

1. Resumen

En sus formas de sepsis grave, shock séptico y síndrome de disfunción multiorgánica, la sepsis constituye en la actualidad la primera causa de mortalidad en las unidades de terapia intensiva (UTIs), produciendo más del 60% de las muertes en estos servicios (Briceño I, 2005). Una de las causas de la sepsis es la activación de células efectoras del hospedero por endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias gram negativas, la señalización del LPS puede sobre activar el sistema inmune, iniciando una cascada de respuestas inflamatorias sin control, que puede llevar a fallos en los órganos y eventualmente a la muerte (Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al, 2006). Los TLRs son una familia de proteínas transmembrana que están encargados del reconocimiento de PAMPs y la eliminación de los microorganismos. En los receptores tipo toll (TLRs) se han identificado varios polimorfismos siendo los de TLR2 y TLR4 los más estudiados. Las modificaciones en la estructura de los TLRs han sido asociadas a una hipo respuesta ante microorganismos invasores, llevando al desarrollo de infecciones. El estudio de los genes involucrados en las vías de inflamación ha sido importante para la instauración de terapias adecuadas en los pacientes, ayudando a reducir el riesgo de muerte.

En este estudio se realizó una identificación de los polimorfismos de TLR4 (Asp299Gly y Thr399Ile) y TLR2 (Arg677Trp y Arg753Gln) presentes en una muestra de la población de Medellín. También se realizó un análisis que asocia la presencia de estos polimorfismos con el desarrollo de sepsis y los estados de gravedad.

2. Introducción

La sepsis se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica (Arcaroli J, Fessler B, Abraham E, 2005), que genera una gran diversidad de daños en los tejidos del organismo tales como: respuesta celular injuria-apoptosis, hipoxia citotóxica y estrés celular. Se define como grave cuando se presenta con disfunción orgánica y como choque séptico cuando se asocia a hipotensión refractaria, además es considerado un problema de salud pública a nivel mundial por su alto nivel de morbi-mortalidad siendo una de las principales causas de muerte en las Unidades de cuidados Intensivos (UCI) (O'Brien G, Wang J, Redmon, H, 2005). En el caso de Colombia, en dos estudios prospectivos de cohorte realizados en pacientes infectados admitidos por urgencias con criterios de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS), se encontraron tasas de mortalidad de 24% para pacientes con hemocultivos negativos y de 31% para los que tenían hemocultivos positivos, lo cual indica que la infección grave o la bacteriemia fueron las principales causas de ingreso por urgencias en 7 de cada 100 pacientes en un hospital universitario (Jaimes F, Arango C, Ruiz G, Cuervo J, Botero J, Vélez G, et al, 2003).

Ante una infección microbiana el sistema inmune innato depende del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (O'Brien G, Wang J, Redmon, H, 2005) de esta manera, se pueden diferenciar en el hospedero los patógenos extraños y provee una respuesta inflamatoria rápida, incluyendo la producción de citoquinas y quimioquinas, elaboración de moléculas efectoras e interacción con la respuesta inmune adaptativa (Misch E, Hawn T, 2008). Los receptores tipo toll (TLRs) son una familia altamente conservada de proteínas transmembrana (O'Brien G, Wang J, Redmon, H, 2005), que juegan un papel importante en la defensa del hospedero ante una infección bacteriana, ya que reconocen distintos PAMPs presentados por los microorganismos invasores (Pené F, Courtine E, et al, 2009). Se han descrito 10 TLRs en humanos, cada

uno con su ligando específico. Se conoce que TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 contribuyen a la defensa del huésped contra bacterias (Pené F, Courtine E, et al, 2009).

De los TLRs el número 4 (receptor tipo toll 4), es conocido como el receptor de lipopolisacáridos (LPS), un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas. La unión del LPS causa la dimerización del TLR4 e inicia la señalización intracelular activando el factor de transcripción NFκB (factor nuclear kappa B), dando como resultado la expresión de numerosos genes que codifican para citoquinas y otras moléculas inflamatorias (Roger T, Froidevaux C, et al, 2008). En el TLR4 se han descrito dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no sinónimos (variación en la secuencia de un aminoácido por cambio de un nucleótido que se encuentra en una región codificante) (Schmitt C, et al, 2002). Estas modificaciones están asociadas a una hiporrespuesta al LPS y una incidencia aumentada de choque séptico por bacterias gram negativas. Esto significa que una baja respuesta inicial del sistema inmune pone en alto riesgo al individuo de contraer una infección, si esto ocurre se podría producir un posterior desarrollo de sepsis ya que no existe una eliminación adecuada de los patógenos (Schmitt C, et al, 2002).

Otro TLR que se ha utilizado para estudios de susceptibilidad en sepsis es el receptor de membrana TLR2, el cual forma un heterodímero con el TLR1 y TLR6, además es capaz de reconocer un gran número de patógenos, incluyendo bacterias, virus, hongos y parásitos. Como el TLR4 y el TLR2 son proteínas transmembrana, no es sorprendente encontrar que estas dos proteínas sean responsables de las vías de señalización apropiadas a través de la membrana celular. Esto aumenta la posibilidad que las variantes en las secuencias en los dominios intra y extracelular tanto del TLR4 como el TLR2 puedan interrumpir la señalización desde la membrana celular al interior de la célula (Lorenz E, Mira J, et al, 2002). Estas mutaciones pueden dar paso a un rango de

fenotipos desde casi normales a completamente sin respuesta dependiendo de la severidad del defecto. Otros efectos potenciales de estas mutaciones podrían incluir baja unión del ligando con el receptor o cambios en la conformación del receptor (Lorenz E, Mira J, et al, 2002). Por esto la importancia a investigar el rol de los TLRs y específicamente el uso del TLR2 y TLR4 como moléculas clave, para la intervención en el desarrollo de infecciones por bacterias gram positivas y bacterias gram negativas.

El estudio de los polimorfismos de TLR4 y TLR2, puede convertirse en una herramienta de pronóstico, además de permitir la aplicación de otros tratamientos más directos y eficaces, así como también predecir que pacientes tienen más o menos sensibilidad para determinados agentes patógenos. Este estudio pretende describir los genotipos presentes en una muestra de la población de Medellín y también asociar estos polimorfismos con los puntajes de APACHE II y SOFA en pacientes que desarrollaron sepsis, pudiendo conocer si estos polimorfismos confieren un riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar las variantes alélicas en los receptores de membrana TLR2 (Arg753Gln, Arg677Trp) y TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) en ADN genómico, en pacientes con sepsis y los puntajes de gravedad APACHEII y de disfunción de órganos SOFA.

3.2 Específicos

Identificar las variantes alélicas de TLR2 (Arg753Gln, Arg677Trp) y TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) presentes en una muestra de la población de Medellín por medio de la técnica PCR-RFLP en ADN genómico.

Relacionar las variantes alélicas de TLR2 y TLR4 presentes en la muestra de población de Medellín con los puntajes de gravedad APACHEII y de disfunción de órganos SOFA.

4. MARCO TEÓRICO

La sepsis se define como una enfermedad compleja resultante de la reacción del hospedero frente a una infección, la cual incluye una respuesta inflamatoria sistémica aguda (Martin J, Wheeler A, 2009). Se ha mencionado que es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en todas las unidades de cuidados intensivos (UCI) en EEUU (Meisner M, 2005). Estudios epidemiológicos reportan una incidencia de 750,000 casos anuales (Martin J, Wheeler A, 2009). Durante el desarrollo de la sepsis se produce un cambio progresivo en las características de la enfermedad. Inicialmente, se observa un aumento de los mediadores pro inflamatorios pero luego se produce un cambio hacia un estado inmunosupresor anti-inflamatorio (Hotchkiss, 2003).

