

Variabilidad genética en la susceptibilidad y en la gravedad de la neumonía

F. Rodríguez de Castro^a, J. Solé-Violán^b y J.C. Rodríguez-Gallego^c

^aServicio de Neumología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas.

^bServicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas.

^cServicio de Inmunología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.

Introducción

Hay algunas observaciones clínicas que han llamado la atención de los médicos desde hace siglos, y una de ellas ha sido la variabilidad individual en la susceptibilidad a presentar enfermedades infecciosas y en la gravedad de éstas. Existen datos históricos de las epidemias de peste que asolaron Europa en el siglo XIV que describen que, incluso compartiendo las mismas viviendas, había individuos que permanecían sanos mientras que la mayoría se afectaba gravemente por la enfermedad. Un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso, aunque sólo el 10% desarrolla tuberculosis activa y en torno al 2-3% una forma diseminada de la enfermedad. Otros ejemplos de la variabilidad individual frente a la infección pueden observarse todos los inviernos en cualquier consulta médica, en las que parece que el 10% de los pacientes presenta el 90% de las infecciones respiratorias, o en los hospitales, donde algunos episodios de neumonía adquirida en la comunidad, en sujetos previamente sanos, tienen un curso fulminante a pesar de recibir tratamiento antibiótico adecuado, mientras que otros muchos casos se curan espontáneamente en su domicilio^{1,2}.

En definitiva, la pregunta es: ¿por qué algunos individuos presentan más infecciones que otros?; o, dicho de otra forma, ¿hasta qué punto nuestra configuración genética determina las diferentes maneras que tenemos de responder frente a una misma infección? Sin duda existen muchos factores potencialmente implicados en la susceptibilidad y en la respuesta a la infección, como el estado de salud previo del paciente, su situación inmunológica (inmunidad adquirida) o la distinta virulencia del microorganismo implicado. Pero, sobre la base de las observa-

ciones previas que se han comentado, no es descabellado pensar que exista también un componente genético que determine las diferencias en la respuesta defensiva frente a la infección³. Sin embargo, si se revisan las historias de los pacientes ingresados en nuestros hospitales, raramente se encontrará información acerca de la historia familiar de infecciones, ni siquiera en los pacientes ingresados por un cuadro infeccioso grave, y esto a pesar de contar con sólidas evidencias que respaldan la importancia del factor genético en estas enfermedades.

Justificación de los estudios genéticos en infecciones

Diversos estudios realizados en modelos animales, en grupos raciales, en familias, en gemelos y en hijos adoptivos han presentado pruebas concluyentes de la importancia de la genética en las infecciones graves³⁻¹⁴.

La susceptibilidad a ciertos patógenos se ha identificado en ratones carentes de determinados genes. Así, los ratones *knock-out* para el gen del interferón gamma (IFN- γ) y su receptor (IFN- γ R₁ e IFN- γ R₂), para el gen del receptor de la interleucina (IL) 12 o para el de STAT-1 (transductor de señal y activador de la transcripción) son extremadamente susceptibles a *Mycobacterium tuberculosis*. Estos animales desarrollan una infección diseminada letal, lo que demuestra la importancia de las moléculas que participan en la regulación de los macrófagos en la defensa frente a patógenos intracelulares⁶⁻⁸. Posteriormente se han descrito los equivalentes humanos de estos ratones en algunos casos familiares excepcionales⁹⁻¹²; de esta forma, se ha confirmado la validez del uso de modelos murinos *knock-out* para identificar las vías clave que controlan la predisposición a la infección.

Los estudios realizados en gemelos postulan que los efectos de los factores ambientales son similares para ambos hermanos, y atribuyen cualquier diferencia respecto a la susceptibilidad o la gravedad de una enfermedad infecciosa a la influencia genética. En este sentido, el estudio británico Prophit¹⁴, llevado a cabo entre 1933 y 1944, demuestra tasas mucho más elevadas de concordancia para tuberculosis en los gemelos monocigotos que en los dicigotos. Los estudios en gemelos han

Este trabajo ha sido financiado en parte por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI02-1620 y PI04-1190) y por la Red Respira (RTIC-ISCIII C03/11).

Correspondencia: Dr. F. Rodríguez de Castro.
Servicio de Neumología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.
Barranco de La Ballena, s/n.
35010 Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas. España.
Correo electrónico: frodcasw@gobiernodecanarias.org

mostrado resultados similares para otras enfermedades infecciosas como la lepra, la persistencia del virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana, la poliomielitis, la malaria e incluso la infección por *Helicobacter pylori*^{1,3}.

También se puede evaluar la importancia de la genética del huésped en las infecciones, al margen de los efectos ambientales, mediante estudios en niños adoptados. Sorensen et al¹⁵ publicaron un estudio sobre las causas de muerte prematura en 1.000 familias con niños adoptados a edad temprana. Estos investigadores comprobaron que, si los padres biológicos de estos niños habían fallecido por una infección antes de los 50 años de edad, su hijo tenía un riesgo relativo de morir por infección de 5,81; por el contrario, el fallecimiento de los padres adoptivos por una infección no confería un mayor riesgo al hijo adoptado de fallecer por esta causa. También observaron que un padre biológico fallecido por una neoplasia no implicaba para el hijo un mayor riesgo de morir por este motivo, mientras que si el padre adoptivo moría por cáncer el hijo tenía un riesgo 5,16 veces mayor de morir también por una neoplasia. Por tanto, la susceptibilidad y la respuesta a la infección parecen tener una influencia genética sorprendentemente importante, mientras que el desarrollo de cáncer tiene una acentuada influencia ambiental.

