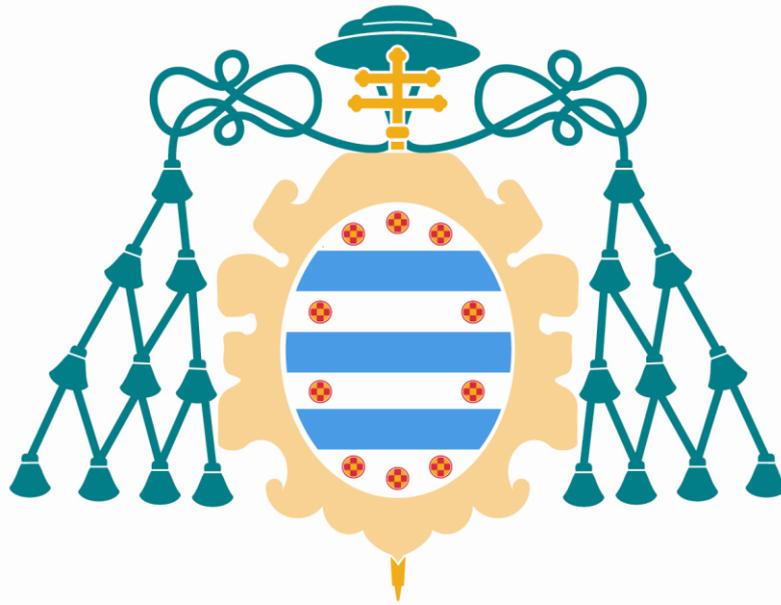


# Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: CLÍNICA MÉDICA**

**CITOQUINAS, METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y  
SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUS RESPECTIVOS POLIMORFISMOS EN  
EL PACIENTE SÉPTICO GRAVE**

**M GUADALUPE MARTÍN ORTIZ**



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: CLÍNICA MÉDICA**

**CITOQUINAS, METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y  
SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO Y SUS RESPECTIVOS POLIMORFISMOS EN  
EL PACIENTE SÉPTICO GRAVE**

**M GUADALUPE MARTÍN ORTIZ**



desarrollo de la sepsis y con su evolución. Diferentes SNPs de estas moléculas se asocian con sepsis al modificar sus niveles plasmáticos o por otros mecanismos no aclarados.

#### RESUMEN (en Inglés)

##### **Introduction**

The role of the immune system in the pathophysiology of sepsis (cytokines, neutrophils, monocytes, macrophages), is well documented, but the role of extracellular matrix metalloproteases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) is less known. MMPs are involved in the response to tissue injury and inflammation, and are stimulated by cytokines. Nitric oxide (NO), produced by cytokine-induced synthases (NOS), modulates susceptibility to sepsis and enhances the presence of sepsis-associated hemodynamic failure. Genetic variations (SNPs) of cytokines, MMPs and TIMPs and NOS might modify their transcription or expression and their plasma levels and might influence the response to the sepsis, patients' hemodynamics and mortality.

##### **Patients and Methods**

Our case-control prospective study was made in 90 patients with severe microbiologically demonstrated sepsis and 91 uninfected patients, all admitted at the Intensive Care Unit of the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). The aims of this study were to investigate the plasma levels of cytokines, MMPs, TIMPs and NOx (nitrates and nitrites) in septic and uninfected patients and their relationship with their SNPs, susceptibility to develop sepsis, sepsis-related organ failure and mortality.

##### **Results**

We found that: 1) *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A) SNP might protect against the development of sepsis; 2) Higher plasma IL-8 levels were predictors of sepsis and mortality; 3) MMP-13 (-77A/G) and MMP-1 (-1607 1G/2G) SNPs were associated with the presence of sepsis; 4) Increased plasma MMP-8 and decreased MMP-9 levels were associated with the presence of sepsis; 5) *NOS3* (E298D) SNP, that modifies plasma nitrite and nitrate levels (NOx) and the *NOS2A* (exon 22) SNP were associated with the presence of sepsis; 6) Increased NOx plasma levels were also associated with the presence of sepsis-associated hemodynamic failure and with increased mortality.



**Conclusions**

Changes in plasma levels of cytokines, MMPs and TIMPs and NOx are associated with the development of sepsis and its evolution. Different SNPs of these molecules are associated with sepsis by modifying their plasma levels or by other unknown mechanisms.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA



**A GOYO**



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado, directa o indirectamente, en la realización de esta Tesis.

En primer lugar a los directores de la misma bajo cuya dirección se ha realizado este Trabajo: la Dra. Eulalia Valle-Garay, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo, el Dr. Víctor Asensi Alvarez, profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo y médico adjunto del servicio de Medicina Interna del HUCA (Enfermedades Infecciosas), y el Dr. Francisco Taboada Costa, profesor jubilado de la Universidad de Oviedo y jefe del servicio de Medicina Intensiva en el que me formé como especialista y en el que trabajo en la actualidad.

Quiero resaltar con especial énfasis, la labor del Dr. Asensi, sin el cual, esta Tesis y las publicaciones derivadas de la misma, simplemente, no habrían sido posibles.

Al Dr. Angel- Hugo Montes Hernández por su continuada colaboración en el tiempo, tan valiosa como desinteresada, junto a la Dra. Eulalia Valle-Garay.

Al Dr. Julio Collazos del servicio de Enfermedades Infecciosas del hospital de Galdácano (Vizcaya) que con su contribución ha logrado dar el soporte estadístico imprescindible a nuestro trabajo.

A la Dra. Victoria Alvarez del laboratorio de Genética Molecular del HUCA.

A las enfermeras y auxiliares del servicio de Medicina Intensiva I del HUCA y a las supervisoras Nati y Begoña, que con su paciencia han contribuido a hacer de esta tesis una realidad.

A los pacientes, a sus familiares o sus representantes, en su caso, que han participado desinteresadamente en este estudio.

A mis amigas, algunas además compañeras de trabajo, sólo ellas saben quienes son.

A Ana, Laura y Eva.

Quiero tener un recuerdo muy especial para mis padres y abuela Irene que siempre creyeron en mi vocación.

A Gregorio Nieto, que si soy buena persona y mejor profesional es gracias a él. A Chispas que me está esperando.

## **ABREVIATURAS**

A	Adenina
ACCP	American College of Chest Physicians
ACV	Accidente cerebrovascular
ACTH	Hormona Corticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ALI	Injuria Pulmonar Aguda
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
AP-1	Proteína de activación 1
Arg	Arginina
ARN	Acido ribonucleico
Asp	Acido Aspártico
BGN	Bacilo Gramnegativo
BGP	Bacilo Gram positivo
bp	pares de bases
C	Citosina
CCR 5	C-C quemoquina receptora tipo 5
ECM	Matriz Extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FiO <sub>2</sub>	Fracción Inspiratoria de Oxígeno
HTA	Hipertensión Arterial
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IFN	Interferón
IC	Intervalo de confianza
IL	Interleukina, citoquina
Ile	Isoleucina
IQ	Intercuartil
IQR	Rango de Intercuartílico
G	Guanina
Glu	Acido Glutámico
Gly	Glicina
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
GPI	Glicofosfatidilinositol
Hpx	Hemopexina
LPB	Proteína de unión de LPS
LPS	Lipopolisacárido
LPT	Acido Lipoteicoico
LTA	Linfotoxina
MMP/MMPS	Metaloproteasa/s de la matriz extracelular
MCP-1	Proteína quimiocina de los monocitos
MODS	Síndrome de Disfunción Multiorgánica
MOF	Fallo Multirorgánico
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NOx	Nitrito/nitrato
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico

NF-KB	Factor nuclear kappa B
OR	Odds Ratio
PAF	Factor Activador de las Plaquetas
PAI	Inhibidor del Factor Tisular del Plasminógeno
PaO <sub>2</sub>	Presión Arterial de Oxígeno
PaCO <sub>2</sub>	Presión Arterial de CO <sub>2</sub>
PAR 1	Receptor 1 de la Proteasa Activada
PCR	Proteína C Reactiva
PCT	Procalcitonina
PMN	Polimorfonucleares
ROC	Receiver Operating Characteristics
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDRA	Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto
SIRS	Respuesta Inflamatoria Sistémica
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP/SNPs	Polimorfismo/s nuclear/es de un solo Nucleótido
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
T	Timidina
TAM	Tensión Arterial Media
TIMP/TIMPs	Inhibidor/es Tisular de las Metaloproteasas
Thr	Treonina
TLR	Receptores Tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TPA,tPA	Activador Tisular del Plasminógeno
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Val	Valina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VNTR	Número Variable de Repeticiones en Tándem

## ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1. Definición de sepsis y reseña histórica.....	1
2. Epidemiología.....	7
3. Fisiopatología.....	12
4. Polimorfismos genéticos y sepsis.....	27
OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Pacientes y controles.....	46
2. Consentimiento informado.....	48
3. Recopilación de datos, extracción y tratamiento de muestras.....	49
4. Análisis genético.....	52
5. Estudio de genotipos de los SNPs.....	53
6. Niveles séricos de citoquinas, MMPs y TIMPs.....	72
7. Niveles séricos de nitratos y nitritos.....	72
8. Análisis estadístico.....	73
RESULTADOS.....	75
1. Citoquinas:	
Niveles plasmáticos.....	79
SNPs.....	80
Time course.....	84
Análisis multivariante.....	85
2. Metaloproteasas:	
Niveles plasmáticos.....	87
SNPs.....	87
Time course.....	90
Análisis multivariante.....	92
3. Oxido nítrico:	
Niveles plasmáticos y SNPs.....	93
Time course.....	98
Expresión del gen de NOS 2A por los neutrófi- los de sangre periférica.....	99
Análisis multivariante.....	99
Curvas ROC para NOx en relación con sepsis, Fallo hemodinámico y pronóstico.....	101
4. Polimorfismos genéticos de los receptores TLR2, TLR 4, CD14, CCR5, TPA y PAI.....	102

DISCUSIÓN	
1. Citoquinas.....	105
2. Metaloproteasas.....	111
3. Óxido nítrico.....	117
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	129
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....	163

## INTRODUCCIÓN

### 1. DEFINICIÓN DE SEPSIS Y RESEÑA HISTÓRICA

La sepsis es la respuesta inmunológica del organismo frente a la invasión de un agente infeccioso o sus toxinas. Se caracteriza por la presencia de los signos cardinales de la inflamación (vasodilatación, acumulación de leucocitos, incremento de la permeabilidad vascular) a nivel de órganos distales al foco de la infección.

El objetivo de esta respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es el control de la infección en el lugar donde se originó, pero si es excesiva o inadecuada, produce una liberación masiva de mediadores inflamatorios y activación de las células del sistema inmune, provocando la lesión tisular en los distintos órganos. Como resultado surge la disfunción de los órganos (MODS o síndrome de disfunción multiorgánica) que si progresa, evoluciona hacia el fallo multiorgánico (MOF), una situación de extrema gravedad con una elevada mortalidad.

La palabra sepsis, etimológicamente procede del griego σηπεΐν = sepein que significa “pudrir”, término acuñado en el siglo XIX tras los estudios de Pasteur y Koch para definir “la descomposición de un animal o vegetal en presencia de bacterias”. Sin embargo, las primeras descripciones conocidas de la enfermedad datan de Hipócrates de Cos (460-370 a.C.) que, en su *Corpus Hippocraticum*, se refirió a un “cuadro de frialdad de extremidades y sudor frío tras una enfermedad aguda febril”

[1]. Ya en ese tiempo se reconocía la existencia signos de hipoperfusión tisular como una situación especialmente grave.

Galeno (129-199 d.C.), médico de origen griego y considerado una autoridad en Medicina, describió las manifestaciones de la inflamación aguda: “rubor, calor, dolor y tumor” a lo que Celso añadió “pérdida de función” [2].

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), un comerciante de telas holandés, fue el primero que describió y dibujó los microorganismos que observó a través de un microscopio de su invención [3]. Pero no fue hasta el siglo XIX, cuando Louis Pasteur (1822-1895) que, en su Germ Theory presentada en 1878 en la Academia Francesa de Medicina, mostró la asociación de la descomposición de la sustancia orgánica con la presencia de microorganismos y, según la cual toda enfermedad infecciosa es secundaria a un germen con capacidad para propagarse entre personas [3]. Robert Koch (1843-1910) demostró en 1876 que una pequeña partícula viva, que él denominó bacilo, podía causar una enfermedad infecciosa concreta. En 1882 publicó su informe, al que añadió sus famosos postulados, para demostrar que determinados microorganismos están relacionados con enfermedades concretas [4].

Fue René Laennec (1781-1826), inventor del estetoscopio, quién por primera vez en 1831, propuso la sepsis como una causa de shock [3]. En 1934 Alfred Blalock propuso la clasificación de shock en 4 categorías: hipovolémico (hemorrágico), cardiogénico,

neurogénico (secundario a lesión espinal) y vasogénico (con la sepsis como causa principal) [3].

Con respecto a la respuesta del huésped, Elie Metchnikoff (1845-1916) fue el primero que describió la inmunidad innata de las células mieloides en el siglo XIX. Él y sus colegas del Instituto Pasteur confirmaron la fagocitosis por los neutrófilos y macrófagos como una parte esencial de la respuesta innata inmune [5]. Desarrolló el concepto de inmunidad celular, aunque Osner y otros, antes que él, habían observado la fagocitosis [5]. Emil von Behring (1854-1917) y Paul Ehrlich (1854-1915), que trabajaron en el laboratorio Koch en Berlín, encontraron que elementos séricos podían evitar la muerte derivada de la acción de las toxinas bacterianas incluyendo el tétanos y la difteria [5]. Esta es la base de la inmunidad humoral desarrollada por el grupo de Koch y el de Emil Roux (1853-1933) en el Instituto Pasteur. Desde entonces, han sido múltiples los avances que nos han llevado a un mayor conocimiento de esta patología.

Ha sido necesaria la Conferencia Consenso de la ACCP (American College of Chest Physicians) y la SCCM (Society of Critical Care Medicine) [6] celebradas en 1991 para establecer las definiciones de los síndromes sépticos y los criterios diagnósticos de los mismos. De esta forma se definió:

- **Infeción** como el proceso patológico causado por la invasión de tejido, líquido o cavidad corporal por un microorganismo patógeno o potencialmente patógeno.

- **Respuesta inflamatoria sistémica** queda definida por la presencia de dos o más de los siguientes criterios:
  - Temperatura corporal mayor de 38°C o menor de 36°C.
  - Frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto.
  - Frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto, o PaCO<sub>2</sub> menor. de 32mmHg.
  - Recuento de leucocitos mayor de 12.000 por mm<sup>3</sup>, menor de 4.000 por mm<sup>3</sup> o presencia de más del 10% de formas inmaduras.
  
- **Sepsis** es la respuesta inflamatoria sistémica provocada por un proceso infeccioso.
  
- **Sepsis severa** es una sepsis que se acompaña de disfunción orgánica. Los criterios para definir el estado de disfunción orgánica que se aceptaron son los desarrollados por Marshall (tabla 1)[7] o bien el SOFA score o puntuación (Sequential Organ Failure Assessment) (tabla 2)[8].
  
- **Shock séptico** consiste en un estado de fallo circulatorio agudo el cual se define por hipotensión persistente que únicamente se explica por una sepsis. La hipotensión persistente se define como una TAS menor de 90mmHg, una TAM menor de 60mmHg o un descenso de la TAS mayor de

40mmHg con respecto a la basal, a pesar de una resucitación con fluidos endovenosos adecuada.

Tabla 1: Criterios de disfunción orgánica de Marshall [7]					
Órgano	Score (puntuación)				
	0	1	2	3	4
<b>Respiratorio</b> (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )	>300	226-300	151-225	76-150	≤75
<b>Renal</b> (creatinina sérica μmol/L)	≤100	101-200	201-350	351-500	>500
<b>Hepático</b> (Bilirrubina sérica μmol/L)	≤20	21-60	61-120	121-40	>240
<b>Cardiovascular</b> (PAR)	≤10	10,1-15	15,1-20	21,1-30	>30
<b>Hematológico</b> (plaquetas/ml 10 <sup>-3</sup> )	>120	81-120	51-80	21-50	≤20
<b>Neurológico</b> (Escala de Glasgow)	15	13-14	10-12	7-9	≤6

PAR = frecuencia cardíaca x presión venosa central / tensión arterial media  
 La escala de Glasgow en pacientes sedoanalgesiado, se asume como normal  
 Con un score o puntuación >20, la mortalidad predecible es de casi el 100%, entre 9 y 12 se corresponde con 25%, entre 13 y 16, 50%, entre 17 y 20 un 75%.

Tabla 2: SOFA score (puntuación) [8]				
	1	2	3	4
<b>Respiratorio</b> (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )	<400	<300	<200	<100
<b>Hematológico</b> (plaquetas/ml 10 <sup>-3</sup> )	<150	<100	<50	<20
<b>Hepático</b> (Bilirrubina mg/dl μmol/L)	1.2-1.9 20-32	2.0-5.9 33-100	6.0-11.9 102-204	>12 >204
<b>Cardiovascular</b> (hipotensión)	TAM<70mmHg	Dopamina≤5 o dobutamina	Dopamina >5 o epinefrina ≤0.1 o norepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 o epinefrina >0.1 o norepinefrina ≤0.1
<b>Neurológico</b> (Escala de Glasgow)	13-14		6-9	<6
<b>Renal</b> (creatinina μmol/L ó gasto urinario)	1.2-1.9 (110-170)	10-12 2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440) o <500ml/día	>5 (>440) o <200ml/día

Fármacos adrenérgicos durante al menos 1 hora (dosis en μg/kg/min)

Posteriormente, en el último consenso del 2001[9], se concluyó que no había motivo para cambiar estas definiciones, si bien se propuso expandir la lista de signos y síntomas de la sepsis (Tabla 3).

**Tabla 3: Criterios de Sepsis de la Conferencia Internacional (2001)**

<b>Infección documentada o sospechada y alguno de los siguientes parámetros</b>
<b>Variabes generales</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fiebre: T<sup>3</sup> mayor de 38,3°C</li> <li>• Hipotermia: T<sup>3</sup> menor de 36°C</li> <li>• Frecuencia cardíaca mayor de 90/min o por encima de 2 desviaciones estándar del valor normal para la edad</li> <li>• Taquipnea</li> <li>• Alteración del estado mental</li> <li>• Edema significativo o balance hídrico positivo (mayor de 20cc/kg en 24 horas)</li> <li>• Hiper glucemia ( mayor de 120mg/dl ó 7,7 mmol/L) en ausencia de diabetes</li> </ul>
<b>Variabes inflamatorias</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucocitosis ( mayor de 12.000 leucos/mm<sup>3</sup>)</li> <li>• Leucopenia ( menor de 4.000 leucos/mm<sup>3</sup>)</li> <li>• Cifra de leucocitos normal con un conteo de más de un 10% de formas inmaduras</li> <li>• Proteína C reactiva plasmática por encima de 2 desviaciones estándar del valor normal</li> <li>• Procalcitonina plasmática por encima de 2 desviaciones estándar del valor normal</li> </ul>
<b>Variabes hemodinámicas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotensión arterial: TAS &lt; 90mmHg, TAM &lt; 70 o un descenso mayor de 40mmHg en adultos o menor de 2 desviaciones estándar por debajo del valor normal para la edad</li> <li>• Saturación venosa mixta de oxígeno &gt; 70% (el valor normal de los niños oscila entre 75 y 80%)</li> <li>• Índice cardíaco mayor de 3,5 L/min/m<sup>3</sup> (en niños el valor normal está entre 3,5 y 5,5)</li> </ul>
<b>Variabes de disfunción orgánica</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipoxemia: PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 300</li> <li>• Oliguria aguda (gasto urinario &lt; 0,5ml/kg/h ó 45mmol/L al menos 2 horas)</li> <li>• Aumento de la creatinina por encima de 0,5mg/dl</li> <li>• Alteraciones de la coagulación: INR &gt; 1,5 ó PTTa &gt; 60s</li> <li>• Íleo: en ausencia de obstrucción intestinal</li> <li>• Trombocitopenia: recuento de plaquetas menor de 100.000/mm<sup>3</sup></li> <li>• Hiperbilirrubinemia: mayor de 4mg/dl ó 70 mmol/L</li> </ul>
<b>Variabes de perfusión tisular</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidosis láctica: &gt; 1 mmol/L</li> <li>• Disminución del llenado capilar o piel marmórea</li> </ul>

Asimismo se estableció un sistema de estadiaje, semejante al TNM para las enfermedades oncológicas, denominado PIRO, que estratifica a los pacientes en base a sus condiciones

predisponentes (patologías o tratamientos que predisponen a la infección, polimorfismos genéticos), la naturaleza y extensión de la infección, la magnitud de la respuesta del huésped y el grado de disfunción orgánica.

## **2. EPIDEMIOLOGÍA**

A pesar de los avances en prevención, diagnóstico y tratamiento, la sepsis grave se mantiene como un reto emergente para los clínicos y los sistemas de salud tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Su incidencia está en aumento y se ha convertido en la primera causa de muerte en las unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo la responsable, de más del 60% de los fallecimientos intraUCI [10]. La sepsis se cobra más vidas que el cáncer de mama e intestinal juntos y ya supera a las hospitalizaciones por infarto agudo de miocardio.

En Estados Unidos, Angus y col. [11] publicaron en el 2001, una incidencia de sepsis grave de 300 casos/100.000 habitantes-año con una mortalidad del 28,6%. Los estudios de Dombrovskiy y col. [12], entre 1993 y 2003, mostraron que el 2,15% de los pacientes hospitalizados presentaban sepsis, de los cuales el 34% eran sepsis grave. La incidencia estimada de sepsis en este estudio fue de 65 casos /100.000 hb. / año en 1993, que se duplicó en 2003 con 135 casos/100.000 hb. /año.

El estudio EPISEPSIS [13] en Francia mostró que un 14,6% de los enfermos ingresados en UCI presentaban sepsis severa. Un

estudio en el que participaron hospitales de Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte [14] estableció que el 27,1% de los pacientes ingresados en UCI tenían criterios de sepsis en las primeras 12-24 horas de su ingreso. En Noruega [15] los investigadores encontraron una incidencia de 1,49 casos/1.000 hb de los que el 31,8% eran sepsis graves. En Holanda [16] se ha publicado una incidencia anual de 0,054% de casos de sepsis entre la población (el 0,61% de ingresos hospitalarios y el 11% de los ingresos en UCI). El estudio SOAP [17] (Sepsis Occurrence in Acute Ill Patients) mostró que el 37% de los pacientes ingresados en UCI presentaron en algún momento sepsis, de los cuales el 30% eran sepsis grave y el 15% shock séptico.

En nuestro país un estudio observacional prospectivo realizado en el año 2003, en el que se recogieron durante un período de tres meses datos de enfermos ingresados en tres hospitales de Madrid [18] (con un área de atención de 580.000 habitantes), se encontró una incidencia de sepsis grave calculada de 104 casos/100.000 habitantes adultos/año con una mortalidad de 20,7%. La incidencia de shock séptico en este estudio fue de 31/100.000 hb/año con una mortalidad de 45,7%. Posteriormente el estudio G.R.E.C.I.A.[19] publicado en el año 2008, que recoge datos de UCIs de 13 hospitales de Castilla-León y Asturias, encontró que casi el 12% de los pacientes ingresados en UCI presentaban al menos un episodio de sepsis grave, lo que correspondería con una incidencia de 25

casos/100.000hab./año. La mortalidad intraUCI fue del 48,4% y la hospitalaria del 54,3%.

Se estima que la incidencia de sepsis se incrementa cada año, entre un 8 y 13% según estudios [12,20] manteniendo una mortalidad elevada. Los factores que contribuyen a esta situación son:

- El envejecimiento de la población, a menudo asociado a patologías crónicas y comorbilidades.
- El incremento de la supervivencia de los pacientes de UCI como son los que han sufrido un traumatismo severo o un infarto agudo de miocardio que son susceptibles a padecer infecciones durante su enfermedad.
- El incremento de procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos.
- El número creciente de condiciones causantes de inmunosupresión: SIDA, cáncer, fármacos inmunosupresores.
- La presencia de un agente causante: la existencia o no de cultivos no influye en la mortalidad, pero sólo un 50% de pacientes con sepsis grave presentan bacteriemia demostrada. La infección nosocomial presenta una mayor mortalidad, así como la infección por microorganismos resistentes como los

*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MARSA,) los hongos y *Pseudomonas spp.*

- El tratamiento antibiótico tiene un papel poco claro aunque algunos estudios han demostrado que el tratamiento empírico apropiado influye en el pronóstico de la sepsis.

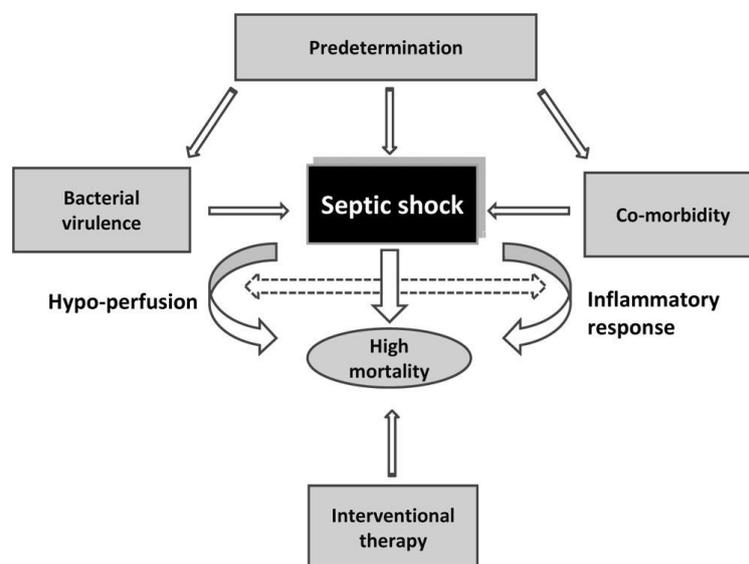


Fig. 1: Diagrama tomado de: The future is predetermined in severe sepsis, so what are the implications? Lukaszewicz AC, Payen D [21].

La incidencia de sepsis grave en la Unión Europea ha sido estimada recientemente en 90,4 casos /100.000 hb. La incidencia de pacientes con sepsis que requieren ingreso en UCI es de 0,25-0,38/1000 hb, lo que sugiere aproximadamente 2 millones de ingresos en UCI. Tras la “Surviving Sepsis Campaign”, una iniciativa de la European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), the International Sepsis Forum (ISF) y the Society of Critical Care Medicine (SCM) ideada para mejorar el diagnóstico

temprano de la sepsis así como el tratamiento con el fin de disminuir la mortalidad de estos enfermos, se concluyó que la sepsis, sepsis grave y el shock séptico permanecen como la mayor causa de morbi-mortalidad global, con una mortalidad para la sepsis grave más de 5 veces mayor que la del síndrome coronario agudo o el ictus. Tras dos años de seguimiento la mortalidad hospitalaria descendió del 37 al 30,8% [22].

Un estudio retrospectivo realizado en Nueva Zelanda sobre más de 100.000 pacientes con sepsis, entre 2000 y 2012, encuentra un descenso en la mortalidad global desde el 35% al 18,4% [24].

En España, los últimos datos publicados por la Sociedad de Medicina Intensiva (SEMICYUC) reflejan una incidencia de 360 personas con sepsis/100.000 habitantes, de los cuales 104 eran pacientes graves, y 31 estaban en shock séptico, con un incremento anual de un 12% de los casos de sepsis. Desde el punto de vista económico, la sepsis representa un coste de entre 17.000 y 19.000 euros/episodio. Además el estudio de la SEMICYUC mostró que fallecieron un 20% en los casos de sepsis grave, y un 45% de aquéllos que estaban en shock séptico, siendo los ancianos y los que presentaban un foco de infección abdominal los pacientes con mayor mortalidad.

### 3. FISIOPATOLOGÍA:

La sepsis se inicia cuando concentraciones elevadas de microorganismos o de sus antígenos pasan a la sangre; ésto ocurre cuando la población microbiana asentada en un punto de infección excede un umbral. El sistema inmune reconoce las moléculas extracelulares de los microorganismos y se activa la cascada inflamatoria. La molécula microbiana más conocida es la endotoxina o lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativas (BGN). Sin embargo, otras moléculas como el ácido lipoteicoico (LPT) de los grampositivos (BGP) o el ergosterol de la pared de las levaduras, son capaces de activar el sistema inmune[25].

**Activación de los macrófagos:** La primera línea celular del sistema inmune la constituyen los monocitos y los macrófagos, identificando, procesando y presentando el antígeno al receptor CD14. Además, pueden fagocitar al agente extraño y expresar una gran variedad de moléculas que estimulan la internalización del elemento extraño cubierto de anticuerpos.

El **CD14** es el receptor del LPS mejor caracterizado. Existen dos formas de CD14: una forma soluble (sCD14) y una situada en la membrana de monocitos y macrófagos (mCD14). El sCD14, glicoproteína de 53KDa, está presente en el suero normal y su función es la de transporte y transferencia del LPS y del complejo LPS-LPB. La LPB (LPS Binding Protein) es una

glicoproteína sintetizada en el hígado que se une al LPS y lo transporta hasta los receptores celulares[25,26,27].

El mCD14 es una glicoproteína de 55KDa cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 5 y se expresa en macrófagos y neutrófilos (PMN) activados. El mCD14 actúa como receptor del complejo LPS-LPB induciendo la transcripción de citoquinas en el macrófago. El CD14 también participa en el reconocimiento de los componentes de pared de los BGP como el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico, y actúa como mediador en la apoptosis del macrófago. La expresión del CD14 está modulada por la interleukina 6 (IL6) y por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) que incrementan su producción, así como por la interleukina 4 (IL4) y el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) que la disminuyen.

Los **toll-like receptors** (TLR) son receptores transmembrana responsables del reconocimiento de una gran variedad de antígenos bacterianos. El receptor Toll es una molécula asociada a mecanismos de diferenciación y defensa de *Drosophila*. En mamíferos, su homólogo es la familia de proteínas Toll-like de los cuáles, hasta la fecha, se han identificado 10 en la especie humana. El receptor TLR4 es el receptor del LPS, se encuentra en la superficie de los monocitos, PMN y células endoteliales. El receptor TLR2, aunque con menor expresión, también media en la respuesta frente a los BGN, y se encuentra en la superficie de los monocitos y PMN. El receptor TLR2 es capaz de detectar un

repertorio amplio de patógenos, reconoce las estructuras de pared de los BGP como los peptidoglicanos, aunque también media la respuesta a lipoproteínas derivadas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* y *Mycoplasma fermentans*, así como al LPS de *Leptospira interrogans*[24], virus y hongos[28].

Los receptores TLR2 y TLR4 reconocen el complejo formado por LPS-LPB con el receptor CD14 e inician una serie de reacciones en el citoplasma que resultan en la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)[24]. Se unen al NF- $\kappa$ B produciendo su activación y migración al núcleo celular donde se unirá a secuencias específicas de DNA localizadas en regiones promotoras y activará la expresión de los genes responsables de la síntesis de las citoquinas. Las citoquinas, una vez secretadas, ejercen sus efectos a través de sus receptores celulares en los tejidos diana, iniciándose una respuesta inmunológica compleja.

Ésta es la vía por la cual las células inflamatorias detectan la presencia del agente infeccioso a través de sus receptores de superficie. Además, el NF- $\kappa$ B juega un papel importante en la apoptosis, al modular la expresión de los genes que regulan la muerte celular[28].

#### **Principales mediadores inflamatorios:**

El TNF- $\alpha$  es una de las primeras citoquinas que aparecen en sangre tras la activación del macrófago. En pocos minutos se secretan grandes cantidades de TNF- $\alpha$ , de manera que se alcanza

un pico máximo en 1,5 a 2 horas, descendiendo en 12 a 24 horas. Esta citoquina está codificada por genes ubicados en el cromosoma 6 y sus efectos biológicos son múltiples:

- Induce la actividad antimicrobiana del monocito, estimulando la secreción de citoquinas y otros mediadores.
- Aumenta la producción de PMN y su marginalización.
- Activa el sistema del complemento y la cascada de la coagulación.
- Altera el tono vascular e incrementa la permeabilidad capilar, promoviendo la aparición de moléculas de adhesión en las células endoteliales.
- Estimula el catabolismo proteico y la gluconeogénesis
- Incrementa la señal de mediadores como prostaglandinas y factor activador de las plaquetas.
- Estimula la proliferación, apoptosis y diferenciación de los macrófagos.

Los genes que codifican la **interleukina 1** (IL1) están situados en el cromosoma 2. Esta citoquina está constituida por 3 polipéptidos estructuralmente relacionados. La IL1 $\alpha$  y la IL1 $\beta$  son biológicamente activas, pero la IL1 $\alpha$  permanece en el citosol en forma de precursor y es transportada como tal a la superficie celular donde ejerce su acción. La IL1 $\beta$  es liberada a

la circulación, sus efectos son similares a los del TNF $\alpha$  actuando sinérgicamente con él. Tiene las siguientes funciones:

- Es un potente pirógeno.
- Induce su propia producción y la de otras citocinas así como de otros mediadores como el factor activador de las plaquetas (PAF) y los eicosanoides.
- Aumenta la expresión de los genes de la colagenasa y fosfolipasas.
- Estimula la síntesis de óxido nítrico (NO).

La **interleukina 6** (IL6), producida por fibroblastos, monocitos, linfocitos y células endoteliales, es una citoquina con carácter básicamente antiinflamatorio:

- Es un pirógeno endógeno,
- Estimula la producción de ACTH por la hipófisis.
- Interviene en la diferenciación de los linfocitos B y en la producción de inmunoglobulinas, y en la activación de los linfocitos T.
- Modula la hematopoyesis.
- Induce la síntesis de reactantes de fase aguda por el hígado, incluyendo la proteína C reactiva (PCR).
- Atenúa la síntesis de mediadores proinflamatorios y la concentración plasmática de la IL6 se correlaciona con la gravedad de la sepsis más que otras citocinas.

La **interleukina 8** (IL8) es sintetizada en distintas células como fibroblastos, células endoteliales, monocitos, PMN y su función principal es la quimiotaxis y activación de los PMN. Además, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos produciendo una amplificación de la respuesta inflamatoria local y de la lesión tisular.

Las **interleukinas 12** (IL12) y **18** (IL18) son citoquinas proinflamatorias; la primera es el factor estimulador de células “natural killer” (NK) y la segunda es inductora del interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Ambas estimulan la producción y citotoxicidad de los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Sus acciones son promover la liberación de IL1 e IL6 por parte del macrófago y actúan sinérgicamente con el TNF $\alpha$ .

La **interleukina 10** (IL10) es el mediador antiinflamatorio por excelencia. La producen los linfocitos T, monocitos y macrófagos, y tiene las siguientes funciones;

- Inhibe la producción de citocinas, de radicales libres y NO por los macrófagos.
- Inhibe la proliferación de los linfocitos T helper dependientes de los monocitos.
- Inhibe la actividad procoagulante dependiente del factor tisular.

- Estimula la función de los linfocitos B, el desarrollo de linfocitos T citotóxicos y la producción de linfocitos y mastocitos.

#### **Las metaloproteasas (MMPs):**

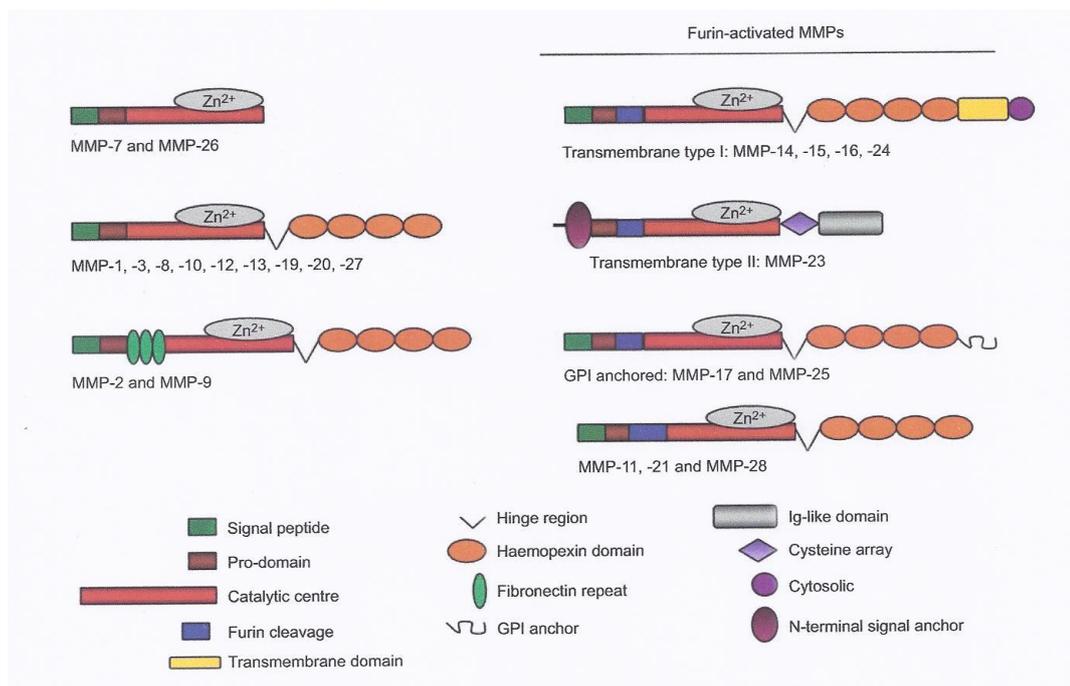
Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son una familia de endoproteasas zinc-dependientes que comparten secuencias de aminoácidos, dominios estructurales y sustratos. Inicialmente se pensó que su función principal era la remodelación y degradación de la matriz extracelular (ECM) del tejido conectivo. Están involucradas en la respuesta a la injuria tisular y la inflamación. Se secretan como proenzimas inactivas en respuesta a gran variedad de mediadores inflamatorios como las citoquinas. La sobreexpresión y activación de estas enzimas induce la reparación celular que se asocia con numerosas enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad periodontal, el cáncer, la insuficiencia cardíaca y la arterioesclerosis, se encuentran incrementadas en el Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto (SDRA) y en respuesta a la inyección de endotoxina. Las MMPs contribuyen a la homeostasis de diversos tejidos, regulan la liberación de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas participando en procesos como la inmunidad innata y adaptativa, angiogénesis, remodelación ósea y crecimiento neuronal. El incremento de la permeabilidad vascular

que producen al digerir el colágeno de la membrana basal vascular, facilita la migración de células inflamatorias incluyendo los PMN al foco de inflamación para la reparación tisular [31,32].