En 1992 en una conferencia consenso (ACCM/SCCM) se introdujo dentro del lenguaje común el término Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), definido como las manifestaciones clínicas de la respuesta inflamatoria, ocasionadas por causas infecciosas y no infecciosas (por ejemplo quemaduras, injuria por isquemia/reperfusión, trauma múltiple, pancreatitis, cirugía mayor e infección sistémica). Dos o más de las siguientes condiciones o criterios deben estar presentes para el diagnóstico de SIRS o sepsis:

1. Temperatura corporal mayor de 38°C o menor de 36°C.
2. Frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto.
3. Frecuencia respiratoria superior a 20 por minuto ó PaCO₂ menor de 32 mmHg.

4. Recuento de leucocitos mayor de 12.000 por mm³ o menor a 4.000 por mm³ o más de 10% de formas inmaduras (Briceño I, 2005).

Una de las causas de la sepsis es la activación de células efectoras del hospedero por endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias gram negativas. El reconocimiento de LPS por los receptores tipo Toll (TLR) en la superficie de los macrófagos, permite la identificación de los patógenos en el hospedero y estimula la respuesta infamatoria innata contra una invasión microbiana. Al mismo tiempo, la señalización del LPS puede sobre activar el sistema inmune, iniciando una cascada de respuestas inflamatorias sin control, que puede llevar a fallos en los órganos y eventualmente a la muerte (Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al, 2006).

Las infecciones por bacterias gram negativas eran predominantes en los 60s y en el inicio de los 70s, pero las infecciones por bacterias gram positivas, PAMPs y superantígenos ha aumentado y ahora se le atribuyen la mitad de los casos de sepsis severa (Pierre-Yves P, Calandra T, 2003). Además de este factor que induce o predispone al desarrollo de la sepsis, también se encuentran otros factores que son importantes tener en cuenta como: la nutrición del individuo y la composición genética, esta última es una de las que determina en su mayoría el curso y pronóstico de la enfermedad (Durán Gimenez-Rico H, et al, 2002). Lo anterior se ha sustentado entre otros, por estudios llevados a cabo en gemelos y en hijos adoptivos que han sugerido que los factores genéticos (ya sean de un trastorno monogénico o de trastornos multifactoriales y complejos) del hospedero son determinantes e importantes en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas en los seres humanos (Durán Gimenez-Rico H, et al, 2002).

La susceptibilidad a la mayoría de las infecciones sigue un modo de herencia poligénica, con una enfermedad que surge de una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos (Misch E, Hawn T, 2008). Durante la evolución nuestro genoma ha presentado

consecuencias importantes para la predisposición a la salud o a la enfermedad, por ello el interés en el estudio de los mecanismos genéticos y fisiológicos de la predisposición a la enfermedad ha permitido la identificación de varios polimorfismos genéticos, que han evolucionado en respuesta a ciertas presiones evolutivas.

Los receptores tipo Toll (TLRs), son proteínas de membrana tipo I (excepto TLR3) que comparten una misma estructura, la cual consiste en un dominio de repeticiones de leucina en su porción extracelular y la presencia de un receptor tipo Toll/IL-1 en el dominio intracelular, el cual es el encargado de iniciar la traducción de las señales. Los TLRs reconocen y responden ante un diverso número de moléculas microbianas, activando la respuesta del sistema inmune innato y dependiendo del tipo de patógeno induciendo una cascada de señalización apropiada (Misch E, Hawn T, 2008). Han sido descritos como receptores importantes durante la defensa y el reconocimiento de diferentes tipos de organismos como bacterias, virus, hongos y protozoos. Existen 2 vías de señalización de los TLRs mediadas por las proteínas adaptadoras MyD88 y TRIF respectivamente. La vía dependiente de MyD88 es común para todos los TLRs excepto para el TLR3 y está involucrada en una fase temprana de la activación de NFκB por la vía de IRAK. La vía independiente de MyD88 es la vía de TRIF y es utilizada por el TLR4 y TLR3, la cual está mediada por el factor de regulación de interferón 3, lo que resulta en la activación del NFκB (Mitchell J, et al, 2007). Los dos TLRs más estudiados son el TLR4 y el TLR2.

La elucidación de la función y la estructura genética del TLR4 se dio por el descubrimiento de Toll, una proteína transmembrana que está involucrada en el desarrollo dorso-ventral de *Drosophila*. La *Drosophila* con una pérdida de la función de Toll por mutación exhibía una alta susceptibilidad a infecciones por hongos, demostrando la gran importancia de esta proteína (Ferwerda B, et al, 2008).

El TLR4 que junto con el CD14 y la molécula adaptadora MD2, funcionan como los receptores principales para componentes de bacterias como lipopolisacáridos (LPS) (Schaaf B, et al, 2009), es el único entre los TLRs que puede utilizar ambas proteínas adaptadoras MyD88 y TRIF, lo que permite una respuesta más compleja al activar ambas vías de señalización (Mitchell J, et al, 2007).

El secuenciamiento del TLR4 humano reveló que la mayoría de las variaciones no sinónimas (variación en la secuencia de aminoácidos ya que se encuentran en una región codificante) están localizadas en el tercer exón que codifica para el dominio LRR (repeticiones ricas en leucina), pero a pesar de estas variaciones, la frecuencia de las mutaciones es baja en las poblaciones humanas (<1%). Existen unas excepciones y son 2 polimorfismos que han sido descritos en frecuencias mayores al 5% (Ferwerda B, et al, 2008).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variaciones en las secuencias de ADN que ocurren cuando un solo nucleótido (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) en la secuencia del genoma es alterado. Muchos SNPs no tienen ningún efecto en las funciones celulares, pero los que afectan la función de un gen, puede predisponer a las personas a una enfermedad o influenciar su respuesta ante una droga (Ougus A, Yoldas B, Ozdemir T, Olcen S, 2004).

Los SNPs son la forma más estable de variación genética en la población. Un SNP ocurre aproximadamente cada 1000 pares de bases, siendo la sustitución más frecuente C→T. Hay diferentes formas en las que un SNP puede llevar a un producto genético aberrante. Primero, la variación en la secuencia no traducida de una región 5' (UTR) puede interrumpir la traducción del ARN mensajero y las mutaciones en 3'UTR pueden afectar la estabilidad, anclaje y exportación del ARN mensajero. Segundo, los polimorfismos de los

promotores que alteran los factores de transcripción de unión al ADN tienen un potencial de disminuir o aumentar la expresión génica. Tercero, mutaciones en el marco de lectura o la variación que resulta en una terminación temprana en la transcripción puede dar como resultado una proteína truncada o defectuosa. Finalmente, los SNP no sinónimos en exones pueden alterar la función de la proteína. Se ha estimado que un 10% de todos los SNP en el genoma son funcionales, lo que trae como consecuencia que puedan potencialmente alterar algunos procesos biológicos (Arcaroli J, Fessler B, Abraham E, 2005).

Los 2 polimorfismos más estudiados presentes en el gen del TLR4, han sido descritos como una transición A/G que causa un cambio de Asp/Gly en el amino ácido 299 y una transición C/T que causa un cambio de Thr/Ile en el amino ácido 399. Los estados derivados (G y T, o Gly y Ile respectivamente) han mostrado el cambio de los sitios de unión de los ligandos al receptor. Ambos estados, llegan a frecuencias substanciales y se encuentran segregados en conjunto en poblaciones Caucásicas (Ferwerda B, et al, 2008).

Mediante estudios de poblaciones basados en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Lorenz y colaboradores (Lorenz E, Mira J, Cronish K, Arbour N, Schwartz A, 2000), reportaron que existía una correlación entre el polimorfismo Asp299Gly con la incidencia de infecciones y sepsis por bacterias Gram negativas. Otros estudios, han sugerido una relación entre estos polimorfismos y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas como con bacterias Gram negativas o candidiasis (Ferwerda B, Mc Call M, Alonso S, 2007).