Algunos conceptos previos

El estudio del genoma humano (GH) ha proporcionado un punto de partida para el análisis sistemático de la diversidad génica en el ser humano. El GH completo está formado por unas 3,1 gigabases, pero se desconoce el número exacto de genes que contiene. Las últimas estimaciones establecen esta cifra en torno a los 20.000 o 25.000 genes (una cuarta parte de lo que algunos investigadores habían calculado), si bien sólo la mitad tiene un patrón de secuencia de bases que indica una posible función. Una de las características del GH con relevancia médica y social es que, como promedio, 2 individuos no relacionados genéticamente comparten más del 99% de sus secuencias de ADN. Sin embargo, dado que existen más de 3.000 millones de pares de bases en el GH, la secuencia de ADN de 2 personas difiere, a pesar de todo, en varios millones de bases. A estas variantes nos referimos habitualmente con la denominación de "polimorfismos"^{16,17}.

Un polimorfismo genético es, por tanto, una región del genoma que varía entre los individuos de una población. Esta variante alélica debe afectar a una porción significativa de la población normal, generalmente a más del 1% (lo que excluye las mutaciones espontáneas que pueden ocurrir, y extenderse a la descendencia, en el seno de una familia), y puede tratarse de la sustitución de un solo nucleótido o afectar al número de secuencias cortas repetitivas (microsatélites) de nucleótidos que constituyen más del 50% del GH. En definitiva, es una mutación estable que se mantiene en la población en un porcentaje significativo. Particularmente importantes son los llamados "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNP). Los SNP son la forma más impor-

tante y frecuente de variación en el GH y la mayoría de las diferencias genéticas entre individuos son de este tipo. La diferencia puede radicar en la sustitución, la inserción o la delección de una base. Se cree que hay aproximadamente 10 millones de estos polimorfismos en la especie humana, lo que significa que unas 10 millones de posiciones a lo largo del genoma (cada 300-500 nucleótidos) tienen variaciones frecuentes.

Llegado este punto, es importante señalar que los SNP que determinan un cambio de aminoácido en la proteína que codifica el gen son los menos frecuentes, seguidos de los que también se sitúan en la zona de codificación del gen pero no determinan ningún cambio en la estructura de aminoácidos de la proteína codificada. Los SNP más frecuentes son los situados en la región promotora del gen (secuencia de ADN donde se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción), que pueden condicionar el nivel de producción de una proteína, y sobre todo los que se ubican en los intrones (la secuencia no codificante que interrumpe los exones de un gen). Se puede deducir, por consiguiente, que sólo una proporción relativamente pequeña de los SNP son funcionalmente relevantes, aunque todos tienen un valor potencial muy interesante como marcadores genéticos¹⁶.

En la actualidad se está investigando intensamente, tanto en el sector académico como en el comercial, para catalogar y relacionar estas variaciones genotípicas específicas con variaciones fenotípicas relevantes para la salud¹⁷.

Predisposición genética a la infección

Defectos de un solo gen

Las mutaciones en un gen en particular tienen un efecto tan importante en el origen o en el desarrollo de algunas enfermedades que nos referimos a ellas como las causantes del trastorno. En estas circunstancias, la mutación en un solo gen es a la vez una condición necesaria y suficiente para producir el fenotipo clínico y provocar la enfermedad. Los patrones de herencia en estos trastornos (conocidos como trastornos mendelianos por seguir las leyes de la herencia de Mendel) suelen ser sencillos: autosómico —dominante o recesivo— o ligado al cromosoma X. Más recientemente se han descrito otros mecanismos de herencia monogénica, como la herencia mitocondrial, la impresión o *imprinting* (los efectos de ciertos genes dependen de si se heredan a través de la madre o del padre), o la disomía uniparental (ambos miembros de un par de cromosomas proceden de uno de los padres)¹⁶. Se trata de genes con gran penetrancia —la cuantificación del efecto que un alelo o genotipo determinado causa sobre el fenotipo—, por lo que la probabilidad de que una persona portadora de una mutación génica concreta tenga un fenotipo alterado es alta y condiciona una relación de casi 1:1 entre genotipo y fenotipo. En las enfermedades monogénicas generalmente es posible rastrear el gen mediante análisis de ligamiento, con el que se compara la segregación de la enfermedad con la segregación de marcadores genéticos en familias con varios miembros afectados (véase más adelante).

En conjunto, se han identificado alrededor de 100 mutaciones monogénicas importantes y poco frecuentes (en algunos casos no se puede hablar de polimorfismos en sentido estricto) que determinan variaciones en el sistema inmunitario y condicionan su capacidad para responder eficazmente a las infecciones. Se asocian con mucha frecuencia a infecciones bacterianas recurrentes, que suelen detectarse en la infancia¹⁸. No obstante, incluso una mutación en un solo *locus* puede originar fenotipos de la enfermedad de muy distinta gravedad. La fibrosis quística es un conocido ejemplo de rasgo monogénico, con más de 1.000 mutaciones identificadas en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. Cada una de estas mutaciones puede ser responsable del desarrollo de signos de la enfermedad, aunque dentro de este fenotipo existe una gran variación en términos de gravedad y pronóstico para los distintos genotipos¹⁹. También puede suceder que mutaciones en diferentes genes provoquen síndromes clínicos semejantes si lo que se altera es una vía común de los mecanismos defensivos. Por último, las mutaciones en un solo gen también pueden conferir resistencia, generalmente parcial, frente a infecciones específicas. *Plasmodium falciparum* constituye un ejemplo clásico en este sentido. Este parásito ha condicionado la selección de una serie de variantes genéticas que confieren protección parcial frente a las formas más graves de la malaria, aunque a un coste biológico significativo, que incluye el desarrollo de hemoglobina S (anemia de células falciformes) o el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Ambas entidades protegen frente al desarrollo de formas graves de paludismo, lo que probablemente explica su alta prevalencia en el África subsahariana, zona endémica de malaria²⁰. Este ejemplo proporciona una evidencia del gran impacto evolutivo que pueden tener las enfermedades infecciosas relevantes e indica que muchos factores genéticos predisponentes para enfermedades comunes han podido ser seleccionados por su papel protector frente a las infecciones.

