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de sepsis en pacientes con neumonía.

4ª.- En la infección meningocócica la homocigosis para el alelo A del polimorfismo rs1938228 del gen TLR2 y del alelo G del rs1898830 del gen TLR2, se relacionan con la presentación de meningitis asociada a sepsis y la presencia del alelo G del polimorfismo rs4986790 del gen TLR4 se asocia a sepsis.

5ª La presencia del alelo T del polimorfismo rs1816702 del gen TLR2 se relaciona con infección grave tanto por *S. pneumoniae*, como por *N. meningitidis*. Su estudio debe considerarse en la clínica.

6°.-Los polimorfismos estudiados que tuvieron significación estadística presentan una alta asociación con sepsis, por lo que su determinación podría ayudar a predecir la posibilidad de evolución a sepsis de una infección neumocócica o meningocócica.

- 1- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Updated 6th edition. Ed. Saunders. Elsevier Inc. Philadelphia, US.2010.
- 2- Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. Células T: Base molecular de su actividad y del reconocimiento del antígeno en Inmunología Celular y Molecular. Edit McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 1995;150-183.
- 3- Abdullah Z, Knolle PA. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. *EMBO J.* 2014;33:2283-2294.
- 4- Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res.* 2010;68:323-329.
- 5- Acuto O, Reinherz E. The human T cell receptor: Structure and function *New Engl J Med.* 1985; 2: 1110-1111.
- 6- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101:36-47.
- 7- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002;186:1522-1525.
- 8- Aguiar (de) BB, Girardi I, Paskulin DD, et al. CD14 expression in the first 24h of sepsis: effect of -260C>T CD14 SNP. *Immunol Invest.* 2008;37:752-769.
- 9- Allen A, Obaro S, Bojang K, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:1018-1019.
- 10- Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J.* 1954;1:290-294.
- 11- Andreu Ballester JC, Ballester F, González Sánchez A, et al. Epidemiology of Sepsis in the Valencian Community (Spain), 1995–2004. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:630–634.
- 12- Arcaroli J, Fressler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock.* 2005; 24:300-312.
- 13- Arguelles JC. Los microbios y el premio Nobel de medicina en 1908 (Ehrlich y Mechnikov). *Anales de Biología.* 2008;30:65-71.
- 14- Arquiola E. La neurología clínica. En: *Historia Universal de la Medicina* Barcelona: Edit.Salvat. 1974;6:240-250.

- 15- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-692.
- 16- Baier RJ, Loggins J, Yanamandra K. ILC10, ILC6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Med.* 2006;4:10.
- 17- Bank S, Andersen PS, Burisch J, et al. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics Journal.* 2014;14:526-534.
- 18- Bank S, Andersen PS, Burisch J, et al. Polymorphisms in the Inflammatory Pathway Genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *LY96*, *NFKBIA*, *NFKB1*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *IL6R*, *IL10*, *IL23R*, *PTPN22*, and *PPARG* Are Associated with Susceptibility of Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. *Plos One.* 2014;7:98815.
- 19- Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, et al.. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:185-214.
- 20- Barber RC, Chang LY, Arnoldo BD, et al. Innate immunity SNP are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res.* 2006;4:250-205.
- 21- Berdeli A, Celik HA, Ozyurek R, et al. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J Mol Med.* 2005;83:535–541.
- 22- Biebl A, Muendlein A, Kazakbaeva Z, et al. CD14 C-159T and toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphisms in surviving meningococcal disease patients. *Plos One.* 2009;4:007374.
- 23- Bielinski SJ, Hall JL, Pankow JS, et al. Genetic variants in TLR2 and TLR4 are associated with markers of monocyte activation: the Atherosclerosis Risk in Communities MRI Study. *Human Genetics.* 2011;129:655-662.
- 24- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, et al. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:41-52.
- 25- Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol.* 2010;12:215-225.
- 26- Bochud, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol.* 2003;170:3451-3414.

- 27- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20:864-874.
- 28- Brouwer MC, De Gans J, Heckemberg S, et al. Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2009;9:31-44.
- 29- Budulac SE, Boezen HM, Hiemstra PS, et al. Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease. *Plos One* 2012;8:0043124.
- 30- Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet.* 2003;361:598-604.
- 31- Celes MR, Prado CM, Rossi M. Sepsis: Going to the heart of the matter. *Pathobiology.* 2013;80:70-86.
- 32- Chapman SJ, Khor CC, Vannberg FO, et al. IkappaB genetic polymorphisms and invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:181-187.
- 33- Chávez M, Vallejo DE. Susceptibilidad genética para el desarrollo de la sepsis bacteriana grave y choque séptico. *Rev Cienc Salud* 2013;11:93-103.
- 34- Chen YC, Hsiao CC, Chen CJ, et al. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts. *BMC Medical Genetics.* 2010;11:17.
- 35- Cheng CH, Lee YS, Chang CJ, et al. Genetic polymorphisms in Toll-like receptors among pediatric patients with renal parenchymal infections of different clinical severities. *Plos One* 2013;8:0058687.
- 36- Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet.* 2003;361:865-872.
- 37- Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Resp Dis.* 1978;117:621-624.
- 38- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, et al. Disseminated tuberculosis in IFN- γ gene disrupted mice. *J Exp Med.* 1993;178:2243-2247.
- 39- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. 2008;180: 5771-5777.

- 40- D'Avila LC, Albarus MH, Franco CR, et al. Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunol Cell Biol.* 2006;84:342-348.
- 41- Dahlman I, Eaves I, Kosoy R, et al. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet.* 2002;30:149-150.
- 42- De Gracia J, Mata F, Álvarez A ,et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax.* 2015;60:558-563.
- 43- Dellinger RP, Mitchell ML, Carlet JM, et al. for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2008;36:296-327.
- 44- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343:108-117.
- 45- Douville RN, Lissitsyn Y, Hirschfeld AF, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus. *Plos One.* 2010;5:12087.
- 46- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Sreptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis.* 2002;186:798-806.
- 47- Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood.* 2007;109:1574-1583.
- 48- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014;4:21-35.
- 49- Esposito S, Zampiero A, Pagni L, et al. Genetic polymorphisms and sepsis in premature neonates. *PLoS One.* 2014;7:101248.
- 50- Faber J, Henninger N, Finn A, et al. A toll-like receptor 4 variant is associated with fatal outcome in children with invasive meningococcal disease. *Acta Paediatr.* 2009;98:548-552.
- 51- Faber J, Meyer CU, Gemmer C, et al. Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:80-81.
- 52- Fang J, Hu R, Hou S, et al. Association of TLR2 gene polymorphisms with ocular Behcet's disease in a Chinese Han population. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013;54:8384-8392.