Un estudio realizado por Arbour y colaboradores (Arbour NC, et al, 2000) en 83 personas para mirar los efectos de endotoxinas inhaladas, reveló la presencia del polimorfismo 299 Asp→Gly que se segregaba en conjunto con el polimorfismo 399 Thr→Ile en 10 individuos. Los individuos con el polimorfismo 299/399 mostraron hiporespuesta a la

endotoxina inhalada (Arbour NC, et al, 2000). Además, en comparación con el tipo silvestre de TLR4, los cambios en 299 Asp→Gly, reducen los niveles de NF-kB en células THP-1 estimuladas con LPS, pero no en las que poseen el polimorfismo 399 Thr→Ile (Hellerud B, et al, 2008). Algunos estudios han mostrado la posible relación entre mutaciones en el TLR4 e infecciones bacterianas y susceptibilidad a sepsis (Schmitt C, et al, 2002). En respuesta al LPS, células epiteliales con el polimorfismo 299/399 en el TLR4 mostraron niveles reducidos de IL-1a. Por el contrario, en otros estudios no se ha visto asociación entre los alelos 299/399 del TLR4 y la sepsis. El caso es un trabajo realizado por Hellerud y colaboradores (Hellerud B, Stenvik J, Espevik T, Lamris J, Mollnes T, Brandtzaeg P, 2008), donde se involucraron 1047 pacientes diagnosticados con meningitis y en los cuales no se pudo establecer una relación entre los pacientes y el polimorfismo 299.

Los estudios de los polimorfismos del TLR4, sugieren que los individuos con el polimorfismo 299/399 pueden tener una respuesta anormal hacia algunas pero no todas las infecciones por bacterias Gram negativas, resultando en una susceptibilidad aumentada a la infección y gravedad de la enfermedad. El efecto genotipo-fenotipo del polimorfismo Asp299Gly y Thr399Ile en la vía de señalización del LPS es aún controversial (Schwartz D, Cook D, 2005).

En cuanto al TLR2, se conoce que hay un amplio número de ligandos que activan el TLR2 como los componentes de la pared celular de bacterias gram positivas llamados peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicoico (LTA) y polisacáridos derivados de *Cándida* como zimosan (Woehrle T, et al, 2008). El TLR2 se expresa en monocitos, neutrófilos y células dendríticas (Lorenz E, Mira J, et al, 2000). En un estudio donde se utilizaron ratones “knock out” para el TLR2, reveló una mayor susceptibilidad a infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Schroder N, et al,

2003). Así el TLR2 es crucial para la activación de la respuesta inflamatoria a componentes de bacterias Gram positivas y hongos, actúa como un heterodímero junto con el TLR1 y TLR6 para evocar una mayor respuesta contra los agentes infecciosos (Misch E, Hawn T, 2008).

Los polimorfismos más comunes en el TLR2 son: el producido por una sustitución de una arginina por triptófano en el amino ácido 677 y el segundo un reemplazo de una arginina por glutamina en el amino ácido 753 (Lorenz E, Mira J, et al, 2000). Estos dos polimorfismos han sido investigados en pacientes con infecciones Gram positivas. Específicamente, Oğus, A y colaboradores (Oğus A, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O, 2004) hicieron un estudio de casos y controles que comprendía 45 pacientes y 45 controles, donde se mostró que el polimorfismo 677 Arg→Trp estaba asociado con el aumento de la susceptibilidad a la lepra. Ben-Ali et al (Ben-Ali M, Barbouche M, Bousina S, Chabbou A, Dellagi K, 2000) reportaron que la frecuencia del polimorfismo del alelo 677 Arg→Trp estaba significativamente elevado en pacientes con tuberculosis en comparación con los voluntarios sanos. En un estudio realizado por Woehrle y colaboradores, al transfectar la línea celular 293T con el gen en su estado silvestre o mutado (Arg753Gln), se encontró que la respuesta al LPS no se afecta por esta mutación, mientras que la respuesta a diferentes lipoproteínas bacterianas se ve reducida cuando la mutación está presente en comparación con los individuos que expresan el tipo silvestre (Woehrle T, et al, 2008). Cuando una población de pacientes con choque séptico y una de individuos sanos fue analizada, se encontró que la mutación Arg753Gln estaba presente en la misma frecuencia en ambas poblaciones. Sin embargo, dos de los pacientes que llevaba la mutación Arg753Gln sufrieron una infección por bacterias gram positivas (Woehrle T, et al, 2008). Estos resultados sugieren que las mutaciones en el TLR2 puede conllevar a un

riesgo de desarrollar choque séptico después de contraer una infección por bacterias gram positivas. En la siguiente tabla se pueden observar los tipos de polimorfismos en los genes del TLR2 y TLR4, su localización dentro del genoma, la frecuencia de expresión y algunas enfermedades con los que ha sido asociado (Tabla 1).

Gen	Polimorfismo	Localización del Polimorfismo	Frecuencia del Alelo	Estudios funcionales	Estudios de asociación a sepsis
TLR2	677 Arg→Trp	Posición 677, cromosoma 4	2%	Disminución de la producción de IL-12 por estimulación con <i>M. Leprae</i> .	El polimorfismo juega un papel en la susceptibilidad a lepra
	753 Arg→Gln	Posición 753, cromosoma 4	2.5%	Disminución en la activación de NF- κ B en células HEK293 transfectadas	Predisposición a infecciones bacterianas que ponen en riesgo la vida.
TLR4	299 Asp→Gly	Posición 299,	5%	Niveles	Aumento de la

		cromosoma 9		reducidos de NF- κ B	susceptibilidad a “shock” séptico,
	399 Thr→Ile	Posición 399, cromosoma 9		Niveles reducidos de IL-1a.	Susceptibilidad a bacterias Gram negativas.

Tabla 1. Polimorfismos en los receptores de membrana TLR2 y TLR4 y su relación a diferentes infecciones. Tomado de: Arcaroli, J. Fessler, M. Abraham, E (2005). “Genetic polymorphisms and sepsis”. SHOCK 24: 300-312.

5. METODOLOGÍA

5.1 Población de estudio

Se utilizaron 144 muestras de ADN genómico para el análisis de los polimorfismos para TLR4 y 94 muestras de ADN para el de TLR2. Los pacientes en este estudio son individuos con sospecha de infección y pertenecen al estudio DISEPSIS (investigación aprobada por COLCIENCIAS), realizado en el servicio de Urgencias del Hospital Universitario San Vicente de Paúl (Medellín, Colombia).

Las características de la población están descritas en la siguiente tabla.

POBLACIÓN

Variables	Estudio
Pacientes (n, %)	(144, 17.9)
Hombres (n, %)	(79, 54.9)
Edad (media, ds)	(55,5, 32 - 72)
APACHE II (mediana - IQR)	(10.5, 7 - 15)
SOFA (mediana - IQR)	(3, 1 - 4.5)
Proteína C Reactiva (mediana - IQR)	(11,9, 3.3 - 24.7)
Dímero D (mediana - IQR)	(2261, 922 - 4188)
Procalcitonina (mediana - IQR)	(0.75, 0.05 - 7.52)
Acido Láctico (mg/dl) (mediana - IQR)	(1.6, 1.2 - 2.4)
Mortalidad a los 28 días (n, %)	(21, 14)
Bacteremia (n, %)	(28, 28)

Tabla 2. Características de la población de estudio.

A estos individuos se les dio a conocer un consentimiento informado, para ser leído y en caso de aceptar, firmarlo. La selección de los pacientes, los criterios de inclusión y exclusión y el seguimiento de los pacientes, están contemplados en el manual de procedimientos en el proyecto antes mencionado.

No existen estudios previos en Colombia que permitan determinar el tamaño de muestra requerido para un análisis estadístico significativo de los polimorfismos en los genes de TLR2 y TLR4, por tanto en este estudio se analiza una muestra inicial con la que se pretende encontrar resultados preliminares con relación a una muestra de la población de Medellín.

5.2 Análisis de los genes TLR4 y TLR2

Para el análisis de los genes implicados en este estudio se utilizó el sistema del Gen Bank que se encuentra en la página de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Basados en los reportes de la literatura, se tomó la secuencia completa del gen del TLR2 (GenBank NG 016229 28803pb) y TLR4 (y GenBank NG 011475 13309pb respectivamente) para establecer la región de interés en el estudio.