Los defectos de un solo gen, además de la relevancia que tienen para la familia afectada, proporcionan información valiosa sobre las bases moleculares y celulares de la inmunidad del huésped frente a diferentes patógenos. Hace unos años se describieron, en varios niños del mismo pueblo de la isla de Malta, infecciones micobacterianas atípicas de pronóstico fatal. En un primer análisis no se encontró ninguna inmunodeficiencia de las clásicas, pero una perseverante investigación clínica reveló finalmente que los niños afectados eran homocigotos para una mutación que alteraba la cadena 1 del receptor del IFN- γ ⁹. Ahora se conoce que diferentes mutaciones en este y en otros genes relacionados predisponen a la infección por micobacterias y por *Salmonella* sp. Algunas de estas mutaciones tienen un curso fatal, y el fenotipo clínico y su patrón de herencia dependen de la naturaleza concreta del defecto molecular¹⁰. Estos hallazgos muestran cómo el análisis genético puede revelar algunos mecanismos clave de la defensa inmunitaria frente a patógenos específicos¹.

Defectos poligénicos

La mayoría de los rasgos fenotípicos de las enfermedades comunes están determinados por muchos genes y carecen del patrón de herencia simple (mendeliana) que caracteriza a las enfermedades monogénicas. Estas enfermedades, complejas o poligénicas, tienden a aparecer agregadas en familias, pero no a segregarse según las leyes de Mendel, y son el resultado de la combinación de distintos factores genéticos y ambientales²¹. En este grupo figuran entidades tan frecuentes como la diabetes, el asma, la hipertensión o la arteriosclerosis y, naturalmente, también la susceptibilidad a la infección. Como ya se ha mencionado, estas enfermedades tienen un patrón de herencia complejo o no mendeliano y, al contrario que las enfermedades monogénicas, tienen baja heredabilidad. Esto significa que no hay un factor genético único responsable de la enfermedad, sino que son numerosos genes —con efectos menos marcados, más sometidos a los efectos ambientales o a interacciones entre ellos— los que determinan las manifestaciones de aquella. La complejidad de las enfermedades comunes deriva del hecho de que la frecuencia con que el genotipo provoca una enfermedad es altamente variable, lo que da lugar a un significativo solapamiento de distribuciones genotípicas y a la ausencia de correspondencia 1:1 entre genotipo y fenotipo (baja penetrancia). Hoy día se piensa que la incidencia de cualquier enfermedad compleja depende de un equilibrio de riesgos. Existe un equilibrio entre las variantes génicas (alélicas) con efectos positivos y negativos, y entre factores ambientales con efectos positivos y negativos. Cuando hay demasiados factores negativos presentes (tanto genéticos como ambientales), se puede desarrollar la enfermedad²¹.

No es sorprendente que muchos de los genes que controlan nuestra susceptibilidad a las enfermedades infecciosas codifiquen proteínas que funcionan en el sistema inmunitario. Muchos de estos genes se encuentran en una porción de ADN de unos 4 millones de pares de bases de longitud, conocido como el complejo principal de histocompatibilidad (CPH), localizado en el cromosoma 6 y que engloba unos 128 genes, de los cuales el 40% tiene una función inmunológica. Entre estos últimos se encuentran los genes *HLA* (antígeno leucocitario humano), conocidos por esta denominación porque la mayoría de las proteínas que codifican se expresan en la superficie de los leucocitos. Su función es la de presentar antígenos a los linfocitos T, por lo que no es extraño que los genes *HLA* y las áreas que los flanquean tengan una frecuencia de SNP mayor que ninguna otra parte del genoma (hasta 20 veces superior), como parte de la estrategia del huésped para contrarrestar la diversidad antigénica de los microorganismos¹. Estos genes, juntos con otros que influyen en la respuesta inflamatoria y que se localizan en la “proximidad” cromosómica —como los que codifican el factor de necrosis tumoral (TNF), diversas proteínas del complemento o las proteínas del shock térmico o *heat shock proteins* (HSP)—, son importantes candidatos a actuar como determinantes genéticos de susceptibilidad a la sepsis. Sus polimorfismos parecen asociarse con un aumento o disminución de la suscepti-

bilidad a diversas enfermedades infecciosas, como la malaria, la tuberculosis, la lepra, la fiebre tifoidea, la hepatitis o el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida), entre otras¹. Igualmente existen acumulaciones de otros genes fuera del CPH (p. ej., en los cromosomas 5, 1 y 9) que también se relacionan potencialmente con la susceptibilidad a la infección.

Abordaje de los estudios genéticos

Existen 2 estrategias generales para la identificación de *loci* o genes que determinan susceptibilidad a una enfermedad: el análisis de ligamiento y los estudios de asociación.