Se conocen, al menos, 25 MMPs en los vertebrados y se han encontrado 24 en humanos. La estructura típica de una MMP consta de un propéptido de aproximadamente 80 aminoácidos, un dominio catalítico de unos 170 aminoácidos, un péptido de unión de longitud variable y un dominio hemopexina (Hpx) de aproximadamente 200 aminoácidos. Además de estos dominios comunes en casi todas las MMPs, algunas van a presentar una serie de dominios adicionales como pueden ser el de anclaje a la membrana por medio de glicofosfatidilinositol (GPI) o los dominios transmembrana en el caso de las MMPs de membrana (MT-MMPs)[33]. Según la organización de los dominios y el sustrato sobre el que actúan las MMPs se clasifican en los siguientes grupos:

- Colagenasas (MMP1, MMP8 y MMP13).
- Gelatinasas (MMP2 y MMP9).
- Estromielisinas (MMP3, MMP10 y MMP11).
- Matrilisinas (MMP7 y MMP26).
- MMPs de membrana (MT-MMPs) que incluyen cuatro proteínas transmembrana tipo I (MMP14, MMP15, MMP16 y MMP24) y dos proteínas ancladas a la membrana por un residuo de GPI (MMP17 y MMP25).

- Existen otras siete MMPs que no pertenecen a ninguna de las categorías anteriores por tener actividades diferentes en el promotor por la presencia de sitios polimórficos. Se expresan fundamentalmente por macrófagos y son esenciales para su migración.



**Fig. 2: Estructura de MMPs, tomada de: Biological role of metalloproteinases: a critical balance. Loeffler KS, 2011 [31].**

Las MMPs generalmente son extracelulares, aunque recientemente se ha encontrado que la MMP1, la MMP2, y la MMP11 se encuentran también intracelularmente y pueden actuar sobre proteínas intracelulares. Otras MMPs, tales como la -8 y la -9, se almacenan en los neutrófilos y se liberan ante la presencia de endotoxina. Liberan citoquinas de unión a la membrana como la TNF- $\alpha$ . Su actividad va a depender tanto de la activación de estos zimógenos como de la influencia que tienen sobre ellas los

TIMPs (inhibidores tisulares de las MMPs). MMPs y TIMPs han sido implicados en el sistema coagulación/fibrinólisis así como en la función plaquetaria en la sepsis.

### **Oxido nítrico (NO)**

Es un radical libre que se sintetiza a partir del nitrógeno (N) de la guanina terminal del aminoácido L-arginina. Esta síntesis, mediada por el enzima sintasa del NO, se produce en una variedad de células como los macrófagos, PMN, plaquetas, células endoteliales y de la musculatura lisa [30].

Existen 3 isoformas conocidas de la sintasa del óxido nítrico (NOS)[35]:

- **NOS neural** (nNOS), también conocida como NOS1, bNOS o ncNOS, que es expresada por las neuronas, aunque también se encuentra en otras células como en los PMN, músculo esquelético, islotes pancreáticos, endotelio y epitelio del aparato respiratorio.
- **NOS inducible** (iNOS, NOS-2, macNOS, hepNOS), expresada por los macrófagos aunque también se ha observado en células musculares lisas, células endoteliales, hepatocitos y células del hueso.
- La **NOS endotelial** (eNOS, NOS-3, ecNOS) fue purificada y clonada en las células endoteliales aunque también es capaz de expresarse en ciertas poblaciones neuronales del cerebro, en plaquetas y otros tejidos como el hueso.

La iNOS es inducida por el LPS o citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ) a través del NF- $\kappa$ B y su actividad depende de varios cofactores (FADH, NADH).

El NO es un potente regulador del tono vascular, además es un agente citotóxico, actúa como un neurotransmisor, como antioxidante, y como modulador de la integridad de la microvasculatura y, por tanto, del transporte de oxígeno. Es responsable de muchas alteraciones fisiopatológicas que se producen en la sepsis entre las que citamos las siguientes:

- Relajación del músculo liso vascular, con la consiguiente vasodilatación que es la causa de la hipotensión e hiporreactividad frente a fármacos vasoconstrictores que se produce en la sepsis y que realiza mediante dos mecanismos:
  - Disminuye los niveles de calcio intracelular, aumenta la permeabilidad de los canales de K<sup>+</sup>, llevando a la hiperpolarización de la membrana plasmática y a la relajación de la fibra muscular lisa.
  - Activación de la proteinkinasa que produce defosforilación de las cadenas de miosina evitando la activación del complejo miosina/actina.

- Inhibe la agregación plaquetaria y leucocitaria al endotelio vascular y disminuye la permeabilidad vascular, evitando el paso de PMN a los tejidos.
- Disfunción miocárdica, sobre la que también influyen factores como el TNF  $\alpha$  , IL1  $\beta$ .
- El NO puede resultar tóxico, a concentraciones elevadas, para los macrófagos, células endoteliales y otras células, inhibiendo la respiración mitocondrial y la síntesis de ADN.

#### **Mediadores celulares:**

La activación del monocito-macrófago induce la síntesis de mediadores (citoquinas, factor activador de las plaquetas, eicosanoides), radicales libres de oxígeno, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y NO. El monocito-macrófago es una célula microbicida y citotóxica y su función inmune la realiza como presentadora de antígenos [28].

Los PMN tienen un doble papel en la sepsis [28]. Por un lado, estas células actúan sobre las bacterias en el foco de infección de manera que impiden la diseminación bacteriana, actúan como células inmunorreguladoras y son claves en la activación endotelial, en la producción de la lesión tisular y en el desarrollo del FMO. Los PMN aumentan las moléculas de adhesión en número y actividad, producen radicales libres, MMPs, citoquinas y proteínas con actividad antibacteriana.

## Activación del endotelio vascular y la cascada de la coagulación:

El endotelio vascular es la interfaz que separa la sangre de los tejidos, una estructura compleja y dinámica con múltiples funciones fisiológicas. La disfunción orgánica en la sepsis es consecuencia de su alteración provocando trastornos en la perfusión y en la producción de mediadores tóxicos [25,34].

Las modificaciones del endotelio vascular que se producen en la sepsis incluyen:

- Incremento de la permeabilidad capilar.
- Alteración de la adhesión leucocitaria reguladas por las moléculas de adhesión celular (diapédesis e infiltración celular).
- Alteración del tono vascular (vasodilatación periférica).
- Alteraciones de la coagulación (actividad procoagulante).

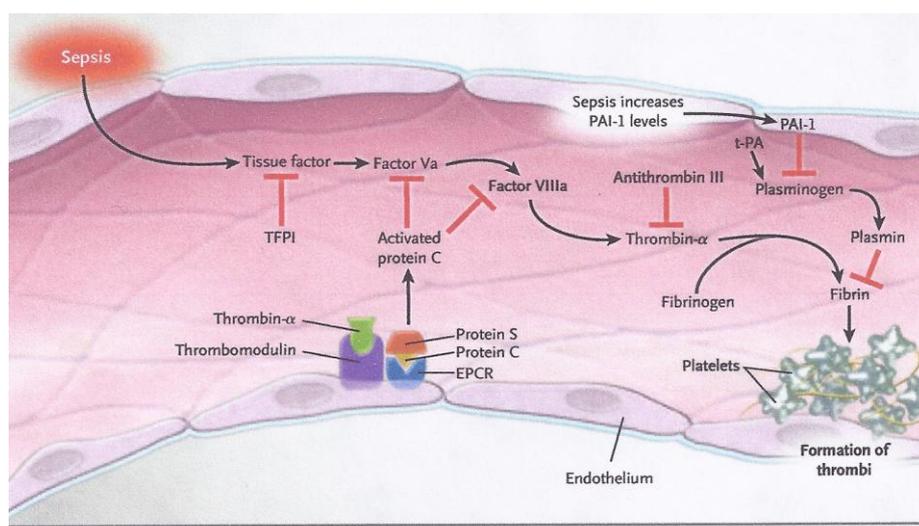


Fig. 3: Tomada de N Engl J Med: Drug Therapy:Management of Sepsis. J.A.Russell, 2006 [40].

Como consecuencia de la liberación de citoquinas, se estimula el reclutamiento de linfocitos, PMN, monocitos y otras células a áreas de la microvasculatura. La activación endotelial tiene un efecto esencial en la formación de la trombina. El endotelio vascular sintetiza y secreta factores de la cascada de la coagulación, particularmente el factor V, Xa y XIa, así como moléculas de unión para los factores VIIIa, Xa y XI, los cuales facilitan la formación del complejo protrombinasa. Adicionalmente el endotelio vascular produce el inhibidor del activador del plasminógeno, esencial en la inhibición de la fibrinólisis y en el proceso de disolución del trombo. El endotelio vascular también secreta citoquinas inflamatorias con lo que se amplifica la respuesta inflamatoria a nivel celular [36].

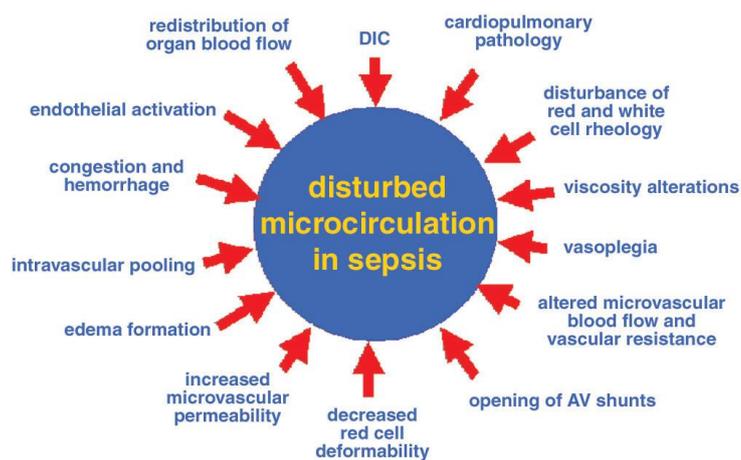


Fig. 4: Diagrama tomado de: Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. Spronk PE, 2004 [35].

**La apoptosis:** Término que se utiliza para designar la “muerte celular programada” [28,37], es un proceso rigurosamen-

te regulado por el cual las propias células dirigen su desactivación y eliminación de una manera ordenada sin reacción inflamatoria (a diferencia de lo que ocurre en la necrosis). Es el principal mecanismo por el cual las células senescentes o disfuncionales son eliminadas y finaliza el proceso inflamatorio una vez la infección ha remitido [35]. Monocitos y macrófagos juegan un papel fundamental en la reacción inicial y en la liberación de una variedad de citoquinas para liderar la respuesta inmune. Una vez que se contiene la agresión y/o la respuesta inmune específica despierta, las células inmunes innatas deben ser contrarreguladas y eliminarse en el momento adecuado y de forma no lesiva, porque algunas de ellas son “bombas de relojería”. Se ha sugerido que la apoptosis juega un papel fundamental en la duración y/o severidad de la respuesta sistémica a la sepsis.

La sepsis es el arquetipo ejemplo de sistema complejo autorregulado, con múltiples reacciones no lineales en cascada y retroalimentaciones (feedbacks). Desde los primeros estadios de la infección se produce la transducción de señales intracelulares que provocan la expresión de genes, con el consiguiente proceso de activación e incluso diferenciación celular en un tiempo relativamente corto. La amplificación de estas reacciones a nivel celular permite su expansión desde la fuente de infección a todo el organismo, hasta que son inhibidas

por el propio sistema inmune (citoquinas antiinflamatorias, inactivación de macrófagos, moléculas de degradación) [25].

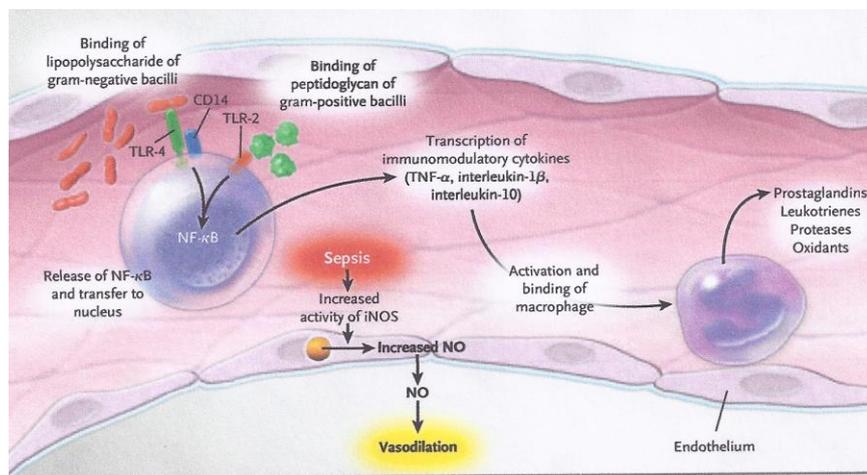


Fig. 5: Tomada de N Engl J Med: Drug Therapy:Management of Sepsis. J.A.Russell, 2006 [40].

#### 4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y SEPSIS

La sepsis es una patología muy heterogénea en lo que respecta a su presentación clínica, evolución y pronóstico. La gran variación en la respuesta a los tratamientos se ha atribuido a diversos factores como la virulencia del patógeno, el tiempo transcurrido desde el inicio del proceso hasta que se comienza con el tratamiento, el uso de una antibioterapia apropiada y el estado de inmunocompetencia del huésped. Sin embargo, merced a estudios realizados en modelos animales y a crecientes estudios observacionales en humanos, cada vez existe una mayor evidencia de la existencia de una predisposición genética a padecer sepsis, lo que ha motivado que en la última década se haya incrementado el interés por los genes implicados

en la respuesta inflamatoria a la infección y su papel en la misma.

Existen antecedentes tanto en modelos animales como en estudios en grupos étnicos, familias, así como gemelos y estudios en hijos adoptados. Estudios en modelos animales modificados genéticamente, como los realizados en los ratones denominados C3H/HeJ, los cuales son resistentes a la inoculación de una dosis de LPS normalmente letal, mostraron que el gen responsable de este defecto de señal al LPS estaba localizado en el cromosoma 5 (locus *lps*), el cual había sufrido una mutación espontánea. Este gen es el responsable de la codificación del TLR4, de manera que estos ratones no respondían al LPS [41]. En humanos se ha identificado una deficiencia similar.

Los primeros estudios en humanos, no encontraron diferencias atribuibles a genes al comparar la respuesta a diferentes agentes infecciosos entre gemelos monozigotos (genéticamente idénticos) y los dizigotos (sólo iguales genéticamente en un 50%), teniendo en cuenta que los factores ambientales eran similares. Pero el Prohit Survey Study [42] sobre tuberculosis mostró una diferencia clara entre en gemelos monozigotos y dizigotos. Se hicieron estudios similares para la lepra y virus de hepatitis B, VIH e infección por *Helicobacter pylori* cuyos resultados apoyaron la tesis de que estas infecciones, de gran prevalencia mundial como la tuberculosis o

la infección por el virus de la hepatitis B o endémicas como la lepra, están muy relacionadas con factores genéticos.

Para valorar la importancia del genotipo independientemente de los factores ambientales, Sorensen y colaboradores [43] realizaron un análisis sobre las causas de muerte prematura en 1000 familias con hijos adoptados. Estos autores encontraron que 1 hijo cuyo padre biológico había muerto antes de los 50 años de enfermedad infecciosa, tenía un riesgo relativo 5,8 veces mayor de morir de una infección, mientras que ésto no se observó cuando se trataba de hijos adoptados.

Con el conocimiento del mapa del genoma humano, se han iniciado estudios que han mostrado la existencia de factores genéticos implicados tanto en la predisposición a padecer una sepsis, como en la regulación de la respuesta inflamatoria desencadenada en cada una de sus fases (reconocimiento del patógeno, proceso de fagocitosis y eliminación del microorganismo, liberación de sustancias inflamatorias y antiinflamatorias). Entre dos individuos no relacionados genéticamente se comparten más del 99% de sus secuencias de ADN, lo que supone, de cualquier modo, que aún difieren en varios millones de bases. Estas variantes son las que se denominan “polimorfismos”. Así, se denomina polimorfismo genético a aquella región del genoma que varía entre los individuos de una población, con una frecuencia de más de un 1%, excluyendo las mutaciones espontáneas. Pueden ser secundarias a la sustitución,

delección o inserción de una o más pares de bases o afectar a un número variable de repeticiones de secuencias cortas de ADN. Los polimorfismos son mutaciones estables que se mantienen en la población general en un porcentaje significativo.

El más frecuente es el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) [44,45]. La mutación se puede presentar en regiones del gen que codifican una proteína (exón) o que no la codifican (intrón y promotor) las cuales pueden estar involucradas en la regulación de la expresión del gen. Cuando el SNP forma parte de una región que codifica una proteína, la variante alélica puede permitir la sustitución de un aminoácido, lo que origina la formación de una proteína funcionalmente alterada; un ejemplo es el caso de la anemia falciforme, en la cual la mutación del gen se traduce en la sustitución de una base timidina (T) por otra adenina (A) (GTG por GAG) en el codón del aminoácido ácido glutámico (Glu), lo cual hace que éste se sustituya por la valina (Val) en la posición  $\beta$ -6 de la cadena de la  $\beta$ globina y la hemoglobina anormal resultante es la hemoglobina S. Sin embargo, aquellos SNP que afectan a la región promotora (parte de un gen que contiene la información necesaria para activarlo o desactivarlo mediante el reconocimiento del inicio del gen por parte de los enzimas que realizan la transcripción) son también importantes, pues aunque no se modifica la estructura de la proteína, pueden afectar a los factores de unión de la transcripción y alterar la expresión de la proteína en respuesta a un estímulo.

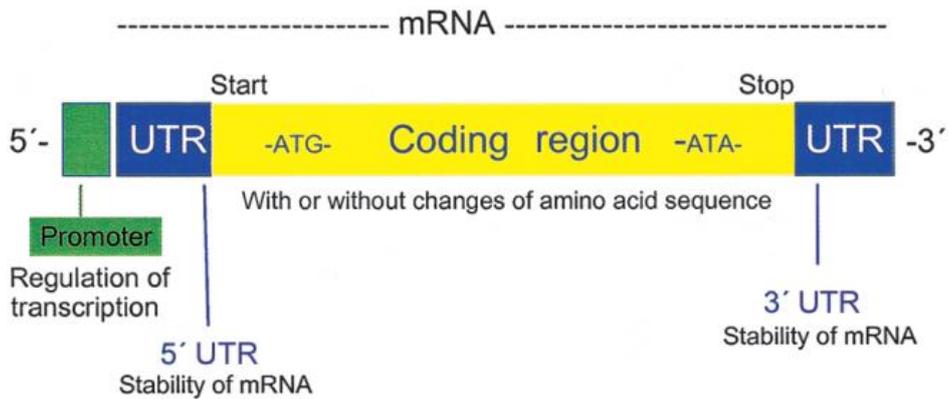


Fig. 6: Tomada de: Cytokine promotor polymorphism in severe sepsis. Stüber F, 2005 [43].

Los SNP más frecuentes son los situados en los intrones, seguidos de los que se producen en las regiones promotoras.

En el caso de la sepsis, la predisposición de una persona a tener una respuesta inflamatoria mayor o menor, está determinada por variantes genéticas de los mediadores inflamatorios. La liberación en mayor o menor proporción de mediadores determinada por los genes que los codifican, es la responsable de la variabilidad interindividual y puede contribuir al amplio rango de manifestaciones clínicas del SIRS ante una infección o agresión. Estudios epidemiológicos recientemente publicados han sugerido que las variables genéticas, especialmente los SNPs, en el sistema inmune innato pueden influir en el riesgo de padecer una infección grave.

Se han identificado los genes que codifican las distintas moléculas que intervienen en la sepsis como las citoquinas, los receptores toll-like (TLR) y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) así como sus niveles de expresión.

El gen que codifica el receptor CD14 se encuentra en el cromosoma 5, y la secuencia promotora del CD14 está localizada en el locus 5q31.1 [46]. El SNP que resulta de la sustitución de la timidina (T) por la citosina (C) en la posición 159 interviene como modulador de los niveles de sCD14 [47] de modo que, los homocigotos T tienen mayores niveles de sCD14 circulante y mayor densidad de mCD14. El incremento en la concentración sérica de sCD14 se ha identificado como un marcador pronóstico en la sepsis grave por BGN [48,49]. Este polimorfismo ha sido motivo de diversos ensayos con resultados contradictorios en lo que respecta tanto a la susceptibilidad de padecer sepsis grave como de influir en su pronóstico. Así Sutherland [50] encontró que los genotipos TT y CT tenían una prevalencia mayor de sepsis por Gram negativos que los portadores del genotipo CC y Gibot [51] observó que los homocigotos TT tenían una mayor predisposición de padecer sepsis por BGN así como una mayor mortalidad. Esto contradice los hallazgos de Hubacek y Stübber [52] que no encontraron asociación entre este SNP con el riesgo de padecer sepsis, ni con el pronóstico de aquéllos que sufrían sepsis. Nakada [53] no encontró diferencias de este SNP entre pacientes séptico y no sépticos y tanto los estudios de Calvano, Lowry y Agenese [55], así como los de Jessen [56] no consiguieron demostrar una asociación con el riesgo de padecer una sepsis por BGN. Un estudio de Barber [57] en enfermos quemados con una superficie

corporal afectada de más del 15%, encontró que este SNP confería un mayor riesgo de padecer sepsis grave.

El gen del TLR 2 se encuentra localizado en el locus q32 del cromosoma 4 y está compuesto por 3 exones, de los que el 1º y el 2º son no codificantes [58]. Existe una mutación en un 3% de la población que consiste en la sustitución de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 2251 lo que ocasiona el cambio de arginina (Arg) por glicina (Gly) en la posición 753, en el dominio TIR de la posición C-terminal, repercutiendo en la señalización de la molécula al interior celular e incrementando el riesgo de padecer sepsis por BGP, en especial por estafilococo [59]. Se ha visto que este SNP, disminuye *in vitro* la capacidad de respuesta frente a *Borrelia burgdorferi* y a *Treponema pallidum*. También se ha mostrado, que afecta a la respuesta a péptidos bacterianos *in vitro*, pero no a LPS [59].

El TLR4 está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 9, en el locus q32-q33. Se han encontrado varios SNP, pero sólo dos se han relacionado con un mayor de riesgo de padecer sepsis: El *TLR4 Asp299Gly* que es la consecuencia de un cambio nucleotídico de una A por una G en el exón 4 del gen que codifica la molécula de TLR4, lo que ocasiona a su vez, la sustitución de aspártico (Asp) por Gly en la posición 299 de la secuencia proteica de este receptor [60]. La consecuencia es una alteración en el dominio extracelular del receptor que modula la

señal ocasionada por el LPS, alterando la respuesta celular al mismo.

Cuando se produce un cambio de C por T en la posición 1196 de este gen, el resultado es la sustitución de una treonina (Thr) por una isoleucina (Ile) en la posición 399 de la secuencia de aminoácidos (*TLR4 Thr399Ile*) que se encuentra también en el dominio extracelular del receptor.

A pesar de los prometedores resultados del estudio de Arbour [63], sobre estos SNPs en individuos que inhalaban LPS, los resultados de trabajos posteriores no han sido concluyentes. Mientras que algunos (Lorenz y Mira [64], Yuan [65]) sugirieron una relación entre estos SNPs y un incremento de susceptibilidad a la sepsis grave, otros (Ahrens [66], Feterowski [67]) no han confirmado estos resultados.

Posteriormente Lorenz y Mira [64] en su trabajo concluyen que existe una asociación, entre estos SNPs y mayor riesgo de shock séptico así como una mayor prevalencia de infección por Gram negativos. Barber [57] encontró que los pacientes quemados portadores del SNP Asp299Gly tenían un riesgo 1,8 veces mayor de sepsis grave. Calvano [68] no encontró diferencias entre los distintos genotipos y la respuesta inflamatoria resultante de la administración de LPS a sujetos sanos. Kumpf y col. [69] observaron un mayor riesgo de padecer infección grave en los portadores de SNPs del TLR4 (Asp299Gly y Thr399Ile) asociados con el SNP del TIRAP/Mal. Un reciente meta-análisis (Zhu [70])

concluye que no se ha podido demostrar hasta el momento una asociación fuerte entre estos SNPs y la susceptibilidad a padecer sepsis, por lo que se precisan más estudios.

Los SNPs más estudiados han sido los del TNF $\alpha$  describiéndose más de una docena, el mejor estudiado es el 308A/G, en la posición 308 (TNF- $\alpha$ -308 G/A) en la región promotora del gen que lo codifica, y que consiste en la sustitución de G (en el alelo común y también conocido por TNF1) por A (en el infrecuente o TNF2). Este cambio de bases modifica la expresión del gen, de manera que, aumenta su transcripción y se asocia con una mayor producción de TNF $\alpha$  [71,72]. Inicialmente se asoció con un pronóstico desfavorable en una variedad de infecciones (malaria[78], meningococemia [79], melioidosis, etc.), incluyendo el shock séptico [53,73,76]. Mira y col. [74] encontraron que los portadores de este SNP tenían un riesgo 3,7 veces mayor de muerte en el caso de sufrir una sepsis grave. Por el contrario, Stuber [80] y, posteriormente, otros autores en un estudio multicéntrico [81], no han podido reproducir estos hallazgos. Del mismo modo, Waterer [77] no ha encontrado una asociación significativa entre este SNP y un mayor riesgo de padecer neumonía comunitaria ni con el pronóstico de la misma.

En la posición -238 del promotor del gen del TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ -238G/A) existe otro polimorfismo resultante de la sustitución de una G por una A. El alelo -238A se asocia a niveles séricos bajos TNF $\alpha$  [83]. Tanto el SNP -308G/A como 238 G/A, aunque no se ha llegado

a demostrar una relación estadísticamente significativa, podrían tener una influencia en la severidad de la lepra multibacilar [84], pero no se ha encontrado asociación estadística entre estos SNP y un mayor riesgo de padecer tuberculosis [85].

Se han descrito dos SNPs en la región promotora +3953 y 511 de la IL-1 $\beta$ . Clínicamente se han asociado a un incremento de riesgo de muerte por infección meningocócica, pero no de shock séptico [86].

Aunque existen diversos polimorfismos en la región promotora del gen de la IL-6, que se encuentra en el cromosoma 7 (locus 7q 21.3-q22), sólo el localizado en la posición -174 de la región promotora ha sido evaluado en diversas situaciones clínicas. Se ha observado que la sustitución de G por C en esta posición, influye en la concentración de IL6 en plasma de manera que el alelo C la disminuye [87] y en el homocigoto GG la incrementa [88]. Se ha encontrado que el SNP -174 de IL6 (*IL6-174 G/C*) se asocia con mayor mortalidad en pacientes con sepsis [57,89], pero el grupo de Sutherland [90] no encontró una asociación de este SNP con mayor mortalidad en pacientes críticos. Un reciente estudio multicéntrico sobre 1246 pacientes con neumonía comunitaria realizado en España [91] también ha encontrado que el genotipo homocigoto GG protege de la gravedad de la sepsis (desarrollo de SDRA y FMO), y que proporciona una mayor supervivencia a los portadores del mismo.

Dentro de la vía fibrinolítica, el inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), una glicoproteína de 50KD de la familia de las serinproteasas cuya función es inhibir el plasminógeno tisular y la urokinasa, juega un papel importante en la patogénesis del fracaso multiorgánico en la sepsis. Existen 3 formas circulantes de PAI-1: activa, inactiva y latente. La PAI-1 es sintetizada por múltiples tipos celulares: hepatocitos, células endoteliales, plaquetas, adipocitos, miocitos cardíacos) [92]. Al eliminar el activador tisular del plasminógeno (tPA), los depósitos de fibrina en la microvasculatura, no se disuelven, resultando en un descenso en la perfusión tisular y contribuyendo al desarrollo del FMO. Es un gen altamente polimórfico, y de los SNPs relacionados con el mismo el 4G/5G en la región promotora 675 es el más estudiado. Una mayor concentración de PAI-1 en el BAL y plasma se asocian con peor pronóstico en pacientes con neumonía, injuria pulmonar aguda (ALI) y SDRA [93]. En una cohorte de pacientes con sepsis [94], los niveles de PAI-1 se correlacionaron con una evolución menos favorable de la misma y desarrollo de enfermedad más grave. Se ha sugerido que la variación 4G/5G de la región promotora del gen que codifica (PAI-1) tiene un papel en una evolución desfavorable de la meningitis en niños [95,96,97,98], pero otros no han encontrado estos resultados [99]. Este polimorfismo del PAI-1 consiste en la inserción/delección de una base guanina en la posición 675 en la región promotora. Ambos

alelos 4G y 5G se unen al activador transcripcional, aunque el 5G también se une a la proteína inhibidora, por tanto reduciendo la transcripción, y asociándose a menores niveles de PAI-1. Binder [98] y Hermans [97]. mostraron una actividad plasmática significativamente mayor de PAI-1 en homocigotos 4G4G. Yende y Angus [100] en un estudio sobre neumonía comunitaria en ancianos, encontraron que los portadores de los genotipos 4G/4G y 4G/5G tenían unos niveles plasmáticos de PAI-1 más elevados y mayor susceptibilidad de padecer la infección pulmonar, pero esto sólo se observó en los pacientes caucásicos. El estudio de García-Segarra [102] sobre enfermos que sufrían shock séptico en las primeras 48 horas de su ingreso en UCI, mostró que los homocigotos 4G/4G presentaban mayor gravedad, sufrían con más frecuencia FMO y tenían mayor mortalidad, relacionándolo con el estado de hipercoagulabilidad secundario a la inhibición de la fibrinólisis por el PAI-1. El mismo resultado encontró Westendorp [103] que observó un riesgo 6 veces mayor de padecer shock séptico en homocigotos 4G4G para este polimorfismo del PAI-1.

En lo que respecta a la sintasa de óxido nítrico, existen pocos estudios que la relacionen con la sepsis y su evolución. Se han descrito varios polimorfismos de NOS endotelial (NOS3) en los que, al menos 3 de ellos, se han asociado con cambios en los niveles de NO en sangre y con diferencias en la expresión de la proteína en respuesta a distintos estímulos. Los SNPs de NOS3

más importantes son el de 27 repeticiones de pares de bases en el intron 4 (*27-bp repeat, intron 4*), el 786T/C en la región promotora y el E298D en el exón 7. Estos polimorfismos están asociados con el riesgo de desarrollar diversas patologías como la enfermedad coronaria [104,105,106,107].

Varios polimorfismos de la NOS inducible (NOS2) tales como el microsatélite (CCTTT)<sub>n</sub> y (TAAA)<sub>n</sub>, 954G/C y 1173C/T en la región promotora y la sustitución de G/A en la posición 37498 en el exón 22 (iNOS22) están asociados con artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson y predisposición a padecer malaria y otras infecciones [104,105,106,107,108]. Asensi y col. [109] describen una asociación entre el SNP de NOS3 (*27-bp repeat, intron 4*) y riesgo de desarrollar osteomielitis bacteriana.

En el gen de la eNOS se han hallado varios polimorfismos, como el 894G/T en el exón 7, que supone una sustitución de Glu por Asp, el 786T/C, en la región promotora, así como el (*27-bp repeat intron 4*) que han sido asociados con patología cardiovascular como la HTA, ictus e IAM. Ma [110]] en su estudio mostró que el SNP 894G/T de la eNOS2, se asociaba con FMO y peor pronóstico en pacientes con sepsis grave, mientras que por el contrario no encontró la misma asociación con el SNP 786T/C. Los pacientes con el genotipo GT del SNP de 894 tenían un APACHEII y SOFA mayor, así como una mayor mortalidad a los 7 y 28 días en comparación con los homocigotos GG. Este SNP codifica una proteína con una capacidad de producción de NO disminuida lo que

puede contribuir a un descenso del flujo circulatorio en la microvasculatura y, por tanto, incrementar el riesgo de FMO. El hecho de no haber encontrado la misma relación con el SNP 786T/C lo atribuyen los autores a la menor frecuencia del mismo en asiáticos que en los caucasianos.

Huttunen y col.[111] mostraron en su estudio que los portadores del alelo T del 894G/T tenían mayor riesgo de hipotensión en las fases iniciales de la bacteriemia por *E. coli*, sugiriendo que este SNP puede contribuir al fallo circulatorio en pacientes con sepsis. Sólo los heterocigotos GT del SNP 894 de eNOS tenían un APACHE II y SOFA mayor que los portadores del genotipo GG (en su casuística no hay TT), el paso de sepsis a shock séptico era más rápido en ellos y tenían mayor mortalidad a los 7 y 28 días.

El gen de la metaloproteasa 1 (MMP1) se encuentra en el cromosoma 11 (11q22-q23) y consta de 10 exones. Se expresa principalmente *in vivo* durante la remodelación tisular fisiológica y patológica. Su expresión se va a ver inducida por una serie de citoquinas como el IFN- $\beta$  y  $\gamma$ , IL-1, -4, -5, -6, -8 y -10, hormonas y factores de crecimiento, mientras que su actividad proteolítica está controlada por medio de activadores e inhibidores como las  $\alpha$ -macroglobulinas y los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). Se ha descrito un polimorfismo que va a consistir en la inserción de una G en posición -1607 del promotor (rs1799750), lo que implica un aumento en la transcripción del gen y, por consiguiente, un incremento en la

producción de esta MMP. Este SNP se ha relacionado con enfermedad coronaria (Ye y col.,[112]) y con algunos tipos de cáncer (Nishioka y col. [113]).

Los SNPs MMP-3 1612 5A/6A, MMP-9 1562C/T y el MMP-13 77A/G, localizados en la región promotora de los genes de estas MMPs, están asociados fundamentalmente a mayor susceptibilidad de padecer enfermedad cardiovascular, cáncer, enfermedad reumática y otras condiciones como la endometriosis[114-120]. Solamente se han publicado 2 artículos sobre MMPs e infección, uno que relaciona el SNP de la MMP9 con la periodontitis [121] y, un segundo estudio, de nuestro grupo, en que asocia el SNP de la MMP-1 con la osteomielitis bacteriana. Los pacientes homocigotos 2G/2G del SNP MMP-1 1607 1G/2G tenían concentraciones séricas de MMP-1 más elevada y una probabilidad superior de padecer osteomielitis [122].

El gen de la *MMP13* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22.3) formando parte del mismo cluster que la *MMP1*. En el promotor de este gen existen dos SNPs, uno de ellos consiste en una sustitución de una A por una G en posición -77 del promotor del gen (rs2252070), el cual se ha asociado con aterosclerosis en la aorta abdominal en jóvenes de raza negra (Yoon y col. [120]).

La información genómica puede ser utilizada para identificar grupos de pacientes con riesgo elevado de desarrollar sepsis

severa y disfunción multiorgánica, así como aquellos que se pueden beneficiar de estrategias antimedidores (Frank Stüber [125]).

## OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia de los polimorfismos (SNPs) de los receptores TLR2 *Asp753Gln*, TLR4 *Asp299Gly*; *Thr399Ile* y CD14 *-159 C/T* en los pacientes con sepsis ingresados en la UCI polivalente del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) en comparación con la de pacientes ingresados en UCI con patologías no infecciosas. Correlacionar las frecuencias de dichos polimorfismos con el tipo de sepsis, el microorganismo causante de la misma, con su gravedad medida mediante APACHE II y fallos orgánicos, con el tiempo de estancia en UCI y con la mortalidad.
2. Determinar la frecuencia de los SNPs de la IL1 $\alpha$  *-889 C/T*, IL-1 $\beta$  *+3954 C/T*, IL6 *-174 G/C* y TNF $\alpha$  *-308 G/A*, *-238 G/A* en los pacientes con sepsis en comparación con la de pacientes ingresados en UCI con patologías no infecciosas. Correlacionar las frecuencias de dichos polimorfismos con el tipo de sepsis, con el microorganismo causante de la misma, con su gravedad medida mediante APACHE II y fallos orgánicos, con el tiempo de estancia en UCI y con la mortalidad.
3. Comparar los niveles de estas citoquinas (IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) en el suero con los diferentes SNPs de citoquinas de los pacientes tanto al ingreso como secuencialmente a los 3 y 7 días de estancia en UCI. Correlacionar los niveles de citoquinas con la evolución de los pacientes sépticos.

4. Determinar la frecuencia de los SNPs de las metaloproteasas *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-8* -799 C/T, *MMP-9* -1562 C/T, y *MMP-13* -77 A/G en los pacientes con sepsis en comparación con la de pacientes ingresados en UCI con patologías no infecciosas. Correlacionar las frecuencias de dichos SNPs con el tipo de sepsis, el microorganismo causante de la misma, con su gravedad medida mediante APACHE II y fallos orgánicos, con el tiempo de estancia en UCI y con la mortalidad.
5. Determinar los niveles de metaloproteasas de matriz extracelular (*MMP-1*, -2,-3,-8,-9,-10,-13) y sus inhibidores tisulares (*TIMP-1*, -2,-4) en el suero de los pacientes y de los controles tanto al ingreso como secuencialmente a los 3 y 7 días de estancia en UCI.
6. Correlacionar los niveles de las MMPs (-1,-3,-8,-9 y -13) en el suero de los pacientes tanto al ingreso como secuencialmente a los 3 y 7 días de estancia en UCI con los diferentes SNPs de las MMPs.
7. Determinar la frecuencia de los SNPs de la sintasa del óxido nítrico endotelial (*eNOS* o *NOS3*) VNTR 27-pb repeticiones, intrón 4; -786 T/C; E298D; e inducible (*iNOS* o *NOS2*) exón 22. Correlacionar las frecuencias de dichos SNPs con el tipo de sepsis, con el microorganismo causante de la misma, con su gravedad medida mediante APACHE II y fallos orgánicos, con el tiempo de estancia en UCI y con la mortalidad.

8. Comparar los niveles de NO en el suero con los diferentes SNPs de *NOS3* y *NOS2* de los pacientes tanto al ingreso como secuencialmente a los 3 y 7 días de estancia en UCI. Correlacionar los niveles de NO con la evolución de los pacientes sépticos.

**HIPÓTESIS:**

Alguno de los diferentes SNPs de TLR, CD14, citoquinas, NOS y MMPs pueden facilitar el desarrollo de sepsis al alterar la liberación sérica de citoquinas, NO o MMPs y TIMPs o modificando la respuesta celular al LPS bacteriano.



## **MATERIAL Y METODOS**

### **1. Pacientes y controles.**

Hemos diseñado un estudio propectivo de casos y controles que incluyó los siguientes tipos de pacientes.

#### **• Pacientes Objeto del Estudio:**

Enfermos ingresados en el servicio de Medicina Intensiva I del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) por sepsis reciente, es decir con un tiempo de evolución menor o igual a 72 horas y que cumplan:

- Bien la presencia de hemocultivos positivos para un microorganismo de significado patogénico,
- Bien, un foco infeccioso demostrado con positividad de otros líquidos biológicos (LCR, líquido pleural, peritoneal, lavado broncoalveolar, etc.).
- Clínica compatible con sepsis habiéndose descartado de forma definitiva durante el ingreso en UCI otras causas de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

La definición de sepsis se basa en los criterios previamente establecidos y reconocidos internacionalmente en la Conferencia-Consenso de *“The American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine”*.

Se excluyeron del estudio los pacientes encuadrados en las siguientes categorías: los menores de 18 años, pacientes con insuficiencia cardiaca clase III/IV, pacientes con insuficiencia hepática en estadio C de Child, con inmunosupresión (aplasia medular, VIH, tratamiento con esteroides sistémicos, cáncer, trasplantados), y pacientes embarazadas.

El servicio de Medicina Intensiva I del HUCA es una UCI polivalente que atiende a enfermos médicos y quirúrgicos a excepción de patología cardiológica ingresados en el HUCA. El HUCA, además de atender a la población del área sanitaria de Oviedo (unos 340.000 hb), es el hospital de referencia de Asturias (más de 1.081.000 hb.).

- **Controles:**

Enfermos ingresados en la UCI polivalente del HUCA que no hayan tenido un proceso séptico en el momento de ser incluidos en el estudio. Los controles han sido fundamentalmente pacientes politraumatizados no infectados o pacientes ingresados por patología neurológica o neuroquirúrgica. Por cada caso, se recogió un control procurando que fuera coincidente en el tiempo.

Tanto los pacientes como los controles fueron individuos de raza Caucásica residentes en Asturias, una región caracterizada por un escaso número de inmigrantes ( menos de 5% del total de la población) y por tanto los pacientes eran miembros de una población homogénea lo que facilitaba el equilibrio de Hardy-Weinberg para los diferentes SNPs estudiados (es decir, que en estos individuos las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación).

2. **Consentimiento Informado:** Para entrar en el estudio se solicitó previamente consentimiento informado al paciente, o bien a sus familiares directos o tutores, contando el estudio con la aprobación previa del Comité Ético del HUCA.

D./Dña. ...., en calidad  
de.....de.....,  
paciente ingresado en el servicio de Medicina Intensiva  
I del Hospital Central de Asturias, doy el  
consentimiento para que la Dra. Guadalupe Martín Ortiz  
realice estudios genéticos relacionados con  
enfermedades infecciosas.

Fdo.

Oviedo, a        de        de 200

### **3. Recopilación de datos, extracción, procesamiento y tratamiento de las muestras.**

Se recogieron los siguientes datos de cada paciente y control:

- Datos epidemiológicos (edad, sexo).
- Constantes generales incluyendo tensión arterial, frecuencia cardiaca y respiratoria, diuresis.
- Datos analíticos (hemograma, coagulación, gasometría, bioquímica general), resultado de hemocultivos y cultivos de otros líquidos biológicos
- Score de gravedad del paciente crítico (APACHE II), fallos orgánicos.
- Tratamientos antibióticos recibidos, soporte hemodinámico y respiratorio recibido.
- Días de estancia en UCI, complicaciones y evolución.

Además de estos datos para cada paciente y para cada control en el día del ingreso en la UCI procedimos a extraer 5 ml de sangre en tubo de tapón malva (con EDTA K3), para una posterior extracción de su ADN genómico, y 5 ml de sangre en tubo de tapón rojo (con gelosa) para obtener posteriormente su suero para determinar diversos compuestos en el mismo. El ADN y el suero extraídos se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

Hay que señalar que en un grupo adicional de pacientes y controles (n=15) se realizaron otras 2 extracciones de 5 ml de sangre en tubo de tapón rojo en días posteriores al ingreso (al tercer y séptimo día de estancia en la UCI) para medir la evolución secuencial de los niveles de citoquinas, NO, MMPs y TIMPs.

*El procesamiento y tratamiento de las muestras se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.*

### **Aislamiento de neutrófilos**

Para aislar estas células del sistema inmune tanto de pacientes como de controles a partir de sangre periférica realizamos el siguiente procedimiento:

1. Los 5 ml de sangre extraídos se recogieron en un tubo de plástico Vacutainer que contenía EDTA-K3E (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria).
2. La sangre se mezcló con un volumen igual de dextrano salino (3% dextrano en NaCl al 0.9%) en un tubo de centrífuga de 50 ml, dejándola sedimentar en posición vertical 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Una vez separadas las dos fases se retiró la superior que fue sometida a centrifugación a 200 x g durante 10 minutos para posteriormente descartar el sobrenadante.
4. El precipitado se resuspendió inmediatamente en un volumen de NaCl al 0.9% igual al volumen de sangre de partida. Se dispuso un volumen de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway), cuatro veces menor que el volumen inicial de sangre, que se depositó con cuidado debajo de la suspensión celular. Toda la muestra se sometió a centrifugación a 380 xg sin freno durante 40 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante.
5. El sedimento que contenía eritrocitos y PMN se resuspendió en NaCl 0.2%, en un volumen que suponía el 50% del volumen de sangre inicial, durante exactamente 30 segundos.
6. Para restablecer la isotonicidad se añadió el mismo volumen de NaCl 1.6%. Se centrifugó a 200 x g durante 6

minutos y se descartó el sobrenadante, eliminando los eritrocitos.

7. Las células se resuspendieron en medio HAM'S F-12 (GIBCO, Paisley, Scotland, UK) y se determinó la concentración de PMN utilizando un contador automático Cell-Dyn® 3200 (Abbott, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA).

### **8. Extracción de ADN genómico**

Se extrajo el ADN tanto de pacientes como de controles siguiendo el procedimiento de precipitación salina descrito por Miller y Polesky (Miller y col., 1998), que consta de los siguientes pasos:

1) Obtener una muestra de 5 ml de sangre en tubos de plástico Vacutainer con EDTA K3 (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria).

2) Realizar la lisis de los eritrocitos: la sangre se mezcla en un tubo Falcon de 50 ml con un volumen igual de solución RBC (Red Cell Lysis Buffer:  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  114 mM, pH=7). Se incuba 10 min a 4° C y posteriormente se centrifuga 10 min a 470 x g. A continuación se elimina el sobrenadante y el precipitado celular se incuba durante 10 min a 4°C. Posteriormente se centrifuga 10 min a 2400 x g eliminándose el sobrenadante.

3) Realizar la lisis de leucocitos: el precipitado final (leucocitos) se resuspende en 9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 1 ml de SDS 10x y 400  $\mu\text{l}$  de ARNsa (20 mg/ml). Se incuba a 37° C durante 12 horas.

4) Eliminación de proteínas y otros restos orgánicos: las proteínas y restos celulares se precipitan por adición de 4 ml de NaCl 5 M, agitación energética y centrifugación a 470 x g durante 15 min.

5) Precipitación del ADN: el sobrenadante se trasvasa a un tubo limpio y el ADN se precipita por adicción de 2 volúmenes de etanol absoluto. La "medusa" de ADN se lava

con etanol al 70 % y se recoge en un tubo Eppendorf estéril. Se resuspende en H<sub>2</sub>O bidestilada durante 2 días a 4° C.

La concentración se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. Las muestras se conservaron a -70° C hasta su uso.

#### 4. Análisis genético

Para definir el genotipo de los distintos SNPs se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando una región genómica, mediante el uso de los primers o cebadores específicos, que contenía la secuencia polimórfica correspondiente (Fig. 7).

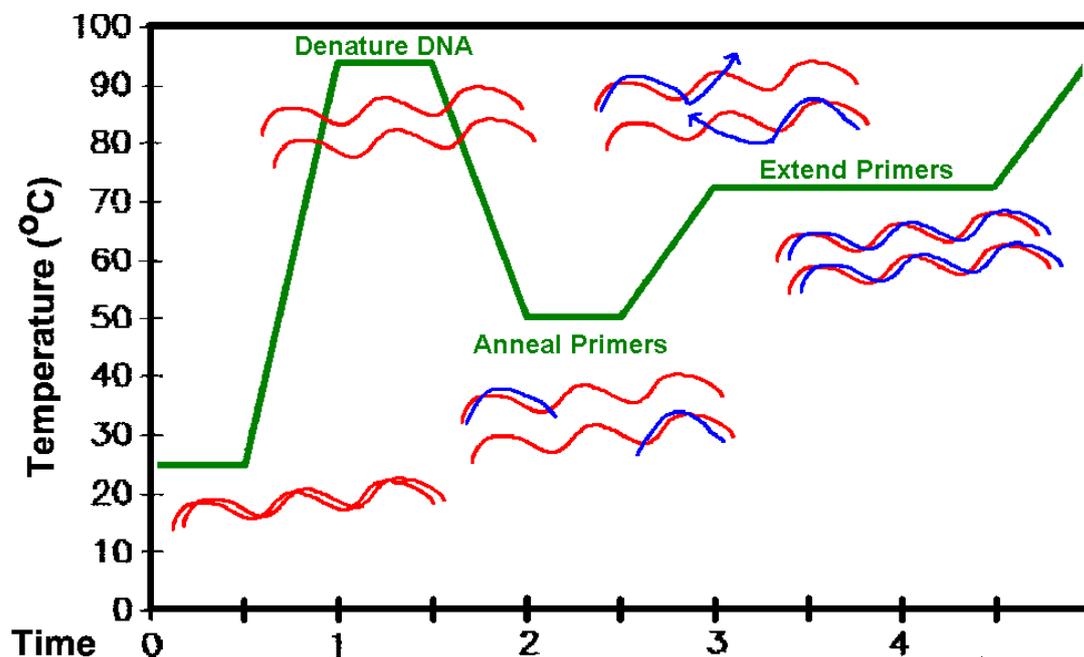


Fig. 7: Esquema de un ciclo de una PCR. (1) Temperatura de desnaturalización de una doble hebra de DNA(ADN). (2) Temperatura de hibridación de los primers o cebadores. (3) Temperatura que permite que la polimera extienda los primers.

Todas las reacciones de PCR se realizaron sobre un volumen total final de 17.5 µl. Cada reacción constaba de:

- 2 µl de tampón de reacción 10x [75 µM Tris HCl (pH=9.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.001% BSA].
- 2 µl dNTPs 2 mM
- 3 µl de ADN
- 1.5 µl de primers o cebadores
- 8 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada
- 1 µl Taq ADN polimerasa (Biotools, B&M Labs, S.A., Madrid, España)

Se amplificó cada fragmento mediante un número variable de ciclos y de temperatura de cebamiento según el tamaño y la composición de los cebadores. El producto de la amplificación se digirió con el enzima de restricción correspondiente en los casos en los que fue necesario, se incubó durante toda la noche según la temperatura requerida por el enzima. El producto de la digestión o de la amplificación fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% que contenía bromuro de etidio.

## 5. Estudio de los genotipos de los polimorfismos (SNPs)

### 5.1 Estudio de Los genotipos de Los polimorfismos de Los TLRs y del CD14

- En este trabajo analizamos, en primer lugar, el SNP del receptor TLR2, *TLR2 Asp753Gln*, que consiste en un cambio de una G por una A que provoca un cambio de Arg por Gln en posición 753 (rs5743708), siendo el tamaño final del

amplificado 260 pb, y que tras la digestión durante toda la noche con el **enzima de restricción Pst I** (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) proporciona unos fragmentos de 124+136 pb para el alelo A y de 260 pb para el alelo G de este SNP *TLR2 Arg753Gln*.

- Los dos SNPs del receptor TLR4 que estudiamos, ***TLR4 Asp299Gly*** y ***TLR4 Thr399Ile***, están en desequilibrio de ligamiento y. por tanto van a cosegregar juntos. El primero es un cambio de Asp por Gly en posición 299 (rs4986790), debido al cambio de una A por una G en posición 896, cuyo amplificado tiene un tamaño de 263 pb para el alelo pero que al producirse el cambio de base va a introducir un punto de corte para la digestión con el **enzima de restricción Nco I** (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) y proporciona los fragmentos de 222+41 pb para el alelo G del SNP *TLR4 Asp299Gly*, mientras que la presencia del alelo A no provoca corte por el enzima de restricción.

El segundo SNP estudiado para el TLR4 consiste en el cambio aminoacídico de Thr por Ile en posición 399 de la proteína debido a un cambio de C por T (rs5031050). El fragmento amplificado tiene un tamaño de 227 pb y tras la digestión con el enzima Msp I (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) el tamaño es de 203+24 pb para el alelo C del SNP *TLR4 Thr399Ile* mientras que la presencia del alelo T no provoca corte dando el fragmento de 227 pb.

- Por último, analizamos un polimorfismo presente en el promotor del gen CD14, ***CD14 -159 C/T (rs2569190)***, en el que ocurre un cambio de C por T en posición -159 del mismo, siendo el tamaño del amplificado de la PCR de 367 pb y tras la digestión con el **enzima de restricción Hae III** (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA)

proporciona fragmentos de 212+155 para el alelo C y de 367 pb para el alelo T del SNP *CD14 Cys-159Thr*.

Los cebadores y las condiciones de las diferentes reacciones de PCR para cada SNP se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Primers y condiciones de la PCR usados para analizar los SNPs relacionados con los TLRs y el CD14.

Gen	SPN	Primers	Tamaño (pb)	Tª(ann)	Enzima
TLR2	Arg753Gln	F: 5'-GAGTGGTGCAAGTATGAACTGGA-3'	260 pb	62º C	Pst I
		R: 5'-TCCCAACTAGACAAAGACTGGTCT-3'			
TLR4	Asp299Gly	F: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'	263 pb	58º C	Nco I
		R: 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'			
TLR4	Thr399Ile	F: 5'-TGGCAACATTTAGAATTAGTTAAC-3'	227 pb	52º C	Msp I
		R: 5'-CTCAGATCTAAATACTTTAGGCCG-3'			
CD14	-159 C/T	F: 5'-CCTAAGGCACTGAGGATCATC-3'	367 pb	60º C	Hae III
		R: 5'-GCTTTAGCTTCTTTCTACACAG-3'			

## 5.2 Estudio de los genotipos de los polimorfismos del *TNF-α*:

En el cromosoma 6p21.3 se encuentra el gen del *TNF-α*. En el promotor de este gen se analizaron los siguientes SNPs:

- En la posición -238 de este promotor existe un SNP que consiste en la sustitución de una G por una A (*TNF-α -238G/A*, rs361525). Para analizarlo se realizó una PCR en la que se utilizaron los primers Forward:

5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3' y Reverse: 5'-CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC-3' (Las bases subrayadas indican la introducción de un miss-match o emparejamiento erróneo necesario para la correcta unión del primer al DNA).

Tras realizar la PCR procedimos a digerir las muestras con el enzima de restricción Bam HI (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA) y las sometimos a electroforesis en gel de

agarosa al 3% obteniendo un fragmento de 155 pb en el caso del alelo A y dos fragmentos de 95 y 60 pb en el caso del alelo G del SNP del *TNF- $\alpha$*  -238 G/A al haber actuado el enzima de digestión.

- En este mismo promotor del gen del *TNF- $\alpha$*  existe otro SNP localizado en la posición -308 que consiste en la sustitución de una G por una A (*TNF- $\alpha$*  -308 G/A, rs1800629). Se analizó también mediante una PCR para la que usamos los siguientes primers: Forward: 5'-GCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' y Reverse: 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3' dando un producto amplificado de 147 pb que tras la digestión con el enzima de restricción Nco I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) y posterior visualización en gel de agarosa al 3 % dará dos fragmentos de 125+22 pb para el alelo *TNF- $\alpha$*  -308G, mientras que al no haber digestión al alelo *TNF- $\alpha$*  -308A le corresponde un fragmento de 147 pb.

Tabla 5: Primers o cebadores , enzimas y temperaturas de anillado usados para analizar diversos SNPs en el promotor del gen *TNF- $\alpha$* .

Gen	SNP	Primers	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> (anill.)	Enzima
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	-238 G/A	F: 5'- AAACAGACCACAGACCTGGTC -3' R: 5'- CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC -3'	155 pb	60° C	Bam HI
	-308 G/A	F: 5'- GCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3' R: 5'- GGGACACACAAGCATCAAG -3'	147 pb	58° C	Nco I

Las bases subrayadas indican la introducción de un miss-match o emparejamiento erróneo necesario para la correcta unión del primer al ADN

### 5.3 Estudio de Los genotipos de Los SNPs de Las citoquinas

Otra parte de la tesis consistió en analizar los SNPs presentes en los genes de una serie de citoquinas involucradas en la respuesta del sistema inmune.

- IL-1 $\alpha$ : en la posición -889 del promotor de su gen, se encuentra un SNP que consiste en una sustitución de una C por una T (*IL-1 $\alpha$  -889 C/T*, rs1800587). Los primers o cebadores utilizados fueron: en el caso de *IL-1 $\alpha$  889C/T* Forward: 5'-ATCACACCTAGTTCATTTCTCTATTTA-3' y Reverse:5'-GATTTTTACATATGA-GAGCCTTCCATG-3'.

Posteriormente procedimos a realizar la PCR y los productos de esta reacción fueron digeridos con el enzima de restricción Nco I (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA). Los productos de esta digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 3% obteniendo los fragmentos de 195 pb para el alelo T y de 116 y 29 pb para el alelo C del SNP *IL-1 $\alpha$  -889C/T*.

- IL-1 $\beta$ : en el gen de esta citoquina existe un SNP localizado en posición +3954 que consiste en un cambio de una C por una T (*IL-1 $\beta$  +3954 C/T*, rs1143634). En este caso los primers o cebadores utilizados fueron: FORWARD 5'- CTACAGGTGTCCTCCAAGAAATCAAA-3' y REVERSE 5'-GGGCACACAAGCATCAAG-3'. Tras amplificar el fragmento de ADN comprendido entre ambos mediante una PCR procedimos a digerir los productos de la misma con el enzima de restricción Taq<sup>α</sup> I (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA). Los fragmentos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 3% visualizándose un fragmento de 194 pb para el alelo T y de 109 y 95 pb para el alelo C del SNP *IL-1 $\beta$  +3954 C/T*.

•IL-6: en el promotor del gen de esta citoquina existe un SNP que consiste en un cambio de G por una C (*IL-6 -174 G/C*, rs1800795). Para analizar este SNP usamos los siguientes primers o cebadores : Forward: 5'-CACTTTTCCCCCTACTTGTGTCTT-TC-3' y Reverse: 5'-GACTCTAATATTGAGACTCATGGGA-3'. Tras la amplificación del fragmento de DNA comprendido entre estos dos primers mediante PCR procedimos a digerirlo usando el enzima de restricción Taq<sup>α</sup> I (New England Biolabs Inc, Beverly, MA, USA). Los fragmentos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 3% visualizándose un fragmento de 160 pb para el alelo C y dos fragmentos de 136 y 24 pb para el alelo G del SNP *IL-6 -174 G/C*.

**Tabla 6: Primers o cebadores, enzimas y temperaturas de anillado usados para analizar diversos SNPs en los genes de las citoquinas.**

Gen	SNP	Primers	Tamaño (pb)	T <sup>a</sup> (anill.)	Enzima
IL-1 $\alpha$	-889 C/T	F: 5'-ATCACACCTAGTTCATTCCTCTATTTA-3' R: 5'-GATTTTACATATGAGAGCCTCCATG-3'	195 pb	58 <sup>o</sup> C	Nco I
IL-1 $\beta$	+3954 C/T	F: 5'-CTACAGGTGTCCTCCAAGAAATCAAA-3' R: 5'-GGGCACACAAGCATCAAG-3'	194 pb	60 <sup>o</sup> C	Taq <sup>α</sup> I
IL-6	-174 G/C	F: 5'-CACTTTTCCCCCTACTTGTGTCTTTC-3' R: 5'-GACTCTAATATTGAGACTCATGGGA-3'	160 pb	55 <sup>o</sup> C	Taq <sup>α</sup> I

•IL-8: el gen de esta citoquina va a tener en su promotor un SNP en posición -251 que consiste en una sustitución de una A por una T (*IL-8 -251 A/T*, rs 4073). Este SNP se analizó mediante el método de la discriminación alélica que es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. La tecnología Taqman puede emplearse como puede verse en la figura para el estudio de SNPs. En este caso las dos sondas Taqman presentes en el ensayo son cada una de ellas complementarias para cada uno de los SNPs. Cada una posee un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR la ADN polimerasa rompe la sonda/as hibridada con el ADN, separando el fluorocromo del quencher y detectándose emisión de fluorescencia de una de las sondas o de ambas.

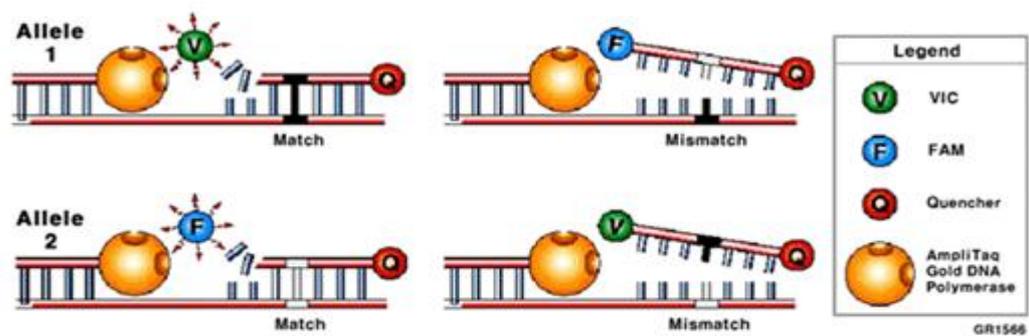


Fig. 8. Esquema ilustrativo del proceso de discriminación alélica en el que se observan las sondas, los quencheres y los fluoróforos.

En las sondas Taqman de Applied Biosystems la correlación sonda/secuencia es la siguiente:

Fluorescencia detectada	Indicativa de....
VIC	Homocigoto para el alelo X
6-FAM	Homocigoto para el alelo Y
Ambas	Heterocigoto

En este caso el alelo A se marcó con el fluoróforo VIC y el alelo T con el fluoróforo 6-FAM. La PCR se realizó en el termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software 7300 System SDS Software v. 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### 5.4 Estudio de Los genotipos de Los SNPs de Las metaloproteasas

- En el promotor del gen de la **MMP-1** se encuentra un SNP en posición -1607 (**MMP-1 -1607 1G/2G**, rs1799750) que consiste en la inserción de una G en un sitio en el que ya existe otra G con lo cual tendremos dos alelos: MMP-1 -1607 1G en ausencia de dicha inserción y MMP-1 -1607 2G cuando está presente la inserción. Para el estudio del mismo amplificamos por PCR un fragmento de 119 pb, usando los primers que se encuentran en la Tabla, el cual se somete a digestión durante toda la noche con el **enzima de restricción Xmn I** (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) y se visualizan los fragmentos en un gel de agarosa al 3%.

- En el caso de la **MMP-3**, su gen se encuentra en el cromosoma 11q22.3. En el promotor de este gen se encuentra, en posición -1612 un SNP que consiste en la I/D de una A con lo cual tendremos en esa posición 5A o 6A según sea el caso (**MMP3 -1612 5A/6A**, rs3025058). Los primers son: Forward: 5'-TCCTCATATCAATGTGGCCAAA-3' y Reverse: 5'-(6-FAM)-CGGCACCTGG-CCTAAAGAC-3'. Una vez realizada la PCR, se diluyó cada muestra 1:200 veces y se analizaron con el equipo ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) que separa las moléculas de DNA marcadas con el fluoróforo mediante electroforesis capilar. Posteriormente, para leer los resultados se utilizó el programa informático Peak Scanner TM Software v1.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) obteniéndose un pico en la posición 122 del electroferograma que corresponde al alelo 5A y un pico de 123 cuando corresponda al alelo 6A.
- En el gen de la **MMP-8** hay un SNP que consiste en una transición de C a T en posición -799 (**MMP-8 -799 T/C**, rs11225395). Este SNP fue analizado usando los primers o cebadores y las condiciones de la PCR de la tabla de debajo dando un fragmento de 967 pb, el producto fue digerido con el enzima de restricción Bfm I (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) durante toda la noche dando un fragmento de 967 pb en el caso del alelo T y unos fragmentos de 894 y 74 pb en el caso del alelo C del SNP **MMP-8 -799 T/C**.
- La **MMP-9** tiene un SNP en el promotor de su gen, que surge de la transición de C a T en la posición -1562

(*MMP-9 -1562 C/T*, rs3918242). Este SNP se analizó con los primers o cebadores y las condiciones de la PCR mostrados en la tabla, dando un fragmento de 436 pb, El producto fue digerido con el enzima de restricción Sph I- HF<sup>TM</sup> (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) durante toda la noche dando un fragmento de 436 pb para el alelo C y unos fragmentos de 242 y 194 pb para el alelo T del SNP *MMP-9 -1562 C/T*.

- La *MMP-13*, también llamada colagenasa-3, es una MMP en la que se encuentra un SNP en el promotor del gen que consiste en una transición de A a G en posición -77 (*MMP-13 -77 A/G*, rs2252070). Este SNP fue analizado usando los primers o cebadores y las condiciones de la PCR de la tabla de debajo dando un fragmento de 445 pb. El producto fue digerido con el enzima de restricción Bsr I (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) durante toda la noche a 65° C dando un fragmento de 445 pb que corresponde al alelo A y unos fragmentos de 248 y 197 pb que corresponden al alelo G del SNP *MMP-13 -77 A/G* .

Los enzimas, la temperatura de anillado y los primers o cebadores usados para el análisis de los polimorfismos de cada MMP se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 8: Características de las PCRs usadas para analizar SNPs de las diversas MMPs.

Gen	SPN	Primers	Tamaño (pb)	Tª(anill.)	Enzima
MMP-1	-1607	F: 5'-TCGTGAGAATGTCTTCCATT-3'	119 pb	55º C	Xmn I
	1G/2G	R: 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC-3'			
MMP-3	-1612	F: 5'-TCCTCATATCAATGTGGCCAAA-3'	122 pb	62º C	-
	5A/6A	R: 5'-(6-FAM)-CGGCACCTGGCCTAAAGAC-3'			
MMP-8	-799	F: 5'-CTGTTGAAGGCCTAGAGCTGCTGCTCC-3'	967 pb	56º C	Bfm I
	T/C	R: 5'-CATCTTCTCTTCAAACCTACCC-3'			
MMP-9	-1562	F: 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'	436 pb	60º C	Sph I - HF™
	C/T	R: 5'-CTTCTAGCCAGCCGGCATC-3'			
MMP-13	-77	F: 5'-GATACGTTCTTACAGAAGGC-3'	445 pb	56º C	Bsr I
	A/G	R: 5'-GACAAATCATCTTCATCACC-3'			

### 5.5 Estudio de Los genotipos de Los SNPs de La NOS2 y La NOS3

- En el gen de la NOS2, concretamente en el exón 22 encontramos un SNP (rs28944189) que consiste en una sustitución de una G por una A en la posición 37498 de este gen, que sin embargo, no provoca un cambio aminoacídico. El producto de la amplificación, cuyo tamaño es de 140pb, se digirió durante toda la noche a 37º C con el enzima de restricción Nco I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) dando fragmentos de 120+20 pb cuando se encuentra presente el alelo NOS2 37498G, mientras que cuando está el alelo NOS2 37498A no hay digestión dando un fragmento de 140 pb. Los primers o cebadores y características de la PCR-RFLP se detallan en la tabla 9.

- El denominado **NOS3 27-pb repeticiones, intrón 4** es un SNP que en realidad es un microsatélite en el intrón 4 del gen y consiste en una repetición de 27 pares de bases (pb) que, una vez amplificados y visualizados en un gel de agarosa al 3%, tendrán un tamaño de 195 pb en el caso de las 5 repeticiones y de 168 pb para las 4 repeticiones.
- También estudiamos el SNP **NOS3 -786T/C** que consiste en la sustitución de una T por una C en la posición -786 del promotor del gen del NOS3 (rs2070744). Tras la amplificación del fragmento del promotor con los primers y con las condiciones de PCR descritas en la tabla-3 obtuvimos un fragmento de 180 pb. El cambio de una base por otra introduce un sitio de corte para el enzima de restricción Msp I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) siendo el tamaño de los fragmentos tras la digestión durante toda la noche a 37° C de 40 pb (constante) para el alelo y de 140 pb y de 90+50 pb para el alelo C del SNP **NOS3 -786T/C**.
- El último SNP que analizamos del gen de la NOS3, el **NOS3 E298D (rs1799983)**, consiste en la sustitución de Asp por Glu en posición 298 debido a un cambio de G por T en la posición 894. Tras la amplificación por PCR proporciona un fragmento de 160 pb. La presencia del Asp crea un sitio de corte para el enzima de restricción Cfo I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) que va a dar fragmentos de 140+20 pb en la posición 894 cuando se encuentra el alelo NOS3 894G, y de 160 pb para el alelo NOS3 894T.

Todos los tamaños de los fragmentos se visualizan por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Tanto las condiciones de la PCR como los primers o cebadores usados en cada amplificación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9: Primers, enzimas y temperaturas de anillado usados para analizar diversos SNPs en los genes de la NOS.

Gen	SNP	Primers	Tamaño (pb)	Tª (anill)	Enzima
NOS 2	Exon 22G/A	F: 5'-CTCCCGGGATCACACGCCCA <u>I</u> -3' R: 5'-GCTGAATCTGAGTTGATGAACAGATG-3'	140 pb	60º C	Nco I
NOS 3	27-pb, Intron4	F: 5'-CTATGGTAGTGCCTTGGCTGGAGG-3' R: 5'-ACCGCCCAGGGAACCTCCGCT-3'	195 pb	63º C	-
NOS 3	-786T	F: 5'-TGGAGAGTGCTGGTGACCCCA-3' R: 5'-GCCTCCACCCCAACCCTGTC-3'	180 pb	62º C	Msp I
NOS 3	E298D	F: 5'-CTGCTGCAGGCCCAAGATGC <u>C</u> -3' R: 5'-CACCCCTTGCAGGCCCT-3'	160 pb	62º C	Cfo I

Las bases subrayadas en los primers o cebadores indican la introducción de un sitio de restricción que sirve de punto de corte para el enzima.

### 5.6 Análisis del genotipo del polimorfismo Alu I/D del TPA

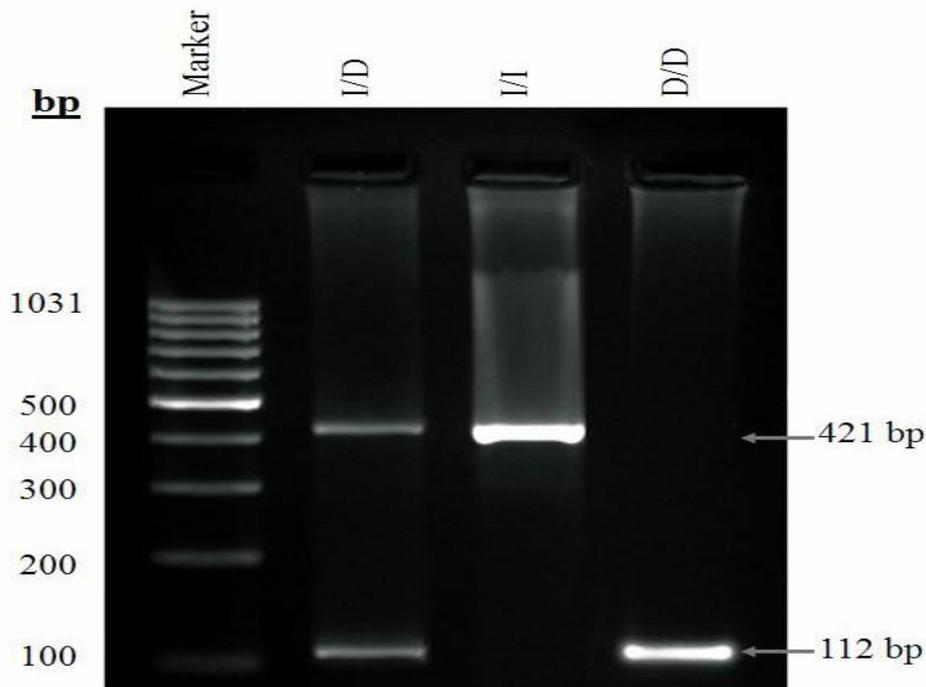
El gen humano del tPA denominado *TPA* se localiza en el cromosoma 8 (8p12-q11.2) y su tamaño es de 36,6 kb. En el intrón 8 del gen *TPA* se ha identificado una secuencia Alu de 311 pares de bases (GenBank sequence position 28804, número de acceso K03021) que corresponde a un polimorfismo (Alu I/D, rs4646972).

Para este análisis se emplearon dos métodos distintos. En ambos métodos el primer paso consistió en una PCR, luego en el primero de los métodos se continuó con la visualización de los productos de la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% que contenía bromuro de etidio, mientras que para el segundo método se empleó la electroforesis capilar.

En el primer método se comenzó realizando una reacción de PCR sobre un volumen final de 16µl. Cada reacción constaba de:

- 2 µL de tampón de reacción 10x [75 µM Tris HCl (pH=9.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,001% BSA]
- 2 µL dNTPs 2 mM
- 1,5 µL de DNA 10 ng/µL
- 1,5 µL de primers o cebadores 10 µM
- 8 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada
- 1 µL Taq DNA polimerasa 1U/µL (Biotools, B&M Labs, S.A., Madrid, España)

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 95°C de un minuto, hibridación a 63°C de 45 segundos y extensión a 72°C de un minuto. Finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 7 minutos. El resultado de la PCR se analizó a través de un gel de agarosa al 3% sumergido en TBE 1X, y sometido a un voltaje de 120 V durante unos 50 minutos. Los fragmentos obtenidos para la secuencia Alu I/D del *TPA*, fueron de 113 bp para la delección y de 424 bp para la inserción (fig. 9).