- 53- Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, et al. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Intern J Hematol.* 2003;78:7-17.
- 54- Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg B J, et al. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10:2058–2066.
- 55- Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* 2013;41:1167-1174.
- 56- Gardner P. Prevention of meningococcal disease. *N Engl J Med.* 2006;335:1466-1473.
- 57- Garnacho J, Garnacho MC; Ortiz C, et al. Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med Intensiva.* 2005;29:185-191.
- 58- Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word sepsis. *Intensive Care Med.* 2006;32:207.
- 59- Gibot S, Cariou A, Drouet L, et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med.* 2002;30:969-973.
- 60- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, et al. *Immunology.* Ed. W.H. Freeman. New York. 2003.
- 61- Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6:2-8.
- 62- Golovkin AS, Ponasenko AV, Yuzhalin AE, et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine.* 2015;71:16-21
- 63- Gross CP, Sepkowitz KA. The myth of the medical breakthrough: Smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *Int. J. Infect. Dis.* 1998;3:54–60.
- 64- Grupo para el Estudio de la Infección en Urgencias. Estudio epidemiológico de las infecciones en el Área de urgencias. *Emergencias.* 2000;12:80-89.
- 65- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13:85-94.
- 66- Guo XG, Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the TLR2 gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Inter J Clin Exper Pathol.* 2015;8:11921-11928.

- 67- Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine a primer. *N Engl J Med*. 2002;347:512-1520.
- 68- Haerynck F, Mahachie John JM, Van Steen K, et al. Genetic variations in toll-like receptor pathway and lung function decline in Cystic fibrosis patients. *Human Immunology*. 2013;74:1649-1655.
- 69- Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study?. *Lancet*. 2005;366:1315-1323.
- 70- Hazelzet JA. Diagnosing meningococemia as a cause of sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:S50-S54.
- 71- Hellerud BC, Stenvik J, Espevik T, et al. Stages of meningococcal sepsis simulated in vitro, with emphasis on complement and Toll-like receptor activation. *Infect Immun*. 2008;76:4183-4189.
- 72- Henckaerts L, Nielsen KR, Steffensen R, et al. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 2009;137:192-201.
- 73- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005;307:1072-1079.
- 74- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, et al. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002;4:45-61.
- 75- Hjuler T, Wohlfahrt J, Simonsen J, et al. Perinatal and crowding-related risk factors for invasive pneumococcal disease in infants and young children: a population-based case-control study. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1051-1056.
- 76- Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest*. 2003;124:1103-1115.
- 77- Iñigo J, Sendrra JM, Díaz R, et al. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid. Estudio de altas hospitalarias. *Med Intensiva*. 2006;30:197-203.
- 78- Ishii K.J, Koyama S, Nakagawa A, et al. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2008;3: 352-363.
- 79- Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. El Sistema del complemento en la inmunidad humoral en Inmunobiología. En *El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Ed. Masson S.A. 2000;9:339-358.
- 80- Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J*. 2011;52:379-392.

- 81- Jessen KM, Lindboe SB, Petersen AL, et al. Common TNF alpha, IL1beta, 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.
- 82- Junjie X, Songyao J, Minmin S, et al. The association between Toll-like receptor 2 single-nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility. *BMC Cancer.* 2012;12:57.
- 83- Kaiser R, Tang LF, Taylor KE, et al. A polymorphism in TLR2 is associated with arterial thrombosis in a multiethnic population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheumatol.* 2014;66:1882-1887.
- 84- Keane C, Tilley D, Cunningham A, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* trigger platelet activation via Toll-like receptor 2. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2757-2765.
- 85- Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, et al. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1315-1320.
- 86- Krediet TG, Wiertsema SP, Vossers MJ, et al. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res.* 2007;62:474-476.
- 87- Kumar S, Ingle H, Prasad DV. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39:229-246.
- 88- Kutukculer N, Yeniay BS, Aksu G, et al. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem Genet.* 2007;45:507-514.
- 89- Kwiatkowski D. Susceptibility to infection. *BMJ.* 2000;321:1061-1065.
- 90- Le Boudier E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, et al. Soluble forms of toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003;171:6680-6689.
- 91- León Gil C, García-Castrillo Riesgo L, Moya Mir M, et al. Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los servicios de urgencias hospitalarios. *Med Intensiva.* 2007;31:375-387.
- 92- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intens Care Med.* 2003;29:530-538.
- 93- Levy O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J Endotoxin Res.* 2005;11:113-116.

- 94- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, et al. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun.* 2000;68:6398-6401.
- 95- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med.* 2002;162:1028-1032.
- 96- Manavalan B, Basith S, Choi S. Similar structures but different roles- An updated perspective on TLR structures. *Front Physiol.* 2011;2:1-13.
- 97- Mansur A, Liese B, Steinau M, et al. The CD14 rs2569190 TT Genotype Is Associated with an Improved 30-Day Survival in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Cohort Study. *Plos One.* 2015;5:0127761.
- 98- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348:1546-1554.
- 99- Martínez-Córdova Z; Calzadilla-Lugo F, Artiles-Valor A. Papel de los polimorfismos genéticos de los receptores de peaje (Toll-R) en la enfermedad y en el trasplante. *Bioquímica.* 2009;21:83-94.
- 100- Massari P; Henneke P, Ho Y, et al. Cuttinedge: Immune stimulation by neisserial porins in toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol.* 2002;168:1533-1537.
- 101- Massari P, Visintin A, Gunawardana J, et al. Meningococcal porin PorB binds to TLR2 for signaling. *J Immunol.* 2006;176:2373-2380.
- 102- Mazana-Casanova J. Sobre la inmunidad a la viruela según Rhazes. *Inmunología.* 1989;8:71-72.
- 103- McCauley K, Irwin R S. Changing the work environment in intensive care units to achieve patient focused care: the time has come. *Am J Crit Care* 2006;15:541-548.
- 104- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449:819-826.
- 105- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91:295-298.
- 106- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila toll proteins signals activation of adaptative immunity. *Nature.* 1997; 388:394-397.
- 107- Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol.* 2000;1:379-385.