Ligamiento es la asociación de genes o marcadores que se encuentran en un mismo cromosoma. Dos alelos en diferentes *loci* (o un rasgo y un marcador) están ligados si se transmiten juntos dentro de un bloque. Por ejemplo, si los miembros de una familia afectados por un rasgo o una enfermedad que se hereda en la misma comparten también un marcador genético, se puede concluir que ambos (gen causal y marcador) están físicamente próximos. El ligamiento es el primer paso para aislar el gen responsable de una enfermedad. No presupone, *a priori*, hipótesis acerca del papel de un gen o genes específicos y sólo permite al investigador ubicarlo en un área concreta del cromosoma (mapeo meiótico o *positional cloning*). El análisis de ligamiento es una herramienta clásica de la genética molecular y en él se emplean marcadores altamente polimórficos distribuidos por el genoma (generalmente *short tandem repeats*, STR) para identificar regiones cromosómicas que segregan con la susceptibilidad a la enfermedad dentro de una familia (rastros genómicos para ligamiento). Es el método preferido para la identificación de genes que ejercen un efecto mayor en la susceptibilidad a una enfermedad, pero es menos probable que tenga éxito si esta susceptibilidad tiene varios determinantes genéticos con efectos individuales pequeños, cuando no hay patrones de segregación familiar de la enfermedad y cuando existe una marcada y variable influencia ambiental. Éste es el caso de la mayoría de las infecciones.

La mayoría de las evidencias sobre el papel genético en las infecciones procede de los estudios de asociación, en los que se compara la incidencia de mutaciones específicas (frecuencias alélicas) de genes que se sabe o se presume que tienen un papel patogénico en la enfermedad, en una población afectada y en una población control. Dado que al aumentar el número de alelos o de genes a estudio se incrementan las posibilidades de asociaciones debidas al azar, los niveles de significación en estos análisis deben corregirse, lo que habitualmente se hace multiplicando el valor de *p* por el número de alelos. A diferencia de los estudios de ligamiento, no existe consenso sobre los criterios y umbrales de significación en los estudios de asociación²². Generalmente se acepta que la reproducción de los resultados por otros autores valida los hallazgos, aunque siempre debe tenerse en cuenta que la falta de reproducibilidad de un estudio puede deberse a un fenómeno biológico inherente a la naturaleza de las enfermedades complejas, donde la

magnitud del efecto de una variante polimórfica sobre el fenotipo puede ser débil y dependiente de las interacciones con otros genes (epistasia) o entre los genes y factores ambientales. Un tamaño de la muestra grande, la ubicación del gen en una región de ligamiento significativo con la respuesta inflamatoria frente a la infección o la demostración de los efectos del polimorfismo *in vitro* o en modelos animales (estudios funcionales) aumentan las posibilidades de que los resultados obtenidos tengan significación biológica^{23,24}.

Los requisitos que deben cumplir los estudios de casos y controles son básicamente 4:

1. Las poblaciones deben ser étnicamente homogéneas. Un grupo étnico puede estar predispuesto a desarrollar una enfermedad por razones exclusivamente socioculturales. En estas circunstancias, una muestra aleatorizada de casos de la enfermedad contendrá una proporción de ese grupo étnico mayor que la que se encuentra en la población general y, por tanto, existe el riesgo de encontrar aparentes "asociaciones genéticas" que pueden reflejar simplemente diferencias étnicas, no la existencia de genes de susceptibilidad. Este problema ha suscitado el interés por realizar estudios de asociación intrafamiliares, en los que se evalúa la frecuencia de transmisión de alelos específicos de un *locus* de padres heterocigotos a sus hijos afectados por la enfermedad (*transmisión disequilibrium test*, TDT). Cada alelo debería transmitirse, por azar, el 50% de las veces, pero si lo hace en una frecuencia significativamente mayor se infiere que este alelo en cuestión debe estar ligado o en "desequilibrio de ligamiento" con el alelo responsable de la enfermedad o ser, él mismo, el causante del trastorno.

2. El polimorfismo del gen debe ser importante. Es decir, la mutación debe ser suficientemente frecuente para afectar a una porción significativa de la población (polimorfismos) y sus efectos, relevantes. Como ya se ha mencionado, la mayoría de los SNP no modifican la cantidad o la calidad del producto del gen, por lo que se denominan "silentes" (no cambia el aminoácido a pesar de cambiar el nucleótido) o "conservadores" (aunque cambia el aminoácido, éste es sustituido por otro de estructura similar). Por el contrario, los polimorfismos son importantes cuando modifican la regulación del gen (SNP del promotor o del potenciador) o la estructura primaria del gen (SNP de exón). Es preciso tener en cuenta además que, aunque genes diferentes dentro de un mismo cromosoma pueden determinar la susceptibilidad a la infección de forma independiente, también puede suceder que la asociación observada entre un gen y una enfermedad sólo esté reflejando lo que está sucediendo en un gen vecino. Existen evidencias de que muchos alelos se segregan en bloque formando haplotipos. Mientras que un SNP representa una variante de un solo nucleótido, un haplotipo representa una secuencia de nucleótidos considerablemente más larga que tiende a segregarse en bloque y dentro de la cual se localizan varios genes. El Proyecto Internacional sobre Haplotipos se propone identificar los patrones de variación comunes en el GH, lo que a su vez facilitará la selección de

ciertos SNP (*tag*-SNP) que identifican de manera exclusiva ciertos haplotipos. Se espera que los estudios de asociación utilizando estos *tag*-SNP resulten más económicos y de análisis más sencillo²⁵.

3. El producto del gen candidato debería estar implicado en la fisiopatología de la enfermedad. Por lo tanto, en los estudios de asociación debe proporcionarse información acerca de la funcionalidad del gen y de qué forma se modifica en las variantes polimórficas.

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

Identificación de genes implicados en la respuesta defensiva innata frente a la infección

El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de los patógenos durante las primeras horas posteriores a la infección. Su eficiencia también es trascendental para el desarrollo de la respuesta inmunológica adquirida y de la memoria inmunológica. La protección inmediata frente a los microorganismos incluye una serie de mecanismos. En primer lugar, el huésped tiene que reconocer al patógeno invasor e inducir su eliminación, bien sea mediante la lisis mediada por complemento o fagocitándolo; a su vez, debe desarrollar una respuesta inflamatoria y, finalmente, debe desencadenar una respuesta antiinflamatoria que sea capaz de restaurar el equilibrio homeostático. Cada uno de estos procesos puede verse afectado por los polimorfismos de los genes implicados, que pueden provocar una susceptibilidad o una resistencia frente a la infección. No obstante, como ya se ha mencionado, el escenario clínico más probable es el de la existencia de múltiples mutaciones (SNP), cada una de las cuales tendría efectos modestos en la producción de las moléculas implicadas o en su función, pero en conjunto condicionarían una mayor repercusión en la defensa frente a la infección²⁶⁻²⁸.