5.3 Genotipificación

Los polimorfismos fueron genotipificados mediante la técnica PCR, utilizando como cebadores oligonucleótidos que flanquean a la región que contiene los polimorfismos. Los cebadores o primers y las enzimas de restricción a utilizar se tomaron del artículo: “Lack of Toll-like Receptor 4 and 2 Polymorphisms in Korean Patients with Bacteremia” **Hee Jung Yoon, Jun Yong Choi (2006)**.

5.4 PCR-RFLP

Reacción PCR

El ADN fue amplificado mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se detectaron los polimorfismos por medio de la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

El protocolo empleado fue el siguiente:

TLR4

Para el polimorfismo Asp299Gly del TLR4 se realizó una amplificación de la secuencias de interés mediante PCR de ADN genómico para el cual se utilizó un oligonucleótido sentido (5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3') y antisentido (5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'). Para la mezcla de reacción se tomaron 6.625 µl del mix de reactivos (Buffer 10X, MgCl₂, primers, y Taq polimerasa), se agregaron 4 µl de ADN problema y se completó con agua ultra pura hasta 25 µl.

Para una reacción:

Buffer 10X, dNTPs 10mM, primers 10 µM, MgCl₂ 25mM y DNA 25ng/ml.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones:

95°C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 95°C por 30 s, 58.5°C por 30 s, and 72°C por 1 minuto seguido por una etapa de elongación a 72°C por 5 min.

Para el polimorfismo Thr399Ile del TLR4 se realizó una amplificación de la secuencia de interés mediante PCR de ADN genómico para el cual se utilizó un oligonucleótido sentido (5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3') y antisentido (5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3'). Para la mezcla de la reacción se tomaron 6.625 µl del mix de reactivos (Buffer 10X, dNTPs 10mM, primers 10 µM, MgCl₂ 25mM y DNA 25ng/ml), se agregaron 4 µl de ADN problema y se completó con agua ultra pura hasta 25 µl.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones:

95°C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 95°C por 30 s, 58.5°C por 30 s, and 72°C por 1 minuto seguido por una etapa de elongación a 72°C por 5 min.

TLR2

Para los polimorfismos del TLR2 (Arg753Gln y Arg677Trp) se realizó una amplificación de la secuencia de interés mediante PCR de ADN genómico para el cual se utilizó un oligonucleótido sentido (5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3') y antisentido (5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'). Para la mezcla de la reacción se tomaron 6.625 µl del mix de reactivos (Buffer 10X, dNTPs 10mM, primers 10 µM, MgCl₂ 25mM y DNA 25ng/ml), se agregaron 4 µl de ADN problema y se completó con agua ultra pura hasta 25 µl.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones: 95°C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 95°C por 30 s, 64.8°C por 30 s, and 72°C por 1 minuto seguido por una etapa de elongación a 72°C por 5 min.

RFLP

A los productos amplificados se agregó 5 U/µl de la enzima de restricción. Para la detección de los polimorfismos Arg677Trp y Arg753Gln de TLR2 se utilizó la enzima de restricción Acil, la cual posee 2 sitios de restricción. Para la detección del polimorfismo de TLR4 Asp299Gly se utilizó la enzima de restricción NcoI y para el polimorfismo de TLR4 Thr399Ile la enzima de restricción HinfI. Todas las enzimas se incubaron por 24 horas a 37°C. Para el análisis de los fragmentos generados el producto de digestión se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 3%. Para mayor resolución de los fragmentos generados por la enzima en caso de ser necesario se hicieron geles de poliacrilamida al 4%. Se secuenciaron las muestras que poseían el polimorfismo para confirmar la presencia de estos.

5.5 Análisis de Datos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa GENEPOP (<http://genepop.curtin.edu.au/>) para obtener el equilibrio de Hardy Weinberg y el valor p (probabilidad) basado en los principios de la prueba de Fisher ($p < 0.05$).

Para los puntajes de SOFA y APACHEII se compararon las medianas a través de la prueba de Kruskal-Wallis, para el cual se utilizó el programa Stata 11.

6. Resultados

6.1 Población de estudio y datos de los pacientes

Los pacientes a los que se le realizó la genotipificación y resultaron positivos para alguno de los polimorfismos de TLR4 fueron incluidos en la siguiente tabla (Tabla 2).

Paciente #	Genotipo TLR4 399	Genotipo TLR4 299	Sepsis
696	C/T	A/A	No
722	C/C	A/G	No
678	C/T	A/A	No
686	C/T	A/A	Si
668	C/T	A/A	No

692	C/T	A/A	Si
669	C/T	A/G	Si
712	C/C	A/G	No
476	C/C	A/G	No
690	C/C	A/G	Si
784	C/T	A/G	Si
661	C/C	A/G	Si
785	C/T	A/G	No

Tabla 3. Genotipos identificados para los dos polimorfismos de TLR4.

6.2 Ensayos PCR-RFLP

TLR4

La enzima de restricción HinfI tiene como blanco la secuencia mutada (cambio de una C por una T) y corta el fragmento amplificado de 407 pb, generando 2 bandas 378 pb y 29 pb. En el gel después de la electroforesis se puede observar:

Una banda de 407 pb que corresponde a un individuo homocigoto CC

Tres bandas de 407 pb, 378 pb y 29 pb que corresponden a un individuo heterocigoto TC

Dos bandas de 378 pb y 29 pb que corresponden a un individuo homocigoto TT

La enzima de restricción NcoI tiene como blanco la secuencia mutada (cambio de una A por una G) y corta el fragmento amplificado de 249 pb, generando 2 bandas de 223 pb y 26 pb. En el gel después de la electroforesis se puede observar:

Una banda de 249pb que corresponde a un individuo homocigoto AA

Tres bandas de 249pb, 223pb y 26pb que corresponden a un individuo heterocigoto AG

Dos bandas de 223pb y 26pb que corresponden a un individuo homocigoto GG

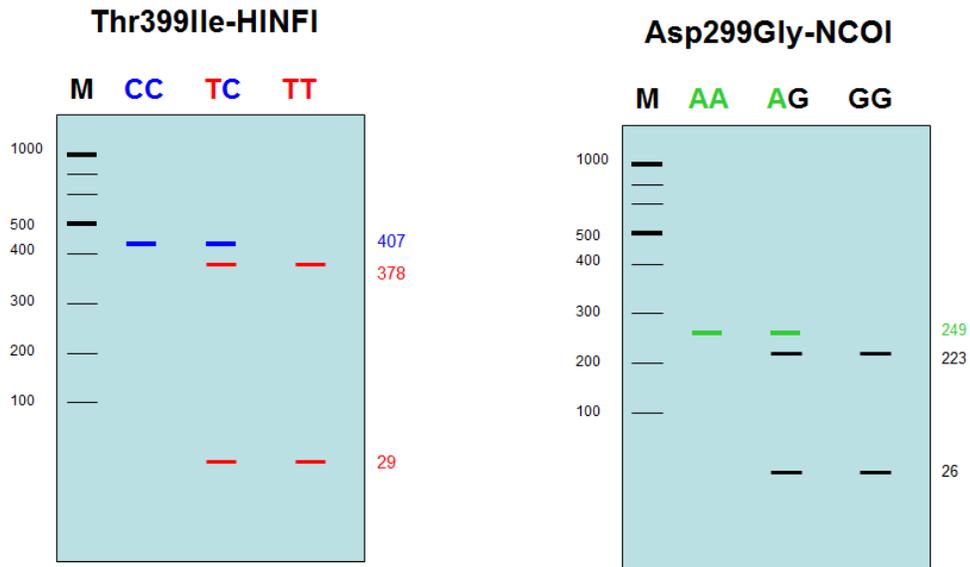


Figura 1. Productos de la digestión de la enzima de restricción en un gel de agarosa o poliacrilamida.

TLR2

La enzima de restricción Acil tiene como blanco 2 sitios de restricción en la secuencia no mutada (Tipo silvestre) y corta el fragmento amplificado de 341 pb, generando 3 bandas de 227 pb, 75 pb y 38 pb.