- 108- Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J Commun Dis.* 2006;38:230-245.
- 109- Moens L, Verhaegen J, Pierik M et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease. *Microbes Infect.* 2007;9:15-20.
- 110- Moore CE, Segal S, Berendt AR, et al. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:1194-1197.
- 111- Nachtigall I, Tamarkin A, Tafelski S, et al. Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients. *J Int Med Res.* 2014;42:93-110.
- 112- Namath A, Patterson AJ. Genetic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Clin.* 2009;25:835-856.
- 113- Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatology.* 2011;55:1010-1016.
- 114- Oğus AC, Yoldas B, Ozdemir T et al. The Arg 753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004;23:219-223.
- 115- Palmer LJ. An introduction of genetic epidemiology. The Policy Press. Bristol. 2011.
- 116- Park HJ, Kim SK, Yun DH, et al. Association of toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J Mol Neurosci.* 2012;46:536-540.
- 117- Poltorak A, Smirnova I, He X, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood cells Mol Dis.* 1998;24:340-355.
- 118- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, et al. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 2005;6:847-859.
- 119- Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.* 2012;366:2055-2064.
- 120- Read RC, Pullin J, Gregory S, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2001;184:640-642.

- 121- Rosentul DC , Delsing CE , Jaeger M, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Frontiers in Microbiology*.2014;5:483.
- 122- Ruiz Castellanos A. La etiología como forma de composición de la Peste de Atenas en Tucídides y en Lucrecio. *Cuad. Fil. Clás. Estud. Lat.* 2012;32:7-34
- 123- Rupp J, Goepel W, Kramme E, et al. CD14 promoter polymorphism -159C>T is associated with susceptibility to chronic *Chlamydia pneumoniae* infection in peripheral blood monocytes. *Genes Immun.* 2004;5:435-438.
- 124- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:331-344.
- 125- Salleras L. Historia de las vacunaciones preventivas. En Salleras L. *Vacunaciones preventivas, principios y aplicaciones.* Ed. Masson Barcelona. 2003;3-13.
- 126- Sampath V, Mulrooney NP, Garland JS, et al. Toll-like receptor genetic variants are associated with Gram-negative infections in VLBW infants. *Journal of Perinatology.* 2013;33:772-777.
- 127- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S41-52.
- 128- Schurz H, Daya M, Möller M, et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One.* 2015; 10:0139711.
- 129- Shalhub S, Junker CE, Imahara SD, et al. Variation in the TLR4 gene influences the risk of organ failure and shock posttrauma: a cohort study. *Trauma.* 2009;66:115-122.
- 130- Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care.* 2010;14:R182.1-12.
- 131- Silverstein A M. *History of Immunology.* Edit. Academic Press. 1989;422.
- 132- Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, et al. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *International Journal of Cancer.* 2012;130:2974-2980.
- 133- Smirnova I, Mann N, Dols A , et al. Assay of locus-specific genetics load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6075-6080.

- 134- Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med.* 1988;318:727–732.
- 135- Stappers MH, Thys Y, Oosting M, et al. TLR1, TLR2, and TLR6 gene polymorphisms are associated with increased susceptibility to complicated skin and skin structure infections. *J Infect Dis.* 2014;210:311-318.
- 136- Sutherland AM, Walley KR. Bench to bedside review: association of genetic variation with sepsis. *Crit Care.* 2009;13:210.
- 137- Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med.* 2005;33:638-644.
- 138- Synger M, Deutchman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315: 801-810.
- 139- Tabel Y, Berdeli A, Mir S. Association of TLR2 gene Arg753Gln polymorphism with urinary tract infection in children. *Int J Immunogenet.* 2007;34:399–405.
- 140- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol.* 2000;165:5392-5396.
- 141- Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, et al. Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. *Intern J Infect Dis.* 2013;17:1092-1097.
- 142- Texereau J, Chiche JD, Taylor W, et al. The importance of Toll-like receptor2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis.* 2005;41:S408-415.
- 143- Travis J. Origins. On the origin of the immune system. *Science.* 2009; 324:580-582.
- 144- Van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB reports.* 2009;42:776-787.
- 145- Villar J, Maca-Meyer N, Pérez-Mendez L, et al. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Crit Care.* 2004;8:180-189.
- 146- Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009; 302:2323-2329.

- 147- Von Aulock S, Schroder NW, Traub S, et al. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *Infect Immun*. 2004;72:1828-1831.
- 148- Vuononvirta J, Toivonen L, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, et al. Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants. *Plos One*. 2011;10:0026198.
- 149- Wang JH, Reinherz E. Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC Molecules. *Molecular Immunobiology*. 2001; 38:1039-1049.
- 150- Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:695-701.
- 151- Well GT, Sanders MS, Ouburg S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptors 2, 4, and 9 are highly associated with hearing loss in survivors of bacterial meningitis. *Plos One* 2012;7:0035837.
- 152- Wong HR. Genetics and genomics in pediatric septic shock. *Crit Care Med*. 2012;40: 1618-1626.
- 153- Wu H , Yang L. Arg753Gln Polymorphisms in Toll-Like Receptor 2 Gene are Associated with Tuberculosis Risk: A Meta-Analysis. *Intern Med J Exper Clinic Res*. 2015;21:2196-2202.
- 154- Wu L, Hu Y, Li D, et al. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Medical Genetics*. 2015;16:19.
- 155- Yuan FF, Marks K, Wong M, et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and Fcγ gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol*. 2008; 86:268-270.
- 156- Zhang F, Gao XD , Wu WW, et al. Polymorphisms in toll-like receptors 2, 4 and 5 are associated with *Legionella pneumophila* infection. *Infection*. 2013;4:941-948.
- 157- Zughair SM, Tzeng YL, Zimmer SM, et al. *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. *Infect Immun*. 2004;72:371-380.

I. Datos de pacientes con infección neumocócica: N° (número de muestra); Patología: NS (Neumonía y sepsis), S (sepsis), M (Meningitis); Genotipos: rs4986790 (TLR4), rs2569190 (CD14)

N°	Patología	rs4986790	rs2569190
1	M	AA	TT
2	S	AA	TC
3	M	AA	TC
4	M	AG	TC
5	M	AA	CC
6	M	AA	TC
7	M	AA	TC
8	M	AA	TC
9	NS	AA	TT
10	NS	AA	TC
11	NS	AA	TC
12	NS	AA	TT
13	NS	AA	TC
14	NS	AA	TC
15	NS	AA	TT
16	NS	AA	TC
17	NS	AA	TT
18	NS	AA	TC
19	NS	AA	TC
20	NS	AA	TT
21	NS	AA	TT
22	NS	AA	TT
23	NS	AA	TC
24	NS	AA	CC
25	NS	AA	TC
26	NS	AA	TT
27	NS	AA	TT
28	NS	AA	TC
29	NS	AA	TT
30	NS	AA	TT
31	NS	AA	TC
32	NS	AA	TT
33	NS	AA	TC
34	NS	AA	TC
35	NS	AA	CC
36	NS	AA	TT
37	NS	AA	TT
38	NS	AA	CC
39	NS	AA	TT
40	NS	GG	TC
41	NS	AA	TT