**Fig. 9:** Gel de agarosa al 3% donde se pueden observar los tres genotipos correspondientes al SNP tPA Alu I/D. De izquierda a derecha podemos ver los marcadores (Marker) y los tres genotipos: I/D, I/I y D/D.

En el otro método se empleó la técnica de electroforesis capilar. Para ello en primer lugar se realizó la reacción de la PCR en las mismas condiciones sobre un volumen total final de 12,5  $\mu\text{L}$ . Cada reacción constaba de:

- 1  $\mu\text{L}$  de tampón IMMOLASA 10x
- 0,5  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$
- 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 2 mM
- 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA 10 ng/ $\mu\text{L}$
- 0,2  $\mu\text{L}$  de primers o cebadores 10  $\mu\text{M}$
- 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada
- 0,1  $\mu\text{L}$  de IMMOLASA 0,2 U/ $\mu\text{L}$  (Bioline, ECOGEN Biología Molecular, Barcelona, España)

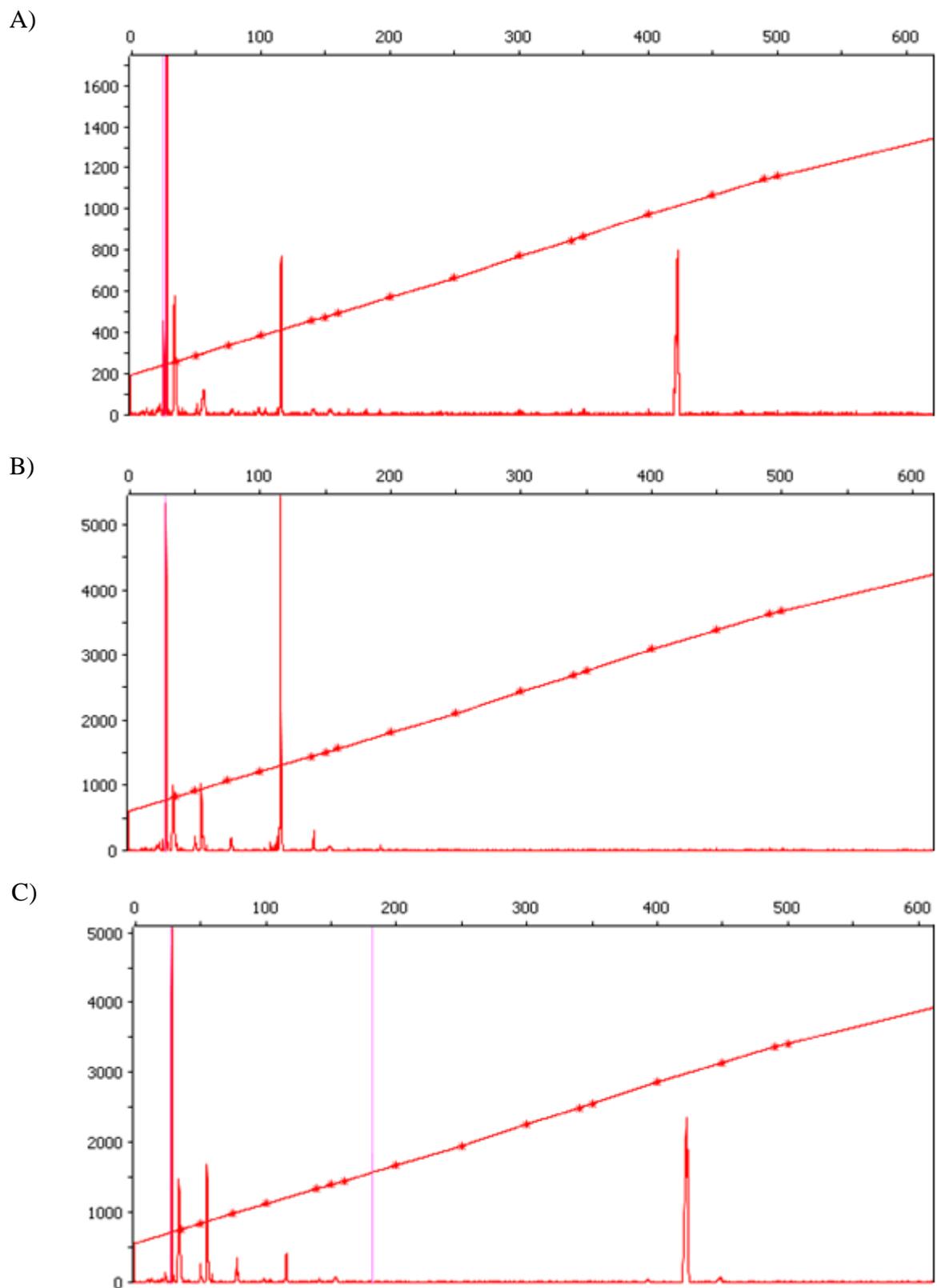
Los primers o cebadores utilizados son los mismos que en el método anterior salvo que ahora se añadió el fluoróforo PET en el extremo 5´ del reverse:

**F: 5´-GTAAGAGTTCCG-TAACAGGACAGCT-3´,**

**R: 5´-(PET)-CCCCACCCTAGGAGAACTTCTCTTT-3´.**

Una vez realizada la PCR, se diluyó cada muestra 1:200 veces y se llevó al servicio de secuenciación (localizado en el edificio de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo) donde se analizaron con el equipo ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) que separa las moléculas de DNA marcadas con el fluoróforo mediante electroforesis capilar. Posteriormente, para leer los resultados se utilizó el programa informático Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Lo que se obtuvo en el electroferograma son unos picos que se corresponden con el tamaño de las bandas del método anterior (Fig.10).



**Figura 10: Electroferograma**, donde en el eje de abscisas superior se representa el número de pares de bases y en el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia. A) Genotipo correspondiente a un individuo Heterocigoto (I/D). B) Genotipo de un individuo Homocigoto (D/D), y C) Genotipo de un individuo Homocigoto (I/I).

### 5.7 Análisis del genotipo del polimorfismo 4G/5G del PAI-1

En el caso del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 (inserción/delección de una G en la región promotora del gen del PAI-1, rs1799889), se analizó a través del método de electroforesis capilar.

Para ello en primer lugar se realizó la reacción de la PCR sobre un volumen total final de 12,5µL. Cada reacción constaba de:

- 1 µL de tampón IMMOLASA 10x
- 0,5 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 µL de dNTPs 2 mM
- 1,5 µL de DNA
- 0,2 µL de primers o cebadores 10 µM
- 8 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada
- 0,1 µL de IMMOLASA 0,2 U/µL (Bioline, ECOGEN Biología Molecular, Barcelona, España).

Las condiciones de la PCR fueron una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 95°C de 30 segundos, hibridación a 62°C de un minuto y extensión a 72°C de 45 segundos. Finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 7 minutos.

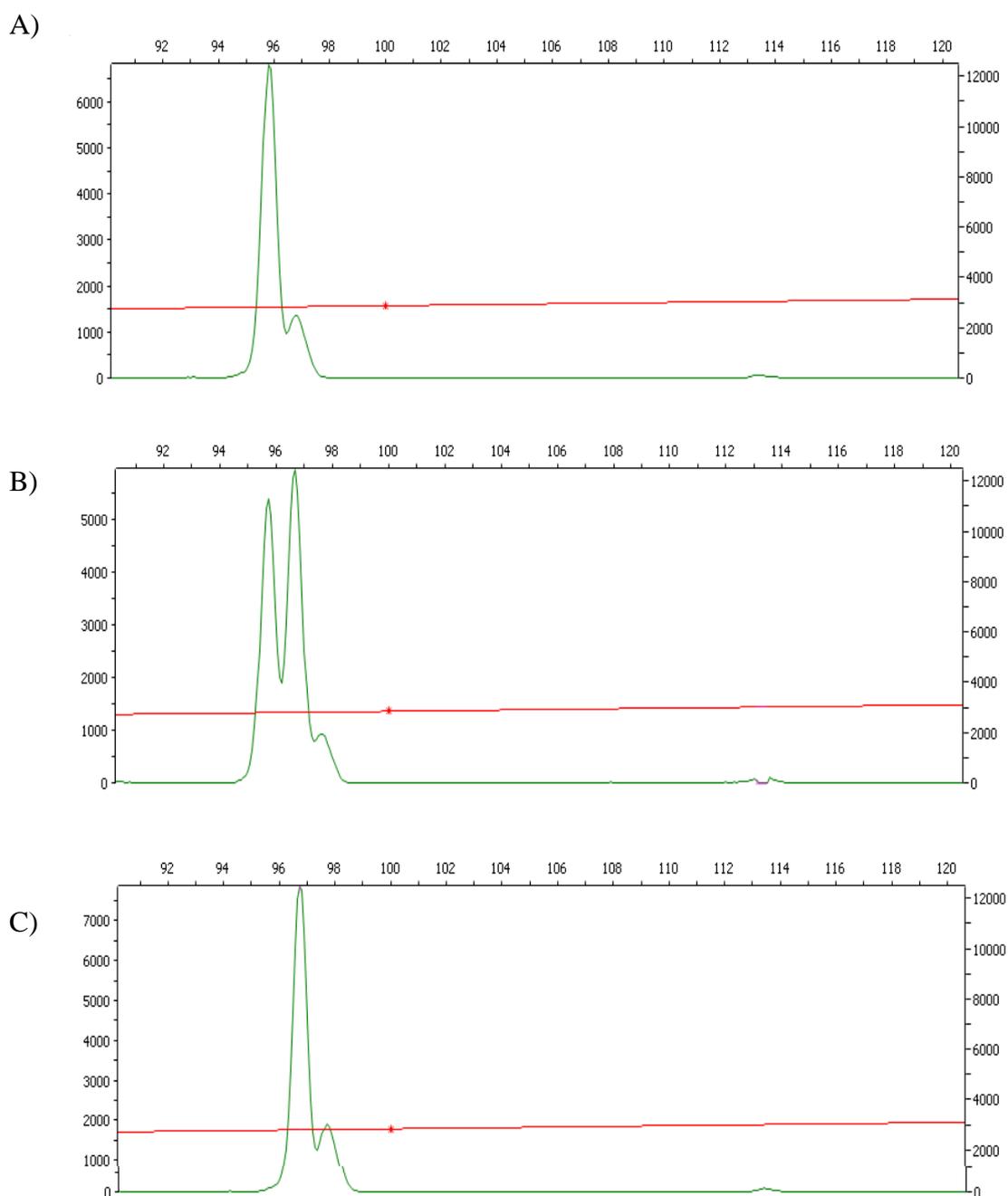
Tabla 10: Secuencias de los primers o cebadores utilizados en las PCR realizadas.

Gen	Primers
PAI-1	F: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGACACGT-3' R: 5'-(VIC)-CCAACAGAGGATCTTGGTCT-3'

Una vez realizada la PCR, se diluyó cada muestra 1:200 veces, Se procedió del mismo modo que se hizo para el análisis del polimorfismo *Alu I/D* del *tPA* por electroforesis capilar. Posteriormente, para leer los

resultados se utilizó el programa informático Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

En este caso, lo que se obtuvo son unos picos de 96 bp, que corresponden a la delección (4G), y de 97 bp que corresponden a la inserción (5G) (Fig. 11).



**Figura 11: Electroferograma.** En el eje de abscisas superior se representa el número de pares de bases y en el eje de ordenadas la intensidad de fluorescencia. A) Homocigoto con genotipo 4G/4G. B) Heterocigoto con genotipo 4G/5G. C) Homocigoto con genotipo 5G/5G.

## **6. Niveles séricos de citoquinas, MMPs y TIMPs**

Una vez extraída la sangre de los pacientes y de los controles las muestras se mantuvieron durante dos horas a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1800 xg durante 5 min. para la obtención del suero. Estos sueros fueron almacenados posteriormente a -70°C hasta el momento del análisis.

Los niveles de las citoquinas se midieron mediante kits de ELISA (R&D Systems Inc, 614 McKinley Place, MN, USA) específicos para cada citoquina.

Los niveles séricos de MMPs (-1, -2 -3, -8, -9, -10, -13) y TIMPs (-1,-2,-4) se midieron usando el Quantibody™ Human MMP Array 1 de Raybiotech (Raybiotech, Parkway Lane, Norcross, GA, USA).

## **7. Niveles séricos de nitratos y nitritos**

Los niveles séricos de nitratos y nitritos se analizaron utilizando una modificación del método de reacción de Griess y de la nitrato reductasa (Giovannoni y col, 1997).

Antes de realizar el ensayo, las muestras de suero se diluyeron cuatro veces con PBS, se ultra-filtraron por centrifugación a 11500 x g durante 30 min usando filtros de peso molecular de 10 kD (Ultrafree-MC, Millipore). Se colocaron 50 µl de muestra por pocillo, 50 de estándar o 50 de PBS (blanco) en una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron 50 µl de una disolución en PBS de nitrato reductasa (600 U/L) y β- NADPH (50 µmol/L). La placa se incubó durante 3 horas a temperatura

ambiente. El exceso de  $\beta$ -NADPH se consumió adicionando 50  $\mu$ l de PBS conteniendo L-glutámico deshidrogenada (500 U/L),  $\alpha$ -cetoglutámico (4 mmol/L) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mmol/L). Se incubó durante 10 min. a 37° C. Finalmente se adicionaron 50  $\mu$ l del reactivo de Griess 1 (1.1 % sulfanilamida en 5 % de ácido fosfórico concentrado) y 50  $\mu$ l del reactivo de Griess 2 (0.1 % N-(1-Naftil)-etilenodiamina en agua) y después de 10 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 540 nm.

Con objeto de determinar la concentración de nitrato/nitrito en las muestras se realizó una recta patrón en las mismas condiciones con una disolución de nitrito de sodio (0-50  $\mu\text{mol/L}$ ).

## **8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con los siguientes programas informáticos: SPSS Software para Windows, (versión 16, Chicago, IL, USA), y GraphPad Prism (versión 4.0, 2003, San Diego, CA, USA).

Los resultados se han expresado como medianas y rango intercuartílicos (IQR) según proceda. Para evaluar las correlaciones entre variables continuas, (niveles de citoquinas, MMPs, TIMPs y otras) hemos utilizado la prueba de Spearman. Los valores de los niveles plasmáticos de  $\text{NO}_x$  han sido la excepción, ya que no siguieron una distribución Gaussiana, por lo que se normalizaron mediante una transformación logarítmica natural. Los valores de  $\text{NO}_x$  obtenidos de la retrotransformación se expresaron en  $\mu\text{M}$  originales.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes SNPs en los diferentes grupos y el resto de variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. Cuando la comparación lo requería se emplearon la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher de dos colas.

En el caso de los niveles plasmáticos de MMPs y citoquinas, se utilizó la U de Mann-Whitney para comparar variables continuas entre dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos. Para los niveles plasmáticos de NOx se utilizó la t de Student y la prueba de ANOVA cuando se compararon más de dos grupos.

Para comparar los niveles de citoquinas, MMPs y NOx de forma secuencial (time course) se utilizó un modelo lineal general. Se evaluaron los factores independientemente asociados a sepsis y muerte mediante un análisis de regresión logística. Se analizaron la capacidad de predicción de los niveles plasmáticos de NOx en sepsis, fallo hemodinámico y supervivencia mediante curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) y su área bajo la curva. También se calcularon la razón de oportunidades u Odds Ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ .



## RESULTADOS

Inicialmente, se incluyeron en el estudio 96 pacientes sépticos de los cuales 6 fueron posteriormente excluidos por lo que enrolamos en el estudio 90 pacientes con una sepsis grave.

Los motivos de la exclusión fueron una patología infecciosa causante diferente de la bacteriana, tuberculosa en dos casos, en uno de ellos con afectación meníngea, viral en tres y sin etiología infecciosa concluyente en un caso.

En una segunda fase de la Tesis estudiamos los niveles plasmáticos de forma secuencial (que denominamos “time course” a partir de ahora), e incluimos 15 pacientes sépticos en este apartado. En ellos, además de los valores basales se extrajeron muestras para medir la evolución secuencial de los niveles plasmáticos de citoquinas, NO, MMPs y TIMPs a los 3 y 7 días del ingreso en la UCI. Los controles, en número de 91, correspondían a pacientes ingresados en UCI sin un proceso infeccioso. A 18 de estos pacientes no sépticos se les realizaron extracciones seriadas para medir los niveles séricos de citoquinas, NO, MMPs y TIMPs secuencialmente a los 3 y 7 días del ingreso en la UCI.

En la siguiente tabla, mostramos las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

<b>Tabla 11: Características demográficas y clínicas de pacientes sépticos y no sépticos ingresados en UCI. Los valores se muestran como medianas (rango IQ) o % según proceda.</b>			
	Sépticos (n=90)	Controles no infectados (n=91)	Valor de p
Edad	58,5 (45,0-73,0)	64,0 (50,0-71,0)	0,9
Género (hombre/mujer)	50/40	61/30	0,1
APACHE II	17.0 (12.0-23.0)	16.0 (9,0-22,0)	0,2
Mortalidad (%)	7 (7,8)	14 (15,4)	0,1
Número de órganos que fallaron	3,0 (2,0-4,0)	2.0 (1,0-2,0)	<0,0001
<b>Fuente de infección</b>			
Genito-urinaria (%)	26 (28,89)		
Intra-abdominal (%)	22 (24,4)		
Pulmonar (%)	16 (17,8)	-	
Sistema nervioso central (SNC) (%)	12 (13,3)	-	
Piel-tejidos blandos (%)	8 (8,9)	-	
Endocarditis (%)	5 (5,6)	-	
Otra localización (%)	1 (1,1)	-	
<b>Comorbilidades</b>			
Cardiovascular: Hipertensión arterial Cardiopatía isquémica Valvulopatía	28(31,1%) 4(4,4%) 2(2,2%)	33(36,3%) 10 (11,0%) 3(3,3%)	
Pulmonar: Asma bronquial EPOC	5(5,6%) 9(10,0%)	6(6,6%) 5(5,5%)	
Digestiva(cirrosis)	7(7,8%)	3(3,3%)	
Renal (insuficiencia renal crónica)	1(1,2%)	3(3,3%)	
Etilismo crónico	14(15,5%)	11(12,08%)	
<b>Diagnóstico al ingreso de pacientes no sépticos</b>			
Politraumatismo (%)	-	40 (43,96)	
ACV (%)	-	46 (50,54)	
Otro diagnostico(%)	-	5 (5,5)	

Los pacientes sépticos y controles estaban igualmente distribuidos en cuanto a edad y género. No hubo diferencias en la puntuación del APACHE II. Veintiún pacientes fallecieron (11,6%). Aunque murieron más controles no infectados, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Como esperábamos, el número de órganos que fallaron fue mayor en los pacientes sépticos que en los controles. Setenta y cinco pacientes sépticos (83,3%) tuvieron hemocultivos positivos, en los que crecieron bacterias Gram negativas en 40 (53,3%), la mayoría *Escherichia coli* (18, 24%) y crecieron bacterias Gram positivas en 35 (46,7%) sobre todo *Streptococcus pneumoniae* (16, 21,3%). Las principales fuentes de infección fueron la urinaria, intraabdominal y la respiratoria. El grupo control no infectado estaba formado por pacientes ingresados en UCI principalmente por politraumatismos y patología neurológica.

**Tabla 12: Resultados de laboratorio de los pacientes sépticos y controles en el primer día de ingreso en UCI.** Los valores se muestran como medianas (rango IQ)

	Valores normales	Sépticos (mediana, rango IQ)	Controles no infectados (mediana, rango IQ)	Valor de p
Número		90	91	
Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	(2800-7350)	12,8 (7,5-19,5)	9,6 (5,8-14,5)	0,002
PCR (mg/mL) Proteína C reactiva	0-0,5	26,0 (17,6-36,2)	1,0 (0,3-3,1)	<0,0001
Fibrinógeno(mg/dL)	(140-600)	692,0 (576,5-847,8)	433,0 (322,8-556,39)	<0,0001
Tasa del Complejo Protrombínico (%)	(60-100)	59,5 (49,0-74,0)	83,0 (72,0-92,0)	<0,0001
Tiempo de tromboplastina parcial activado (segundos)	( 20-40)	28,9 (17,8-35,4)	26,1(21,38-29,0)	0,02
Citoquinas (pg/mL)				
IL-1 $\beta$		20,0 (5,9-66,08)	15,0 (4,3-36,7)	0,3
IL-4		45,1 (25,1-74,2)	42,8 (24,3-57,1)	0,7
IL-6		178,6 (93,7-679,4)	96,0 (45,9-180,5)	<0,0001
IL-8		23,4 (10,4-55,1)	15,4 (6,3-33,6)	0,005
IL-10		22,7 (12,9-48,8)	9,2 (6,3-14,6)	<0,0001
IL-13		15,1 (7,3-29,3)	15,4 (7,6-23,8)	0,9
$\gamma$ -IFN		23,8 (10,3-40,3)	20,9 (15,1-31,5)	0,4
TNF- $\alpha$		461,8 (142,3-849,3)	187,0 (85,3-444,7)	0,004
MCP-1		533,6 (205,7-1163,5)	232,8 (136,4-447,0)	<0,0001
Expresión de <i>AP-1</i> por los neutrófilos de sangre periférica ( $\log_{10}\text{Qr}$ )		1,64 (1,34-1,93)	2,18 (1,84-2,32)	0,001
Expresión de <i>NF-kB</i> por los neutrófilos de sangre periférica ( $\log_{10}\text{Qr}$ )		1,43 (1,35-1,59)	1,62 (1,47-1,77)	0,03
<b>MMPs/TIMPs (ng/mL)</b>				
MMP-1		25,6 (15,5-57,6)	27,8 (14,5-56,1)	0,5
MMP-2		1,0 (0,5-1,0)	0,6 (0,4-1,1)	0,1
MMP-3		19,8 (12,1-47,2)	12,4 (6,6-23,9)	<0,0001
MMP-8		48,0 (33,7-73,0)	16,5 (10,1-35,7)	<0,0001
MMP-9		394,3 (198,8-618,7)	592,4 (376,6-766,9)	<0,0001
MMP-10		27,8 (50,9-160,4)	23,2 (10,4-47,7)	<0,0001
MMP-13		0,1 (0,07-0,3)	0,08 (0,04-0,2)	0,2
TIMP-1		253,1 (230,6-304,6)	259,3 (218,0-303,6)	0,9
TIMP-2		101,7 (70,3-124,7)	87,2 (58,8-119,1)	0,045
TIMP-4		3,7 (2,1-6,9)	2,8 (1,8-5,5)	0,07
<b>GENNOS2</b> ( $\log_{10}\text{Qr}$ )		0,766 (0,488-1,041)	0,676 (0,375-0,976)	0,7
<b>NOx</b> ( $\mu\text{M}$ )		47,5 (40,4-55,9)	17,0 (14,7-19,7)	<0,0001

*AP-1* y *NF-kB* significan expresión génica de la proteína 1 de activación y del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  por los neutrófilos de sangre periférica.

En la tabla 12 se muestran los resultados analíticos de los pacientes sépticos y de los controles no infectados a su ingreso en la UCI. Cabe destacar los valores significativamente más elevados de neutrófilos en sangre periférica, PCR, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno, en los pacientes sépticos en comparación con los controles. La tasa de factores del complejo protrombínico era menor en los sépticos que en los controles no infectados.

### **1. CITOQUINAS: NIVELES PLASMÁTICOS , TIME COURSE, POLIMORFISMOS GENÉTICOS, ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

#### **NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOQUINAS Y EXPRESIÓN DE *AP-1* Y *NF-κB* Y POR LOS NEUTRÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

En la tabla 12 podemos ver que los niveles plasmáticos de las citoquinas IL-6, IL-8, IL-10, y TNF- $\alpha$  y de MCP-1 eran significativamente más elevados en los pacientes sépticos en comparación con los controles. En el grupo de pacientes sépticos, aquellos que fallecieron tenían unos niveles plasmáticos de IL-8 e IL-10 significativamente más elevados que en los que sobrevivieron [69,3 pg/mL (23,7-938,4) frente a 21,4 (10,1-50,3),  $p=0,03$ ; y 52,5 pg/mL (33,9-536,4) frente a 21,9 (12,8-42,3),  $p=0,04$ , respectivamente]. Los niveles de otras citoquinas, tales como IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$  y de MCP-1,

también eran más elevados en los enfermos que fallecieron en comparación con los que sobrevivieron, aunque las diferencias no alcanzaron un nivel significativo, probablemente por el pequeño número de pacientes que fallecieron. No hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de citoquinas de los pacientes sépticos con respecto a la etiología de la sepsis (microorganismos Gram-positivos frente a Gram-negativos), o con respecto al foco primario de infección. Del mismo modo, no hubo diferencias en los controles en relación al diagnóstico de ingreso en UCI a excepción del IFN- $\gamma$ , que estaba más elevado en los pacientes politraumatizados que en los que habían sufrido un accidente cerebrovascular (26,5 pg/mL [17,2-35,0] frente a 18,2 [9,0-25,3], respectivamente,  $p=0,026$ ).

#### POLIMORFISMOS GENETICOS DE CITOQUINAS

En la tabla 13 mostramos las frecuencias genotípicas y alélicas de todos los SNPs de citoquinas que estudiamos en los pacientes sépticos y controles no infectados. Únicamente encontramos que los genotipos variantes GA y AA del SNP del *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A) y el alelo A del mismo SNP eran significativamente menos frecuentes entre los sépticos que entre los controles de UCI no infectados.

Los diversos SNPs de citoquinas no se asociaron con las concentraciones plasmáticas de sus respectivas citoquinas ( $p= 0,08$  a  $0,8$ ), excepto en el caso del SNP de la *IL-8*(-251 A/T) que se asoció con cambios en los niveles plasmáticos de IL-8 (genotipo *TT* 13,4 pg/mL [7,0-27,7], *AA* 17,2 [8,4-40,1], y *AT* 22,1 [10,3-53,2],  $p=0,04$ ).

**Tabla 13: Frecuencias genotípicas y alélicas, y niveles plasmáticos de citoquinas.**

SNP	Frecuencias genotípicas			Niveles de citoquinas(pg/ml) *		Frecuencias alélicas				
	Genotipo	Sépticos n (%)	Controles no infectados n (%)	Valor de p	Valor de p	Alelos	Sépticos n (%)	Controles no infectados n (%)	Valor de p	
<i>IL-1α (-889C/T)</i>	CC	43 (48,3)	44 (48,3)	0,8	-	-	C	122 (68,5)	122 (67,0)	0,8
	CT	36 (40,5)	34 (37,4)		-		T	56 (31,5)	60 (33,0)	
	TT	10 (11,2)	13 (14,3)		-					
<i>IL-1β (+3954C/T)</i>	CC	47 (52,2)	53(58,2)	0,2	19,57 (4,29- 38,28)	0,55	C	132 (73,3)	134 (73,6)	0,9
	CT	38 (42,2)	28 (30,8)		15,08 (6,17- 62,40)		T	48 (26,7)	48 (26,4)	
	TT	5 (5,6)	10 (11,0)		10,13 (3,63- 27,06)					
<i>IL-6(-174G/C)</i>	GG	40 (44,5)	45 (49,4)	0,4	136,3 (55,8- 322,1)	0,38	G	111 (61,7)	124 (68,1)	0,2
	GC	31 (34,4)	34 (37,4)		123,8 (58,3- 205,3)		C	69 (38,3)	58 (31,9)	
	CC	19 (21,1)	12 (13,2)		152,3 (76,5- 826,7)					
<i>TNF-α(-238G/A)</i>	GG	62 (68,9)	35 (38,5)	0,0002	336,2 (140,4- 722,6)	0,26	G	150 (83,3)	122 (67,0)	0,0003
	GA	26 (28,9)	52 (57,1)		320,1 (101,3- 700,7)		A	30 (16,7)	60 (33,0)	
	AA	2 (2,2)	4 (4,4)		88,6 (50,5- 463,4)					
<i>TNF-α(-308G/A)</i>	GG	67 (74,5)	61 (67,7)	0,4	350,3 (137,9-700,7)	0,08	C	155 (86,1)	146 (81,1)	0,2
	GA	21 (23,3)	24 (26,7)		320,1 (84,5-868,2)		T	25 (13,9)	34 (18,9)	
	AA	2 (2,2)	5 (5,6)		88,2 (28,4-134,3)					
<i>IL-8(-251A/T)</i>	AA	10 (11,1)	18 (19,8)	0,3	17,21 (8,37- 40,06)	0,04	A	65 (36,1)	79 (43,4)	0,2
	AT	45 (50,0)	43 (47,3)		22,13 (10,32- 53,22)		T	115 (63,9)	103 (56,6)	
	TT	35 (38,9)	30 (33,0)		13,35 (7,00- 27,69)					
<i>IL-10(-1082G/A)</i>	GG	12 (13,6)	11 (12,1)	0,8	19,00 (7,35- 27,64)	0,85	G	64 (36,4)	60 (33,0)	0,5
	GA	40 (45,5)	38 (41,7)		13,75 (8,19- 32,48)		A	112 (63,6)	122 (67,0)	
	AA	36 (40,9)	42 (46,2)		13,13 (7,81- 23,64)					

Valores expresados en % o mediana (rango IQ) según proceda.

\* Los valores de citoquinas se presentan junto a sus respectivos SNPs: IL-1β para *IL-1β (+3954C/T)*, IL-6 para *IL-6(-174G/C)*, TNF-α para *TNF-α(-238G/A)* y *TNF-α(-308G/A)*, IL-8 para *IL-8(-251A/T)*, y IL-10 para *IL-10(-1082G/A)*.

La tabla 14 muestra las correlaciones de las diversas citoquinas con otros parámetros. El número de órganos que fallaron se correlacionó con los niveles plasmáticos de IL-6,IL-8,IL-10 y MCP-1, mientras que la puntuación del APACHE II se correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de IL-6,IL-8,IL-10 y MCP-1 y negativamente con los niveles plasmáticos de IL-4. Del mismo modo, los coeficientes de correlación de los niveles de citoquinas entre sí fueron  $>0,5$  para la mayoría de las mismas. La expresión génica de *AP-1* y *NF- $\kappa$ B* por los neutrófilos de sangre periférica fue significativamente menor en los sépticos en comparación con controles no infectados (Tabla 12). No se observaron diferencias entre la expresión génica de *AP-1* o *NF- $\kappa$ B* por los neutrófilos de sangre periférica entre los portadores de los diferentes genotipos de los SNPs de citoquinas estudiados aquí.

**Tabla 14: Correlaciones de niveles plasmáticos de citoquinas en la sepsis**

	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	INF- $\gamma$	TNF- $\alpha$	MCP-1
IL-4	0,68**								
IL-6	0,06	0,16*							
IL-8	-0,10	0,36**	0,53**						
IL-10	0,10	0,26*	0,63**	0,47**					
IL-13	0,20*	0,50**	0,29**	0,39**	0,29**				
INF- $\gamma$	0,13	0,51**	0,40**	0,56**	0,40**	0,66**			
TNF- $\alpha$	0,27*	0,43**	0,43**	0,32**	0,52**	0,38**	0,52**		
MCP-1	0,04	0,21*	0,66**	0,49**	0,57**	0,22*	0,30**	0,19*	
Edad	0,03	-0,29*	0,03	0,09	0,03	-0,12	-0,09	-0,05	0,12
Tasa de factores del complejo protrombinico	0,15*	0,18*	-0,26**	-0,18*	-0,34**	-0,04	-0,15	-0,21*	-0,22**
Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado	0,13	-0,15*	0,18*	0,01	0,11	-0,06	-0,06	0,19*	0,08
Fibrinógeno	0,11	0,03	0,12	-0,06	0,20*	-0,06	-0,17*	0,04	0,09
Neutrófilos	-0,07	-0,07	0,04	-0,02	0,15	-0,20*	-0,16*	0,06	-0,04
Dias de estancia en UCI	0,01	0,07	0,13	0,20**	0,05	-0,01	0,08	0,02	0,15*
Número de órganos que fallaron	-0,11	0,03	0,26**	0,28**	0,36**	-0,04	0,04	0,15	0,32**
APACHE II	0,01	-0,24*	0,32**	0,32**	0,28**	-0,03	0,01	0,07	0,29**

Los valores numéricos representan los coeficientes de correlación (Spearman's rho)

\* Correlación significativa en el nivel <0.05 .

\*\* Correlación significativa en el nivel <0.01.

## TIME COURSE

En un subgrupo de 14 pacientes sépticos y 15 controles no infectados medimos los niveles de citoquinas de forma secuencial a lo largo del tiempo, en concreto los días 1º, 3º y 7º de su ingreso en la UCI. Entre los sépticos, solamente la IL-10 mostró un descenso significativo entre las medidas del 1º y 7º día ( $p=0,008$ ). El resto de las citoquinas no experimentaron cambios significativos (IL-1 $\beta$   $p=0,9$ , IL-4  $p=0,6$ , IL-6  $p=0,1$ , IL-8  $p=0,18$ , IL-13  $p=0,3$ , IFN  $\gamma$   $p=0,3$ , TNF- $\alpha$   $p=0,9$ ). No observamos modificaciones en los niveles plasmáticos de citoquinas a lo largo del tiempo en el grupo control ( $p=0,1$  a  $p=0,9$ ).

En cuanto a la comparación entre los dos grupos de sépticos y controles no infectados , las curvas de la IL-10 y TNF- $\alpha$  fueron diferentes a lo largo del tiempo ( $p=0,007$  y  $p=0,02$ , respectivamente), principalmente debido a un descenso de IL-10 en los sépticos y de TNF- $\alpha$  en los controles. Las curvas del resto de las citoquinas no difirieron significativamente entre sépticos y controles ( $p=0,09$  a  $p=0,8$ ).

#### ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Las variables con  $p<0,1$  en el análisis univariante fueron utilizadas en la regresión logística. La sepsis estaba asociada independientemente con las siguientes variables en el primer día de ingreso en UCI: con valores descendidos de la tasa de factores del complejo protrombínico, con valores elevados de fibrinógeno, número de neutrófilos en sangre periférica y niveles plasmáticos de IL-8, con la presencia de fallo hemodinámico, y con la ausencia del alelo variante A del SNP del TNF- $\alpha$  (-238 G/A). La mortalidad estaba asociada independientemente con una puntuación elevada del APACHE II, con niveles plasmáticos elevados de IL-8 y con el diagnóstico de sepsis en el análisis multivariante(Tabla 15).

**Tabla 15: Variables independientemente asociadas con sepsis y mortalidad.**

Variable pronóstico	Parámetros explicatorios	Valor de p	OR (IC 95%)
Sepsis	Fibrinógeno (mg/dL)	<0,0001	1,009 (1,005-1,013)
	Fallo hemodinámico	0,0001	25,64 (5,32-125,0)
	Tasa de factores del Complejo Protrombínico (%)	0,01	0,956 (0,923-0,990)
	Neutrófilos ( $10^3$ células/ $\mu$ l)	0,01	1,115 (1,027-1,212)
	IL-8 (pg/mL)	0,035	1,007 (1,001-1,014)
	* <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (-238G/A) genotipos variantes frente salvajes	0,008	0,173 (0,047-0,638)
	APACHE II (por unidad)	0,016	1,083 (1,015-1,156)
Mortalidad	IL-8 (pg/mL)	0,017	1,003 (1,001-1,006)
	Sepsis	0,021	4,57 (1,26-16,39)

\*Los genotipos variantes del SNP del *TNF- $\alpha$*  (238 G/A) corresponden a AA y AG y el tipo salvaje a GG.

## **2. MMPs: NIVELES PLASMÁTICOS, TIME COURSE, POLIMORFISMOS GENÉTICOS, ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

### **NIVELES DE MMPs**

En la Tabla 12 se muestran los niveles plasmáticos de metaloproteasas medidos el día de ingreso en la UCI. Observamos que las MMPs -3, -8, -10, -13 y el TIMP-2 tenían una concentración plasmática significativamente más elevada en los pacientes sépticos que en los controles mientras que las concentraciones de MMP-9 eran menores en los sépticos que en los controles no infectados.

Los niveles plasmáticos de la MMP-8 se correlacionaban positivamente ( $r= 0,39$ ,  $p<0,0001$ ) y los de MMP-9 negativamente ( $r= -0,29$ ,  $p=0,003$ ) con los niveles de PCR. El resto de los niveles plasmáticos de MMPs y TIMPs no mostraron diferencias significativas al correlacionarlos con la PCR ( $p=0,07$  a  $p=0,9$ ). Los niveles plasmáticos de MMP-2 y MMP-13 eran significativamente más elevados en los sépticos que sobrevivieron en comparación con los sépticos que fallecieron.