Polimorfismos implicados en el reconocimiento antigénico

A lo largo de la evolución, la inmunidad innata ha desarrollado un sistema muy eficaz de reconocimiento de un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos —denominado “patrón molecular asociado a patógenos” (PMAP)— a través de los llamados receptores reconocedores de patrones. Los PMAP son característicos de los microorganismos, lo que permite al sistema inmunitario innato distinguir entre antígenos propios y extraños; son invariables, de forma que con un número limitado de receptores reconocedores de patrones se detecta la presencia de cualquier

patógeno; y son esenciales para la supervivencia o patogenicidad del microorganismo, por lo que sus mutaciones son letales. Entre los principales PMAP que actúan como dianas para la activación del sistema inmunitario innato se encuentran productos de la fisiología microbiana como el lipopolisacárido (gramnegativos), ácido lipoteicoico y peptidoglucano (grampositivos), cimosán (levaduras), secuencias de ADN con dominios CpG no metilados, manosa o ARN bicatenario (virus). Por otra parte, hay distintos tipos de proteínas que son capaces de reconocer PMAP. Entre estos receptores reconocedores de patrones se encuentran proteínas del sistema del complemento, como la lectina de unión a manosa (MBL); receptores endocíticos, como los receptores de la manosa; y por último, los receptores de membrana, como los “receptores tipo Toll” (TLR) y CD14, que se expresan fundamentalmente en la superficie de las células que primero entran en contacto con el patógeno durante la infección (células de la superficie epitelial) y en las células presentadoras de antígenos (monocitos/macrófagos y células dendríticas).

Proteínas ligadoras de lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos son componentes estructurales de la pared celular de las bacterias, principalmente de las gramnegativas. Se considera que son uno de los factores biológicos fundamentales en el inicio del proceso infeccioso e inflamatorio. Aunque la endotoxina se puede unir a proteínas transportadoras inespecíficas, son sus uniones con proteínas específicas, como la proteína ligadora de lipopolisacáridos (LBP) o la proteína ligadora incrementadora de permeabilidad (BPI), las que participan en la activación o neutralización fagocitarias. Ambas proteínas son estructuralmente muy parecidas, aunque difieren en su función. La LBP facilita la transferencia del lipopolisacárido al CD14 y a las lipoproteínas de la pared del fagocito, cuya activación favorece. La BPI, producida fundamentalmente por los leucocitos, actúa sobre la pared bacteriana e incrementa su permeabilidad y es, por tanto, bactericida para muchos patógenos gramnegativos.

Dos grupos de investigadores^{29,30} han estudiado distintos polimorfismos de la LBP y de la BPI con resultados discrepantes. Mientras que unos²⁹ encuentran que uno de los polimorfismos estudiados del gen de la LBP (*Cys98Gly*) se asocia a un riesgo aumentado de sepsis en varones y, probablemente, a un peor pronóstico, los otros autores³⁰ no pudieron reproducir esos resultados y ni siquiera pudieron identificar uno de los SNP descritos por los primeros.

CD14. La CD14 es una proteína de membrana que se expresa en los macrófagos, en los monocitos y, en menor proporción, en los neutrófilos. Además de unirse al lípido A del lipopolisacárido, la CD14 también se puede unir al peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*, al lipoarabinomano de las micobacterias y a otros componentes de la pared de los estreptococos. Se ha descrito un SNP ubicado en la posición -159 de la región promotora del gen (cromosoma 5) que afecta a una transición citosina-timina y que en los sujetos homocigotos para el alelo T condiciona mayores títulos circulantes

de CD14 soluble y una mayor producción de IFN- γ . El genotipo CD14 -159 TT apareció con más frecuencia en una población de pacientes con shock séptico en relación con un grupo control de sujetos sanos y se asoció, además, a una mayor mortalidad³¹. Otros autores no han encontrado asociación de este SNP con formas más graves o con peor pronóstico de la infección³².

Receptores tipo Toll. Existen al menos 10 TLR diferentes, con distintas afinidades por diferentes antígenos microbianos. TLR-4 parece ser esencial para el reconocimiento de la endotoxina, mientras que TLR-2 es más importante en el reconocimiento de diversos componentes de *M. tuberculosis* y de los peptidoglucanos de grampositivos. La activación de los TLR implica un aumento de la expresión de moléculas del CPH y de moléculas coestimuladoras, así como un incremento de la expresión de genes dependientes del factor nuclear κ B, como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α . Se han identificado varios SNP de TLR-4 y TLR-2 (cromosoma 9) que parecen incrementar el riesgo de infecciones bacterianas graves, aunque los resultados son discrepantes^{33,34}. TLR-5 reconoce la proteína flagelina, que constituye un estímulo inflamatorio muy potente y que está presente en la estructura flagelar de muchas bacterias. Recientemente se ha descrito un SNP en un codón de parada (que señala la terminación de la síntesis proteica) en la posición 392 del gen de TLR-5, que codifica una proteína incapaz de reconocer la flagelina y, como consecuencia, incrementa la susceptibilidad a la infección por *Legionella pneumophila*³⁵.