42	NS	AA	TT
43	NS	AA	TC
44	NS	AA	TC
45	NS	AA	TC
46	NS	AA	TC
47	NS	AA	CC
48	NS	AA	TC
49	NS	AA	TC
50	NS	GG	CC
51	NS	AA	TT
52	NS	AA	TC
53	NS	AA	TC
54	NS	AA	TT
55	NS	AG	TT
56	NS	AA	TT
57	NS	AA	TC
58	NS	AA	TC
59	NS	AA	CC
60	NS	AA	TT
61	NS	AA	TT
62	NS	AA	TT
63	NS	AA	TC
64	NS	AG	TT
65	NS	AA	TC
66	NS	AG	TC
67	NS	AG	CC
68	NS	AA	TC
69	NS	AG	CC
70	NS	GG	TC
71	NS	AA	TT
72	NS	AA	TC
73	NS	AA	CC
74	NS	AA	CC
75	NS	AA	TT
76	NS	AA	CC
77	NS	AA	TT
78	NS	AA	TC
79	NS	AA	CC
80	NS	AG	TT
81	NS	AA	TC
82	NS	AA	TT
83	S	AA	CC
84	S	AA	TC
85	S	AG	TT
86	M	AG	TC
87	M	AA	TT

88	M	AA	TT
89	NS	AA	TC
90	NS	AA	TC
91	NS	AA	TC
92	M	AG	TT
93	NS	AA	TC
94	NS	AG	TC
95	NS	AA	TC
96	S	AA	TT
97	S	AA	TT
98	NS	AG	TC
99	NS	AA	CC
100	NS	AA	TC
101	NS	AA	TC
102	NS	AA	TC
103	M	AA	TT
104	NS	AA	TC
105	NS	AG	TC
106	NS	AG	TC
107	S	AA	TC
108	S	AA	TC
109	S	AA	CC
110	NS	AA	TT
111	NS	AG	TC
112	NS	AG	TC
113	NS	AG	TC
114	S	AA	CC

II. Datos de pacientes con infección meningocócica: N° (número de muestra); Patología: MS (Meningitis y sepsis), S (Sepsis), M (Meningitis); Genotipos: rs4986790 (TLR4), rs2569190 (CD14)

N°	Patología	rs4986790	rs2569190
115	M	AA	TT
116	M	AA	CC
117	M	GG	TC
118	M	AA	CC
119	S	AA	TC
120	S	AA	TC
121	S	GG	TC
122	S	AA	CC
123	S	AG	TT
124	S	GG	TT
125	MS	AA	TC
126	MS	AA	TC
127	MS	AA	TT
128	MS	AA	TT
129	MS	AA	TC
130	MS	AA	TC
131	MS	GG	TC
132	MS	AA	TC
133	MS	AA	TC
134	S	AG	TC
135	S	AG	CC
136	S	AA	TC
137	S	AA	CC
138	S	AG	TC
139	S	AG	TC
140	S	AA	TC
141	S	AA	TC
142	S	AA	TC
143	S	AA	TC
144	S	AG	TT
145	S	AA	TT
146	S	AG	TC
147	S	AA	TC
148	S	AA	TT
149	S	GG	TC
150	S	AA	TC
151	S	AA	TT
152	S	AA	TC
153	S	AA	TC
154	S	AA	TC
155	S	AA	TC

156	S	AA	CC
157	S	AA	TT
158	S	AA	TT
159	S	AA	TT
160	S	AA	TT
161	S	AG	TC
162	MS	AA	TC
163	S	AA	TC
164	S	AA	TC
165	S	AA	TC
166	M	AA	CC
167	M	AA	TT
168	M	AA	TC
169	M	AA	TC
170	S	AA	CC
171	S	AG	TC
172	S	AA	TC
173	S	AA	CC

III. Datos de controles: N° (número de muestra); Genotipos: rs4986790 (TLR4), rs2569190 (CD14)

N°	rs4986790	rs2569190
C1	AA	TT
C2	AA	TC
C3	AA	TC
C4	AA	TC
C5	AA	TT
C6	AA	CC
C7	AA	CC
C8	AA	CC
C9	AG	CC
C10	AG	TC
C11	AA	TT
C12	AA	TC
C13	AA	TT
C14	AA	CC
C15	AA	TC
C16	AG	CC
C17	AA	CC
C18	AA	TC
C19	AA	CC
C20	AA	CC
C21	AA	TC
C22	AA	TC
C23	AA	CC
C24	AA	TC
C25	AA	TT
C26	AA	TC
C27	AA	TC
C28	AA	TT
C29	AA	TC
C30	AA	TC
C31	AA	TC
C32	AA	TC
C33	AA	TT
C34	AA	TT
C35	AG	TT
C36	AA	TC
C37	AA	TC
C38	AA	CC
C39	AA	TC
C40	AA	TC
C41	AA	TC
C42	AA	CC

C43	AA	CC
C44	AA	CC
C45	AA	TT
C46	AA	CC
C47	AA	TC
C48	AG	TT
C49	AA	TC
C50	AA	TT
C51	AA	TC
C52	AA	TC
C53	AA	CC
C54	AA	TC
C55	AA	CC
C56	AG	TT
C57	AA	CC
C58	AA	CC
C59	AA	TC
C60	AA	TC
C61	AG	CC
C62	AA	TC
C63	AA	TC
C64	AA	TC
C65	AA	CC
C66	AA	TT
C67	AA	TC
C68	AA	TC
C69	AA	TT
C70	AA	CC
C71	AA	TC
C72	AA	TC
C73	AA	CC
C74	AG	TC
C75	AA	TT
C76	AA	TC
C77	AA	TC
C78	AA	TT
C79	AG	TT
C80	AA	TT
C81	AA	TC
C82	AA	TC
C83	AA	TC
C84	AA	CC
C85	AG	TC
C86	AA	TT
C87	AA	TC
C88	AA	CC

C89	AA	CC
C90	AA	TT
C91	AA	TC
C92	AA	TC
C93	AA	TC
C94	AA	CC
C95	AA	TC
C96	AA	TC
C97	AG	TC
C98	AA	TC
C99	AA	TT
C100	AA	TT
C101	AA	CC
C102	AA	CC
C103	AA	CC
C104	AA	TT
C105	AA	CC
C106	AA	CC
C107	AA	TC
C108	AA	TC
C109	AA	TC
C110	AA	TC
C111	AA	TT
C112	AA	CC
C113	AA	CC
C114	AA	TC
C115	AA	CC
C116	AA	TT
C117	AA	CC
C118	AA	CC
C119	AA	TC
C120	AA	TC
C121	AA	TC
C122	AA	TC
C123	AA	TC
C124	AA	TC
C125	AA	CC
C126	AA	CC
C127	AA	CC
C128	AG	CC
C129	AA	TC
C130	AA	TC
C131	AA	TT
C132	AA	TC

IV. Datos de pacientes con infección neumocócica: N° (número de muestra); Patología: NS (Neumonía y sepsis), S (sepsis), M (Meningitis); Genotipos de TLR2: rs1938228, rs1816702, rs1898830, rs2289318, rs3804099.