### **POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

En la Tabla 16 mostramos las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de MMPs en los pacientes sépticos y controles no infectados. De todos los SNPs de MMPs estudiados, solamente

**Tabla 16: Frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes SNPs de MMPs en los pacientes sépticos y controles no infectados.**

SNP	Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas			
	Genotipo	Sépticos n (%)	Controles n (%)	Valor de p	Alelo	Sépticos n (%)	Controles no infectados n (%)	Valor de p
<i>MMP-13</i> -77A/G	AA	54 (60,0) <sup>a</sup>	39 (42,9)	0,0497	A	144 (80,0) <sup>b</sup>	129 (70,9)	0,044
	AG	36 (40,0)	51 (56,0)		G	36 (20,0)	53 (29,1)	
	GG	0 (0,0)	1 (1,1)					
<i>MMP-1</i> -1607 1G/2G	1G1G	31 (34,8)	25 (27,5)	0,03	1G	88 (49,4)	94 (51,6)	0,7
	1G2G	26 (29,2) <sup>c</sup>	44 (48,3)		2G	90 (50,6)	88 (48,4)	
	2G2G	32 (36,0)	22 (24,2)					
<i>MMP-3</i> -1612 5A/6A	5A5A	29(32,2)	26(28,6)	0,3	5A	94 (52,2)	99 (54,4)	0,7
	5A6A	36 (40,0)	47 (51,6)		6A	86 (47,8)	83 (45,6)	
	6A6A	25 (27,8)	18 (19,8)					
<i>MMP-8</i> -799C/T	CC	20 (23,3)	23 (25,8)	0,5	C	84 (48,8)	96 (53,9)	0,3
	CT	44 (51,1)	50 (56,2)		T	88 (51,2)	82 (46,1)	
	TT	22 (25,6)	16 (18,0)					
<i>MMP-9</i> -1562 C/T	CC	72 (80,0)	69 (76,7)	0,6	C	162 (90,0)	159 (88,3)	0,6
	CT	18 (20,0)	21 (23,3)		T	18 (10,0)	21 (11,7)	
	TT	0 (0,0)	0 (0,0)					

<sup>a</sup>  $\chi^2 = 4.66$ , OR (IC 95%) = 2,0(1,05-3,78) al comparar las frecuencias del genotipo AA entre sépticos y controles no infectados

<sup>b</sup>  $\chi^2 = 3.58$ , OR (IC 95%) = 1,64 (0,98-2,75) al comparar las frecuencias del alelo A entre sépticos y controles no infectados

<sup>c</sup>  $\chi^2 = 6.15$ , OR (IC 95%) = 0,44(0,23-0,85) al comparar las frecuencias del genotipo 1G2G entre sépticos y controles no infectados

encontramos que el genotipo AA del SNP (-77A/G) de la *MMP-13* era significativamente más frecuente y el genotipo 1G2G del SNP (-1607 1G/2G) de la *MMP-1* era significativamente menos frecuente en los pacientes sépticos que en los controles no infectados de UCI. El alelo A del SNP (-77A/G) de la *MMP-13* era significativamente más frecuente entre los enfermos sépticos que entre los controles no infectados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de las diferentes MMPs en los enfermos portadores de los diferentes genotipos del SNP (-77A/G) de la *MMP-13* ni del SNP (-1607 1G/2G) de la *MMP-1* (datos no mostrados).

Los enfermos sépticos que eran portadores del genotipo 5A/6A del SNP (-1612 5A/6A) de la *MMP-3* tenían unos niveles plasmáticos de *MMP-3* significativamente más elevados al compararlos con los de los portadores del genotipo 5A/5A del mismo SNP de la *MMP-3* y con los de los controles no infectados (Fig. 12).

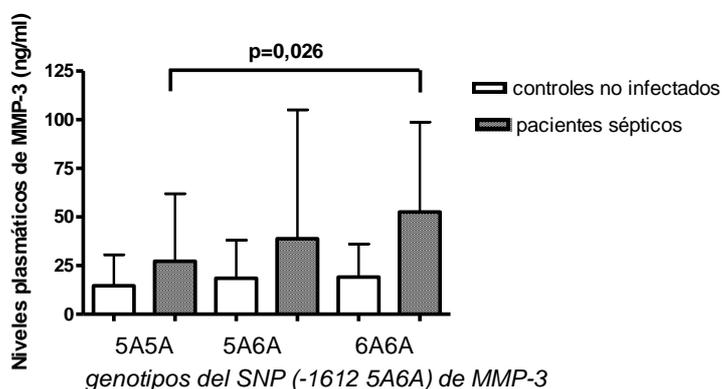
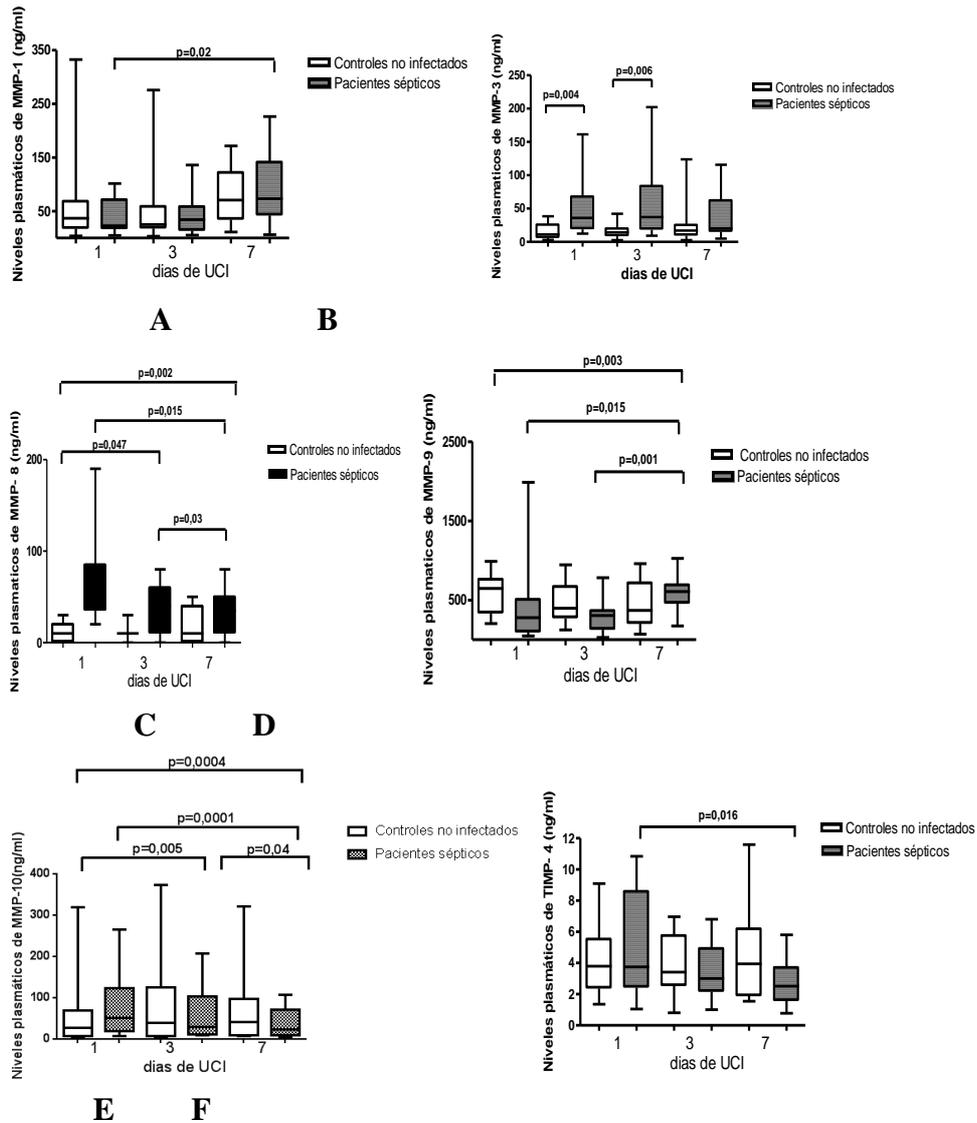


Fig. 12: Niveles plasmáticos de *MMP-3* el día del ingreso en UCI en sépticos y controles portadores de los diferentes genotipos del SNP (-1612 5A/6A) de la *MMP-3*. Las barras representan la mediana y los valores IQR en ng/mL.

Encontramos que había una cierta tendencia a una evolución desfavorable aunque sin alcanzar la significación estadística en los pacientes sépticos portadores del genotipo 6A6A del SNP (-1612 5A/6A) de la *MMP-3* (4/7 [57%] frente a 21/83 [25,3%],  $p=0,07$ ), si bien es difícil sacar conclusiones debido a que el número de pacientes que fallecieron en el grupo de enfermos sépticos fue bajo. Los pacientes portadores de este genotipo tenían niveles plasmáticos de *MMP-3* significativamente más elevados que los de los portadores del genotipo 5A5A del mismo SNP de la *MMP-3* y que los de los controles no infectados (Fig. 12). No observamos asociación para ninguno de los SNPs de las *MMPs* estudiados con la puntuación del APACHE II o con el número de órganos que fallaron.

#### TIME COURSE

En un subgrupo de 14 pacientes y 18 controles no infectados, se midieron los niveles plasmáticos de *MMPs* y *TIMPs* a lo largo del tiempo, en concreto los días 1º, 3º y 7º de su ingreso en UCI. Encontramos un descenso progresivo a lo largo del tiempo de los niveles plasmáticos de *MMP-3* ( $p=0,02$ ), *MMP-8* ( $p=0,015$ ), *MMP-10* ( $p=0,0001$ ) y *TIMP-4* ( $0,016$ ), y niveles paulatinamente más elevados de *MMP-1* ( $p=0,02$ ) y *MMP-9* ( $p=0,01$ ). Por el contrario en el grupo control no hubo diferencia significativa a lo largo del tiempo para los niveles de ninguna *MMP* o *TIMP* (Fig. 13).



**Fig. 13:** Time course de los niveles plasmáticos de MMP-1 (A), -3 (B), -8 (C), -9 (D), -10 (E) y TIMP-4 (F) en los días 1, 3 y 7 de ingreso en UCI. Los diagramas de cajas representan la mediana y el rango de valores en ng/mL.

En cuanto a las curvas de MMPs y TIMPs a lo largo del tiempo eran significativamente diferentes entre sépticos y controles las de la MMP-3 (globalmente  $p=0,045$ ; días 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup>  $p=0,6$ ; días 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup>  $p=0,04$ ), de la MMP-8 (globalmente  $p=0,002$ ; días 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup>

p=0,047; días 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> p=0,03), de la MMP-9 (globalmente p=0,003; días 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> p=0,5; días 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> p=0,001) y de la MMP-10 (globalmente p=0,0004; días 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> p=0,005; días 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> p=0,04).

#### ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Las variables con un valor de  $p < 0.1$  en las comparaciones univariantes fueron utilizadas para el análisis multivariante. La sepsis estaba asociada de manera independiente con las siguientes variables en el primer día de ingreso en UCI: concentraciones plasmáticas elevadas de MMP-8 (OR [IC 95%] 1,107[1,058-1,158],  $p < 0,0001$ ), niveles de fibrinógeno (1,010[1,005-1,015],  $p < 0,0001$ ), número de neutrófilos en sangre periférica (1,116[1,014-1,228],  $p = 0,02$ ) y el número de órganos que fallaron (2,174[1,117-4,229],  $p = 0,02$  y concentraciones más descendidas de MMP-9 (0,995[0,992-0,998],  $p = 0,0001$ ).

En el análisis multivariante, la supervivencia en los pacientes sépticos estaba asociada con niveles plasmáticos más bajos de MMP-2 (OR [IC 95%] 0,456[0,252-0,824],  $p = 0,009$ ) y tasa de factores del complejo protrombínico más elevada (1,107[1,018-1,204],  $p = 0,0018$ ).

#### CURVAS ROC

El área bajo la curva ROC para la MMP-8 para el diagnóstico de sepsis fue 0,87 (IC 95% 0,82-0,92),  $p < 0,0001$ . El valor más

discriminante fue 30,5 ng/mL (sensibilidad 80,0%, especificidad 84,6%). El área bajo la curva ROC para la MMP-9 para la detección de un estado no séptico fue 0,73 (IC 95% 0,65-0,80),  $p < 0,0001$ , siendo el punto de corte más discriminante el nivel 567,1 ng/mL (sensibilidad 68,1%, especificidad 70,0%). Con respecto a la PCR, el área bajo la curva ROC para el diagnóstico de sepsis fue de 0,98 (IC 95% 0,94-0,998),  $p < 0,0001$ , mejor que los de las MMPs y TIMPs. El valor más discriminante de PCR fue de 8,0 ng/mL (sensibilidad 89,0%, especificidad 92,3%).

### ***3. ÓXIDO NÍTRICO: NIVELES PLASMÁTICOS Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE NOS3 Y NOS2, TIME COURSE, POLIMORFISMOS GENÉTICOS, ANÁLISIS MULTIVARIANTE, CURVAS ROC.***

#### ***NIVELES PLASMÁTICOS DE NO<sub>x</sub> y POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE NOS3 Y NOS2A***

Los niveles plasmáticos de NO<sub>x</sub> estaban significativamente más elevados en sépticos en comparación con controles no infectados ( $p < 0,0001$ ) como mostramos en la tabla 12. Hay que resaltar que los pacientes que presentaron unos niveles más elevados de NO<sub>x</sub> fueron los pacientes sépticos con fracaso hemodinámico y, especialmente aquellos que no sobrevivieron (Fig.14).

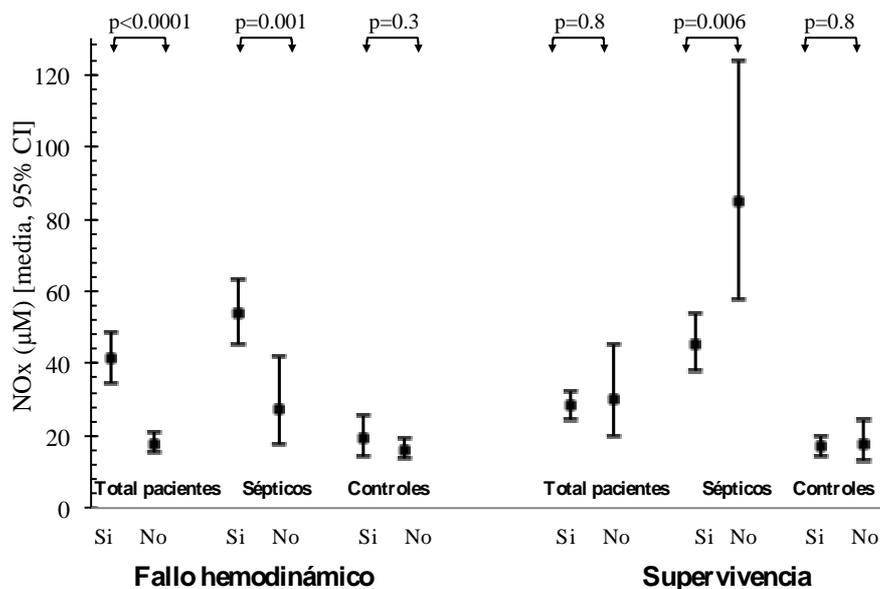


Fig. 14: Niveles plasmáticos de NOx del total de pacientes, sépticos y controles en las 24 horas de ingreso en UCI con respecto al fallo hemodinámico y supervivencia (resultados expresados como NOx en µM), media, 95% CI.

La tabla 17 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de *NOS3* y *NOS2A* de los pacientes sépticos y de los controles no infectados. De todos los SNPs de *NOS3* estudiados encontramos que el genotipo *TT* y el alelo *T* del SNP de *NOS3* (*E298D*) eran significativamente más frecuentes entre los sépticos que en los controles de UCI no infectados ( $p < 0,004$ ). Del mismo modo, el genotipo *AG* del SNP (*exon 22*) de la *NOS2A* también era significativamente más frecuente en los sépticos comparado con los controles no infectados ( $p = 0,046$ ). Al considerar de forma conjunta ambos SNPs observamos que había más pacientes portadores de ambos, es decir, del alelo *T* de la *NOS3* (*E298D*) y del genotipo *AG* del SNP (*exon 2,*) de la *NOS2A* entre

los sépticos que en los controles de UCI no infectados(68/89 [76,4%] vs. 40/91 [52,7%],  $p=0,0009$ ).

Ninguno de estos SNPs estudiados se asoció con cambios en la supervivencia de los pacientes sépticos (datos no mostrados).

Los portadores del alelo C del SNP (-786T/C) de la *NOS3*, pero no del SNP (E298D) de la *NOS3*, eran significativamente más frecuentes entre los pacientes con fracaso hemodinámico que en aquellos que no sufrieron problemas hemodinámicos ( $p=0,044$ ). No se observó ninguna otra asociación de la presencia de fallo hemodinámico con otros genotipos o alelos de los SNPs estudiados: (298D) *NOS3*  $p=0,4$ , (27bp-VNTR) *NOS3*,  $p=0,7$ , (exon 22) *NOS2A*  $p=0,6$ ]. Ninguno de estos SNPs se asoció con una mayor o menor mortalidad.

Tabla 17: frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes SNPs de NOS en los pacientes sépticos y controles no infectados.

SNP	Frecuencias Genotípicas				Frecuencias Alélicas			
	Genotipo	Sépticos n (%)	Controles no infectados n (%)	valor de p	Alelo	Sépticos n (%)	Controles no infectados n (%)	Valor de p
<i>NOS3</i> (E298D)	TT	38 (42,2)	28 (30,8)	<0,0001	T	128 (71,1)	102 (56,0)	0,004
	GT	52 (57,8)	46 (50,5)		G	52 (28,9)	80 (44,0)	
	GG	0 (0,0)	17 (18,7)					
<i>NOS3</i> (786T/C)	TT	26 (29,5)	41 (45,0)	0,10	T	98 (55,7)	119 (65,4)	0,06
	CT	46 (62,3)	37 (40,7)		C	78 (44,3)	63 (34,6)	
	CC	16 (18,2)	13 (14,3)					
<i>NOS3</i> (27 bp-VNTR)	44	0 (0,0)	3 (3,3)	0,08	4	23 (12,8)	21 (11,5)	0,7
	45	23 (25,6)	15 (16,5)		5	157 (87,2)	161 (88,5)	
	55	67 (74,4)	73 (80,2)					
<i>NOS2A</i> (exón 22)	GG	21 (23,6)	34 (37,4)	0,046	G	110 (61,8)	125 (68,7)	0,2
	AG	68 (76,4)	57 (62,6)		A	68 (38,2)	57 (31,3)	
	AA	0 (0,0)	0 (0,0)					

La tabla 18 muestra los niveles plasmáticos de NOx según los diferentes SNPs genotipados. Los portadores del alelo T del SNP (E298D) de la NOS3 tenían niveles plasmáticos de NOx más elevados al compararlos con aquéllos portadores del alelo G. No encontramos otras relaciones de los niveles plasmáticos de NOx con otros SNPs de NOS.

Tabla 18. Niveles plasmáticos de NOx en los portadores de los diferentes genotipos de NOS

SNP	Genotipo	Todos los pacientes	Sépticos	Controles no infectados
<b>NOS3(E298D)</b>	TT	27,62 (22,51-33,90)	37,89 (28,78-49,88)	17,99 (14,17-22,84)
	GT	32,13 (26,63-38,76)	56,08 (46,30-67,91)	17,12 (13,63-21,51)
	GG	15,18 (10,91-21,11)	-	15,18 (10,91-21,11)
	<b>Valor de p</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,017</b>	<b>0,7</b>
<b>NOS3(-786T/C)</b>	TT	26,39 (21,49-32,40)	47,31 (36,09-62,03)	18,23 (14,50-22,90)
	CT	30,05 (24,31-37,16)	50,07 (38,73-64,75)	15,93 (12,68-20,01)
	CC	27,40 (20,01-37,53)	41,54 (28,49-60,56)	16,42 (10,93-24,69)
	<b>Valor de p</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>
<b>NOS3 (27 bp-VNTR)</b>	44	33,70 (2,01-565,78)	-	33,70 (2,01-565,78)
	45	28,86 (21,14-39,38)	48,61 (36,22-65,25)	12,97 (8,75-19,23)
	55	28,10 (24,23-32,58)	47,15 (38,71-57,44)	17,47 (14,98-20,38)
	<b>Valor de p</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,07</b>
<b>NOS2A (exon22)</b>	GG	26,02 (20,34-33,28)	51,49 (35,07-75,59)	17,06 (13,51-21,55)
	AG	29,45 (25,13-34,50)	46,76 (38,90-56,20)	16,96 (14,02-20,52)
	AA	-	-	-
	<b>Valor de p</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>

NOx representa los valores plasmáticos de nitrito/nitrato en  $\mu\text{M}$  y se presentan como mediana (IC 95%).

\* TT frente a GT  $p=0,3$ ; TT frente a GG  $p=0,007$ ; GT frente a GG  $p=0,0003$

## TIME COURSE

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de NOx en un subgrupo de 14 pacientes sépticos y en 15 controles no infectados, tomándose muestras el 1º, 3º y 7º día de estancia en UCI. No encontramos significación estadística a lo largo del tiempo en los sépticos y controles de forma conjunta ( $p=0,3$ ), en los sépticos ( $p=0,12$ ) o en controles ( $p=0,7$ ). La pendiente de las curvas de NOx plasmático a lo largo del tiempo no mostró diferencias significativas entre sépticos y controles ( $p=0,11$ ), aunque la pendiente de curva de NOx a lo largo del tiempo de los controles era plana mientras que las de los sépticos era descendente.

Considerando el pronóstico, no había diferencias significativas en la evolución del NOx plasmático a lo largo del tiempo en los pacientes que sobrevivieron ( $p=0,26$ ), ni en aquéllos que murieron ( $p=0,06$ ). De cualquier modo, debería tenerse en cuenta que solamente hubo 2 fallecidos en este subgrupo de pacientes sépticos y que ambos pacientes experimentaron un incremento en los niveles de NOx plasmático desde el día 1º al 7º (mediana 68.8  $\mu\text{M}$  y 88.6  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Por otro lado, la pendiente de la curva de NOx no fue significativamente diferente entre supervivientes y no supervivientes ( $p=0,5$ ).

### ***Expresión del gen de NOS2A por los neutrófilos de sangre periférica en los pacientes sépticos y controles no infectados.***

No se observaron diferencias significativas en la comparación de la expresión del gen *NOS2A* por los neutrófilos de sangre periférica de pacientes sépticos y no infectados. Además, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *NOS2A* entre los portadores de los diferentes genotipos de los SNPs de la *NOS2A* y *NOS3* (datos no mostrados).

### **ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

#### **Sepsis, fallo hemodinámico y supervivencia**

El análisis multivariante reveló que las variables independientemente asociadas con el diagnóstico de sepsis fueron: fallo hemodinámico, niveles plasmáticos elevados de NOx, fibrinógeno y del número total de neutrófilos de sangre periférica, una tasa baja de factores del complejo protrombínico y la presencia de los SNPs (*E298D*) de *NOS3*, especialmente el genotipo *TT* , y del genotipo *AG* del SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* (Tabla 19).

El fallo hemodinámico estaba independientemente asociado con la presencia de sepsis, con un número de fallos orgánicos elevado y con valores elevados de fibrinógeno. La supervivencia estaba asociada solamente con una puntuación menor del APACHE II (Tabla

19). La sepsis causada por organismos Gram-negativos no difería significativamente de la causada por Gram-positivos en cuanto a frecuencia de fallo hemodinámico ( $p=0,16$ ), supervivencia ( $p=0,4$ ), SNP (*E298D*) de la *NOS3* ( $p=0,9$ ), SNP (*-786T/C*) de la *NOS3* ( $p=0,07$ ), SNP (*27 bp-VNTR*) de la *NOS3* ( $p=0,9$ ), SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* ( $p=0,7$ ), número de órganos que fallaron ( $p=0,5$ ) o niveles plasmáticos de NOx ( $p=0,6$ ).

**Tabla 19. Análisis multivariante**

Variable pronóstica	Parámetros explicatorios	Valor de p	OR (IC 95%)
Sepsis	NOx ( $\mu\text{M}$ )	0,0009	1,043 (1,018-1,070)
	Fallo hemodinámico	0,0006	119,0 (7,9-1666,7)
	Fibrinógeno(mg/dl)	0,0001	1,015 (1,007-1,022)
	Tasa del Complejo Protrombínico (%)	0,001	0,880 (0,813-0,952)
	Número de Neutrófilos en sangre periférica ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,014	1,136 (1,026-1,258)
	genotipo AG frente al GG) del SNP ( <i>exón22</i> ) de la <i>NOS2A</i>	0,009	13,69 (1,94-98,0)
	Genotipos del SNP ( <i>E298D</i> ) de la <i>NOS3</i>	0,006	-
	GG frente a GT	0,998	-
	TT frente a GT	0,001	42,07 (4,22-419,8)
Fallo hemodinámico	Presencia de sepsis	<0,0001	46,95 (11,15-198,02)
	Número de órganos que fallaron	<0,0001	4,298 (2,295-8,048)
	Fibrinógeno (mg/dl)	0,017	0,997 (0,9948-0,9995)
Supervivencia	Puntuación del APACHE II	0,023	0,936 (0,883-0,991)

### NOx plasmático

El análisis multivariante reveló que las variables independientemente asociadas con niveles plasmáticos elevados de NOx en los pacientes globalmente eran: la presencia de sepsis ( $p < 0,0001$ ), la existencia de fallo hemodinámico ( $p = 0,02$ ), una cifra baja de neutrófilos de sangre periférica ( $p = 0,01$ ) y una puntuación elevada del APACHE II ( $p = 0,03$ ). Estas variables explicativas juntas representaron el 37,9% del total de variabilidad de los niveles de NOx, de los que la sepsis solamente representó el 32.7%.

Considerando solamente los pacientes sépticos, los predictores independientes de niveles plasmáticos de NOx fueron la presencia de fallo hemodinámico ( $p = 0,01$ ) y el SNP (*E298D*) de la *NOS3* ( $p = 0,02$ ), que suponían globalmente el 13.4% de la variabilidad total del NOx plasmático.

### CURVAS ROC PARA NOX EN RELACIÓN CON SEPSIS, FALLO HEMODINÁMICO Y PRONÓSTICO

La medida de los niveles de NOx plasmático en el momento del ingreso en UCI fue potencialmente útil para la detección de la sepsis, el área bajo a curva ROC fue 0,837 (IC 95% 0,778-0,896),  $p < 0,0001$ . El valor más discriminante de NOx fue de 25,17  $\mu\text{M}$  (sensibilidad 78,9%, especificidad 79.,1%). Considerando la

curva ROC de NOx para la detección del fallo hemodinámico, el área era de 0,77 (0,701-0,839),  $p < 0,0001$ , y el valor más discriminatorio de NOx en plasma era de 24,52  $\mu\text{M}$  (sensibilidad 73,0%, especificidad 72,8%). El valor predictivo de NOx plasmático para un pronóstico fatal considerando a todos los pacientes fue muy pobre (área de 0,526, IC 95% 0,396-0,656,  $p = 0,7$ ), pero mejoraba si solamente considerábamos a los pacientes sépticos (área 0,753, IC 95% 0,623-0,883,  $p = 0,027$ ).

#### **4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS RECEPTORES TLR2, TLR4, CD14, CCR5, TPA y PAI**

A continuación se detallan de forma pormenorizada en la siguiente tabla las frecuencias genotípicas y alélicas de los diferentes SNPs de los receptores celulares TLR, CD14, CCR5, de diferentes factores moduladores de la fibrinólisis sanguínea (TPA y PAI). No encontramos diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas ni alélicas de estos SNP entre pacientes sépticos y controles no infectados.

**Tabla 20: Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP de TLR2, TLR4, CD14, CCR5, TPA y PAI en pacientes sépticos y en controles no infectados de UCI.**

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		
	Genotipo	Sépticos	Controles no infectados	Alelo	Sépticos	Controles no infectados
<i>TLR2 Asp753Gly</i>	GG	90 (100,0 %)	89 (97,8 %)	G	90 (100,0 %)	180 (98,9 %)
	GA	0 (0,0 %)	2 (2,2 %)	A	0 (0,0 %)	2 (1,1 %)
	AA	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)			
<i>TLR4 Asp299Gly</i>	AA	75 (84,3 %)	83 (90,7 %)	A	164 (94,3 %)	173 (95,1 %)
	GA	14 (15,7 %)	7 (8,3 %)	G	14 (5,7 %)	9 (4,9 %)
	GG	0 (0,0 %)	1 (1,0 %)			
<i>TLR4 The399Ile</i>	CC	70 (77,8 %)	80 (87,9 %)	C	160 (88,9 %)	170 (93,4%)
	CT	20 (22,2 %)	10 (11,0 %)	T	20 (11,1 %)	12 (6,6 %)
	TT	0 (0,0 %)	1 (1,1 %)			
<i>CD14 C159T</i>	CC	19 (21,1 %)	21 (23,1 %)	C	86 (46,7 %)	98 (53,3 %)
	CT	48 (51,1 %)	46 (52,7 %)	T	88 (44,9 %)	90 (55,1 %)
	TT	25 (27,8 %)	22 (24,2 %)			
<i>CCR5</i>	WtWt	76 (85,4 %)	82 (90,1 %)	Wt	163 (91,6 %)	173 (95,1 %)
	WtΔ32	11 (12,4 %)	9 (9,9 %)	Δ32	15 (8,4 %)	9 (4,9 %)
	Δ32Δ32	2 (2,2 %)	0 (0,0 %)			
<i>tPA (I/D)</i>	I/I	27 (30,0 %)	29 (31,9 %)	I	96 (53,3 %)	84 (46,7 %)
	I/D	42 (46,7 %)	41 (45,0 %)	D	99 (54,4 %)	83 (46,7 %)
	D/D	21 (23,3 %)	21 (23,1 %)			
<i>PAI 4G/5G</i>	4G/4G	19 (21,1 %)	21 (23,1 %)	4G	84 (46,7 %)	90 (49,5 %)
	4G/5G	46 (51,1 %)	48 (52,7 %)	5G	96 (53,3 %)	92 (50,5 %)
	5G/5G	25 (27,8 %)	22 (24,2 %)			

P no significativa para todas las comparaciones



## **DISCUSIÓN**

### **CITOQUINAS**

Esta es la primera vez que se describe una asociación entre el SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  y un efecto protector contra el desarrollo de sepsis grave. Encontramos en nuestro estudio menos portadores del alelo A de este SNP entre los sépticos que en controles de UCI no infectados. De cualquier manera, no observamos ninguna relación entre este SNP del *TNF- $\alpha$*  y la mortalidad, la puntuación del APACHE II, el número de órganos que fallaron, la etiología de la sepsis o el foco primario de infección.

Hasta ahora se le ha prestado poca atención al papel del SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  como protector del desarrollo de infecciones en general y de sepsis en particular [44,123,124]. Pappachan y col. [130] encontraron que la frecuencia del alelo A del SNP (-238 A/G) del *TNF- $\alpha$*  era significativamente más elevada entre pacientes de UCI sépticos que morían en comparación con los que sobrevivían, pero en asociación con haplotipos de otros SNPs, como el (+252 A/G) de la linfotoxina- $\alpha$  (*LTA*) y el (-308 G/A, -1031 T/C) del *TNF- $\alpha$* . Los genes del *TNF- $\alpha$*  y de la *LTA* son genes vecinos que están en desequilibrio de sobrecruzamiento. Por tanto es difícil dilucidar el efecto individual del SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  en los resultados de Pappachan. El SNP (-238

G/A) del *TNF- $\alpha$*  se ha asociado con la malaria grave en poblaciones africanas [132-134], lo que sugiere que el SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  podría empeorar la evolución de la malaria por alteración del equilibrio entre la citoquina antiinflamatoria IL-10 y la proinflamatoria *TNF- $\alpha$*  [133]. Estudios funcionales directos proporcionaron información sobre el efecto del alelo variante A del SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  en la actividad promotora del gen [135-137]. En estos estudios, al reemplazar 10 bp que cubren la región del *TNF-238* con una secuencia irrelevante, se incrementaba la transcripción basal [138]. Además se ha sugerido que la región *TNF-238* contiene un lugar represor y un SNP del promotor del gen del *TNF- $\alpha$*  que podría modificar su actividad [139]. Resulta muy atractiva una asociación entre el SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  con cambios en los niveles plasmáticos de *TNF- $\alpha$*  incrementados por la sepsis pero esta hipótesis no se ha podido demostrar claramente. En nuestro estudio no encontramos diferencias en los niveles plasmáticos de *TNF- $\alpha$*  u otras citoquinas en portadores de diferentes genotipos del SNP (-238 G/A) de *TNF- $\alpha$*  o de otros SNPs de otras citoquinas excepto del SNP (-251 A/T) de la IL-8. Una hipótesis razonable podría ser que el SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  determinase cambios en la expresión de AP-1 y NF-KB, factores nucleares proteicos de unión al ADN que regulan la expresión de los genes de las citoquinas en respuesta a la infección grave. Sin embargo nuestros resultados no apoyan esta hipótesis. Aunque la

expresión de los genes de *AP-1* y *NF-κB* por los neutrófilos de sangre periférica fue significativamente menor en los pacientes sépticos que en los de los controles no infectados de UCI, no encontramos diferencias en la expresión de los genes de *AP-1* y *NF-κB* entre los portadores de los diferentes genotipos del SNP (-238 G/A) del *TNF-α* u otros SNPs de citoquinas. Por tanto, el mecanismo del efecto protector de este SNP del *TNF-α* en la sepsis permanece esquivo. Podría especularse que el alelo A del SNP (-238 G/A) del *TNF-α* podría ser un marcador funcional de otro SNP desconocido en otro lugar del gen del *TNF-α* o en otro gen cercano inmunológicamente relevante [132].

No tenemos una explicación clara de la baja expresión de los genes de *AP-1* y *NF-κB* por los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes sépticos en comparación con los de los controles no infectados en nuestro estudio, cuando la expresión de ambos factores de activación de la transcripción están generalmente incrementada en la sepsis inducida por LPS. Quizás el número importante de politraumatizados entre nuestros controles (44% del total de los controles) podría explicar este resultado contradictorio pues el factor tisular liberado tras el traumatismo incrementa la expresión de los genes de *AP-1* y *NF-κB* y este efecto puede superar al debido al LPS [143]. En contra de esta explicación debemos mencionar que no hubo diferencias en los niveles plasmáticos de citoquinas entre controles ingresados por politraumatismos y los ingresados por ACV para justificarlo

(datos no mostrados). En nuestro estudio no pudimos reproducir la asociación publicada previamente entre los SNPs (-308 G/A) del *TNF- $\alpha$* , (-889 C/T) del *IL-1 $\alpha$* , (+3954 C/T) del *IL- $\beta$*  y (-174 G/C) del *IL-6* con la evolución de la sepsis y mortalidad asociada a la misma [74,89, 90, 125-128].

El tamaño relativamente pequeño de la cohorte, los criterios estrictos de inclusión que utilizamos y la baja tasa de mortalidad pueden explicar esta discrepancia. Todos los enfermos sépticos incluidos eran inmunocompetentes y tenían, o bien hemocultivos positivos, o bien una fuente de infección demostrada microbiológicamente en el momento de ingreso en la UCI. La baja mortalidad en esta cohorte séptica con una media de 3 órganos que fallaron puede ser debida a la exclusión de pacientes con cáncer, infección por VIH, trasplantados u con otras causas de inmunosupresión. Los pacientes inmunocomprometidos, con una expectativa de vida más corta debido a su patología de base, han sido generalmente incluidos en la mayoría de las series de pacientes con sepsis previas. Nuestros criterios de inclusión tan restrictivos han limitado el número de pacientes reclutados y alargado nuestra ventana de reclutamiento.

En este estudio evaluamos los perfiles de 9 citoquinas y quemoquinas inflamatorias en la sepsis grave utilizando un microarray de ELISA que mide muchas proteínas simultáneamente. Las evaluaciones simultáneas de muchas citoquinas tienen la

ventaja de descubrir posibles asociaciones entre ellas y con los diferentes parámetros de gravedad de la sepsis. La mayoría de las citoquinas y MCP-1 estudiadas aquí, mostraron unos niveles plasmáticos significativamente más altos en los pacientes sépticos al compararlos con los controles no infectados, similares a los publicados previamente [146-156]. Los niveles plasmáticos de IL-6, IL-8, IL-10 y MCP-1 se correlacionaron con el número de órganos que fallaron y con la puntuación del APACHE II en nuestra cohorte como publicaron otros autores [148-158]. Encontramos una asociación independiente entre los niveles plasmáticos de IL-8 con el diagnóstico de sepsis y mortalidad. Los niveles plasmáticos de IL-8 podrían ser una herramienta útil para predecir la mortalidad de la sepsis como sugiere nuestro estudio. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por otros autores aunque el papel de las citoquinas plasmáticas como predictores de mortalidad en la sepsis todavía es motivo de controversia [153-156].