Lectina de unión a manosa. La MBL es una molécula pluripotencial del sistema inmunitario innato que, tras su unión a diversos azúcares de la superficie microbiana, es capaz de activar el complemento. Además, puede actuar directamente como opsonina y unirse a receptores específicos expresados en la superficie de varios tipos de células. Esta proteína está codificada por un gen único (*mbl2*) localizado en el cromosoma 10, y existen 3 variantes alélicas estructurales y otras en la región promotora del gen que reducen significativamente sus títulos plasmáticos. Al estudiar distintos polimorfismos de la MBL, nuestro grupo ha encontrado que, si bien las variantes alélicas relacionadas con títulos bajos de la proteína se asocian a mayor susceptibilidad a neumonía adquirida en la comunidad, los genotipos salvajes (productores normales) confieren un mayor riesgo de desarrollar las formas más graves de la enfermedad³⁶. Estos hallazgos explicarían por qué los SNP del gen de la MBL son relativamente frecuentes en muchos grupos étnicos (hasta el 30% en población blanca), lo cual apunta a alguna ventaja evolutiva de los mismos (polimorfismo equilibrado). Sin embargo, otros autores han encontrado que los polimorfismos de MBL son un factor de riesgo para el desarrollo de sepsis grave³⁷.

Polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria

Al unirse los PAMP a los receptores reconocedores de patrones se activa el factor nuclear κ B, que es una proteína intracelular que al translocarse al núcleo pro-

voca la transcripción de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1 e IL-6). La reacción inflamatoria es un componente esencial de los mecanismos de defensa del organismo; es el precio que hay que pagar para resolver la infección. En el ser humano la mayoría de los genes de las citocinas son polimórficos, y existe una evidencia creciente de que la producción de citocinas del paciente está determinada genéticamente y, como consecuencia, la variabilidad en sus genes determina la complejidad y diversidad de las respuestas individuales frente a la infección.

Factor de necrosis tumoral. El TNF- α cumple un papel clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria aguda tras un estímulo infeccioso y, por tanto, sus concentraciones tienen relevancia potencial en la evolución clínica. Por esta razón los polimorfismos de esta citocina han sido los más estudiados, y se han descrito más de una docena de SNP en el *locus* del TNF (cromosoma 6, dentro del CPH). El mejor estudiado de todos ellos es el TNF- α -308, cuyo alelo A (transición de guanina por adenina en la posición 308 antes del comienzo de la transcripción) se asocia a incrementos significativos de la producción de la proteína. Este polimorfismo se ha asociado a un mayor riesgo de presentar diversas enfermedades infecciosas³⁸, si bien, una vez más, otros autores no han encontrado una asociación significativa entre este SNP y un incremento del riesgo de neumonía adquirida en la comunidad o un peor pronóstico de ésta³⁹. Para explicar esta discrepancia, ha de tenerse en cuenta que este polimorfismo se encuentra en elevado desequilibrio de ligamiento con otros SNP de la región del promotor y de otros polimorfismos de genes vecinos, muchos de los cuales también tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria. Es el caso del alelo A de la linfotóxina alfa (LTA+250 A), que casi siempre se asocia con un alelo G en la posición TNF- α -308. El genotipo LTA+250 AA o "TNF- β_2 " (transición de guanina por adenina en el primer intrón) se ha asociado a concentraciones aumentadas de TNF y a un mayor riesgo de shock séptico en pacientes hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad³⁹. Por el contrario, la insuficiencia respiratoria en ausencia de shock se relacionó estrechamente con el genotipo LTA+250 GG³⁹, lo que indica que las disfunciones orgánicas utilizadas para establecer la existencia de sepsis grave pueden no tener la misma base genética que el shock séptico y que, por tanto, la sepsis grave no puede definirse exclusivamente como una fase previa del desarrollo del shock séptico²⁸. La proximidad de los genes de TNF y de LTA a otros genes inmunológicamente importantes en la región adyacente del cromosoma 6, como los *loci* de HLA, del complemento y de las HSP, puede complicar todavía más el análisis de los estudios de asociación.

Proteínas del shock térmico. Las HSP se expresan en respuesta al shock térmico y otros estímulos —como la endotoxina y otros mediadores de la sepsis grave— induciendo una respuesta proinflamatoria. Tres genes codifican proteínas de la familia HSP (HSP70): *HSPA1A*, *HSPA1B* y *HSPA1L*. Se ha encontrado una asociación

significativa, mayor incluso que la mencionada anteriormente para LTA+250, entre el alelo A de *HSPA1B* +1267 y el desarrollo de shock séptico en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad⁴⁰. Una vez más, estos 2 polimorfismos están en desequilibrio de ligamiento, y un análisis de haplotipos indica que el mayor riesgo de shock séptico existe cuando hay una adenina en las posiciones +250 y +1267 de LTA y *HSPA1B*, respectivamente. Lo que vuelven a subrayar estos datos es la importancia de conocer todos los polimorfismos relevantes en la respuesta inflamatoria más que la interpretación aislada de alguno de ellos.

Interleucinas 1 y 6. La IL-1 también es una potente citocina proinflamatoria, liberada por los macrófagos en una fase temprana de la sepsis, que incrementa las concentraciones plasmáticas del factor de activación de las plaquetas, de las prostaglandinas y del óxido nítrico. Los polimorfismos IL1 β +3953 y -511 influyen en los títulos de IL-1 β y, aunque los estudios de asociación han mostrado hallazgos dispares, parece incuestionable el papel de los polimorfismos genéticos de la familia de genes de IL-1 en la sepsis²⁶. Por otra parte, la IL-6 es un marcador de gravedad y pronóstico de la sepsis, aunque su relación causal no está del todo clara. El genotipo GG del polimorfismo IL-6-174 se ha asociado a una mejor supervivencia en un estudio reciente en pacientes con sepsis grave⁴¹, aunque esta asociación fue independiente de la respuesta sistémica de IL-6, lo que de nuevo apunta a que otros polimorfismos genéticamente relacionados con éste podrían ser la causa primaria de los hallazgos.