N°	PATOLOGIA	rs1938228	rs1816702	rs1898830	rs2289318	rs3804099
174	NS	AA	CC	GG	GC	TT
175	NS	CC	CC	AA	GG	TC
176	NS	CA	CC	GA	GG	TC
177	NS	CC	CC	AA	GG	CC
178	NS	CA	CC	GA	GG	TC
179	S	CC	CC	GA	GC	CC
180	S	AA	CC	AA	GG	TT
181	NS	CC	TC	AA	GC	TC
182	S	CC	CC	AA	GG	TC
183	S	CA	CC	GA	GC	TC
184	S	CA	CC	GA	GC	TC
185	NS	CA	CC	GA	GG	TC
186	M	AA	CC	GA	GG	TC
187	NS	CC	TC	AA	GG	TT
188	NS	CC	CC	AA	GG	TT
189	NS	CC	CC	AA	GG	TC
190	S	CA	CC	GA	GG	TT
191	NS	CC	CC	AA	GG	CC
192	NS	CC	TC	AA	GC	TC
193	M	CA	CC	GA	GG	TC
194	NS	CA	TC	GA	GC	TT
195	NS	CA	CC	GA	GG	TT
196	M	CA	CC	GG	GC	TT
197	NS	AA	TT	GA	GG	TT
198	NS	CA	CC	GG	GG	TT
199	NS	CC	CC	AA	GG	CC
200	NS	CC	CC	GA	GC	CC
201	NS	CC	CC	AA	GG	CC
202	NS	CC	CC	AA	GG	CC
203	NS	CA	CC	GA	GC	TC
204	NS	AA	CC	GG	GG	TT
205	NS	CA	CC	GA	GG	TT
206	NS	CC	CC	AA	GG	TC
207	NS	AA	CC	GA	GG	TT
208	NS	CC	TC	AA	GC	CC
209	NS	AA	CC	GG	GC	TT
210	NS	CC	CC	AA	GG	TT
211	M	CC	CC	AA	GG	CC
212	M	AA	CC	GG	GC	TT

213	NS	CC	CC	GA	GG	TT
214	NS	CC	CC	AA	GG	CC
215	NS	CC	CC	AA	GG	TC
216	NS	CA	CC	AA	GG	TT
217	NS	CC	CC	AA	GC	TC
218	NS	CC	TC	AA	GC	CC
219	NS	CC	TC	AA	GG	TC
220	NS	CA	TC	GA	GG	TT
221	NS	CC	TC	GA	GG	TT
222	NS	AA	CC	GG	GG	TT
223	NS	CC	CC	AA	GG	TC
224	NS	CA	CC	GA	GG	TC
225	NS	CA	TC	GA	GC	TT
226	NS	CA	TC	GA	GG	TT
227	NS	CA	TC	GA	GC	TC
228	NS	CC	CC	GA	GC	CC
229	NS	CC	TC	AA	GC	CC
230	NS	CC	CC	AA	GG	TT
231	NS	CA	CC	GA	GC	TC
232	NS	AA	CC	AA	GG	TT
233	NS	CA	CC	GA	GC	TC
234	NS	AA	TT	AA	GC	CC
235	NS	CA	CC	GA	GG	TT
236	NS	CC	TC	AA	GC	CC
237	M	CC	CC	AA	GC	TC
238	SN	CC	TC	AA	GC	CC
239	NS	CA	CC	GA	GG	TC
240	NS	CA	TC	GA	GC	TC
241	S	CA	CC	GA	GC	TT
242	NS	CA	CC	AA	GG	TC
243	NS	CC	CC	GA	GG	TT
244	S	CA	TC	GA	GG	TC
245	NS	CC	TC	AA	GC	TC
246	NS	CA	CC	GA	GG	TC
247	NS	CA	TC	GA	GC	TC
248	NS	CA	TC	GA	GC	TC
249	NS	AA	CC	GG	GG	TT
250	NS	CA	TC	GA	GG	TC
251	NS	CC	TC	AA	CC	CC
252	NS	CC	TC	AA	GC	CC
253	NS	AA	CC	GG	GG	TT
254	NS	CA	CC	GA	GG	CC
255	NS	CA	CC	GA	GG	TC
256	NS	AA	CC	GG	GG	TT
257	NS	CA	CC	GA	GG	TC
258	NS	CA	CC	GA	GG	TC

259	NS	CC	CC	GG	GC	TT
260	NS	CC	TC	GA	GC	TC
261	NS	CC	TC	AA	GC	CC
262	NS	CC	TC	AA	GC	CC
263	M	CC	CC	GA	GC	TC
264	NS	CC	CC	AA	GG	TT
265	S	CC	CC	AA	GG	TT
266	S	CC	CC	GG	GG	TT
267	NS	CC	TC	AA	GC	CC
268	NS	CA	CC	GG	CC	TT
269	M	CC	TC	AA	GC	CC
270	NS	CA	CC	GA	GG	TT
271	NS	CC	CC	GA	GC	TC
272	NS	CA	CC	GA	GG	TC
273	NS	AA	CC	GG	GG	TT
274	NS	AA	CC	GG	GG	TT
275	NS	CA	CC	GA	GG	TC
276	NS	CA	CC	GA	GG	TC
277	NS	CA	CC	GA	GG	TC
278	NS	CA	CC	GA	GG	TC
279	S	AA	CC	GG	GG	TT
280	NS	AA	CC	GG	GG	TC
281	NS	CA	CC	GA	GC	TC
282	NS	CA	CC	GA	GG	TC
283	S	CC	TC	AA	GC	TC
284	NS	CC	CC	AA	GG	TC
285	NS	CC	TC	AA	GC	CC

V. Datos de pacientes con infección neumocócica: N° (número de muestra); Patología: NS (Neumonía y sepsis), S (sepsis), M (Meningitis); Genotipos de TLR2: rs3804100 rs5743704, rs5743708, rs7674579.