Para el polimorfismo Arg677Trp

Tres bandas 227 pb, 75 pb y 38 pb que corresponden a un individuo homocigoto CC

Cuatro bandas de 302 pb, 227 pb, 75 pb y 38 pb que corresponden a un individuo heterocigoto CT

Dos bandas de 302 pb y 38 pb que corresponden a un individuo homocigoto TT

Para el polimorfismo Arg753Gln

Tres bandas de 227 pb, 75 pb y 38 pb que corresponden a un individuo homocigoto AA

Cuatro bandas de 265 pb, 227 pb, 75 pb y 38 pb que corresponden a un individuo heterocigoto AG

Dos bandas 265 pb y 75 pb que corresponden a un individuo homocigoto GG

6.3 Geles agarosa y poliacrilamida

TLR4

La siguiente imagen muestra una electroforesis para un gel de poliacrilamida, donde se pueden observar las diferentes bandas para ambos polimorfismos (Thr399Ile y Asp299Gly). También, se puede observar que una de las muestras presenta ambos polimorfismos (paciente 669).

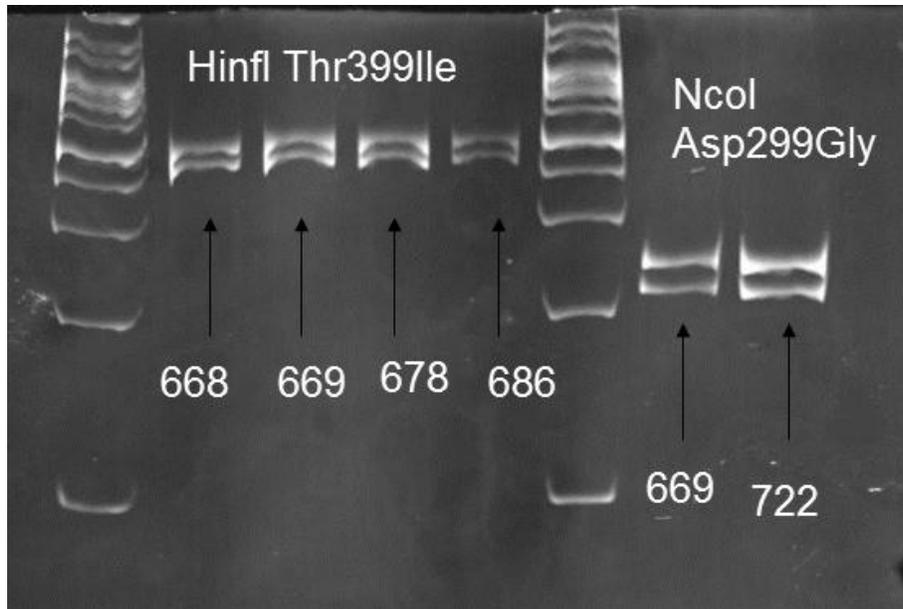


Figura 2. Gel de poliacrilamida mostrando las diferentes bandas que corresponden a los 2 polimorfismos de TLR4 Asp299 y Thr399Ile.

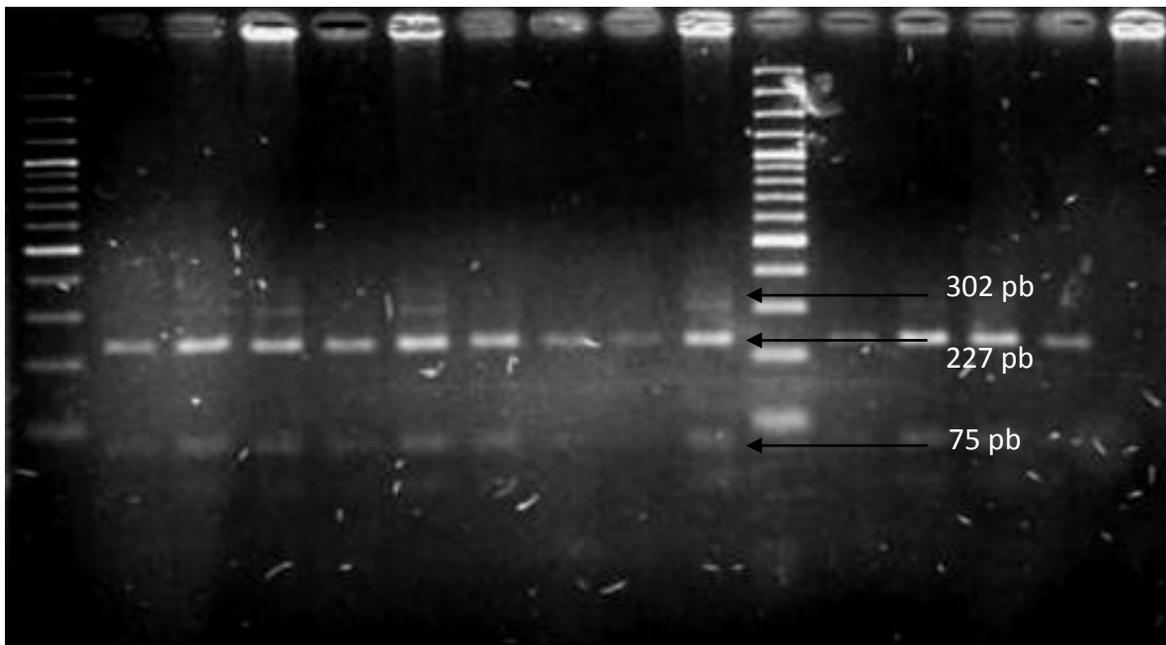


Figura 3. Gel de agarosa mostrando las diferentes bandas que corresponden al polimorfismo de TLR2 Arg677Trp.

Para el polimorfismo del TLR2 se utilizó un gel de agarosa, es necesario realizar un gel de poliacrilamida para una mejor resolución, y así confirmar estos resultados.

Como resultado tenemos que:

TLR4

- Muestras de ADN a las que se les realizó PCR: 147
- Muestras a las que se realizó RFLP: 126
- Muestras en las que se identificó el polimorfismo Asp299Gly: 2
- Muestras en las que se identificó el polimorfismo Thr399Ile: 6
- Muestras en las que se identificaron ambos polimorfismos: 1

TLR2

- Muestras de ADN a las que se les realizó PCR: 94
- Muestras a las que se realizó RFLP: 69
- Muestras en las que se identificó el polimorfismo Arg677Trp: 14
- Muestras en las que se identificó el polimorfismo Arg753Gln: 0

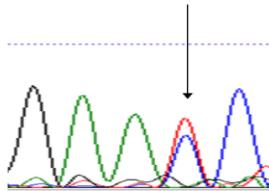
6.4 Secuenciación

Las muestras que se secuenciaron fueron las que presentaron corte por parte de la enzima de restricción.

Los nucleótidos que se observan en la parte superior de las figuras corresponde a las secuencias de restricción para cada enzima.

668 HinfI

G A A T C



669 NcoI

C C A T G G

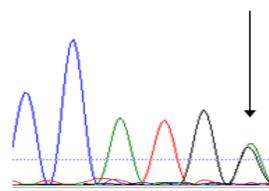


Figura 4. Resultado de la secuenciación de dos muestras, mostrando el cambio de nucleótido, indicando los 2 polimorfismos presentes en el gen del TLR4 (Asp299Gly y Thr399Ile).

6.5 Análisis estadístico

Al realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Genpop, se calculó el equilibrio de Hardy Weinberg y el valor p. En la siguiente tabla se puede observar los resultados:

Polimorfismo	Valor P (H-W)	Población Total	No Sepsis	Sepsis	Valor P (Fisher)
TLR4 Thr399Ile	1.0000	109	59	50	1.00000

(C/T)					
TLR4 Asp299Gly (A/G)	1.0000	107	57	50	1.00000

Tabla 4. Valores estadísticos basados en la prueba de Fisher y el equilibrio de Hardy Weinberg.