Respecto a la evolución secuencial de los niveles de citoquinas (time course) solamente la IL-10 mostró un descenso persistente entre los días 1º y 7º desde el ingreso del paciente en la UCI. No se puede descartar que la falta de diferencias en el time course de las citoquinas se deba al efecto normalizador del tratamiento de la sepsis instaurado en UCI. Sin embargo en contra de esta hipótesis está el que los niveles plasmáticos secuenciales de citoquinas no se modificaron en los controles no

infectados excepto para el TNF- $\alpha$ . Podríamos especular que el incremento progresivo de los niveles plasmáticos de IL-10 en el time course podría traducir un fracaso del tratamiento o recaída de la sepsis. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en pacientes quemados y sépticos, en los cuales además del descenso en la curva evolutiva de IL-10 a lo largo del tiempo, esta citoquina se comportó como un predictor de mortalidad en UCI [156,157].

En resumen, nosotros describimos la regulación diferencial de varias proteínas inflamatorias que podría contribuir a la fisiopatología de la sepsis. El SNP (-238 G/A) del TNF- $\alpha$  podría proteger contra el desarrollo de la sepsis. Este efecto era independiente de los niveles plasmáticos de citoquinas o de la expresión de factores de transcripción por los neutrófilos de sangre periférica. Además, los niveles plasmáticos elevados de IL-8 fueron los mejores predictores de mortalidad en la sepsis.

### **METALOPROTEASAS**

En esta Tesis encontramos por primera vez en la bibliografía una asociación entre los SNPs (-77A/G) de la MMP-13 y (-1607 1G/2G) de la MMP-1 con la presencia de sepsis. La asociación de este SNP de la MMP-13 con la sepsis puede que no sorprenda considerando el papel central de la MMP-13 en la cascada de

activación de las MMPs y la implicación de las mismas en la inflamación y en la respuesta a la endotoxina [38]. De cualquier manera, el mecanismo por el cual los portadores del genotipo AA y el alelo variante A de este SNP de la *MMP-13* desarrollan más fácilmente sepsis no se comprende bien. Entre otras razones porque no hemos podido encontrar una asociación entre los diferentes genotipos de este SNP y los cambios en los niveles plasmáticos de *MMP-13*. De cualquier manera, la expresión de la *MMP-13* puede estar incrementada en células de colágeno y otras células estromales humanas en los portadores de este SNP, que debe investigarse a fondo y que no pudimos analizar porque no se obtuvieron biopsias en nuestro estudio. Por otro lado, el incremento de la expresión de la *MMP-13* debido al SNP del gen de la *MMP-13* podría producir cambios en la expresión y en niveles plasmáticos de otras MMPs ligadas a la *MMP-13* en la cascada de activación de las MMPs, como la *MMP-2* (en nuestro estudio los niveles plasmáticos de *MMP-2* de los pacientes sépticos que fallecieron estaban elevados) y la *MMP-9* (que mostraban niveles plasmáticos descendidos en los pacientes sépticos de nuestro estudio). La asociación del SNP (-1607 1G/2G) de la *MMP-1* y la sepsis podría ser debida a un desequilibrio de sobrecruzamiento con el SNP de la *MMP-13* porque los genes de la *MMP-13* y de *MMP-1* están ambos localizados en el mismo clúster del cromosoma 11q22-23 junto con los genes de la *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-8*, *MMP-10*, *MMP-12*, y *MMP-20*. Incluso se ha sugerido la existencia de un

ancestro común en la evolución de los genes de las MMPs localizados en el cromosoma 11q [38]. Borghese y col han confirmado el desequilibrio de sobrecruzamiento entre los SNPs de las *MMP-13* y *MMP-1* en un estudio genético multi-étnico. Además las frecuencias alélicas de los SNPs de la *MMP-1*, *MMP-3* y *MMP-13* de los controles no infectados de UCI obtenidas en nuestro estudio fueron similares a los obtenidos en mujeres francesas caucásicas sanas [173].

La asociación entre SNPs de las MMPs e infección está muy poco estudiada. Asensi y col. han publicado una asociación entre el SNP (-1607 1G/2G, rs 11292517) de la *MMP-1* con la osteomielitis bacteriana. Esta asociación era debida a un incremento en la expresión ósea y de los niveles plasmáticos de la *MMP-1* en portadores del genotipo 2G/2G del SNP de la *MMP-1* [122]. Pan y col. observaron una asociación del genotipo TT del SNP (-1562 C/T, rs 34016235) de la *MMP-9* con la periodontitis crónica, una forma de osteomielitis mandibular, en pacientes chinos [121].

En nuestro estudio también observamos una tendencia a una menor supervivencia en pacientes de UCI portadores del genotipo 6A/6A del SNP (-1612 5A/6A, rs35068180) de la *MMP-3*. La baja mortalidad entre los pacientes sépticos de nuestro estudio ha limitado el estudio de esta variable. El genotipo 6A/6A del SNP de la *MMP-3* se ha asociado previamente con una menor expresión del gen de la *MMP-3* y niveles plasmáticos más bajos de la *MMP-3* al compararlos con los de los portadores del genotipo 5A/5A del

mismo SNP de la *MMP-3* [115-118]. De cualquier modo otros estudios han mostrado que los portadores del genotipo 6A/6A de este SNP de la *MMP-3* presentaban niveles plasmáticos elevados de *MMP-3* [122,165-177]. Nuestros resultados fueron similares aunque solamente en pacientes sépticos y no en los controles no infectados, lo cual es sorprendente y necesita ser investigado en mayor profundidad. El SNP de la *MMP-3* se ha asociado con la presencia de enfermedad cardiovascular, incluyendo la enfermedad coronaria severa y el infarto de miocardio, lo cual podría explicar la presencia de una menor supervivencia en pacientes sépticos de UCI portadores del SNP de la *MMP-3* observada en nuestra cohorte [115,176,177].

También observamos, al igual que otros autores, un incremento en los niveles plasmáticos de la mayoría de las MMPs en los pacientes sépticos, a excepción de la *MMP-9*, y el *TIMP-2*, pero no en los controles no infectados. Los niveles plasmáticos de *MMP-8* se correlacionaron positivamente y los de *MMP-9* negativamente con los de la PCR. Los niveles plasmáticos de *MMP-9* fueron menores en los pacientes sépticos en comparación con los de los controles, un hecho a considerar porque en el análisis multivariado se asociaron con un diagnóstico de sepsis. La implicación de las gelatinasas (*MMP-2* y *MMP-9*), ambas secretadas por los neutrófilos circulantes, en la fisiopatología de la sepsis está bien documentada [114,163,165]. Proponemos aquí un posible papel de las colagenasas (*MMP-13* y *MMP-1*) y

quizás de las estromelisininas (MMP-3) en la sepsis, un hallazgo interesante porque estas MMPs ni son expresadas por los neutrófilos de sangre periférica ni son liberadas desde los gránulos de los neutrófilos tras la inyección de endotoxina como las MMP-8 and MMP-9 [162]. La asociación de la MMP-1 con la presencia de sepsis se ha publicado recientemente. En un modelo murino, Tressel y col. observaron que la MMP-1 aparece a las pocas horas del comienzo de la sepsis. Además el inhibidor de la MMP-1 bloqueado experimentalmente, induce la sepsis en estos mismos animales [178]. La MMP-1 se expresa por células endoteliales no inactivas y es secretada por estas células en la sepsis. Este hecho conlleva la activación del receptor-1 activado por proteasas (PAR1), alteración de la permeabilidad vascular, trastornos de la coagulación y la producción de citoquinas y prostaglandinas [179].

Con respecto a la evolución secuencial en el tiempo de los niveles plasmáticos de MMPs y TIMPs (time course), es importante tener en mente que en nuestro estudio los niveles plasmáticos de MMP-1 y MMP-9 en los pacientes sépticos de la UCI alcanzaron su máximo el 7º día de ingreso. Por el contrario, los niveles plasmáticos de MMP-3, MMP-8, MMP-10 y TIMP-4 tuvieron su punto más bajo el 7º día de estancia en UCI. Esta puede ser una de las razones de la disparidad de nuestros resultados del time course de los niveles plasmáticos de MMPs y TIMPs en comparación con trabajos previos en la mayoría de los cuales se medían

solamente los niveles en el primer día (o un día sin determinar) a lo largo de su estancia en UCI. Nosotros no pudimos encontrar diferencias entre los niveles plasmáticos de TIMP-1 de los pacientes sépticos y de los controles no infectados o entre los sépticos supervivientes y los que fallecieron. El TIMP-1 ha sido propuesto por varios autores como un marcador de laboratorio útil para el pronóstico en los pacientes sépticos [165,166]. En ese sentido el alelo *T* del SNP [(372 *T/C*) , rs4898] del *TIMP-1* se asoció con niveles plasmáticos más elevados de TIMP-1 y una menor supervivencia entre los pacientes sépticos en un estudio [174]. La baja mortalidad (7,8%) de los pacientes sépticos de nuestro estudio limita las conclusiones con respecto al TIMP-1 y al resto de los datos analizados.

Podemos resumir nuestros hallazgos sobre las MMPs en la fisiopatología de la sepsis como sigue: la endotoxina bacteriana estimula la liberación de citoquinas que pueden contribuir a la expresión de MMPs de las células endoteliales (MMP-1) o de los neutrófilos de sangre periférica (MMP-8 y MMP-9). Además las MMPs activan a los precursores de citoquinas perpetuándose el círculo vicioso. La MMP-13 tiene un papel capital en el proceso de activación de las MMPs y así un SNP de la *MMP-13* influenciando su expresión podría contribuir a facilitar el desarrollo de la sepsis, como hemos encontrado en esta Tesis. También hemos observado que entre las MMPs estudiadas, las que más temprano incrementaban sus niveles plasmáticos fueron la

MMP-3, 8 y 10 mientras que otras como MMP-1 y MMP-9 se elevaban más tarde.

Observamos en el análisis multivariante que, niveles elevados de MMP-8 y bajos de MMP-9 los cuales se correlacionaban con niveles plasmáticos de PCR, se asociaban con un diagnóstico de sepsis, con niveles elevados de fibrinógeno y de neutrófilos de sangre periférica. Algunos de las MMPs elevadas en plasma, tales como MMP-1 producen trastornos de coagulación asociados a la sepsis. Otras MMPs ayudan a los neutrófilos a cruzar desde la sangre y los vasos linfáticos al foco de infección al digerir la membrana basal de colágeno de los capilares. Finalmente, las MMPs incluyendo la MMP-1, contribuyen a la reparación del tejido una vez resuelta la infección [162]. Por tanto el SNP de MMP-1 que influye en la producción de la MMP-1 podría jugar un papel tanto como estímulo de la sepsis, como en la reparación de la lesión tisular producida en la sepsis.

Hasta ahora, se han publicado 8 artículos basados en el papel de las MMPs y TIMPs en la sepsis en los últimos 15 años [114,163-169]. Las principales limitaciones de estos estudios son: 1º, pequeños tamaños muestrales; 2º, uso de controles sanos en lugar de pacientes no infectados de UCI como hemos hecho nosotros; y 3º, la ausencia de criterios de exclusión de pacientes con diferentes inmunodeficiencias [146].

En conclusión, esta es la primera vez que se publica una asociación entre los SNPs de la *MMP-13* y la *MMP-1* y la sepsis,

así como una asociación independiente de los niveles plasmáticos de MMP-8 y MMP-9 con la sepsis. El papel de las MMPs y sus SNPs en el desarrollo de la sepsis necesita ser estudiado en mayor profundidad.

### ÓXIDO NÍTRICO

En relación con los SNPs de NOS en la sepsis describimos una asociación de dos de ellos, individualmente o en combinación, con el desarrollo de sepsis, el (*E298D*, rs1799983) de la *NOS3* y el (*exón 22*, rs28944189) de la *NOS2A*. La asociación del SNP (*E298D*, rs1799983) de la *NOS3* con el desarrollo de sepsis podría estar relacionada con la presencia de niveles plasmáticos más elevados de NOx en los portadores del alelo variante *T* del SNP (*E298D*) de la *NOS3* que podría facilitar el desarrollo de fallo hemodinámico y la mortalidad de los pacientes sépticos. Algunos autores han sugerido que el SNP (*E298D*) de la *NOS3* podría empeorar la sepsis al disminuir la producción de NO por la *NOS3* en la microcirculación, lo que representa un mecanismo adaptativo muy importante para mantener el flujo sanguíneo de los diferentes órganos y la integridad vascular [110]. Otros autores han postulado que este SNP de la *NOS3* podría lesionar directamente la función endotelial induciendo un daño de la microvasculatura[182]. Tampoco podemos excluir la posibilidad de la existencia de un desequilibrio de sobrecruzamiento del SNP

(E298D) de la NOS3 con otro SNP cercano desconocido hasta ahora afectando la actividad de la NOS estimulada por las citoquinas producidas en la sepsis como hemos visto antes. Este hecho podría explicar el incremento de los niveles plasmáticos de NOx observado en los portadores del SNP (E298D) de la NOS3. Ninguno de los SNP estudiados aquí se asociaron con cambios en la supervivencia de los pacientes sépticos, aunque sólo hubo 7 muertes en el grupo de sépticos lo que es difícil sacar conclusiones definitivas sobre asociaciones genéticas y mortalidad.

Los portadores del alelo T variante del SNP (E298D) de la NOS3 y del genotipo AG del SNP (exón 22) de la NOS2A eran significativamente más frecuentes en el grupo de sépticos que en los controles de UCI no infectados. El efecto sumatorio potencial de la combinación de los SNPs de NOS3 y de NOS2A en el desarrollo de la sepsis no ha sido explorado hasta el momento, y esta es una de las principales aportaciones de este trabajo.

La asociación entre el SNP de la NOS3 (E298D) y sepsis ya ha sido descrita [110,111]. En estos estudios se observó una asociación de este SNP con el shock séptico, con la presencia de disfunción de varios órganos y con infecciones por microorganismos Gram negativos pero no con el desarrollo de la sepsis en sí mismo, como demostramos en nuestra Tesis. A diferencia de los trabajos anteriores no observamos una

correlación entre ser portador del alelo variante *T* del SNP (*E298D*) de la *NOS3* y la presencia o desarrollo de shock séptico, con el número de órganos que fallaron, o con la puntuación de APACHE II. Del mismo modo, no observamos ninguna asociación entre el alelo variante *T* de este SNP y la presencia de sepsis por Gram negativos o Gram positivos. No detectamos en nuestros pacientes asturianos, todos caucasianos, ningún portador del genotipo salvaje *GG* del SNP (*E298D*) *NOS3*, asociado con niveles séricos bajos de NOx, como tampoco se encontró entre sépticos chinos, todos de la raza Han [110].

Este es el primer estudio que encuentra una asociación entre el SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* y sepsis. Ya ha sido publicada una asociación del SNP en el *exón 16* (pero no en el *exón 22*) del gen de *NOS2A* con el shock séptico en pacientes Chinos [104]. Este SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* se ha asociado con el desarrollo de patología neuropsiquiátrica como la enfermedad de Parkinson y con trastornos depresivos recurrentes pero hasta ahora nunca con infecciones [183,184]. Hemos encontrado que el genotipo *AG* de este SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* era más frecuente entre sépticos en comparación con pacientes de UCI no infectados. Una hipótesis razonable para explicar esta asociación sería un cambio en la expresión del gen de *NOS2A* por los neutrófilos de sangre periférica en los pacientes sépticos portadores del genotipo *AG* de este SNP. Sin embargo esta explicación no parece válida puesto que no encontramos una asociación del SNP (*exón*

22) de la *NOS2A* con cambios en los niveles plasmáticos de NOx en pacientes sépticos. Por tanto, esta asociación entre el SNP (exón 22) de la *NOS2A* y la presencia de sepsis necesita de más investigación.

El NO es un mediador fundamental en la fisiopatología del shock séptico por un mecanismo dual. Por una parte el NO es un mediador de la pérdida de tono vascular (vasoplejia) característica de una fase temprana e hiperdinámica de la sepsis, y en segundo lugar contribuye a la depresión miocárdica en la fase tardía de la sepsis. El NO juega también un papel importante en la interacción entre plaquetas, leucocitos y el endotelio vascular y es fundamental en la regulación del flujo sanguíneo local. El NO activa la adenilato ciclasa que permite la formación de GMPc, el cual disminuye el  $Ca^{+2}$  intracelular y produce la relajación de las células de la musculatura lisa. El NO es rápidamente convertido a nitrito que es oxidado a nitrato por la hemoglobina en el interior de los eritrocitos [185-187]. El NO es difícil de cuantificar porque se produce en pequeñas cantidades y tiene una vida media muy corta. Aun así la medida de nitratos y nitritos es útil para cuantificar la actividad de la NOS. La reacción de Griess se utiliza hoy en día habitualmente para medir nitritos y nitratos, productos más estables en plasma que otros fluidos biológicos. En la reacción de Griess los nitratos no sufren diazotización con sulfanilamida y deben ser reducidos cuantitativamente a nitritos para

reaccionar con los reactivos de Griess [188-190]. Los nitratos representan 17.6% del total de los niveles plasmáticos de nitritos y nitratos (NOx) que mide la reacción de Griess [191]. Aunque en niveles fisiológicos los nitratos plasmáticos no son vasodilatadores, niveles plasmáticos elevados podrían justificar la alteración hemodinámica observada en la sepsis [192,193]. Por otra parte los niveles plasmáticos de NOx de nuestros controles no infectados (mediana 17  $\mu$ M) fueron similares a los publicados por otros autores [191]. Sin embargo los niveles plasmáticos de NOx de nuestros pacientes sépticos fueron más bajos (mediana 47.5  $\mu$ M) que los publicados por otros [194,195]. Este hecho da más valor a nuestros resultados porque aún así hemos podido observar diferencias significativas en los niveles de NOx al comparar sépticos y controles no infectados.

La importancia del papel de NOx en la patogénesis de la sepsis fue confirmada en nuestra Tesis, así como la presencia de una asociación fuerte entre los niveles plasmáticos de NOx y la presencia de sepsis tanto en el análisis univariante como multivariante. Los niveles elevados de NOx en plasma se asociaron con shock y menor supervivencia en los pacientes sépticos pero no en los controles no infectados. En cuanto al “time course” de NOx, aunque había una clara tendencia hacia el descenso de los niveles plasmáticos de NOx a lo largo del tiempo en pacientes sépticos (pero no en controles) y un incremento de

niveles plasmáticos de NO<sub>x</sub> en los pacientes que fallecieron en comparación con los que sobrevivieron, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El pequeño número de pacientes en los que pudimos disponer de mediciones secuenciales de NO<sub>x</sub> plasmático y, particularmente de pacientes que fallecieron, fueron probablemente responsables de la ausencia de esta significación estadística.

El reconocimiento de NO como un mediador importante de la sepsis y del shock séptico ha sugerido la potencial inhibición farmacológica de la producción de NO como una terapia coadyuvante útil en la sepsis. Algunos estudios apoyan esta idea mostrando que ratones mutantes de la cepa C57BL6 (knockout, KO) que carecen de los genes de *NOS2* o *NOS3* presentan alguna protección contra el shock séptico al mejorar la disfunción endotelial, incrementar la reactividad microvascular y disminuir su mortalidad tras exponerlos a LPS [196-200]. Sin embargo otros estudios han mostrado resultados opuestos pues ratones de la cepa C57BL6 también KO para los mismos genes de *NOS* tenían una supervivencia menor en la sepsis inducida [201]. Otro argumento que explicaría la mayor supervivencia de los ratones de la cepa C57BL6 del tipo salvaje, pero no en el modelo del ratón KO, podría residir en un papel beneficioso del NO como regulador crítico negativo de la vía de estabilización del inflamasoma NLRP3 de la mitocondria [202]. Intentos previos de frenar la producción de NO con inhibidores específicos no-isomorfos tales

como la metilarginina o L-NMMA, nitroarginina o L-NNA y el clorhidrato de NG-metil-L-arginina o 546C88, fueron inicialmente muy prometedores en el tratamiento del shock séptico en humanos, pero en estudios multicéntricos posteriores el uso del 546C88 en los paciente sépticos, se vio un incremento en la mortalidad [203,204]. Con inhibidores selectivos de NOS1 y NOS2 administrados en determinados momentos tras la inducción de sepsis en modelos animales se han obtenido resultados más alentadores y quizás esta vía podría llegar a ser una terapia útil para la sepsis en el futuro [205-206].

En resumen, el SNPs (*E298D*) de la *NOS3* y el (*exón 22*) de la *NOS2A* individualmente y en combinación, se asocian con sepsis grave. Además, los niveles plasmáticos de NOx se asocian con la presencia de shock séptico y con la mortalidad debida a la sepsis.

Para concluir, en lo que respecta a las bondades y limitaciones de nuestro estudio cabe destacar que:

- Nuestra cohorte, está integrada por 90 pacientes sépticos los cuales bien presentaron hemocultivos positivos, bien la fuente de la infección se demostró microbiológicamente.

- La población control la conformaron 91 pacientes ingresados en UCI que no presentaban un proceso infeccioso, en lugar de individuos sanos, algo que raramente se ve en otros estudios.
- El tamaño de la muestra, relativamente pequeño, aunque en lo que respecta a las MMPs, es la tercera en tamaño, pero la única procedente de un único hospital.
- La baja mortalidad de la cohorte séptica con una media de 3 fallos orgánicos puede ser debida a unos criterios de inclusión estrictos. Excluimos pacientes inmunocomprometidos, con cáncer, infección por VIH, trasplantados u otras causas de inmunodeficiencias, con una expectativa de vida más corta debido a su patología de base que, en la mayoría de las series previas si fueron incluidos o bien no se especifica. Nuestros criterios de inclusión tan restrictivos, asimismo, han limitado el tamaño de la muestra.
- Especificamos el momento en que se toman las muestras para medir niveles plasmáticos y, en un subgrupo de pacientes, realizamos mediciones a lo largo del tiempo de niveles de citoquinas, MMPs y NOx.
- La población estudiada fue únicamente caucasiana. Se necesitan estudios multiétnicos de pacientes sépticos para confirmar estos hallazgos y extrapolarlos a otras poblaciones.

## CONCLUSIONES

**A) Con respecto a las citoquinas y a sus polimorfismos (SNPs) observamos que:**

1. Los portadores del alelo variante A del SNP (-238 G/A) del *TNF- $\alpha$*  fueron significativamente menos frecuentes entre los pacientes con sepsis que entre los controles no infectados.
2. Los niveles plasmáticos al ingreso en UCI de IL-6, IL-8, IL-10, *TNF- $\alpha$*  y de MCP-1 estaban significativamente más elevados, y la expresión de los genes de *AP-1* y *NF- $\kappa$ B* de los neutrófilos de sangre periférica significativamente más descendida, en los pacientes con sepsis que en los controles no infectados.
3. El diagnóstico de sepsis se asoció de forma independiente a la ausencia del alelo variante A del SNP (-2398 G/A) del *TNF- $\alpha$* , lo que sugiere un papel protector de este SNP frente al desarrollo de sepsis. Asimismo se asoció de forma independiente a niveles basales elevados de IL-8 plasmática, de fibrinógeno, de neutrófilos de sangre periférica y, a niveles más bajos del complejo protrombínico, y a la presencia de fallo hemodinámico
4. La mortalidad se asoció de forma independiente a niveles plasmáticos más elevados de IL-8, lo que apunta a un papel predictor de esta citoquina sobre el pronóstico de los pacientes. También se asoció a puntuaciones más elevadas del APACHE II y a la presencia de sepsis.

**B) Con respecto a las MMPs y a sus SNPs, observamos que :**

1. Los homocigotos AA y los portadores del alelo A del SNP (-77 A/G) de la *MMP-13* fueron significativamente más frecuentes entre los pacientes con sepsis que entre los controles no infectados.
2. Los portadores del genotipo heterocigoto 1G2G del SNP (-1607 1G/2G) de la *MMP-1* fueron significativamente menos frecuentes entre los pacientes con sepsis que entre los controles no infectados .

3. Los niveles plasmáticos de MMP-3, -8, -10 and TIMP-2 fueron más altos, y los de MMP-9 más bajos, en los pacientes con sepsis que en los controles no infectados.

4. No observamos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de las diferentes MMPs entre los portadores de los diferentes genotipos de los SNPs de *MMP-1* y *MMP-13*.

5. El diagnóstico de sepsis se asoció de forma independiente a niveles plasmáticos mayores de MMP-8 y menores de MMP-9, una asociación no descrita hasta ahora en la literatura.

**C) Con respecto al NOx y a los SNPs de NOS observamos que :**

1. Los homocigotos *TT* y los portadores del alelo *T* del SNP (*E298D*) de la *NOS3* y los portadores del genotipo *AG* del SNP (*exón 22*) de la *NOS2A* fueron significativamente más frecuentes entre los pacientes con sepsis que entre los controles no infectados.

2. Los niveles plasmáticos al ingreso en UCI de NOx estaban significativamente más elevados en los pacientes con sepsis, especialmente en los que tenían fallo hemodinámico o fallecieron.

3. Los niveles plasmáticos basales de NOx estaban significativamente más elevados en los portadores del alelo *T* del SNP (*E298D*) de la *NOS3* que en los portadores del genotipo *GG* del mismo SNP.

4. El diagnóstico de sepsis se asoció de forma independiente a la presencia de los SNPs (*E298D*) de la *NOS3* y (*exón 22*) de la *NOS2A*, una asociación no descrita hasta ahora. Asimismo se asoció a valores elevados de NOx plasmático, de neutrófilos de sangre periférica y de fibrinógeno, y a niveles más bajos del complejo protrombínico.

5. la mortalidad global se asoció de forma independiente a una puntuación más elevada del APACHE II. Los niveles plasmáticos de NOx fueron significativamente más elevados en los pacientes que

fallecieron, pero solo en los pacientes sépticos, sin que existiera diferencias en los controles.

6. Los niveles plasmáticos basales de NOx se asociaron independientemente a la presencia de sepsis, de fallo hemodinámico, a niveles de neutrófilos circulantes más bajos y a puntuaciones del APACHE II más elevadas.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aforismos. En "Tratados Hipocráticos", traducción del griego de Carlos García Gual. Editorial Gredos, Madrid 1983; p. 243.
2. Marshall JC. Sepsis: Rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol.* 2008; 83 (3):471-482.
3. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin.* 2009; 25 (1):83-101
4. Torradabella P. Aspectos generales de la sepsis y el shock séptico: diagnóstico y epidemiología. En " Sepsis Grave". Ed. Experiencia, Barcelona 2002: 1-20.
5. Opal SM. The evolution of the understanding of sepsis, infection and host response: a brief history. *Crit Care Clin.* 2009; 25(4):637-663.
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee American college of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101(6):1644-1655.
7. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med.* 1995(10); 23. 1638-1652.
8. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA Score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001(14); 286: 1754-1758.

9. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31(4):1250-1256.
10. Briceño I. Sepsis: Definiciones y aspectos fisiopatológicos. Medicrit 2005; 2(8): 164-178.
11. Angus DC, Waxs RS. Epidemiology of sepsis: an update. Cri Care Med 2001; 29(7 Suppl): S109-S116.
12. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the united States: a trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med 2007;35(5): 1244-1250.
13. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B; EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. Intensive Care Med 2004; 30(4):580-588.
14. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hours in intensive care unit in England, Wales and Northern Ireland. Crit Care Med 2003; 31 (4): 2332-2338.
15. Flaatten H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. Cirtical Care 2007; 8(4): R180-R184.
16. Van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, Van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. Crit Care 2004; 8(4): R153-R162.

17. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators..Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP Study. Crit Care Med 2006; 34(2): 344-53.
18. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, Honrubia T, Algora A, Bustos A, García G, Diaz-Regañón IR, de Luna RR. Sepsis incidence and outcome: Contrasting the intensive care unit with the hospital ward. Crit Care Med 2007; 35(5): 1284-1289.
19. Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, López MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J; Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicenter study. Crit Care 2008; 12(6): R158.
20. Esper A, Martin GS. Is severe sepsis increasing in incidence and severity?. Crit Care Med 2007; 35(5): 1414-1415.
21. Lukaszewicz AC, Payen D. The future is predetermined in severe sepsis, so what are the implications?. Crit Care Med. 2010; 38 (10 Suppl):S513.
22. Daniels R. Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). J. Antimicrobials Chemother 2011; 66 (Suppl 2): ii11-ii23.
23. Chalupka AN, Tolmar D. The economics of sepsis. Crit Care Clinics; 2012; 28 (1): 57-76.

24. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014; 311(13): 1308-16.
25. López-Bojórquez LN, Zentella Dehesa A, Reyes-Terán G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research* 2004; 35(6): 465-479.
26. Bocchino M, Marruchella A, Saltini C. Immunogenetics of severe respiratory Infections: models for the development of new therapeutic strategies: *Respiration* 2005; 72(5): 449-457.
27. Silva E, Passons Rda H, Ferri MB, de Figueiredo LF. Sepsis: From bench to bedside. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63(1):109-120.
28. Martín Delgado MC. Fisiopatología: respuesta del huésped a la infección. Mediadores inflamatorios y antiinflamatorios. El óxido nítrico, citocinas. En *Sepsis grave*. Ediciones Experiencia, Barcelona 2002: 21-34.
29. Texereau J, Chiche JD, Tylor W, Choukroun G, Comba B and Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphism in severe infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Supl 7):S408-15
30. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench to bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis-hemodynamics, oxygen transport and nitric oxide. *Crit Care* 2003; 7(5):359-373.
31. Löeffe KS, Schilling O, Franzke CW. Series "Matrix Metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38(1):191-208.

32. Lorente L, Martín MM, Labarta L, Díaz C, Solé-Violán J, Blanquer J, Orbe J, Rodríguez JA, Jiménez A, Borreguero-León JM, Belmonte F, Medina JC, Llimiñana MC, Ferrer-Agüero JM, Ferreres J, Mora ML, Lubillo S, Sánchez M, Barrios Y, Sierra A, Páramo JA. Matrix Metalloproteinase-9-10 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit Care* 2009; 13(5): R158: 1-9.
33. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3): 562-573.
34. Roncalés Mateo FJ, Grau Cat J, Sancho Cía JM. Activación de la cascada de la coagulación, índices biológicos. En *Sepsis grave*. Ediciones Experiencia, Barcelona 2002: 35-43.
35. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004; 8(6): 462-468.
36. Levi M y van der Poll T. Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Crit Care* 2004; 8(6): 99-100.
37. Moraes TY, Downey GP. Death of septic monocyte: is more better?. *Crit Care* 2006; 10(3):146.
38. Meviere R. Pathophysiology of sepsis. Up to date 2012.
39. Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Critical Rev. Biochem Mol Biol* 2002; 37:149-166.
40. Russell JA. Drug Therapy: Management of Sepsis. *N Engl J Med*. 2006;355: 1699- 713.

41. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene. *Science* 1998; 282(5396): 2085-2088.
42. Simonds B. Tuberculosis in twins: a reportt for the Prohibit Committee of the Royal College of Physicians. London. Pitman Medical Publishing; 1963.
43. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1998; 318: 727-732.
44. Stüber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine Promotor Polymorphism in severe sepsis. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl 7): S416-420.
45. Garnacho Montero J, Garnacho Montero MC, Ortiz Leyba C, Alabó Pallés T. Polimorfismos genéticos en la sepsis: *Medicina Intensiva* 2005; 29(3): 185-191.
46. Hubáček JA, Poledne R. The common cDNA and amino acid sequences of the CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) receptor. *Physiol Res.*;1999;48(4):323-326.
47. Baldini M, Lohman IC, Halonem M, Erickson RP, Halt PG y Martinez FD. A polymorphism in the 5'flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum inmunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol.*1999,20(5):976-983.

48. Burgmann H, Winkler S, Locker GJ, Presterl E, Laczika K, Staudinger T, Knapp S, Thalhammer F, Wenisch C, Zedwitz-Liebenstein K, Frass M, Graninger W. Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1996, 80(3):307-310.
49. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171(3): 639-44.
50. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, manosa-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005;33(3):638-644.
51. Gibot S, Cariou A, Drouot 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 May;30(5):969-73.
52. Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Rothe G, Schmitz G. The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. *Genes Immun*. 2000 Aug;1(6):405-7.
53. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Watanabe E, Abe R, Hatano M, Tokuhisa T. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res*. 2005 Dec;129(2):322-8.

54. Hubáček JA, Poledne R. The common cDNA and amino acid sequences of the CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) receptor. *Physiol Res.* 1999;48(4):323-6.
55. Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis.* 2002 Nov 15;186(10):1522-5.
56. Jessen KM, Lindboe SB, Petersen AL, Eugen-Olsen J, Benfield T. Common TNF-alpha, IL-1 beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis.* 2007 Sep 18;7:108.
57. Barber RC, Chang LY, Arnoldo BD, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW, Aragaki CC. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res.* 2006 Dec;4(4):250-5.
58. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis.* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S408-15. Review.
59. Lorenz 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 Immun.* 2000 Nov;68(11):6398-401.
60. Zhu L, Li X, Miao C. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene.* 2012 Jun 15;501(2):213-218.

61. Bochud PY, Bochud M, Telenti A, Calandra T. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *Lancet Infect Dis*. 2007 Aug;7(8):531-42.
62. Henckaerts L, Nielsen KR, Steffensen R, Van Steen K, Mathieu C, Giulietti A, Wouters PJ, Milants I, Vanhorebeek I, Langouche L, Vermeire S, Rutgeerts P, Thiel S, Wilmer A, Hansen TK, Van den Berghe G. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 2009 Jan;37(1):192-201.
63. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):187-91.
64. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002 May 13;162(9):1028-32.
65. Yuan FF, Marks K, Wong M, Watson S, de Leon E, McIntyre PB, Sullivan JS. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and FcγRIIA gene polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol*. 2008 Mar-Apr;86(3):268-70.
66. Ahrens P, Kattner E, Köhler B, Härtel C, Seidenberg J, Segerer H, Möller J, Göpel W. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2004 Apr;55(4):652-6.
67. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, Holzmann B, Weighardt H. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology*. 2003 Jul;109(3):426-31.

68. Calvano JE, Bowers DJ, Coyle SM, Macor M, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF. Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). *Clin Immunol*. 2006 Nov;121(2):186-90.
69. Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, Hamann L, Mouktaroudi M, Oh DY, Latz E, Lorenz E, Schwartz DA, Ferwerda B, Routsis C, Skalioti C, Kullberg BJ, van der Meer JW, Schlag PM, Netea MG, Zacharowski K, Schumann RR. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care*. 2010;14(3):R103.
70. Zhu L, Li X, Miao C. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene*. 2012 Jun 15;501(2):213-218.
71. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3195-9.
72. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997 Apr;34(5):391-9.
73. 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 May;52(5):817-25.

74. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*. 1999 Aug 11;282(6):561-8.
75. Cipriano C, Caruso C, Lio D, Giacconi R, Malavolta M, Muti E, Gasparini N, Franceschi C, Mocchegiani E. The -308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int J Immunogenet*. 2005 Feb;32(1):13-8.
76. Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor alpha -- 308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 May;23(5):424-8.
77. 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 Jun;163(7):1599-604.
78. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994 Oct 6;371(6497):508-10.
79. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis*. 1996 Oct;174(4):878-80.

80. Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, Nedospasov SA. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm.* 1995-1996;46(1):42-50.
81. Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, Millo JL, Welsh KI, Holloway P, Hitman GA, Piper RD, Garrard CS, Hinds CJ. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun.* 2004 Dec;5(8):631-40.
82. Read RC, Camp NJ, di Giovine FS, Borrow R, Kaczmarski EB, Chaudhary AG, Fox AJ, Duff GW. An interleukin-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2000 Nov;182(5):1557-60.
83. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Maerker-Hermann E, Hoehler T. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000 Jun;114(6):1180-3.
84. Vanderborcht PR, Matos HJ, Salles AM, Vasconcellos SE, Silva-Filho VF, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN, Santos AR, Moraes MO. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004 Jun;72(2):143-8.
85. Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2008 May;28(3):232-6.

86. Fang XM, Schröder S, Hoeft A, Stüber 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 Jul;27(7):1330-4.
87. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998 Oct 1;102(7):1369-76.
88. Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R, Di Castelnuovo A, Nasso G, Burzotta F, Iacoviello L, Donati MB, Schiavello R, Maseri A, Possati G. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? *Circulation.* 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II195-9.
89. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1):32-7.
90. Sutherland AM, Walley KR, Manocha S, Russell JA. The association of interleukin 6 haplotype clades with mortality in critically ill adults. *Arch Intern Med.* 2005 Jan 10;165(1):75-82.