Polimorfismos implicados en la respuesta antiinflamatoria

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

Interleucina 10. La IL-10 es una proteína antiinflamatoria muy potente que suprime la función de los macrófagos e inhibe indirectamente la actividad de las células B. El gen humano de la IL-10 es altamente polimórfico. En la región del promotor se han descrito 2 microsatélites CA y 3 SNP en las posiciones -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), que forman al menos 3 haplotipos distintos. El haplotipo GCC del gen de la IL-10 produce más IL-10 que el ACC y parece tener una menor prevalencia en pacientes con fracaso mul-

tiorgánico⁴². Por otra parte, el efecto del haplotipo sobre la producción de la citocina parece depender de las características del patógeno. Se ha descrito una mayor frecuencia del alelo G de IL-10-1082 en pacientes fallecidos con neumonía adquirida en la comunidad⁴³, aunque, una vez más, otros estudios han encontrado resultados discrepantes⁴².

Antagonista del receptor de la interleucina 1. El antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RN) representa el oponente antiinflamatorio fisiológico de la IL-1 y, por consiguiente, parece tener un efecto protector frente a los efectos adversos de una respuesta inflamatoria excesiva. Existe una región polimórfica en el intrón 2 del gen del IL-1RN que contiene un número variable de repeticiones en tándem. Los alelos de esta parte del gen del IL-1RN se denominan A₁, A₂, A₃, A₄ y A₅, según el rango de frecuencias que presentan en la población sana. Se ha señalado que, cuanto menor sea el número de secuencias repetidas, mayor es la producción de la proteína tras la estimulación con lipopolisacáridos. El alelo IL-1RNA₂ (2 repeticiones en tándem de la secuencia de pares de bases) se asocia a una mayor producción de IL-1RN y es más frecuente en pacientes con sepsis grave, aunque no parece implicar un peor pronóstico⁴⁴. Sin embargo, los individuos homocigotos para LTA+250 A e IL-1RNA₂ permiten identificar un grupo de individuos con una elevada mortalidad por sepsis⁴⁴.

Otros polimorfismos de interés

Enzima de conversión de la angiotensina. La inserción/delección de 250 pares de bases en el gen de la enzima de conversión de la angiotensina (ACE-DD) se asocia con concentraciones disminuidas de bradicinina y sustancia P, lo que disminuye el reflejo tusígeno e incrementa el riesgo de aspiración. Se ha descrito que el alelo ACE-D es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de neumonía en pacientes ancianos⁴⁵.

Proteínas del surfactante. Las proteínas del surfactante (SP) son miembros de la familia de las colectinas secretadas por los neumocitos tipo II. Durante las infecciones pulmonares agudas estas moléculas de la inmunidad innata pueden destruir los microorganismos, opsonizar y/o estimular su fagocitosis y modular la inflamación pulmonar. Se conocen distintos polimorfismos en los genes de SP-A, B, C y D. El genotipo SP-B +1580 CC supone una variación timina/citosina en la posición 1580 en el exón 4, lo que condiciona un cambio de treonina a isoleucina en la cadena de aminoácidos de la proteína y determina una disminución de SP-B funcional. Recientemente se ha demostrado una relación significativa entre este SNP y el riesgo de shock séptico e insuficiencia respiratoria en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad⁴⁶.

Proteínas de la coagulación. Inflamación y coagulación están íntimamente relacionadas. El factor tisular, producido por la adhesión de neutrófilos y por la lesión celular, activa la cascada de la coagulación y estimula la

respuesta inflamatoria. La proteína C activada inhibe este proceso a diferentes niveles y existen mutaciones en el gen que la codifica que pueden determinar el riesgo de desarrollar una coagulación intravascular diseminada. También se ha estudiado un polimorfismo muy prevalente del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1, cuyos títulos elevados en suero determinan un estado de hipercoagulabilidad. Los individuos homocigotos para la ausencia de una guanina adicional (4G) tienen unas concentraciones de dicho inhibidor más elevadas que los heterocigotos o con otros SNP, y presentan un riesgo mayor de desarrollar shock séptico y de muerte en ciertas infecciones⁴⁷. Otro SNP, esta vez en el gen del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (*TAFI Thr325Ile*), también se ha relacionado con mala evolución en algunas infecciones⁴⁸.

Futuro de los estudios genéticos en infecciones

La creciente disponibilidad de datos sobre SNP en el GH¹⁷ y la gran diversidad de fenotipos clínicos con los que podrían estar relacionados ha estimulado la aparición de multitud de estudios de asociación entre polimorfismos de genes candidatos y distintos fenotipos de enfermedades comunes. Sin embargo, los estudios observacionales no pueden establecer las causas de las enfermedades con razonable seguridad y pronto se ha hecho evidente que muy pocas de las asociaciones publicadas han podido ser inequívocamente reproducidas por otros investigadores y que, habitualmente, la primera publicación en la que se describe una asociación genética es, en el mejor de los casos, extraordinariamente optimista respecto a la contribución real del polimorfismo a la susceptibilidad de la enfermedad. No obstante, aunque los resultados obtenidos en los estudios antes mencionados no prueban de forma irrefutable el papel o la función de un gen en la patogenia de la infección respiratoria, permiten generar nuevas hipótesis, apuntan a nuevos genes candidatos sobre la base de su papel en la respuesta inflamatoria y proporcionan el primer paso en la comprensión de los factores genéticos subyacentes.