N°	PATOLOGIA	rs3804100	rs5743704	rs5743708	rs7674579
174	NS	TT	CC	GG	TT
175	NS	TT	CC	GG	TT
176	NS	TC	CC	GG	TT
177	NS	TT	CC	GG	TT
178	NS	TT	CC	GG	TT
179	S	TT	CC	GG	TT
180	S	TT	CC	GG	TT
181	NS	TT	CC	GG	TT
182	S	TT	CC	GG	TT
183	S	TT	CC	GG	TT
184	S	TT	CC	GG	TT
185	NS	TT	CC	GG	TT
186	M	TT	CC	GG	TT
187	NS	TT	AC	GG	TT
188	NS	TC	CC	GG	TT
189	NS	TT	CC	GG	TT
190	S	TT	CC	GG	TT
191	NS	TT	CC	GG	TT
192	NS	TT	CC	GG	TT
193	M	TT	CC	GG	TT
194	NS	TT	CC	GG	GT
195	NS	TT	CC	GG	TT
196	M	TT	CC	GG	TT
197	NS	TT	CC	GG	TT
198	NS	TT	CC	GG	TT
199	NS	TT	CC	GG	TT
200	NS	TT	CC	AG	TT
201	NS	TT	CC	GG	TT
202	NS	TT	CC	GG	TT
203	NS	TT	CC	GG	TT
204	NS	TT	CC	GG	GT
205	NS	TT	CC	GG	TT
206	NS	TC	CC	GG	TT
207	NS	TT	CC	GG	TT
208	NS	TT	CC	GG	TT
209	NS	TT	CC	GG	TT
210	NS	TT	CC	GG	TT
211	M	TC	CC	GG	TT
212	M	TT	CC	GG	TT

213	NS	TT	CC	GG	TT
214	NS	TT	CC	GG	TT
215	NS	TT	CC	GG	TT
216	NS	TT	CC	GG	TT
217	NS	TT	CC	GG	TT
218	NS	TT	CC	GG	TT
219	NS	TC	CC	GG	GT
220	NS	TT	AC	GG	GT
221	NS	TT	CC	GG	GT
222	NS	TT	CC	GG	TT
223	NS	TC	CC	GG	TT
224	NS	TT	CC	GG	TT
225	NS	TT	CC	AG	TT
226	NS	TT	CC	GG	TT
227	NS	TT	CC	GG	TT
228	NS	TT	CC	GG	TT
239	NS	TT	CC	GG	TT
230	NS	TT	CC	GG	TT
231	NS	TT	CC	GG	TT
232	NS	TT	CC	GG	TT
233	NS	TC	CC	GG	TT
234	NS	TC	CC	GG	TT
235	NS	TT	CC	GG	TT
236	NS	TC	CC	GG	TT
237	M	TT	CC	GG	TT
238	SN	TT	CC	GG	TT
239	NS	TT	CC	GG	TT
240	NS	TT	CC	GG	TT
241	S	TT	CC	GG	TT
242	NS	TT	CC	GG	TT
243	NS	TT	CC	GG	TT
244	S	TT	CC	GG	TT
245	NS	TT	CC	GG	TT
246	NS	TT	CC	GG	TT
247	NS	TT	CC	GG	TT
248	NS	TT	CC	GG	TT
249	NS	TT	CC	GG	TT
250	NS	TT	CC	GG	TT
251	NS	TT	CC	GG	TT
252	NS	TC	CC	GG	TT
253	NS	TT	CC	GG	TT
254	NS	TC	CC	GG	TT
255	NS	TT	CC	GG	GT
256	NS	TT	CC	GG	TT
257	NS	TC	CC	GG	TT
258	NS	TC	CC	GG	TT

259	NS	TT	CC	GG	TT
260	NS	TT	CC	GG	TT
261	NS	TT	CC	GG	TT
262	NS	TT	CC	GG	TT
263	M	TT	CC	GG	TT
264	NS	TT	CC	GG	TT
265	S	TC	CC	GG	TT
266	S	TT	CC	GG	TT
267	NS	TC	CC	GG	TT
268	NS	TT	CC	GG	TT
269	M	TT	CC	GG	TT
270	NS	TT	CC	GG	TT
271	NS	TT	CC	AG	TT
272	NS	CC	CC	GG	TT
273	NS	TT	CC	GG	TT
274	NS	TT	CC	GG	TT
275	NS	TC	CC	GG	TT
276	NS	TT	CC	GG	TT
277	NS	TT	CC	GG	TT
278	NS	TC	CC	GG	TT
279	S	TT	CC	GG	TT
280	NS	TC	CC	GG	TT
281	NS	TT	CC	GG	TT
282	NS	TT	CC	GG	TT
283	S	TT	CC	GG	GT
284	NS	TT	CC	GG	TT
285	NS	TT	CC	GG	TT

VI. Datos de pacientes con infección meningocócica: N° (número de muestra);
 Patología: M (Meningitis), S (sepsis), MS (Meningitis y Sepsis); Genotipos de TLR2:
 rs1938228, rs1816702, rs1898830, rs2289318, rs3804099.

N°	PATOLOGIA	rs1938228	rs1816702	rs1898830	rs2289318	rs3804099
286	S	AA	TC	GG	GG	TT
287	S	CA	CC	GG	GG	TT
288	S	CC	CC	AA	GG	TC
289	S	CA	CC	GA	GG	TC
290	S	CA	CC	AA	GG	TC
291	S	CC	TC	AA	GG	CC
292	MS	CC	CC	AA	GG	TC
293	S	CA	CC	GG	GG	TT
294	S	CA	CC	GA	GG	TT
295	M	CC	CC	AA	GG	CC
296	S	CA	TC	AA	GG	TC
297	S	CC	CC	GA	GG	TC
298	S	CC	CC	GA	GG	TC
299	S	CA	CC	GA	GG	TC
300	MS	CC	TC	AA	GG	TC
301	S	CC	TC	AA	GC	TC
302	S	CC	CC	AA	GG	TT
303	S	CA	CC	GA	GC	TC
304	S	CC	TC	AA	GG	TT
305	M	CC	CC	GA	GG	TC
306	S	CA	CC	GA	GG	TT
307	S	CC	CC	GA	GG	TT
308	S	AA	CC	GG	GG	TT
309	MS	CC	CC	AA	GC	TC
310	S	CA	TC	GA	GG	TC
311	S	CA	CC	GA	GG	TC
312	S	CC	CC	AA	GG	TT
313	M	CC	CC	GA	GG	TT
314	S	CC	TC	AA	GG	CC
315	S	CA	CC	GA	GG	TC
316	S	CC	CC	AA	GG	TC
317	MS	CC	CC	AA	GG	CC
318	S	CA	CC	GA	GG	TC
319	MS	AA	CC	GG	GG	TT
320	MS	AA	CC	GG	GG	TT
321	MS	CC	CC	AA	GC	CC
322	S	CC	CC	AA	GC	CC
323	S	CA	CC	GA	GG	TC
324	M	CC	CC	AA	GC	CC