En los datos obtenidos se puede observar que no hay una diferencia significativa entre los pacientes que presentan el polimorfismo y desarrollaron sepsis y los pacientes que presentan el polimorfismo y no desarrollaron sepsis, siendo $p < 0.05$ estadísticamente significativo. La no significancia estadística puede deberse al tamaño pequeño de la población. La probabilidad de encontrar un individuo con el polimorfismo y que este se encuentre relacionado con el desarrollo de sepsis y el estado de gravedad sería mayor si el tamaño poblacional aumenta.

Para cada polimorfismo se realizó la prueba de equilibrio de Hardy Weinberg, donde un valor de 1 indica que se encuentra en equilibrio.

6.6 Puntajes de APACHE II y SOFA

APACHE II

Polimorfismo	Chi cuadrado	Valor p

SNP Thr399Ile	1.057	0.5894
SNP Asp299Gly	0.087	0.9574

Tabla 5. Prueba Kruskal-Wallis comparando las medianas del puntaje de APACHEII para los 2 polimorfismos de TLR4.

SOFA

Polimorfismo	Chi cuadrado	Valor p
SNP Thr399Ile	0.462	0.7937
SNP Arg299Gly	0.213	0.8990

Tabla 6. Prueba Kruskal-Wallis comparando las medianas del puntaje de SOFA para los 2 polimorfismos de TLR4.

Los valores de p observados en las tablas para la prueba de Kruskal-Wallis tanto para SOFA como para APACHE II se encuentran alejados de 0.05, indicando que no existe una relación entre estos puntajes de gravedad y disfunción de órganos con la presencia de los polimorfismos en los individuos.

7. Discusión

Durante la evolución, nuestra información genética ha sido profundamente influenciada para la predisposición a la salud o la enfermedad. En las últimas décadas, el interés en

los mecanismos genéticos y fisiológicos para la predisposición a una enfermedad ha llevado a la identificación de varios polimorfismos genéticos que han ido evolucionando en respuesta a presiones evolutivas específicas (Ferwerda B, Mc Call M, Alonso S, Giarmarellos-Buorboulis E, et al, 2007). Los receptores tipo Toll han sido descritos como los receptores más importantes para el reconocimiento de patrones moleculares, los cuales están involucrados en la defensa del hospedero contra bacterias, virus, hongos y protozoos. Los TLRs son receptores evolutivamente conservados, descritos inicialmente en *Drosophila*, y cuenta con homólogos en plantas y vertebrados inferiores (Ferwerda B, Mc Call M, Alonso S, Giarmarellos-Buorboulis E, et al, 2007). Diez receptores tipo Toll han sido identificados, de los cuales dos de estos el TLR4 y TRL2 cumplen un rol crítico en la inmunidad innata. Se ha mostrado que el TLR4 activa quinasas asociadas al receptor de la IL-1 en respuesta a PAMPs, incluyendo el LPS, llevando a la posterior activación del NFκB y liberación de citoquinas (Schmitt C, Humeny A, et al, 2002). Los receptores tipo Toll no solo contribuyen a una activación eficiente en la respuesta inmune contra ciertos patógenos, sino que durante la activación de estos, contribuyen a hiperinflamación y choque. (Feterowski C, Emmanuilidis K, 2003).

Se ha mostrado que las mutaciones en el gen del TLR4 produce una hiporespuesta al LPS. Existen dos mutaciones que han sido las más estudiadas. La primera es una sustitución de una adenina por una guanina que lleva al cambio de un ácido aspártico por una glicina en el aminoácido 299 de la proteína. Esta mutación en el tercer exón del gen del TLR4 altera la estructura del dominio extracelular de este receptor. Además existe otra mutación en la cual se reemplaza una treonina por una isoleucina en el aminoácido 399, también en el dominio extracelular de este receptor. Estas dos mutaciones han sido descritas en un estado cosegregado. (Schmitt C, Humeny A, et al, 2002).

Algunos estudios han sido realizados para poder determinar el efecto de estas mutaciones, sea de forma separada o en su forma cosegregada. Existe una controversia entre si el estado cosegregado está o no asociado a infecciones por bacterias Gram negativas y posterior desarrollo de sepsis. Ferwerda y colaboradores (Ferwerda B, et al, 2008) en un metanálisis demostraron en un 62% de las investigaciones realizadas no existe asociación alguna. Estos mismos autores demostraron que no hay diferencia significativa entre los individuos que poseen el alelo tipo salvaje para el TLR4 y los que tienen los polimorfismos Asp299Gly/Thr399Ile en la forma cosegregada, sugiriendo que no hay una relación entre la presencia del polimorfismo y las infecciones por bacterias Gram negativas (Ferwerda, et al, 2007). Podemos observar que los resultados arrojados por Ferwerda, son similares al presente estudio donde no se observa una diferencia entre la población con sepsis y la población sin sepsis. En el presente estudio no se puede determinar si la no asociación de los polimorfismos con la presencia de sepsis es debido a un tamaño poblacional pequeño o corresponde a una concordancia con los resultados de estudios antes realizados. Se necesitaría un estudio con un tamaño poblacional mayor para verificar estos resultados.

Ferwerda y colaboradores (Ferwerda B, Mc Call M, Alonso S, Giarmarellos-Buorboulis E, et al, 2008), ubicaron los polimorfismos de TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile en las diferentes poblaciones mundiales y además realizaron una asociación genotipo-fenotipo con respecto a la producción de citoquinas dependiendo del tipo de polimorfismo. La siguiente figura muestra lo descrito anteriormente.

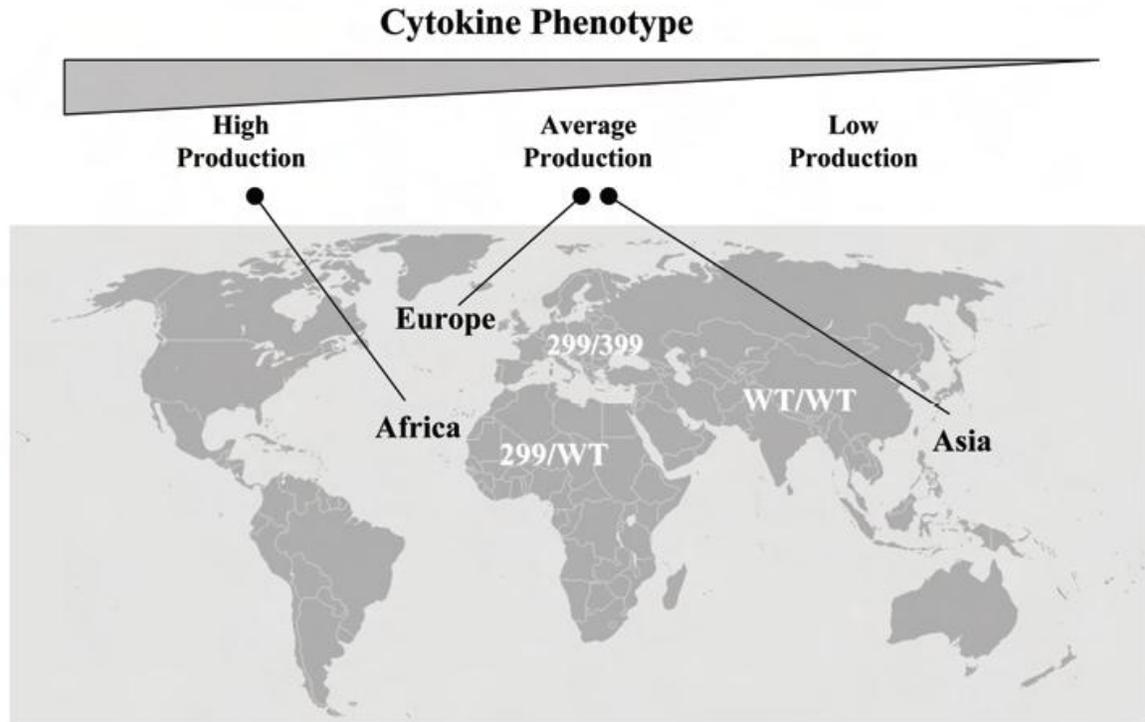


Figura 5. Distribución de los haplotipos de TLR4 y la asociación con los fenotipos de citoquinas, a través de los 3 continentes del viejo mundo. Tomado de “Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms”. Mol Med 2008.