El futuro inmediato de los estudios de asociación genética en enfermedades infecciosas continuará con diseños de casos y controles metodológicamente estrictos²³. También se profundizará en los rastreos genómicos mediante el empleo de micromatrices (*microarrays*). Aunque esta estrategia implica retos adicionales, tanto teóricos como técnicos, se espera que con ella se puedan superar muchos de los inconvenientes que se derivan de estudiar por separado los polimorfismos de cada gen candidato⁴⁹. El empleo de micromatrices también será de gran interés en el análisis de la expresión diferencial de genes en sepsis experimentales en animales. De esta manera se podrán seleccionar genes candidatos para estudios de asociación en humanos y se profundizará en la identificación de los acontecimientos moleculares esenciales que precisa un patógeno para invadir un huésped y los de éste para eliminarlo, lo que sin duda revolucionará el desarrollo de vacunas y antimicrobianos. Finalmente, el estudio de perfiles farmacogenéticos

específicos permitirá reconocer a pacientes con distintas posibilidades de responder a ciertos medicamentos y ajustar mejor el tratamiento antimicrobiano⁵⁰.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kwiatkowski D. Susceptibility to infection. *BMJ*. 2000;321:1061-5.
2. Winkelstein JA, Childs B. Why do some individuals have some more infections than others? *JAMA*. 2001;285:1348-9.
3. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2001;2:967-77.
4. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCR mice: mutations in TLR4 gene. *Science*. 1998;282:2085-8.
5. Lorentz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immunity*. 2000;69:6398-401.
6. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in IFN- γ gene disrupted mice. *J Exp Med*. 1993;178:2243-7.
7. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack the IFN- γ receptor have profoundly altered responses to infections with bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993;178:1435-40.
8. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 is crucial to development protective immunity mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med*. 1997;186:39-45.
9. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1941-9.
10. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, et al. A human IFN γ 1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet*. 1999;21:370-8.
11. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, et al. Low penetrance, broad resistance and favorable outcome of IL-12 receptor beta 1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med*. 2003;197:527-35.
12. Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005;203:38-47.
13. Dorman SE, Picard C, Lammas D, Heyne K, Van Dissel JT, Barretto R, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon γ receptor 1 deficiencies. *Lancet*. 2004;364:2113-21.
14. Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Resp Dis*. 1978;117:621-4.
15. Sorensen TIA, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med*. 1988;318:727-32.
16. Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine – a primer. *N Engl J Med*. 2002;347:1512-20.
17. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005;307:1072-9.
18. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:677-87.
19. De Gracia J, Mata F, Álvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:558-63.
20. Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*. 1954;1:290-4.
21. Kaprio J. Genetic epidemiology. *BMJ*. 2000;320:1257-9.
22. Dahlman I, Eaves I, Kosoy R, Morrison VA, Heward J, Gough SC, et al. Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet*. 2002;30:149-50.
23. Hall IP, Blakey JD. Genetic association studies in thorax. *Thorax*. 2005;60:357-9.
24. Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*. 2003;361:865-72.
25. The international HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426:789-96.

26. Wunderink RG, Waterer GW. Genetics of sepsis and pneumonia. *Curr Opin Crit Care*. 2003;9:384-9.
27. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. *Chest*. 2003;124:1103-15.
28. Waterer GW, Wunderink RG. Genetic susceptibility to pneumonia. *Clin Chest Med*. 2005;26:29-38.
29. Hubacek JA, Stuber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med*. 2001;29:557-61.
30. Barber RC, O'Keefe GE. Characterization of a single nucleotide polymorphism in the lipopolysaccharide binding protein and its association with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1316-20.
31. Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med*. 2002;30:969-73.
32. 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;33:638-44.
33. Qureshi ST, Medzhitov R. Receptores tipo Toll y patología humana. *Genes Immun*. 2003;4:87-94.
34. Sánchez E, Orozco G, Martín J. Toll-like receptors and human pathology. *Inmunología*. 2004;23:328-38.
35. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003;198:1563-72.
36. García-Saavedra A, Rodríguez de Castro F, Solé J, García-Laorden I, Caballero A, Marcos A, et al. Relación entre los polimorfismos de la MBL y la susceptibilidad y severidad de la neumonía adquirida en la comunidad. *Inmunología*. 2004;23 Supl 1:97.
37. Garred P, Strom J, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis*. 2003;188:1394-403.
38. O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS. The G→A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. *J Trauma*. 2002;52:817-25.
39. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1599-604.
40. Waterer GW, El Bahlwan L, Quasney MW, Zhang Q, Kessler LA, Wunderink RG. Heat shock protein 70-2+1267 AA homozygotes have an increased risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med*. 2003;31:1367-72.
41. Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, et al. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med*. 2002;30:32-7.
42. Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2002;30:2216-21.
43. Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, Bella A, Greene CM, McElvaney NG, et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2003;58:154-6.
44. Fang XM, Schroeder S, Hoeft A, Stuber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med*. 1999;27:1330-4.
45. Morimoto S, Okaishi K, Onishi M, Katsuya T, Yang J, Okuro M, et al. Deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene as a risk factor for pneumonia in elderly patients. *Am J Med*. 2002;112:89-94.
46. Quasney MW, Waterer GW, Dahmer MK, Kron GK, Zhang Q, Kessler LA, et al. Association between surfactant protein B + 1580 polymorphism and the risk of respiratory failure in adults with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med*. 2004;32:1115-9.
47. Westendorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet*. 1999;354:561-3.
48. Kremer Hovinga JA, Franco RF, Zago MA, Ten Cate H, Westendorp RG, Reitsma PH. A functional single nucleotide polymorphism in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene associates with outcome of meningococcal disease. *J Thromb Haemost*. 2004;2:54-7.
49. Liu ET, Karuturi KR. Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med*. 2004;350:1595-7.
50. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*. 2003;348:529-37.