325	S	CA	CC	GA	GG	TC
326	S	CC	CC	AA	GG	TC
327	M	CA	CC	AA	GG	TT
328	S	CC	CC	AA	GC	TC
329	S	AA	CC	GA	GG	TT
330	S	CC	TC	AA	GC	CC
331	MS	CC	TC	AA	GC	TC
332	MS	AA	CC	GG	GG	TT
333	S	CA	TT	AA	GG	TC
334	S	CC	CC	AA	GG	TC
335	MS	AA	CC	GG	GG	TT
336	S	CC	CC	AA	GG	CC
337	S	CA	TC	GG	GC	TC
338	M	CA	CC	AA	GG	TC
339	M	CA	CC	GG	GG	TT
340	S	CC	CC	GA	GG	CC
341	S	CA	CC	GA	GC	TC
342	S	CA	CC	GA	GG	TC
343	S	CC	TC	GA	GC	TC
344	M	AA	CC	GA	GG	TC
345	M	CC	CC	AA	GG	CC
346	M	AA	CC	GG	GG	TT
347	M	CC	CC	AA	GC	CC
348	S	CC	CC	AA	GG	CC
349	S	CC	TC	AA	GC	TC
350	S	CA	CC	GA	GC	TC
351	S	CA	TC	GA	GC	TC
352	S	CA	CC	GA	GG	TC

VII. Datos de pacientes con infección meningocócica: N° (número de muestra); Patología: M (Meningitis), S (Sepsis), MS (Meningitis y Sepsis); Genotipos de TLR2: rs3804100 rs5743704, rs5743708, rs7674579.

N°	PATOLOGIA	rs3804100	rs5743704	rs5743708	rs7674579
286	S	TT	CC	GG	TT
287	S	TT	CC	GG	TT
288	S	TT	CC	GG	TT
289	S	TT	CC	GG	TT
290	S	TT	CC	GG	TT
291	S	TT	CC	GG	TT
292	MS	TC	CC	GA	TT
293	S	TT	CC	GG	TT
294	S	TT	CC	GG	TT
295	M	TT	CC	GG	TT
296	S	TC	CC	GG	TT
297	S	TT	CA	GG	TT
298	S	TT	CC	GG	TT
299	S	TT	CC	GG	TT
300	MS	TT	CC	GG	TT
301	S	TT	CC	GG	TT
302	S	TT	CC	GG	TT
303	S	TT	CC	GG	TT
304	S	TT	CC	GG	GT
305	M	TT	CC	GG	TT
306	S	TT	CC	AG	TT
307	S	TT	CC	GG	TT
308	S	TT	CC	GG	TT
309	MS	TT	CA	GG	TT
310	S	TT	CC	GG	TT
311	S	TT	CC	GG	TT
312	S	TT	CC	GG	TT
313	M	TT	CC	GG	TT
314	S	TT	CC	GG	TT
315	S	TT	CC	GG	TT
316	S	TT	CC	GG	TT
317	MS	TC	CC	GG	TT
318	S	TT	CC	GG	TT
319	MS	TT	CC	GG	TT
320	MS	TT	CC	GG	TT
321	MS	TC	CC	GG	TT
322	S	TT	CC	GG	TT
323	S	TT	CC	GG	TT
324	M	TT	CC	GG	TT
325	S	TT	CC	GG	TT
326	S	TT	CC	GG	TT

327	M	TT	CC	GG	TT
328	S	TT	AC	GG	TT
329	S	TT	CC	GG	TT
330	S	TT	CC	GG	TT
331	MS	TT	CC	GG	TT
332	MS	TT	CC	GG	TT
333	S	TT	CC	GG	TT
334	S	TT	CC	GG	TT
335	MS	TT	CC	GG	TT
336	S	TT	CC	GG	TT
337	S	TT	CC	GG	TT
338	M	TT	CC	GG	TT
339	M	TT	CC	GG	TT
340	S	TT	CC	GG	TT
341	S	TT	CC	GG	TT
342	S	TT	CC	GG	TT
343	S	TT	CC	GG	TT
344	M	TT	CC	GG	TT
345	M	TT	CC	GG	TT
346	M	TT	CC	GG	TT
347	M	TT	CC	GG	TT
348	S	TT	CC	GG	TT
349	S	TT	CA	GG	TT
350	S	TT	CC	GG	TT
351	S	TT	CC	GG	TT
352	S	TT	CC	GG	TT

VIII. Datos de controles: N° (número de muestra); Genotipos de TLR2: rs1938228, rs1816702, rs1898830, rs2289318, rs3804099.

N°	rs1938228	rs1816702	rs1898830	rs2289318	rs3804099
C133	CA	CC	GA	GG	TC
C134	CA	TC	GA	GG	TC
C135	CC	CC	AA	GG	TT
C136	CA	CC	GA	GG	TC
C137	AA	CC	GA	GG	TT
C138	CA	CC	GA	GG	TT
C139	CC	CC	AA	GC	CC
C140	CA	CC	GA	GG	TT
C141	CC	CC	AA	GC	CC
C142	CA	CC	GA	GG	TT
C143	CC	CC	AA	CC	CC
C144	CC	CC	AA	CC	CC
C145	CC	CC	AA	GG	TC
C146	CA	CC	GA	GC	TC
C147	CC	CC	AA	GG	TC
C148	CC	TC	AA	GC	CC
C149	CC	CC	AA	GC	CC
C150	CC	CC	AA	GG	TC
C151	CC	CC	AA	GG	TC
C152	CC	CC	AA	GC	TC
C153	CA	CC	GA	GC	TC
C154	CA	CC	AA	GG	TC
C155	CC	CC	AA	GG	TC
C156	CC	CC	AA	GG	CC
C157	CA	CC	GA	GG	TC
C158	CC	CC	AA	GG	TC
C159	AA	TC	GA	GG	TT
C160	CA	TT	GA	GC	TC
C161	CC	CC	GA	GC	TC
C162	CC	CC	GA	GC	TC
C163	CC	CC	GA	GC	CC
C164	CA	CC	GA	GG	TC
C165	CC	CC	GA	GG	TC
C166	CA	CC	GA	GG	TC
C167	AA	CC	GA	GG	TT
C168	CA	CC	GA	GG	TC
C169	CA	CC	GA	GG	TC
C170	AA	CC	GG	GG	TT
C171	CC	CC	AA	GC	CC
C172	CA	TC	GA	GC	TC
C173	AA	CC	GG	GG	TT
C174	CA	CC	GA	GG	TT