91. Martín-Loeches I, Solé-Violán J, Rodríguez de Castro F, García-Laorden MI, Borderías L, Blanquer J, Rajas O, Briones ML, Aspa J, Herrera-Ramos E, Marcos-Ramos JA, Sologuren I, González-Quevedo N, Ferrer-Agüero JM, Noda J, Rodríguez-Gallego C. Variants at the promoter of the interleukin-6 gene are associated with severity and outcome of pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* 2012 Feb;38(2):256-62.
92. Dempfle CE. Coagulopathy of sepsis. *Thromb Haemost.* 2004 Feb;91(2):213-24.
93. Song Y, Lynch SV, Flanagan J, Zhuo H, Tom W, Dotson RH, Baek MS, Rubio-Mills A, Singh G, Kipnis E, Glidden D, Brown R, Garcia O, Wiener-Kronish JP. Increased plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in bronchoalveolar lavage fluids are associated with increased mortality in a cohort of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiology.* 2007 Feb;106(2):252-61.
94. Hermans PW, Hazelzet JA. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphism and sepsis. *Clin Infect Dis.* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S453-8.
95. Geishofer G, Binder A, Müller M, Zöhrer B, Resch B, Müller W, Faber J, Finn A, Endler G, Mannhalter C, Zenz W; Central European Meningococcal Genetic Study Group. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene in children with systemic meningococcaemia. *Eur J Pediatr.* 2005 Aug;164(8):486-90.

96. Haralambous E, Hibberd ML, Hermans PW, Ninis N, Nadel S, Levin M. Role of functional plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism in susceptibility, severity, and outcome of meningococcal disease in Caucasian children. *Crit Care Med*. 2003 Dec;31(12):2788-93.
97. Hermans PW, Hibberd ML, Booy R, Daramola O, Hazelzet JA, de Groot R, Levin M. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet*. 1999 Aug 14;354(9178):556-60.
98. Binder A, Endler G, Müller M, Mannhalter C, Zenz W; European Meningococcal Study Group. 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism associates with disseminated intravascular coagulation in children with systemic meningococemia. *J Thromb Haemost*. 2007 Oct;5(10):2049-54.
99. Domingo P, Muñoz-Díaz E, Baraldès MA, Arilla M, Barquet N, Pericas R, Juárez C, Madoz P, Vázquez G. Relevance of genetically determined host factors to the prognosis of meningococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Aug;23(8):634-7.
100. Yende S, Angus DC, Ding J, Newman AB, Kellum JA, Li R, Ferrell RE, Zmuda J, Kritchevsky SB, Harris TB, Garcia M, Yaffe K, Wunderink RG; for the Health ABC Study. 4G/5G plasminogen activator inhibitor-1 polymorphisms and haplotypes are associated with pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 1;176(11):1129-37.

101. Sapru A, Hansen H, Ajayi T, Brown R, Garcia O, Zhuo H, Wiemels J, Matthay MA, Wiener-Kronish J. 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with mortality in intensive care unit patients with severe pneumonia. *Anesthesiology*. 2009 May;110(5):1086-91.
102. García-Segarra G, Espinosa G, Tassies D, Oriola J, Aibar J, Bové A, Castro P, Reverter JC, Nicolás JM. Increased mortality in septic shock with the 4G/4G genotype of plasminogen activator inhibitor 1 in patients of white descent. *Intensive Care Med*. 2007 Aug;33(8):1354-62.
103. Westendorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. *Lancet*. 1999 Aug 14;354(9178):561-573.
104. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):41-5.
105. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999 Oct 5;100(14):1515-20.
106. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem*. 2000 Oct;46(10):1626-30.

107. Alvarez R, González P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, González I, Alvarez V, Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide*. 2001 Aug;5(4):343-8.
108. Pascual M, López-Nevot MA, Cáliz R, Koeleman BP, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martín J. Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene promoter polymorphism. *Genes Immun*. 2002 Aug;3(5):299-301.
109. Asensi V, Montes AH, Valle E, Ocaña MG, Astudillo A, Alvarez V, López-Anglada E, Solís A, Coto E, Meana A, Gonzalez P, Carton JA, Paz J, Fierer J, Celada A. The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. *Nitric Oxide*. 2007 Feb;16(1):44-53.
110. Ma P, Zhu Y, Qiu H, Liu J, Wang Y, Zeng L. Endothelial nitric oxide synthase 894G→T but not -786T→C gene polymorphism is associated with organ dysfunction and increased mortality in patients with severe sepsis. *J Trauma*. 2011 Oct;71(4):872-7.
111. Huttunen R, Hurme M, Laine J, Eklund C, Vuento R, Aittoniemi J, Huhtala H, Syrjänen J. Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP) polymorphism is associated with hypotension in patients with *E. coli* bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism. *Shock*. 2009 May;31(5):448-53.
112. Ye S, Gale CR, Martyn CN. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2003 Sep;24(18):1668-71.

113. Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, Ishioka Si, Kudo R. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Lett.* 2003 Oct 8;200(1):49-55.
114. Lauhio A, Hästbackac J, Pettilä V, et al. Serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in sepsis: High serum levels of MMP-8 and TIMP-1 are associated with fatal outcome in a multicentre, prospective cohort study. Hypothetical impact of tetracyclines. *Pharmacol Res* 2011; 64:590-594.
115. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovascular Research* 2006; 69:636-645.
116. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271:13055-13060.
117. Blacknenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. Plasma Concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107:1579-1585.
118. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA. Matrix Metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1479-1484.
119. Kader AK, Shao L, Dinney CP, Schabath MB, Wang Y, Liu J, Gu J, Grossman HB, Wu X. Matrix metalloproteinases polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Res* 2006;66(24): 11644-11648.

120. Yoon S, Kuivaniemi H, Gatalica Z, Olson JM, Buttice G, Ye S, Norris BA, Malcom GT, Strong JP, Tromp G. MMP13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol.* 2002 Oct;21(6):487-98.
121. Pan Y, Li D, Cai Q, Zhang W, Ma J, Wang M, Wang L. MMP-9-1562C>T contributes to periodontitis susceptibility. *J Clin Periodontol* 2013; 40:125-130.
122. Montes AH, Valle-Garay E, Alvarez V, Pevida M, García Pérez E, Paz J, Meana A, Asensi V. A functional polymorphism in MMP1 could influence osteomyelitis development. *J Bone Miner Res.* 2010 Apr;25(4):912-9.
123. Stüber F. Effects of genomic polymorphism on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy? *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:S60-S644.
124. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 2005; 24: 300-312.
125. Majetschack M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade U, Stüber F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230:207-214.
126. Gu W, Zeng L, Zhou J, Jiang DP, Zhang L, Du DY, Hu P, Chen K, Liu Q, Wang ZG, Jiang JX. Clinical relevance of 13 cytokine gene polymorphisms in Chinese major trauma patients. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1261-1265.
127. Song Z, Song Y, Yin J, Shen Y, Yao C, Sun Z, Jiang J, Zhu D, Zhang Y, Shen Q, Gao L, Tong C, Bai C. Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality. *PLoS One* 2012;7:e46113.

128. Zhang AQ, Pan W, Gao JW, Yue CL, Zeng L, Gu W, Jiang JX. Associations between interleukin-1 gene polymorphisms and sepsis risk: a meta-analysis. *BMC Med Genet* 2014; 15:8. doi: 10.1186/1471-2350-15-8.

129. Asensi V, Alvarez V, Valle E, Meana A, Fierer J, Coto E, Carton JA, Maradona JA, Paz J, Dieguez MA, de la Fuente B, Moreno A, Rubio S, Tuya MJ, Sarasúa J, Llames S, Arribas JM. IL-1 alpha (-889) promoter polymorphism is a risk factor for osteomyelitis. *Am J Med Genet A*. 2003; 119A:132-136.

130. Pappachan JV, Coulson TG, Child NJ, Markham DJ, Nour SM, Pulletz MC, Rose-Zerilli MJ, de Courcey-Golder K, Barton SJ, Yang IA, Holloway JW. Mortality in adult intensive care patients with severe systemic inflammatory response syndromes is strongly associated with the hypo-immune TNF -238A polymorphism. *Immunogenetics* 2009; 61:657-662.

131. Stenzel A, Lu T, Koch WA, Hampe J, Guenther SM, De La Vega FM, Krawczak M, Schreiber S. Patterns of linkage disequilibrium in the MHC region on human chromosome 6p. *Hum Genet* 2004; 114:377-385.

132. McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 1999 179:287-290.

133. Flori L, Delahaye NF, Iraqi FA, Hernandez-Valladares M, Fumoux F, Rihet P. TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes Immun*. 2005; 6:472-480.

134. Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, Richardson A, Small K, Teo YY, Wilson J, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Griffiths MJ, Peshu N, Williams TN, Marsh K, Molyneux ME, Taylor TE, Rockett KA, Kwiatkowski DP. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis.* 2009; 199:569-575.
135. Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 1694-1700.
136. Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501-504.
137. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Maerker-Hermann E, Hoehler T.. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1180-1183.
138. Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 2001; 14: 316-323.
139. Fong CL, Siddiqui AH, Mark DF. Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor alpha gene. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 1108-1114.

140. Schippers EF, van 't Veer C, van Voorden S, Martina CA, le Cessie S, van Dissel JT. TNF-alpha promoter, Nod2 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin. *Cytokine* 2004; 26: 16-24.
141. Taudorf S, Krabbe KS, Berg RM, Møller K, Pedersen BK, Bruunsgaard H. Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:147-152.
142. Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B binding sites. *J Exp Med* 1991; 174: 1517-6. 30. Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock. *Anesthesiology* 1999; 91:1844-52.
143. Armstead VE. Opentanova iL., Minchenko AG., Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock. *Anesthesiology* 1999; 91:1844-52.
144. Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med* 2006; 32:1760-1712.
145. Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med* 1995; 21 Suppl 2:S258-S263.
146. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 2005; 23:488-493.

147. Rivers EP, Kruse JA, Jacobsen G, Shah K, Loomba M, Otero R, Childs EW. The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35:2016-2024.

148. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007;11:R49.

149. Lvovschi V, Arnaud L, Parizot C, Freund Y, Juillien G, Ghillani-Dalbin P, Bouberima M, Larsen M, Riou B, Gorochov G, Hausfater P. Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: a prospective observational study. *PLoS One* 2011;6: e28870. doi: 10.1371/journal.pone.0028870.

150. Que YA, Delodder F, Guessous I, Graf R, Bain M, Calandra T, Liaudet L, Eggimann P. Pancreatic stone protein as an early biomarker predicting mortality in a prospective cohort of patients with sepsis requiring ICU management. *Crit Care* 2012;16:R114.

151. Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, Resino S, Tamayo E, de Lejarazu RO, Bermejo-Martin JF. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine* 2012; 57: 332-336.

152. Lin KJ, Lin J, Hanasawa K, Tani T, Kodama M. Interleukin-8 as a predictor of the severity of bacteremia and infectious disease. *Shock* 2000; 14:95-100.

153. Rodríguez-Wilhelmi P, Montes R, Matsukawa A, Hurtado V, Montes M, Hermida J, Rocha E. Interleukin (IL)-8 and growth related oncogene-alpha in severe endotoxemia and the effects of a tumor necrosis factor-alpha/IL-1beta inhibitor on these chemokines. *Exp Mol Pathol* 2002; 73:220-229.
154. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, Papasteriades C, Armaganidis A, Roussos C, Orfanos SE, Douzinas EE. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine* 2006 36:283-290.
155. Wong HR, Cvijanovich N, Wheeler DS, Bigham MT, Monaco M, Odoms K, Macias WL, Williams MD. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:276-82.
156. Csontos C, Foldi V, Pálinkas L, Bogar L, Röth E, Weber G, Lantos J. Time course of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in patients with burns-prognostic value of interleukin-10. *Burns*. 2010; 36: 483-494.
157. Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, Orfanos SE, Nikitas N, Armaganidis A, Koutsilieris M, Roussos C, Tsagarakis S, Dimopoulou . Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations.
158. Vallés J, Rello J, Ochagavia A et al. Community-acquired bloodstream infection in critically-ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003; 123:1615-1624.
159. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 840-851.

160. Holmes CL, Rusell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003; 124:1103-1115.
161. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 2007; 170:1435-1444.
162. Parks WC, Wilson CL and Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2004; 4:617-629.
163. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Shoji H, Koide H. Modulation of plasma metalloprotease-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock : effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. *Am J Sci* 1998; 316:355-360.
164. Yassen KA, Galley HF, Webster NR. Matrix metalloproteinase-9 concentrations in critically ill patients. *Anesthesia* 2001; 56:729-732.
165. Hoffmann U, Bertsch T, Dvorstask E, et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: Prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scan J Infect Dis* 2006; 38:867-872.
166. Lorente L, Martin MM, Labarta M, et al. Matrix metalloproteinase-9, -10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit Care* 2009; 13:R158.
167. Gäddnas F, Sutinen MM, Koskela M, et al. Matrix metalloproteinase-2, -8 and -9 in serum and skin blister fluid in patients with severe sepsis. *Critical Care* 2010; 14:R49.

168. Yazdan-Ashoori P, Liaw P, Tottdl L, et al. Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J Crit Care* 2011; 26:556-565.
169. Mühl D, Nagy B, Woth G, et al. Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis. *Crit Care* 2011; 26:550-555.
170. Lin CC, Yang WC, Chung MY, Lee PC. Functional polymorphisms in matrix metalloproteinases-1, -3, -9 are associated with arteriovenous fistula patency in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:1805-1814.
171. Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7:e31251.
172. Ye S, Patodi N, Walker-Bone K, Reading I, Cooper C, Dennison E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Intern J Immunogenetics* 2007; 34:81-85.
173. Borghese B, Chiche JD, Vernerey DW, et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression. *Human Reproduct* 2008; 23:1207-1213.
174. Lorente L, Martin MM, Plasencia F, et al. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Critical Care* 2013; 17:R94.

175. Matthey DL, Nixon NB, Dawes PT, Ollier WER, Hajeer AH. Association of matrix metalloproteinase-3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Gen Immun* 2004; 5:147-149.
176. Samnegård A, Silveira A, Lundman P, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3-16125A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction. *J Intern Med* 2005; 258:411-419.
177. White AJ, Duffy SJ, Walton AS, et al. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodeling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovascular Res* 2007; 75:813-820.
178. Tressel SL, Kaneider NC, Kasuda S, et al. A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med* 2011; 3:370-384.
179. Vandembroucke RE, Dejager L, Libert C. The first MMP in sepsis. *EMBO Mol Med* 2011; 3:367-369.
180. Annane D, Sanquer S, Sebille V, et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet* 2000; 355:1143-1148.
181. Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007; 43:117-137.
182. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C. Genetic polymorphism G894T on the NOS gene is associated with endothelial function and vWF levels in premature myocardial infarction survivors. *Int J Cardiol* 2006; 107:95-100.

183. Levecque C, Elbaz A, Clavel J et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Gen* 2003; 12:79-86.
184. Galecki P, Maes M, Florkowski A, et al. Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder. *J Affect Dis* 2011; 129:175-182.
185. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl Med* 1993; 329:2002-12.
186. Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41. Suppl A, 31-9.
187. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:437-55.
188. Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJ. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 193-198.
189. Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma. *Free Radic Res* 2004; 38: 1235-40.
190. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851:51-70.

191. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:892-6.
192. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *PNAS* 2001; 97:12814-12819.
193. Doughty L, Carcillo JA, Kaplan S, Janosky J. Plasma nitrite and nitrate concentrations and multiple organ failure in pediatric sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26:157-62.
194. De Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chioleró R, Yersin B, Gallati H, Assicot M, Bohuon C, Baumgartner JD, Glauser MP, Heumann D. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997; 25: 607-13.
195. Strand OA, Leone A, Giercksky KE, Kirkebøen KA. Nitric oxide indices in human septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28:2779-85
196. Gross SS, Kilbourn RG, Griffith OW. NO in septic shock: good, bad or ugly? Learning from *iNOS* knockouts. *Trends Microbiol* 1996; 4:47-9
197. Hollenberg SM, Broussard M, Osman J, Parrillo JE. Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res* 2000; 86:774-8.

198. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of *iNOS* knockout mice. *FASEB J* 2003; 17:773-5.
199. Bailey TC, Cavanagh C, Mehta S, Lewis JF, Veldhuizen RA. Sepsis and hyperoxia effects on the pulmonary surfactant system in wild-type and *iNOS* knockout mice. *Eur Resp J* 2002; 20:177-82.
200. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (*eNOS*) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280:10040-6.
201. Cobb JP, Hotchkiss RS, Swanson PE, Chang K, Qiu Y, Laubach VE, Karl IE, Buchman TG. Inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery* 1999; 126: 438-42.
202. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, He Z, Zeng Y, Hu Y, Sun S, Li J, Wu X, Wang X, Strober W, Chen C, Meng G, Sun B. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res* 2013; 23:201-12.
203. Bakker J, Grover R, McLuckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D, Grossman S, Donaldson J, Takala J; Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med.* 2004 ; 32: 21-30.

204. López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004; 32: 21-30.
205. Liaudet L, Rosselet A, Schaller MD, Markert M, Peter C, Feihl F. Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. *J Infect Dis* 1998; 177:127-32.
206. Su F, Huang H, Akieda K, Occhipinti G, Donadello K, Piagnerelli M, De Backer D, Vincent JL. Effects of a selective *iNOS* inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock. *Shock.* 2010; 34: 243-9.
207. Lange M, Hamahata A, Traber DL, Nakano Y, Traber LD, Enkhbaatar. Specific inhibition of nitric oxide synthases at different time points in a murine model of pulmonary sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404:877-81.
208. Stahl W, Matejovic M, Radermacher P. Inhibition of nitric oxide synthase during sepsis: revival because of isoform selectivity? *Shock.* 2010; 34: 321-2.
209. Wang Z, Feng K, Yue M, et al. A non-synonymous SNP in the *NOS2* associated with septic shock in patients with sepsis in Chinese populations. *Hum Genet* 2013; 132:337-346.
210. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the *ecNOS* gene polymorphism with plasma no metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:190-193.

211. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *Faseb J* 2007; 21:2635-2663.
212. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2629-37.
213. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DE. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3147-53.
214. Kwiatkowski D, Liu L, Charles IG. Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease. *Nitric Oxide* 2000; 4: 379-383.
215. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-5248.
216. Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 2002; 360: 1468-1475.
217. Orozco G, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, et al. Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphisms in human brucellosis. *Microbes Infect* 2003; 5: 1165-1169.

218. Celik U, Yildizdas D, Alhan E, et al. Genetic dilemma: eNOS gene intron 4a/b VNTR polymorphism in sepsis and its clinical features in Turkish children. *Turk J Pediatr* 2008;50:114-9.
219. Tsai HH, Lee WR, Wang PH, Cheng KT, Chen YC, Shen SC. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in macrophages. *J Dermatol Sci* 2013;69:122-31.
220. Ratajczak-Wrona W, Jablonska E, Garley M, Jablonski J, Radziwon P, Iwaniuk A. Role of AP-1 family proteins in regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human neutrophils. *J Immunotoxicol* 2013;10:32-9.
221. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006; 445:214-224.
222. Mitaka C, Hirata Y, Yokoyama K, Wakimoto H, Hirokawa M, Nosaka T, Imai T. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock* 2003; 19:305-9.



## PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS



## OPEN

SUBJECT AREAS:  
BACTERIAL INFECTION  
SEPSISReceived  
27 January 2014Accepted  
25 April 2014Published  
16 May 2014Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
V.A. (vasensia@gmail.  
com)

## Role of plasma matrix-metalloproteases (MMPs) and their polymorphisms (SNPs) in sepsis development and outcome in ICU patients

Guadalupe Martín<sup>1</sup>, Víctor Asensi<sup>2</sup>, A. Hugo Montes<sup>3</sup>, Julio Collazos<sup>4</sup>, Victoria Álvarez<sup>5</sup>, José A. Carton<sup>2</sup>, Francisco Taboada<sup>1</sup> & Eulalia Valle-Garay<sup>2</sup><sup>1</sup>Critical Care, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), <sup>2</sup>Infectious Diseases, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), <sup>3</sup>Biochemistry and Molecular Biology, Oviedo University School of Medicine, Oviedo, <sup>4</sup>Infectious Diseases, Hospital de Galdacano, Vizcaya, all in Spain, <sup>5</sup>Molecular Genetics Unit-Nephrology Research Institute, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Matrix-metalloproteases (MMPs) and their tissue-inhibitors (TIMPs), modulated by different single nucleotide polymorphisms (SNPs), are critical in sepsis development. Ninety ICU severely septic and 91 ICU uninfected patients were prospectively studied. *MMP-1* (-1607 1G/2G), *MMP-3* (-1612 5A/6A), *MMP-8* (-799 C/T), *MMP-9* (-1562 C/T), and *MMP-13* (-77A/G) SNPs were genotyped. Plasma MMPs (-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) and TIMPs (-1, -2, -4) were measured. AA homozygotes and A allele carriers of *MMP-13* (-77 A/G) and 1G2G carriers of the *MMP-1* (-1607 1G/2G) SNPs frequencies were different between septic and uninfected patients ( $p < 0.05$ ), as well as plasma MMP-3, -8, -9 -10 and TIMP-2 levels ( $p < 0.04$ ). No differences in MMPs levels among *MMP-13* or *MMP-1* SNPs genotypes carriers were observed. The area under the ROC curve for MMP-8 in the diagnosis of sepsis was 0.87 (95% CI 0.82–0.92), and that of CRP was 0.98 (0.94–0.998), whereas the area of MMP-9 in the detection of non-septic state was 0.73 (0.65–0.80),  $p < 0.0001$  for all curves. Sepsis associated with increased MMP-8 and decreased MMP-9 levels in multivariate analysis ( $p < 0.0002$ ). We report for the first time an association between *MMP-13* and *MMP-1* SNPs and sepsis. An independent association of MMP-8 and MMP-9 levels with sepsis was also observed.

Sepsis is the most common cause of death in the Intensive Care Units (ICU). Despite modern intensive care and antibiotic treatments the mortality of sepsis still remains high, ranging from 20% to 30% in septic shock<sup>1,2</sup>. The role of the immune system in the pathophysiology of septic shock (cytokines, neutrophils, monocytes, macrophages) has been well documented but little is known regarding the role of extracellular matrix metalloproteases (MMPs)<sup>3,4</sup>.

MMPs are a family of zinc-dependent endoproteases that share amino-acid sequences, structural domains and substrates and can degrade the extracellular matrix (ECM) proteins. Their activity depends on activation of MMPs zymogens and is influenced by tissue inhibitors (TIMPs). MMPs are involved in the response to tissue injury and inflammation and are stimulated by cytokines. MMPs activity is increased in inflammatory diseases, acute respiratory distress syndrome (ARDS) and in response to endotoxin injection. Some MMPs, such as MMP-8 and -9, are stored in neutrophils granules and are liberated by endotoxin. MMPs release membrane-bound cytokines such as TNF- $\alpha$ . MMPs cleavage of ECM collagen present in membranes basement might help neutrophils crossing blood and lymph circulation into sites of infection<sup>5,6</sup>. There is a large and ever increasing family of mammalian MMPs that are broadly divided in different subfamilies according to their substrate specificity. Gelatinases (MMP-2 and -9) have been related to sepsis so far although less attention has been paid to collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10). This is important considering the central role played by MMP-3 and especially MMP-13 in the MMPs activation cascade<sup>7</sup>. Previous studies have found increased serum levels of most of the MMPs and TIMPs in sepsis although results are far from clear<sup>8–15</sup>. Only three studies centered on the time course of MMPs and TIMPs so far, two of them only tangentially<sup>12–14</sup>. Different polymorphisms (SNPs) of MMPs and TIMPs have been described. Some of them such as the *MMP-3* (-1612 5A/6A), *MMP-9* (-1562 C/T) and *MMP-13* (-77 A/G) are located in the MMPs genes promoter region and induce changes in MMPs



genes mRNA and protein expression<sup>16</sup>. These functional *MMPs* SNPs are associated mostly with cardiovascular disease susceptibility, but also with cancer, rheumatic diseases and other conditions, such as endometriosis<sup>16–24</sup>. To our knowledge, only two papers on *MMPs* SNPs and infection have been published, one reporting an association of a *MMP9* SNP with periodontitis susceptibility<sup>25</sup> and a second, from our group, of a *MMP1* SNP with bacterial osteomyelitis<sup>26</sup>. Very recently an association between a *TIMP1* SNP and sepsis mortality has been published<sup>27</sup>.

The aims of this study were: 1. to investigate the baseline and time course plasma levels of *MMPs* and *TIMPs* in ICU septic and uninfected patients; 2. to investigate whether *MMPs* SNPs might associate with susceptibility to sepsis or influence the sepsis outcome, with/out associated changes in plasma *MMPs* and *TIMPs* levels. In order to answer these questions, plasma levels of different *MMPs* and *TIMPs* were measured and different SNPs of *MMPs* were genotyped in septic and uninfected control patients. The time course of *MMPs* and *TIMPs* at days 1, 3 and 7 of ICU admission in a subgroup of septic patients and uninfected controls was also analyzed.

## Methods

**Patients.** Ninety ICU patients with severe sepsis admitted to the ICU of the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) in Oviedo, Spain, between May 2007 and August 2010 were enrolled in the study. Patients were enrolled as septic if fulfilled the diagnosis of severe sepsis according to the 1992 International Sepsis Definitions Conference Criteria modified in 2003<sup>28,29</sup>. In addition, all septic patients had positive blood cultures or a microbiologically-demonstrated source of bacterial infection at ICU admission. All infections were community-acquired. Patients with cancer, HIV infection, transplantation or other causes of immunodepression were excluded. Ninety one uninfected patients admitted to the ICU for other non-infective diseases, mostly severe trauma and brain strokes, were used as controls. If a control patient developed an ICU infection during the follow-up was excluded from the control group. APACHE II scores and number of organ failures were calculated in septic patients and uninfected controls. Patients and controls were members of a homogeneous Caucasian population, and were residents of the same region (Asturias, Northern Spain) that has a small foreign immigrant population (less than 5%). Each participant or their legal representatives gave informed consent for the study, which was approved by the Ethics Committee of the HUCA. Organ dysfunction failures were defined according to Marshall<sup>30</sup>. Treatment of organ failures, volume resuscitation, and supportive therapy for sepsis were based on currently applied guidelines<sup>31</sup>. Fluid resuscitation with crystalloids and colloids, early broad spectrum antibiotic treatment (most commonly broad spectrum  $\beta$ -lactams such as carbapenems or piperacillin-tazobactam with or without aminoglycosides), norepinephrine with or without dobutamine in case of hemodynamic shock, infusion of *iv* insulin for glucose level control, furosemide with hemofiltration in oliguria or anuria, stress ulcer prophylaxis with omeprazole, and thrombosis prophylaxis with enoxaparin or fraxiparin were administered. Morphine and propofol were used for analgesia and sedation during mechanical ventilation at appropriate doses. None of the patients received drotrecogin alfa.

**Methods.** All the experiments described here were performed in accordance with the regulations issued by the Ethics Committee of the HUCA.

**Plasma *MMPs* and *TIMPs*.** Ten ml of blood were drawn by venipuncture in EDTA-containing tubes within the first 24 hours of ICU admission in all the individuals, and in a subgroup of 14 septic patients and 18 controls samples were also obtained at days 1, 3 and 7 of ICU stay. Tubes were centrifuged for 5 minutes at 1800 g and serum was removed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Plasma levels of *MMPs*-1, -2, -3, -8, -9, -10 and -13 and *TIMP*-1, -2, and -4 were measured using the Quantibody<sup>TM</sup> Human *MMP* Array 1 from Raybiotech (Raybiotech, Parkway Lane, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions<sup>32</sup>.

***MMPs* SNPs genotyping.** DNA was obtained from peripheral blood cells and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before use. The following SNPs of *MMPs* were genotyped by PCR: *MMP-1* ( $-1607$  *IG/2G*, rs 11292517), *MMP-3* ( $-1612$  *5A/6A*, rs35068180), *MMP-8* ( $-799$  *C/T*, rs 11225395), *MMP-9* ( $-1562$  *C/T*, rs 34016235), and *MMP-13* ( $-77$  *A/G*, rs 2252070). Oligonucleotide primer sequences, PCR conditions and restriction enzymes used for genotyping and sequencing the different matrix metalloproteases (*MMPs*) polymorphisms studied are described elsewhere<sup>16,23,26,33</sup>.

**Other laboratory analysis.** A complete hemogram, coagulation, general biochemistry, and C-reactive protein (CRP) levels were obtained from patients and controls at day 1 of ICU admission.

**Statistics.** Results are expressed as median and inter-quartile range (IQR), mean and range or proportions as appropriate. Spearman's rho was used to assess the correlations among continuous variables. The Pearson  $\chi^2$  test was used to compare

allele and genotype frequencies and the clinical characteristics between the groups. Fisher's exact test and the Yates correction were used when indicated. Odds ratios (OR's) and their 95% confidence intervals (CI) were also calculated. Variables with a normal distribution were compared by the Student *t* test, while those without a normal distribution were compared by the Mann-Whitney test. A repeated measures general linear model procedure was carried out to evaluate the course of *MMPs* and *TIMPs* over time. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to evaluate the diagnostic accuracy of selected variables. A multivariate stepwise logistic regression analysis was also done to assess the factors independently associated with sepsis and death. The statistical analysis was performed with the SPSS Statistical Software (version 15.0, Chicago, USA) and GraphPad Prism Software (version 5.0, San Diego, CA, USA). All the reported *p* values are two-sided. A *p*-value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Patients clinical and laboratory characteristics and outcome.

Septic and uninfected ICU patients were matched in age and sex. There were no differences regarding the APACHE II score. A total of 21 individuals died (11.6%). Although more uninfected controls died there were not statistically significant differences compared to the septic patients. As expected, the number of organ failures has significantly higher in septic patients. Positive blood cultures were observed in 75 (83.3%) of septic patients, 40 (53.3%) of them grew Gram negative bacteria, mostly *Escherichia coli* (18, 24%) and 35 (46.7%) grew Gram positive bacteria, mostly *Streptococcus pneumoniae* (16, 21.3%). The main sources of infection were urinary, intra-abdominal and respiratory. The uninfected control group was composed of ICU patients admitted mainly because of politrauma and neurological problems.

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of both groups, and Table 2 the laboratory results. We observed significantly higher levels of neutrophils, CRP and plasma *MMP*-3, -8, -10, and *TIMP*-2 and lower concentrations of *MMP*-9 in septic patients compared to uninfected controls at day 1 of ICU admission. *MMP*-8 correlated positively ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.0001$ ) and *MMP*-9 negatively ( $r = -0.29$ ,  $p = 0.003$ ) with CRP levels. The remaining *MMPs* and *TIMPs* did not show any significant correlation with CRP ( $p = 0.07$  to  $p = 0.9$ ). Plasma levels of *MMP*-2 and *MMP*-13 were significantly increased in septic survivors compared to non-survivors (Table 3).

***MMPs* SNPs.** Table 4 shows the genotypic and allelic frequencies in septic and control patients. Of all the *MMPs* SNPs studied we only found that the *AA* genotype of the *MMP-13* ( $-77$  *A/G*) SNP was significantly more frequent and the *IG/2G* genotype of the *MMP-1* ( $-1607$  *IG/2G*) less frequent in septic patients compared to uninfected ICU controls. The *A* allele of the *MMP-13* SNP was also significantly more frequent in septic patients compared to uninfected controls. No differences in plasma *MMPs* levels in carriers of the different genotypes of the *MMP-13* ( $-77$  *A/G*) and of the *MMP-1* ( $-1607$  *IG/2G*) SNPs were observed (data not shown). Septic carriers of the *MMP-3* ( $-1612$  *5A/6A*) genotype had significantly higher plasma levels of *MMP*-3 compared to those with the *5A/5A* genotype and to uninfected controls (Figure 1).

Due to the relatively small number of non-survivors in the sepsis group (7 patients) it is difficult to draw definitive conclusions regarding the *MMPs* SNPs studied and mortality. No associations with the APACHE II score or the number of organ failures were observed for any of the *MMPs* SNPs studied.

**Logistic regression analysis.** Variables with a *p* value  $< 0.1$  in the univariate comparisons were used for the logistic regression analysis. Sepsis was independently associated with the following variables at the first day of ICU admission: higher *MMP*-8 concentrations (OR [95%CI] 1.107 [1.058–1.158],  $p < 0.0001$ ), fibrinogen levels (1.010 [1.005–1.015],  $p = 0.0001$ ), neutrophils counts (1.116 [1.014–1.228],  $p = 0.02$ ), and number of organ failures (2.174 [1.117–4.229],  $p = 0.02$ ), and lower concentrations of *MMP*-9 (0.995 [0.992–0.998],  $p = 0.0001$ ).



Table 1 | Overall demographic and clinical characteristics of septic and uninfected ICU patients

	Septic (n = 90)	Uninfected Controls (n = 91)	p-value
Age	58.5 (45.0–73.0)	64.0 (50.0–71.0)	0.9
Gender (male/female)	50/40	61/30	0.1
APACHE II	17.0 (12.0–23.0)	16.0 (9.0–22.0)	0.2
Mortality (%)	7 (7.8)	14 (15.4)	0.1
Number of organ failures	3.0 (2.0–4.0)	2.0 (1.0–2.0)	<0.0001
Source of infection			
Genito-urinary (%)	26 (28.9)	-	
Intra-abdominal (%)	22 (24.4)	-	
Lung (%)	16 (17.8)	-	
CNS (%)	12 (13.3)	-	
Skin-soft tissue (%)	8 (8.9)	-	
Endocarditis (%)	5 (5.6)	-	
Other location (%)	1 (1.1)	-	
Non-septic diagnosis			
Polytrauma (%)	-	40 (44.0)	
Cerebro-vascular attack (%)	-	46 (50.5)	
Other diagnosis (%)	-	5 (5.5)	

Results are expressed as median (IQR).

Survival in septic patients was independently associated with lower plasma levels of MMP-2 (OR [95%CI] 0.456 [0.252–0.824],  $p = 0.009$ ) and higher prothrombin activity (1.107 [1.018–1.204],  $p = 0.018$ ) in the multivariate regression analysis.

**ROC curves.** The area under the ROC curve for MMP-8 in the diagnosis of sepsis was 0.87 (95% CI 0.82–0.92),  $p < 0.0001$ . The most discriminant value was 30.5 ng/mL (sensitivity 80.0%, specificity 84.6%). The area for MMP-9 in the detection of non-septic state was 0.73 (95% CI 0.65–0.80),  $p < 0.0001$ , being the most discriminant cut-off level 567.1 ng/mL (sensitivity 68.1%, specificity 70.0%). Regarding CRP, the area under the ROC curve in the diagnosis of sepsis was 0.98 (95% CI 0.94–0.998),  $p < 0.0001$ , better than those of the MMPs and TIMPs. The most discriminant value of CRP was 8.0 ng/mL (sensitivity 89.0%, specificity 92.3%).

**Plasma MMPs and TIMPs time course.** The course of MMPs y TIMPs over time were evaluated in a subgroup of 14 sepsis and 18 uninfected control patients, who underwent measurements at day 1, 3 and 7 of ICU admission. Considering the three determinations of each septic patient altogether, we found progressively decreasing levels over time for MMP-3 ( $p = 0.02$ ), MMP-8 ( $p = 0.015$ ), MMP-10 ( $p = 0.0001$ ) and TIMP-4 (0.016), and progressively

increasing concentrations for MMP-1 ( $p = 0.02$ ) and MMP-9 ( $p = 0.01$ ). On the contrary, there were no statistically significant differences over time for any MMP or TIMP in the control group (Fig. 2, A–F).

The slopes of the MMPs and TIMPs curves over time were significantly different between septic and uninfected control patients only for MMP-3 (overall  $p = 0.045$ ; days 1–3  $p = 0.6$ ; days 3–7  $p = 0.04$ ), MMP-8 (overall  $p = 0.002$ ; days 1–3  $p = 0.047$ ; days 3–7  $p = 0.03$ ), MMP-9 (overall  $p = 0.003$ ; days 1–3  $p = 0.5$ ; days 3–7  $p = 0.001$ ) and MMP-10 (overall  $p = 0.0004$ ; days 1–3  $p = 0.005$ ; days 3–7  $p = 0.04$ ).