Como se puede observar en la figura no existe hasta el momento registro de estos polimorfismos en el continente Americano, lo hallado en nuestros datos es novedoso debido a que pueden ser usados más adelante para poder identificar las frecuencias de esos polimorfismos en las poblaciones Americanas y mas importante, en Colombia ya que no existen reportes previos. El hallazgo de nuestros datos puede ayudar a aumentar los estudios de asociación a sepsis como también cuales son las proporciones y el posible impacto de estas mutaciones en las diferentes poblaciones. Nuestros datos pueden convertirse en herramientas para estudios posteriores.

El polimorfismo 399/WT no ha sido descrito en las poblaciones mundiales excepto en Indonesia donde tiene una frecuencia bastante baja, no se conoce si esta presente en

otro tipo de poblaciones o cual es la relación genotipo-fenotipo. Lo hallado en nuestros resultados es algo novedoso ya que se está identificando esta mutación en una muestra de la población de Medellín. Además de la identificación de este polimorfismo en nuestra población, con un estudio mas exhaustivo se puede conocer cual es la relación entre el genotipo 399/WT y el fenotipo y cuál sería el rol que juega esta variación alélica en la susceptibilidad a infecciones por bacterias gram negativas y el desarrollo de sepsis.

Algo interesante que cabe resaltar es que la frecuencia de los polimorfismos en la forma cosegregada 299/399 no fue la esperada. La población de Medellín al contener un alto porcentaje de europeo se esperaría que este fuera el polimorfismo predominante en la población. La frecuencia de los genotipos se puede observar en la figura 6.

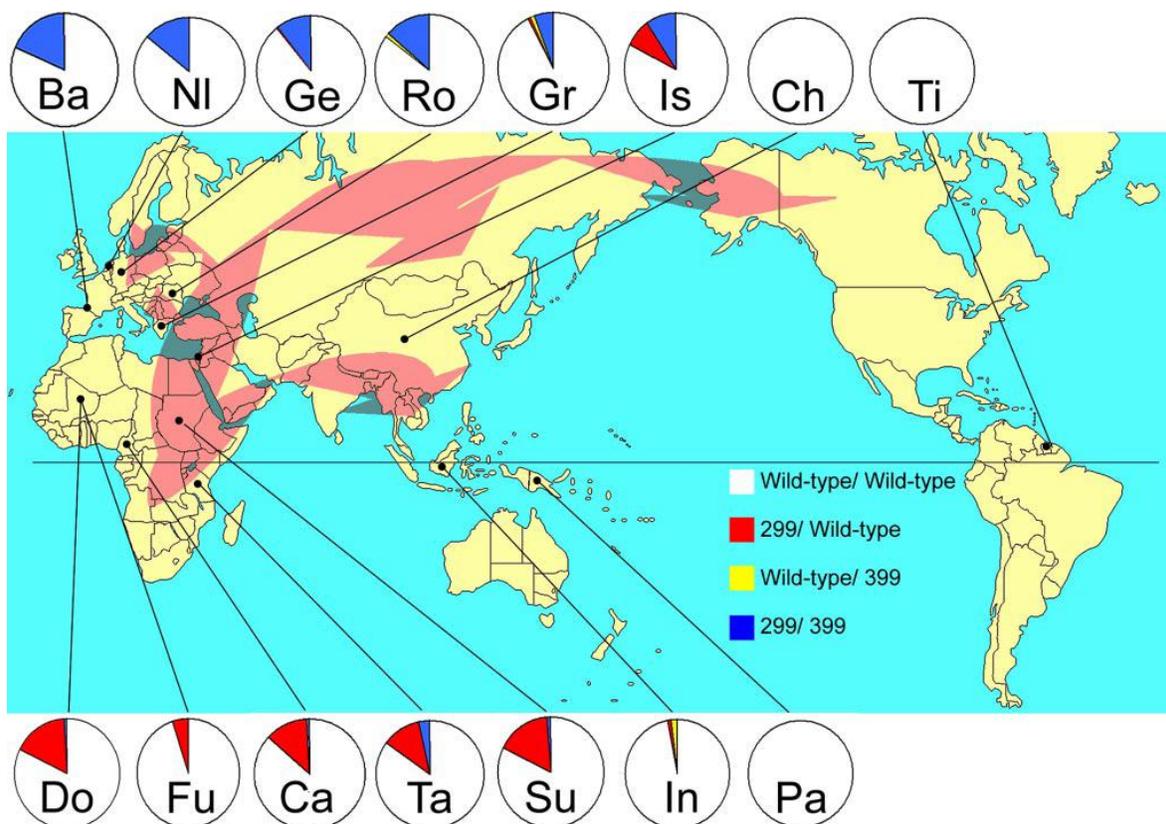


Figura 6. Distribución mundial de los haplotipos de TLR4 en las poblaciones humanas.

El segundo gen que se incluyó en este estudio es el TLR2, este receptor interactúa con un gran número de compuestos incluyendo peptidoglicanos y ácido lipoteicoico de bacterias gram positivas, glicolípidos de espiroquetas, lipoproteínas, lipopeptidos de *Borrelia* y *Mycoplasma* spp (Schroder N, et al, 2003). En el gen del TLR2 se han descrito 2 polimorfismos de un solo nucleótido (Arg677Trp y Arg753Gln) que están localizados en la porción citoplasmática de la molécula del TLR2 (Woehrle T, et al, 2008). Estos polimorfismos han sido asociados a una respuesta disminuida de los macrófagos a péptidos bacterianos, llevando así a una respuesta atenuada por parte del hospedero. El polimorfismo Arg677Trp ha sido descrito y asociado a infecciones por mycobacterias, se cree que este polimorfismo no se encuentra presente en la población Caucásica (Woehrle T, et al, 2008). Según los resultados de nuestro estudio hay 14 individuos que presentan el polimorfismo Arg677Trp, y hasta ahora no se ha encontrado ni un solo individuo con el polimorfismo Arg753Gln esto se puede deber a un efecto fundador al igual que el polimorfismo Thr399Ile en el gen del TLR4. Este es un hallazgo importante debido a que el polimorfismo Arg677Trp no ha sido muy estudiado y menos en poblaciones caucásicas ya que no se había descrito en este tipo de poblaciones, se necesita más información para conocer cual es el impacto de este polimorfismo en la población, y que tanta es la frecuencia, en que tipo de individuos se encuentra más y también cual sería el efecto sobre los individuos. Si o es el ya descrito por otros autores o si tiene algún otro efecto.

Uno de los objetivos de este estudio fue conocer si la presencia de las variantes alélicas de TLR4 y TLR2 están asociadas con los estados de gravedad de sepsis, para esto se utilizaron los puntajes de gravedad APACHE II y de disfunción de órganos SOFA.

Una prueba de Kruskal-Wallis para datos no simétricos fue realizada para cada polimorfismo. Al observar los resultados, encontramos que no existe una asociación inicial a ni al puntaje APACHE II ni al de SOFA, esto podría indicar que los polimorfismos

presentes en esta población no están asociados a los estados de gravedad de los pacientes, ni con la disfunción de órganos. De esto se puede concluir que los polimorfismos de TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile no confieren una susceptibilidad a desarrollo de sepsis.

Lo descrito anteriormente podría ser resultado de un tamaño poblacional pequeño pero al no haber estudios previos, no se puede determinar cuál es el tamaño adecuado para la obtención de un resultado estadísticamente significativo.

Además no es posible comparar los resultados obtenidos en este estudio con algún otro estudio de asociación donde se utilice puntajes ya sea de SOFA o de APACHE II, ya que no existen estudios previos que reporten asociaciones de la presencia de los polimorfismos de TLR2 y TLR4 con los puntajes de gravedad.