C175	CA	CC	AA	GG	TC
C176	CC	CC	AA	GC	CC
C177	AA	CC	GA	GG	TT
C178	CC	CC	AA	GC	TC
C179	CC	CC	AA	GG	TC
C180	CC	CC	AA	GC	CC
C181	CC	CC	AA	GG	TT
C182	CA	CC	GA	GG	TT
C183	CA	CC	GA	GG	TC
C184	CC	CC	AA	GC	TC
C185	CA	CC	GA	GC	TC
C186	CA	CC	GA	GG	TC
C187	CC	CC	AA	GC	CC
C188	CC	CC	AA	GG	TT
C189	CC	TC	AA	GC	TC
C190	CA	CC	GA	GC	TC
C191	CA	TC	GA	GG	TT
C192	CC	CC	AA	GC	CC
C193	CC	TC	AA	GC	TC
C194	CA	CC	GA	CC	TC
C195	CA	CC	AA	GG	TC
C196	CC	CC	AA	GC	TC
C197	CC	CC	AA	GG	TC
C198	CC	CC	AA	GG	CC
C199	CA	CC	GA	GG	TT
C200	CC	CC	AA	GG	CC
C201	AA	CC	GG	GG	TT
C202	CC	CC	AA	GG	CC
C203	CA	CC	GA	GG	TC
C204	CC	CC	AA	GC	CC
C205	CC	CC	AA	GC	TC
C206	CA	CC	GG	GG	TT
C207	CA	CC	GA	GG	TC
C208	CC	CC	AA	GG	TC
C209	CC	CC	AA	GC	TT
C210	CC	TC	AA	GC	TC
C211	CC	CC	AA	GG	TC
C212	CA	CC	GA	GG	TC
C213	CA	CC	AA	GG	TT
C214	CA	CC	GA	GG	CC
C215	CC	CC	AA	GG	TT
C216	AA	CC	GG	GG	TC
C217	CC	CC	AA	GG	TT
C218	CA	CC	GA	GG	TT
C219	CA	CC	GA	GC	CC
C220	CC	CC	AA	GG	TT

C221	CA	CC	GA	GG	TC
C222	CA	CC	GA	GG	TT
C223	AA	CC	GG	GC	CC
C224	CC	CC	AA	GG	TT
C225	CA	CC	GA	GG	TT
C226	CA	CC	GA	GG	CC
C227	CC	CC	AA	GC	TC
C228	CC	CC	AA	GC	TC
C229	CC	CC	AA	GG	TC
C230	CA	CC	GA	GC	CC
C231	CC	CC	AA	GG	TC
C232	CC	CC	AA	GC	TT

IX. Datos de controles: N° (número de muestra); Genotipos de TLR2: rs3804100 rs5743704, rs5743708, rs7674579.

N°	rs3804100	rs5743704	rs5743708	rs7674579
C133	TT	CC	GG	TT
C134	TT	CC	GG	TT
C135	TT	CC	GG	TT
C136	TT	CC	GG	TT
C137	TT	CC	GG	TT
C138	TT	CC	GG	TT
C139	TT	CC	GG	TT
C140	TT	CC	GG	TT
C142	TT	CC	GG	TT
C143	TT	CC	GG	GT
C144	TT	CC	GG	TT
C145	TT	CC	GG	TT
C146	TT	CC	GG	TT
C147	TT	AC	GG	TT
C148	TT	CC	GG	TT
C149	TT	CC	GG	TT
C150	TT	CC	GG	TT
C151	TT	CC	GG	TT
C152	TT	CC	GG	TT
C153	TT	CC	GG	TT
C154	TC	CC	GG	TT
C155	TT	CC	GG	TT
C156	TC	CC	GG	TT
C157	TT	CC	GG	TT
C158	TC	CC	GG	TT
C159	TT	CC	GG	TT
C160	TT	CC	GG	TT
C161	TT	CC	GG	TT
C162	TT	AC	GG	GT
C163	TT	CC	GG	TT
C164	TC	CC	GG	TT
C165	TT	AC	GA	TT
C166	TT	CC	GG	TT
C167	TT	CC	GG	TT
C168	TT	AC	GG	TT
C169	TT	CC	GG	TT
C170	TT	CC	GG	TT
C171	TC	CC	GG	TT
C172	TT	CC	GG	TT
C173	TT	CC	GG	TT
C174	TT	AC	GG	TT
C175	TT	CC	GG	TT

C176	TC	CC	GG	TT
C177	TT	CC	GG	TT
C178	TT	CC	GG	TT
C179	TT	CC	GG	TT
C180	TT	CC	GG	TT
C181	TT	AC	GG	TT
C182	TT	CC	GG	TT
C183	TT	CC	GG	TT
C184	TT	CC	GG	TT
C185	TT	AC	GG	TT
C186	TC	CC	GG	TT
C187	TT	CC	GG	TT
C188	TT	CC	GG	TT
C189	TT	CC	GG	GT
C190	TT	CC	AG	TT
C191	TT	CC	GG	GT
C192	TT	CC	GG	TT
C193	TT	CC	GG	TT
C194	TT	CC	GG	TT
C195	TC	AC	GG	TT
C196	TC	CC	GG	TT
C197	TT	CC	GG	TT
C198	TC	CC	GG	TT
C199	TT	CC	GG	GT
C200	TT	CC	GG	TT
C201	TT	AC	GG	TT
C202	TT	CC	GG	TT
C203	TC	CC	GG	GT
C204	TT	CC	GG	TT
C205	TT	CC	GG	TT
C206	TT	CC	GG	TT
C207	TT	AC	GG	TT
C208	TT	CC	GG	TT
C209	TT	CC	GG	TT
C210	TT	CC	GG	TT
C211	TT	CC	GG	TT
C212	TT	CC	GG	TT
C213	TT	CC	GG	GT
C214	TT	CC	GG	TT
C215	TC	CC	GG	TT
C216	TT	CC	GG	TT
C217	TT	CC	GG	TT
C218	TT	CC	GG	TT
C219	TT	CC	GG	TT
C220	TT	CC	GG	TT
C221	TT	AC	GG	TT

C222	TC	CC	GG	TT
C223	TT	CC	GG	TT
C224	TT	CC	GG	GT
C225	TT	CC	GG	TT
C226	TT	CC	GG	TT
C227	TT	CC	GG	TT
C228	TT	AC	GG	TT
C229	TT	CC	GG	TT
C230	TT	CC	GG	TG
C231	TT	CC	GG	TT
C232	TC	CC	GG	TT