Es necesario realizar un estudio exhaustivo para conocer la asociación de los polimorfismos de TLR2 y TLR4 con sepsis y los estados de gravedad (SOFA y APACHE II), en una población de mayor tamaño, además de estudiar cómo sería la relación genotipo-fenotipo, además de la frecuencia de los polimorfismos Thr399Ile de TLR4 y Arg677Trp de TLR2.

8. Conclusiones

- El tamaño de muestra no es adecuado para obtener un resultado que sea estadísticamente significativo.
- Los polimorfismos Thr399Ile de TLR4 y Arg677Trp de TLR2 fueron encontrados en una alta frecuencia.
- El polimorfismo cosegregado 399/299 no se encontró en la proporción esperada teniendo en cuenta los antecedentes y hallazgos de otros autores.

- Los polimorfismos de TLR4 encontrados en los pacientes de este estudio no tienen una asociación con los puntajes de APACHE II y SOFA.

9. Limitaciones

Para los polimorfismos de TLR4, no se realizó la prueba de PCR-RFLP en todas las muestras debido a degradación del ADN, baja pureza, interrumpiendo el proceso de amplificado por medio de PCR.

Por falta de tiempo y algunos problemas técnicos no se realizó toda la genotipificación de las muestras para TLR2, como tampoco el análisis estadístico correspondiente, la secuenciación y la asociación con los puntajes de APACHE II y SOFA.

10. Proyecciones

Para obtener los resultados faltantes se proyecta realizar el análisis correspondiente a las muestras faltantes de TLR2, como también aumentar el tamaño poblacional para verificar los resultados obtenidos.

11. Bibliografía

Arcaroli J, Fessler B, Abraham, E (2005). “Genetic polymorphisms and sepsis”. *SHOCK* 24: 300-312.

Jaimes F, Garcés J, Cuervo J, Ramírez F, Ramírez J, Vargas A, et al (2003). “The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to identify infected patients in the emergency room”. *Intensive Care Med* 29: 1368-1371.

Jaimes F, Garcés J, Cuervo J, Ramírez F, Ramírez J, Estrada JC, et al (2001). “Factores pronósticos en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Desarrollo de un índice de severidad”. *Acta Med Col* 26: 149-157.

Mitchell, J. Paul-Clark, M. Clarke, G. McMaster, S. Cartwright, N., (2007). “Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease”. *Journal of Endocrinology* 193, 323–330.

Schmitt, C. Humeny, A. Becker, CM, Brune, K. Pahl, A (2002). “Polymorphisms of TLR4: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles”. *Molecular Diagnostics and Genetics* 48: 1661-1667.

Arbour, NC. Lorenz, E. Schutte, B. Zabner, J. Kline. J. Jones, M. Frees, K. Watt, J. Schwartz, D. (2000). “TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25: 187-91.

Hellerud, B. Stenvik, J. Espevik, T. Lamris, J. Mollnes, T. Brandtzaeg, P (2008). “Stages of Meningococcal Sepsis Simulated In Vitro, with Emphasis on Complement and Toll-Like Receptor Activation”. *Infection and Immunity* 76: 4183–4189.

Ougus, A. Yoldas, B. Ozdemir, T. Uguz, A. Olcen, S. Keser, I. Coskun, M. Cilli, A. Yegin, O (2004). “The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease”. *European Respiratory Journal* 23: 219-223.

Ben-Ali, M. Barbouche, M. Bousina, S. Chabbou, A. Dellagi, K (2000). “Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients”. *Clinical and Vaccine Immunology* 11: 625–626.

Martin, J. Wheeler, A (2009). “Approach to the patient with sepsis”. *Clin Chest Med* 30: 1-16.

Meisner, M (2005). “Biomarkers of sepsis: clinically useful?”. *Current opinion in critical care* 11: 473-480.

Hotchkiss, K (2003). “The pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine* 348: 138-150.

Giacometti, A. Cirioni, O. Ghiselli, R. Mocchegiani, F. Orlando, F. Silvestri, C. Bozzi, A. Di Giulio, A. Luzi, C. Mongoni, M. Barra, D. Saba, V. Scalise, G. Rinaldi, A. (2006). “Interaction of Antimicrobial Peptide Temporin L with Lipopolysaccharide In Vitro and in Experimental Rat Models of Sepsis Shock Caused by Gram-Negative Bacteria”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2478-2486.

Pierre-Yves, B. Calandra, T (2003). “Pathogenesis of Severe Sepsis: new Concepts and implications for future treatment”. *BMJ* 326: 262-266.

Durán Gimenez-Rico, H. Aller Reyero, M. Lorente Ruigomez, L. Durán Gimenez-Rico, L. Arias Perez, J. Durán Sacristán, H (2002). “Sepsis y shock séptico: un torbellino de mediadores inflamatorios de difícil manejo terapéutico. *An. Med. Interna* 19: 35-43.

Misch, E. Hawn, T (2008). "Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease". *Clinical Science* 114: 347-360.

Schaaf, B. Luitjens, K. Goldmann, T. van Bremen, T. Sayk, F. Dot, C. Dalhoff, K. Droemann, D (2009). "Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes". *Diagnostic Pathology* 4: 1-7.

Fewerda, B. Mc Call, M. Alonso, S. Giarmarellos-Buorboulis, E. Mouktaroudi, M. Izagirre, N. Syafruddin, D. Kibiki, G. Cristea, T. Hijmans, A. Hamman, L. Isarael, S. ElGhazali, G. Troye-Blomerg, M. Kumpf, O. Maiga, B. Dolo, A. Doumbo, O. Hemersen, C. Stalenhoef, A. Van Crevel, R. Brunner, H. Ye-Oh, D. Schumann, R. de la Rúa, C. Sauerwein, R. Kullberg, B. van der Ven, A. van der Meer, J. Netea, M (2007). "TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans". *PNAS* 42: 16645-16650.

Schroder, N. Herman, C. Hamann, L. Gobel, U. Hartung, T. Schumann, R (2003). "High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR". *Journal of molecular medicine* 81: 368-372.

O'Brien, G. Wang, J. Redmon, H (2005). "Bacterial lipoprotein induces resistance to Gram-negative sepsis in TLR4-deficient mice via enhanced bacterial clearance". *The Journal of Immunology* 174: 1020-1026.

Pené, F. Courtine, E. Ouaz, F. Zuber, B. Sauneuf, B. Sirgo, G. Rousseau, C. Toubiana, J. Balloy, V. Chignard, M. Mira, J. Chiche, D (2009). "TLR2 and TLR4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells". *Infect. Immun.* 10: 1-26.

Roger, T. Froidevaux, C. Le Roy, D. Knaup, M. Chanson, A. Mauri, D. Burns, K. Riederer, B. Akira, S. Calandra, T (2008). “Protection from lethal Gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4”. PNAS 106: 2348-2352.

Schwartz, D. Cook, D (2005). “Polymorphisms of the toll like receptors and human disease”. Clinical infectious diseases 41: S403-7.

Lorenz, E. Mira, J. Cornish, K. Arbour, N. Schwartz, D (2000). Polymorphisms in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with Staphylococcal infection. Infection and Immunity 68: 6398-6401.

Lorenz, E. Mira, J. Frees, K. Schwartz, D (2002). Relevance of mutations en the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. Arch Intern Med 162: 1028-1032.

Abraham, E. Singer, M (2007). “Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction and recovery”. Springer pages 17-21.

Ferwerda, B. McCall, M. Verheijen, K. Kullberg, B. van der Ven, A. Van der Meer, J. Netea, M (2008). “Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms”. Mol Med 14: 346-352.

Briceño, I (2005). “Sepsis: Definiciones y Aspectos Fisiopatológicos”, Medicrit 2: 164-178.

Woehrle, T. Du, W. Goetz, A. Hsu, H. Joos, T. Weiss, M. Bauer, U. Brueckner, U. Schneider, E (2008). “Pathogen specific cytokine reléase reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans”. Cytokine 41: 322-329.