## Discussion

We report here for the first time an association between the *MMP-13* (–77 A/G) and the *MMP-1* (–1607 1G/2G) SNPs and sepsis. The *MMP-13* SNP association with sepsis we report might not be surprising considering the central role of MMP-13 in the MMPs activation cascade and the involvement of MMPs in inflammation and response to endotoxin<sup>17</sup>. However the mechanism by which carriers of the AA genotype and the A allele of this *MMP-13* SNP develop more easily sepsis is not well understood. We could not find an association between changes of plasma MMP-13 levels and the different genotypes of the *MMP-13* SNP. However, the expression of

Table 2 | Laboratory results of septic and uninfected control patients at day 1 of ICU admission

	Septic (median, IQR)	Uninfected (median, IQR)	p-value
Number	90	91	
Neutrophils ( $\times 10^3$ /ml)	12.8 (7.5–19.5)	9.6 (5.8–14.5)	0.002
CRP (mg/ml)	26.0 (17.6–36.2)	1.0 (0.3–3.1)	<0.0001
Fibrinogen (mg/dl)	692.0 (576.5–847.8)	433 (322.8–556.39)	<0.0001
Prothrombin complex factors rate (%)	59.5 (49–74)	83 (72–92)	<0.0001
Activated partial thromboplastin time (seconds)	28.9 (17–8.35.4)	26.1 (21.38–29)	0.02
MMPs/TIMPs (ng/ml)			
MMP-1	25.6 (15.5–57.6)	27.8 (14.5–56.1)	0.5
MMP-2	1.0 (0.5–1.0)	0.6 (0.4–1.1)	0.1
MMP-3	19.8 (12.1–47.2)	12.4 (6.6–23.9)	<0.0001
MMP-8	48.0 (33.7–73.0)	16.5 (10.1–35.7)	<0.0001
MMP-9	394.3 (198.8–618.7)	592.4 (376.6–766.9)	<0.0001
MMP-10	50.9 (27.8–160.4)	23.2 (10.4–47.7)	<0.0001
MMP-13	0.1 (0.07–0.3)	0.08 (0.04–0.2)	0.2
TIMP-1	253.1 (230.6–304.6)	259.3 (218.0–303.6)	0.9
TIMP-2	101.7 (70.3–124.7)	87.2 (58.8–119.1)	0.045
TIMP-4	3.7 (2.1–6.9)	2.8 (1.8–5.5)	0.07



Table 3 | Laboratory characteristics of surviving and non-surviving ICU septic patients

	Non-survivors (median, IQR)	Survivors (median, IQR)	p-value
Number	7 (7, 8)	83 (92, 2)	
Neutrophils ( $\times 10^3$ /ml)	7.5 (43.1–16.4)	13.5 (7.7–19.6)	0.1
CRP (mg/ml)	25.1 (9.3–28.6)	26.6 (17.9–37.1)	0.5
Fibrinogen (mg/dl)	506.5 (267.3–738.0)	703 (585.5–870)	0.026
Prothrombin complex factors rate (%)	36 (26–58.8)	60 (50.3–74.8)	0.004
Activated partial thromboplastin time (seconds)	29.0 (21.1–37.4)	28.8 (17.7–35.3)	0.9
MMPs/TIMPs (ng/ml)			
MMP-1	54.7 (34.1–85.1)	24.7 (14.8–50.9)	0.051
MMP-2	5.4 (1.3–6.8)	0.8 (0.5–1.8)	0.001
MMP-3	45.2 (29.7–65.4)	19.0 (11.9–45.6)	0.1
MMP-8	55.2 (30.6–96.7)	47.7 (33.9–71.3)	0.4
MMP-9	164.0 (121.9–484.0)	399.1 (212.1–629.6)	0.1
MMP-10	96.6 (46.1–172.1)	49.5 (26.9–156.3)	0.3
MMP-13	0.4 (0.1–0.6)	0.1 (0.07–0.2)	0.04
TIMP-1	235.4 (188.2–323.7)	256.6 (230.7–304.1)	0.4
TIMP-2	106.9 (70.5–180.1)	99.8 (69.9–124.1)	0.6
TIMP-4	4.0 (3.1–25.6)	3.6 (2.0–6.6)	0.2

MMP-13 might be increased in collagen and other human stromal cells in carriers of the *MMP-13* SNP, a fact that invites further research and that we could not analyze because tissue biopsies were not obtained in our study. On the other hand increased expression of MMP-13 due to the *MMP-13* SNP might contribute to changes in the expression and plasma levels of other MMPs intimately bound to MMP-13 in the MMPs activation cascade such as MMP-2 (increased in plasma of non-surviving septic patients in our study) and MMP-9 (decreased in plasma of septic patients in our study). The association of the *MMP-1* (-1607 1G/2G) SNP and sepsis might be due to linkage disequilibrium with the *MMP-13* SNP because the *MMP-13* and *MMP-1* genes are both located in the same cluster of the chromosome 11q22-23 along with the *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-8*, *MMP-10*, *MMP-12*, and

*MMP-20* genes. A common evolutionary ancestry for the *MMPs* genes located on chromosome 11q has been suggested<sup>7</sup>. Borghese *et al* have confirmed the linkage disequilibrium between the *MMP-13* and *MMP-1* SNPs in a large multi-ethnic genetic study. In addition they reported allelic frequencies of the *MMP-1*, *MMP-3* and *MMP-13* SNPs in healthy French Caucasians women similar to those observed in the ICU uninfected controls in our study<sup>24</sup>.

The association of *MMPs* SNPs and infection was been rarely explored so far. We have previously reported an association of the *MMP-1* (-1607 1G/2G, rs 11292517) SNP with bacterial osteomyelitis due to an increased bone expression and plasma levels of MMP-1 in carriers of 2G2G genotype of the *MMP-1* SNP<sup>25</sup>. Pan *et al* also reported an association of chronic periodontitis with the carriage

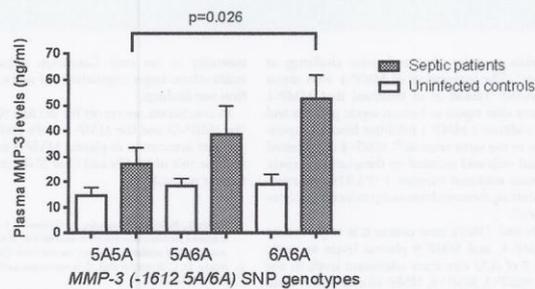
Table 4 | Genotypic and allelic frequencies of different MMPs SNPs in ICU septic patients and uninfected controls

SNP	Genotypic frequencies				Allelic frequencies			
	Genotype	Septic n (%)	Controls n (%)	p value	Allele	Septic n (%)	Controls n (%)	p value
<i>MMP-13</i> (-77A/G)	AA	54 (60.0) <sup>a</sup>	39 (42.9)	0.03	A	144 (80.0) <sup>b</sup>	129 (70.9)	0.044
	AG	36 (40.0)	51 (56.0)		G	36 (20.0)	53 (29.1)	
	GG	0 (0.0)	1 (1.1)					
	n	90	91					
<i>MMP-1</i> (-1607 1G/2G)	1G1G	31 (34.8)	25 (27.5)	0.013	1G	88 (49.4)	94 (51.6)	0.7
	1G2G	26 (29.2) <sup>c</sup>	44 (48.3)		2G	90 (50.6)	88 (48.4)	
	2G2G	32 (36.0)	22 (24.2)					
	n	89	91					
<i>MMP-3</i> (-1612 5A/6A)	5A5A	29 (32.2)	26 (28.6)	0.3	5A	94 (52.2)	99 (54.4)	0.7
	5A6A	36 (40.0)	47 (51.6)		6A	86 (47.8)	83 (45.6)	
	6A6A	25 (27.8)	18 (19.8)					
	n	90	91					
<i>MMP-8</i> (-799C/T)	CC	20 (23.3)	23 (25.8)	0.5	C	84 (48.8)	96 (53.9)	0.3
	CT	44 (51.1)	50 (56.2)		T	88 (51.2)	82 (46.1)	
	TT	22 (25.6)	16 (18.0)					
	n	86	89					
<i>MMP-9</i> (-1562 C/T)	CC	72 (80.0)	69 (76.7)	0.6	C	162 (90.0)	159 (88.3)	0.6
	CT	18 (20.0)	21 (23.3)		T	18 (10.0)	21 (11.7)	
	TT	0 (0.0)	0 (0.0)					
	n	90	91					

<sup>a</sup> $\chi^2 = 4.66$ , OR [95%CI] = 2.0 [1.05–3.78] comparing the AA genotypic frequencies between septic and control patients.

<sup>b</sup> $\chi^2 = 3.58$ , OR [95%CI] = 1.64 [0.98–2.75] comparing the A allelic frequencies between septic and control patients.

<sup>c</sup> $\chi^2 = 6.15$ , OR [95%CI] = 0.44 [0.23–0.85] comparing the 1G2G genotypic frequencies between septic and control patients.

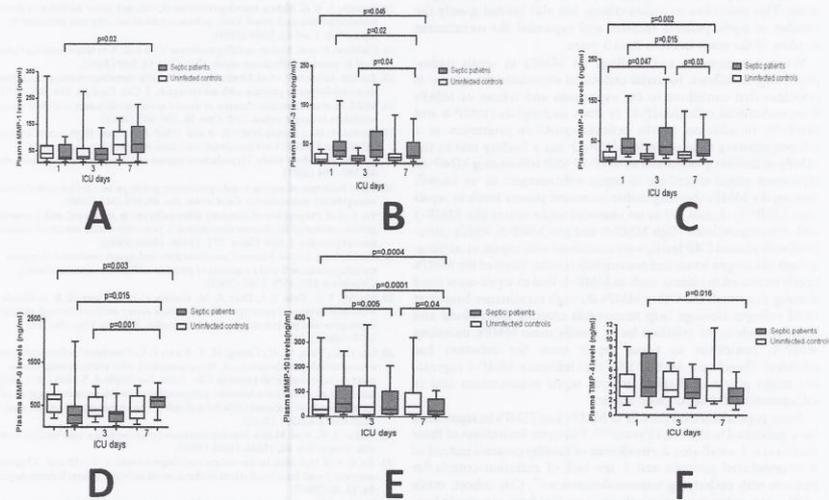


**Figure 1** | Plasma levels of MMP-3 at ICU admission in septic and uninfected control patients carriers of the different genotypes of the *MMP-3* (-1612 5A/6A) SNP. Bars represent median and IQR values in ng/mL.

of the *TT* genotype of the *MMP-9* (-1562 C/T, rs 34016235) SNP among Chinese individuals<sup>23</sup>.

The 6A6A genotype of the *MMP-3* (-1612 5A/6A) SNP has been previously associated with a lower gene expression of the *MMP-3* gene and lower MMP-3 plasma levels compared to those carriers of the 5A5A genotype<sup>16–19</sup>. However other studies have reported that carriers of the 6A6A genotype of this *MMP-3* SNP had higher plasma MMP-3 levels<sup>20–24</sup>. Our results were similar to the latter studies although only in septic patients but not in the uninfected controls, which is intriguing and needs further exploration. The *MMP-3* SNP has been associated with different forms of cardiovascular disease, including severe coronary disease and myocardial infarction but not with sepsis or infection<sup>16,33,34</sup>.

We also observed, as other authors did, increased plasma levels of most of the MMPs, except MMP-9, and TIMP-2 in septic patients but not in the uninfected controls. CRP plasma levels correlated positively with those of MMP-8 and negatively with those of MMP-9. Plasma MMP-9 levels were lower in septic patients compared to those of the controls, a fact to consider because decreased plasma MMP-9 levels were associated with sepsis in the multivariate logistic regression in our study. The implication of gelatinases (MMP-2 and MMP-9), both secreted by the circulating neutrophils, in sepsis pathophysiology is well documented<sup>35–37</sup>. We bring forward now the potential role of collagenases (MMP-13 and MMP-1) and perhaps stromelysins (MMP-3) in sepsis, an interesting finding because these MMPs are neither expressed in neutrophils nor



**Figure 2** | Time course plasma levels of MMP-1 (A), -3 (B), -8 (C), -9 (D), -10 (E) and TIMP-4 (F) at days 1, 3 and 7 of ICU admission. Boxes and whiskers represent mean and range values in ng/mL.



released from neutrophils granules after endotoxin challenge as MMP-8 and MMP-9 do<sup>5</sup>. The association of MMP-1 with sepsis has been recently reported. Tresselt *et al* observed that MMP-1 appeared just a few hours after sepsis in human septic patients and in a murine model. In addition a MMP-1 inhibitor blocked experimentally-induced sepsis in the same animals<sup>36</sup>. MMP-1 is expressed by unstressed endothelial cells and secreted by these cells in sepsis. This fact leads to protease-activated receptor 1 (PAR1) activation, vascular permeability, clotting abnormalities and production of cytokines and prostaglandins<sup>36</sup>.

Regarding the MMPs and TIMPs time course it is important to keep in mind that MMP-1, and MMP-9 plasma levels in septic patients peaked at day 7 of ICU stay from admission levels in our study. On the contrary MMP-3, MMP-8, MMP-10 and TIMP-4 had their nadir serum levels at day 7 of ICU stay. This might be one of the reasons of the disparity in plasma MMPs levels data in our study compared to previous reports in which blood was mostly drawn only within the day 1 or at random during the ICU stay. We could not find differences between TIMP-1 plasma levels of ICU septic and uninfected patients or among non-surviving and surviving septic patients. TIMP-1 has been proposed as a useful laboratory marker to predict the clinical outcome of septic patients<sup>31,31</sup>. Furthermore, carriers of the T allele in the TIMP-1 (372 T/C) SNP (rs4898) showed higher serum TIMP-1 levels and lower survival rate among septic patients in one study<sup>27</sup>. The low death rate among septic patients in our cohort (7.8%) has limited the statistical significance of TIMP-1 and the rest of data analyzed. The low mortality rate in this septic cohort of ICU patients with a mean of 3 organ failures might be due to the very restrictive inclusion criteria we used in our study excluding patients with cancer, HIV infection, transplantation or other causes of immunodepression, patients normally included in previous ICU sepsis series. This restrictive inclusion criteria has also limited greatly the number of septic patients enrolled and expanded the recruitment window of the study to more than 3 years.

We can summarize our findings on MMPs in sepsis pathophysiology as follows. Bacterial endotoxin stimulates the release of cytokines that contribute to the expression and release of MMPs from endothelial cells (MMP-1) or from neutrophils (MMP-8 and MMP-9). In addition MMPs activate cytokines precursors in a self-perpetuating vicious circle. MMP-13 has a leading role in the MMPs-activation process and a MMP-13 SNP influencing MMP-13 expression might contribute to sepsis enhancement as we found<sup>7</sup>. Among the MMPs showing earlier increased plasma levels in sepsis were MMP-3, -8, and -10 as we observed while others like MMP-1 and -9 increased later. High MMP-8 and low MMP-9, which correlated with plasma CRP levels, were associated with sepsis, in addition to high fibrinogen levels and neutrophils counts. Some of the MMPs later increased in plasma, such as MMP-1, lead to sepsis-associated clotting abnormalities. Other MMPs through membranes basement ECM collagen cleavage help neutrophils crossing from blood and lymph vessels to the infection locus. Finally some MMPs, including MMP-1, contribute to tissue repair once the infection has subsided<sup>3</sup>. Therefore a MMP-1 SNP that influence MMP-1 expression might play a dual effect in both sepsis enhancement and in inflammation-damaged tissue repair.

Some papers based on the role of MMPs and TIMPs in sepsis have been published in the last 15 years<sup>27-32</sup>. The main limitations of these studies are: 1. small size; 2. enrollment of healthy controls instead of ICU uninfected patients; and 3. the lack of exclusion criteria for patients with underlying immunodeficiencies<sup>37</sup>. Our cohort, made of 90 septic patients was the only one enrolled from one single hospital. In addition we included uninfected 91 ICU patients as controls instead of healthy individuals, something rarely done and we excluded patients with underlying immunodeficiencies, a fact not previously considered. The main limitations of our study in addition to the relatively small sample size and the low septic patients

mortality is our only Caucasian population. More research in multi-ethnic larger populations of septic patients is needed to confirm our findings.

In conclusion, we report for the first time an association between the MMP-13 and the MMP-1 SNPs and sepsis, as well as an independent association of plasma MMP-8 and MMP-9 levels with sepsis. The role of MMPs and their SNPs in sepsis development needs further research.

- Vallés, J., Rello, J., Ochagavía, A., Garnacho, J. & Alcalá, M. A. Community-acquired bloodstream infection in critically-ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* **123**,1615–1624 (2003).
- Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
- Holmes, C. L., Russell, J. A. & Walley, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* **124**, 1103–1115 (2003).
- Bernick, D. G. Pathophysiology of sepsis. *Am. J. Pathol.* **170**, 1435–1444 (2007).
- Parke, W. C., Wilson, G. L. & Lopez-Boado, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 617–629 (2004).
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
- Leeman, M. F., Curran, S. & Murray, G. I. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 149–166 (2002).
- Nakamura, T., Ebihara, I., Shimada, N., Shoji, H. & Koide, H. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. *Am. J. Med. Sci.* **316**, 355–360 (1998).
- Yassen, K. A., Galley, H. F. & Webster, N. R. Matrix metalloproteinase-9 concentrations in critically ill patients. *Anesthesia* **56**, 729–732 (2001).
- Hoffmann, U. *et al.* Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: Prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand. J. Infect. Dis.* **38**, 867–872 (2006).
- Lorente, L. *et al.* Matrix metalloproteinase-9, -10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit. Care* **13**, R158 (2009).
- Gáldnas, F. *et al.* Matrix metalloproteinase-2, -8 and -9 in serum and skin blister fluid in patients with severe sepsis. *Crit. Care* **14**, R49 (2010).
- Yazdan-Ashoori, P. *et al.* Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* **26**, 556–565 (2011).
- Mühl, D. *et al.* Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis. *Crit. Care* **26**, 550–555 (2011).
- Lauhio, A. *et al.* Serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in sepsis: High serum levels of MMP-8 and TIMP-1 are associated with fatal outcome in a multicentre, prospective cohort study. Hypothetical impact of tetracyclines. *Pharmacol. Res.* **64**, 590–594 (2011).
- Ye, S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc. Res.* **69**, 636–645 (2006).
- Ye, S. *et al.* Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 13055–13060 (1996).
- Blackenberg, S. *et al.* Plasma Concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* **107**, 1579–1585 (2003).
- Medley, T. L., Cole, T. J., Dart, A. M., Gatzka, C. D. & Kingwell, B. A. Matrix Metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1479–1484 (2004).
- Lin, C. C., Yang, W. C., Chung, M. Y. & Lee, P. C. Functional polymorphisms in matrix metalloproteinases-1, -3, -9 are associated with arteriovenous fistula patency in hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 1805–1814 (2010).
- Liu, D. *et al.* Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One* **7**, e31251 (2012).
- Kader, A. K. *et al.* Matrix Metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Res.* **66**, 11644–11648 (2006).
- Ye, S. *et al.* Variation in the matrix metalloproteinase 3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Intern. J. Immunogenet.* **34**, 81–85 (2007).
- Borghese, B. *et al.* Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression. *Hum. Reprod.* **23**, 1207–1213 (2008).
- Pan, Y. *et al.* MMP-9-1562C > T contributes to periodontitis susceptibility. *J. Clin. Periodontol.* **40**, 125–130 (2013).
- Montes, A. H. *et al.* A functional polymorphism in MMP1 could influence osteomyelitis development. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 912–919 (2010).



27. Lorente, L. *et al.* The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Crit. Care* **17**, R94 (2013).
28. Bone, R. C., Sibald, W. J. & Spring, C. L. The ACCP-SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure. *Chest* **101**, 1481–1483 (1992).
29. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* **31**, 1250–1256 (2003).
30. Marshall, J. C. *et al.* Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med.* **23**, 1638–1652 (1995).
31. Dellinger, R. P. Cardiovascular management of septic shock. *Crit. Care Med.* **31**, 946–55 (2003).
32. Matvey, D. L., Nixon, N. B., Dawes, P. T., Ollier, W. E. & Hajeer, A. H. Association of matrix metalloproteinase-3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* **5**, 147–149 (2004).
33. Samnegård, A., Silveira, A. & Lundman, P. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3-16125A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction. *J. Intern. Med.* **258**, 411–419 (2005).
34. White, A. J. *et al.* Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodeling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovasc. Res.* **75**, 813–820 (2007).
35. Tresselt, S. L. *et al.* A matrix metalloproteinase-3 promoter polymorphism regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol. Med.* **3**, 370–384 (2011).
36. Vandembroucke, R. E., DeJager, L. & Libert, C. The first MMP in sepsis. *EMBO Mol. Med.* **3**, 367–369 (2011).
37. Clark, M. F. & Baudouin, S. V. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med.* **32**, 1706–1712 (2006).

## Acknowledgments

This work was supported by the Oviedo University research grants (UNIOV-12-MA-03 and SV-PA-13-ECOEMP-57) given to V.A. and by grants from Janssen Pharmaceutica and Red Temática de Investigación de SIDA (RIS), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Plan Estatal I+D+I and European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa", grant (RD06/0006/0010). These results were presented in part at the 53<sup>rd</sup> ICAAC Meeting, ASM, Denver, CO, September 10–12, 2013. Abstracts B-1430 and B-1431.

## Author contributions

G.M., J.A.C. and F.T. recruited the ICU patients and contributed to design the study. A.M. and V.A.<sup>3</sup> did the MMPs genotyping. E.V.G. measured the MMPs plasma levels and contributed to design the study. J.C. did the statistical analysis of the data and edited the manuscript. V.A.<sup>1</sup> designed the study, wrote the main manuscript text and prepared the figures 1 and 2.

## Additional information

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Martín, G. *et al.* Role of plasma matrix-metalloproteinases (MMPs) and their polymorphisms (SNPs) in sepsis development and outcome in ICU patients. *Sci. Rep.* **4**, 5002; DOI:10.1038/srep05002 (2014).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. The images in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the image credit; if the image is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder in order to reproduce the image. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yniox](http://www.elsevier.com/locate/yniox)

## Endothelial (*NOS3 E298D*) and inducible (*NOS2 exon 22*) nitric oxide synthase polymorphisms, as well as plasma NOx, influence sepsis development



Guadalupe Martín <sup>a</sup>, Víctor Asensi <sup>b,\*</sup>, A. Hugo Montes <sup>c</sup>, Julio Collazos <sup>d</sup>, Victoria Álvarez <sup>e</sup>, Laura Pérez-Is <sup>c</sup>, José A. Carton <sup>b</sup>, Francisco Taboada <sup>a</sup>, Eulalia Valle-Garay <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Critical Care, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Infectious Diseases Services, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Biochemistry and Molecular Biology, Oviedo University School of Medicine, Oviedo, Spain

<sup>d</sup> Infectious Diseases Unit, Hospital de Galdácano, Vizcaya, Spain

<sup>e</sup> Molecular Genetics Unit-Nephrology Research Institute, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 April 2014

Revised 24 July 2014

Available online 16 September 2014

#### Keywords:

Nitric oxide

Nitric oxide synthase

Polymorphisms

Sepsis

Hemodynamic failure

Survival

### ABSTRACT

**Introduction:** Nitric oxide (NO) influences susceptibility to infection and hemodynamic failure (HF) in sepsis. *NOS3* and *NOS2* SNPs might modify plasma nitrite/nitrate (NOx) levels, sepsis development, hemodynamics and survival.

**Methods:** 90 severely septic and 91 non-infected ICU patients were prospectively studied. *NOS3* (*E298D*), *NOS3* (-786 T/C), *NOS3* (27 bp-VNTR), and *NOS2A* (exon 22) SNPs and plasma NOx levels were assessed.

**Results:** 21 patients (11.6%) died, 7 with sepsis. TT homozygotes and T allele carriers of *NOS3* (*E298D*) and AG carriers of the *NOS2A* (exon 22) SNPs were more frequent among septic compared to non-infected ICU patients ( $p < 0.05$ ). Plasma NOx was higher in septic, especially in septic with hemodynamic failure (HF) or fatal outcome ( $p < 0.006$ ). Plasma NOx was higher in carriers of the T allele of the *NOS3* (*E298D*) SNP ( $p = 0.006$ ). Sepsis independently associated with HF, increased NOx, peripheral neutrophils, and fibrinogen levels, decreased prothrombin and the presence of the *NOS3* (*E298D*) and *NOS2A* (exon 22) SNPs. A low APACHE II score was the only variable associated with sepsis survival. NOx was independently associated with sepsis, HF, decreased neutrophils and higher APACHE.

**Conclusions:** *NOS3* (*E298D*) and *NOS2A* (exon 22) SNPs, individually and in combination, and plasma NOx, associated with sepsis development. NOx associated with HF and fatal outcome.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Sepsis is the most common cause of death in the intensive care units (ICU). Despite modern intensive care including broad spectrum antibiotics mortality still remains high, ranging from 20% to 30% in septic shock [1,2].

Nitric oxide (NO) plays a critical role in the pathogenesis of sepsis, not only in regulating vascular tone and permeability, but also by its antimicrobial effect. NO induces peripheral vascular failure leading to several sepsis complications, such as organ dysfunction and septic shock. Three different nitric oxide synthase (*NOS*) isoforms catalyze the synthesis of NO from L-arginine; inducible NOS (*iNOS* or *NOS2*) is encoded by the *NOS2A* gene, neuronal NOS (*nNOS* or *NOS1*) is encoded by the *NOS1* gene, and endothelial NOS (*eNOS* or *NOS3*)

is encoded by the *NOS3* gene. Under non-pathological conditions *NOS1* and *NOS3* release small amounts of NO to maintain adequate tissue flow. In contrast, cytokine-induced *NOS2* expression releases an order of magnitude more NO in response to both tissue damage and infection [3–5]. Therefore *NOS2* plays a key role in sepsis-induced hemodynamic changes and resultant hypotension.

*NOS2A* is located on chromosome 17q11.2–q12. *NOS2A* SNPs mapped to the promoter region and to exon 16 have been reported to influence the enzymatic function of *NOS2* and the production of NO [5]. Some *NOS3* SNPs, such as the (-786T/C, rs2070744), found in the promoter area of the *NOS3* gene, or the *E298D* (also known as *Glu298Asp*, or G894T, rs1799983) located in the exon 7 [6–10] have been associated with changes in the *NOS3* activity and sometimes lower basal plasma nitrite/nitrate (NOx) levels. In contrast other *NOS3* SNPs have been associated with higher basal plasma NOx levels, as found in the 44 variant carriers of the 27-bp variable number tandem repeats (VNTR) located in intron 4 (27bp-VNTR) [11,12].

\* Corresponding author. Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain. Fax: (+34)985109804. E-mail address: [vasensia@gmail.com](mailto:vasensia@gmail.com) (V. Asensi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2014.09.004>

1089-8603/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

*NOS2A* gene is related to inflammatory diseases [13]. *NOS2A* SNPs have been associated with predisposition to or protection against infections in murine models [14] and in humans [5,14–16]. Thus, a (CCTTT)<sub>n</sub> penta-nucleotide repeat and a (-1173 C/T) SNP in the *NOS2A* promoter region have been associated with predisposition to malaria [15,16], and protection against brucellosis [17], and a SNP in the exon 16 of *NOS2A* (rs 22979518) was associated with development of septic shock in a Chinese population [5]. A G/A substitution was found in exon 22 of the *NOS2A* gene resulting in a synonymous substitution at a threonine residue. The functionality of this exon 22 *NOS2A* SNP is unknown and it has been scarcely studied regarding infections so far [12]. *NOS3* SNPs have been also associated with infections. The *NOS3* E298D SNP has been associated with hypertension and organ failure in Finnish septic patients with *Escherichia coli* bacteremia [18], and with organ dysfunction and mortality in Chinese patients with severe sepsis [19]. Finally, the *NOS3* (27bp-VNTR) was associated with bacterial osteomyelitis [12] but did not associate with multi-organ dysfunction, acute respiratory distress syndrome, mortality, or shock in Turkish septic children [20].

The aims of this study were to investigate whether there was an association between *NOS3* and/or *NOS2A* SNPs and susceptibility to sepsis or with the development of hypotension (septic shock), or death from sepsis. In order to correlate genetic polymorphisms in *NOS2* and *NOS3* with total enzymatic activity plasma NO<sub>x</sub> levels were measured in cases and controls. It has been suggested that NO production might change over time during an episode of sepsis so we also determined the changes in plasma NO<sub>x</sub> over the first week of illness in a subgroup of septic and control patients.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

We enrolled ninety ICU patients with severe sepsis who were admitted to the ICU of the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) in Oviedo, Spain, between May 2007 and August 2010 in a prospective observational study. Sepsis was defined according to the 1992 International Sepsis Definitions Conference Criteria (ISDCC) modified in 2003 [21,22], and all septic patients enrolled fulfilled the ISDC criteria and had positive blood cultures or a microbiologically-demonstrated source of bacterial infection. All the infections were community-acquired. Patients with cancer, HIV infection, transplantation or other causes of immunodepression were excluded. Ninety one uninfected patients admitted to the ICU for other non-infective diseases were used as controls. If an uninfected control developed an infection during the ICU stay that patient was excluded from the study. APACHE II scores and number of organs that failed were recorded in both patient groups. Patients and controls were members of a homogeneous Caucasian population, and were residents of the same region (Asturias, Northern Spain) that has a small population of foreign immigrants (<5%). All participants or their legal representatives gave informed consent for the study, which was approved by the Ethics Committee of the HUCA. Hemodynamic and other organ dysfunction failures were defined according to Marshall et al. [23]. Treatment of organ failures, volume resuscitation, and supportive therapy for sepsis were based on current guidelines [24]. Fluid resuscitation with crystalloids and colloids, early use of broad spectrum antibiotics (most commonly broad spectrum β-lactam such as carbapenems or piperacillin-tazobactam, with or without aminoglycosides), norepinephrine with or without dobutamine in cases of shock, infusion of iv insulin for glucose control, furosemide with hemofiltration in oliguric or anuric patients, stress ulcers prophylaxis with omeprazole, and thrombosis prophylaxis with enoxaparine or fraxiparine were administered. Morphine and propofol were used for analgesia and sedation during

mechanical ventilation at appropriate doses. None of the patients received drotrecogin alfa.

### 2.2. Methods

Routine laboratory tests were performed in patients and controls on the first day of ICU admission.

#### 2.2.1. Plasma NO<sub>x</sub> levels

Blood was drawn by venipuncture in EDTA-containing tubes within the first 24 hours of ICU admission from each of the subjects. In a subgroup of 14 sepsis patients and 15 controls chosen at random, samples were also obtained at days 3 and 7 of ICU stay. Tubes were centrifuged for 5 minutes at 1800 g and plasma was removed and frozen at -80 °C until use. NO is a short-lived free radical gas that rapidly reacts with oxygen to generate the stable metabolites nitrate and nitrite. Thus plasma NO was assessed indirectly using the Griess reaction to detect nitrates and nitrites, as previously described [12,25]. Results were expressed as μM of NO<sub>x</sub>/sample.

#### 2.2.2. *NOS3* and *NOS2A* genotyping

DNA was extracted from peripheral blood cells and stored at -20 °C before use. The following SNPs of *NOS* were genotyped by PCR: *NOS3* (E298D), *NOS3* (-786 T/C), *NOS3* (27 bp-VNTR), and *NOS2A* (exon 22, PubMed, accession NT\_024889) [26]. Oligonucleotide primer sequences, PCR conditions and restriction enzymes used for genotyping and sequencing the *NOS* SNPs studied have been previously reported by our group [12].

#### 2.2.3. Neutrophil isolation

Ten mL of peripheral blood were drawn from each patient and control in an EDTA-K3E tube (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) and neutrophils were separated with Ficoll-Hypaque (δ = 1.113) (Lymphoprep™, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) following the manufacturer's instructions. Cells were resuspended in Ham's F-12 medium (GIBCO, Paisley, Scotland, UK) and counted using with a Cell-Dyn® 3200 Coulter (Abbott, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA). Neutrophil purity was always >98%.

#### 2.2.4. Neutrophils mRNA extraction and *NOS2* expression analysis

Total RNA from the isolated neutrophils was extracted using the E.Z.N.A. Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantity of total RNA extracted was measured using spectrophotometry at 260 nm. Then the RNA was reverse-transcribed to cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After that, gene transcription levels of *NOS2A* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using the TaqMan Gene Expression Assays on a 7300 RealTime PCR System using the 7300 System SDS Software Version 1.4 (all from Applied Biosystems). *GAPDH* was the housekeeping gene used as endogenous control for calibration of mRNA levels. All primers and probes (*NOS2A*, cat. N° Hs01075529\_m1; *GAPDH*, cat. N° Hs03929097\_g1) were obtained commercially and are proprietary; thus their sequences are not available (TaqMan Gene Expression Assays from Applied Biosystems). The conditions for the qRT-PCR were as follows: preheating at 50 °C for 2 minutes and at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of shuttle heating at 95 °C for 15 seconds and at 60 °C for 1 minute. All the RT-PCR reactions were performed in triplicate. The data analysis of the gene expression levels was performed on ΔΔCt values normalized to *GAPDH* expression as previously described and results expressed as log<sub>10</sub>Qr [27].

### 3. Statistical analysis

Results are expressed as mean (95% CI) or proportions as appropriate. As the NOx values did not follow a Gaussian distribution, they were normalized by natural logarithmic transformation. The reported NOx values are the result of back-transformation to the original  $\mu\text{M}$  units. Chi-square tests were used to compare categorical variables, with the Yates correction and Fisher's exact test when indicated. Continuous variables in two groups were compared with the Student t-test, and if more than two groups were compared with the one way ANOVA. A general linear model repeated measures procedure was carried out to evaluate the course of NOx curves over time according to different end-points, and paired t-tests to evaluate the changes over time of each patient compared with him/herself. A multivariate stepwise logistic regression analysis was also done to assess the factors independently associated with sepsis, hemodynamic failure, and survival, whereas a stepwise multiple regression analysis to assess the independent predictors of plasma NOx was used. Receiver operating characteristic (ROC) curves were also drawn, and their area calculated, to analyze the predictive value of plasma NOx in diagnosis of sepsis, and predicting hemodynamic failure and survival. Statistical analyses were performed with the SPSS Software (version 16.0, Chicago, USA). All the reported p values are two-sided. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

### 4. Results

#### 4.1. Patients clinical and laboratory characteristics and outcome

Septic and uninfected control patients were matched by age and gender. There were no differences regarding the APACHE II score. Twenty-one individuals died (11.6%). Although more controls died there were no statistically significant differences compared to the septic patients. As expected, the number of cases with organs that failed was significantly higher in septic patients. Seventy-five (84%) of the septic patients had positive blood cultures; 40 (53.3%) grew Gram-negative bacteria, mostly *E. coli* (18, 24%), and 35 (46.7%) grew

Gram-positive bacteria, mostly *Streptococcus pneumoniae* (16, 21.3%). The main sources of infection were urinary, intra-abdominal and respiratory. The uninfected ICU control group was composed of people who suffered polytrauma or cerebro-vascular accidents.

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics and laboratory results of septic and uninfected patients at the time of enrollment. The septic patients had significantly higher numbers of neutrophils, higher fibrinogen levels, more prolonged activated partial thromboplastin time, and lower prothrombin complex factors compared to uninfected patients. Plasma levels of NOx were significantly increased in septic compared to uninfected controls ( $p < 0.0001$ , Table 1). Plasma NOx levels were also higher in septic patients with hemodynamic failure and in those with fatal outcome (Fig. 1).

#### 4.2. NOS3 and NOS2A SNPs and plasma NOx levels

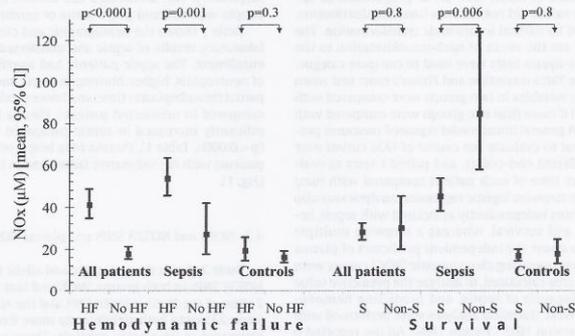
Table 2 shows the genotypic and allelic frequencies of NOS3 and NOS2A SNPs in both groups. We found that the TT genotype and the T allele of the NOS3 (E298D) SNP, and the AG genotype of the NOS2A (exon 22) were both significantly more frequent in septic patients compared to uninfected controls. There were more patients who carried both the T allele and the AG genotype of these SNPs among septic compared to control patients (68/89 [76%] vs. 48/91 [53%],  $p = 0.0009$ ). Carriers of the C allele of the NOS3 (-786T/C) but not the NOS3 (E298D) SNP were significantly more frequent among patients with compared to those without hemodynamic failure ( $p = 0.044$ ). No other associations of hemodynamic failure with other genotypes or alleles were observed: [NOS3 (E298D)]  $p = 0.4$ , [NOS3 (27 bp-VNTR)]  $p = 0.7$ , [NOS2A (exon22)]  $p = 0.6$ . None of the SNPs we analyzed were significantly associated with mortality form from sepsis (data not shown).

Table 3 shows the association of plasma NOx levels with the different NOS3 and NOS2A SNPs that we analyzed. Carriers of the T allele of the NOS3 (E298D) SNP had higher plasma levels of NOx than those with the C allele. There were no associations of plasma NOx levels with the other SNPs.

**Table 1**  
Demographic, clinical and laboratory characteristics of septic and uninfected ICU patients.

	Septic (n = 90)	Uninfected controls (n = 91)	p-value
Age (years)	58.2 (54.8–61.7)	58.0 (54.4–61.6)	0.9
Gender (male/female)	50/40	61/30	0.1
APACHE II score	18.2 (16.4–19.9)	16.4 (14.7–18.2)	0.16
Mortality	7 (7.8%)	14 (15.4%)	0.1
Number of organs that failed	2.80 (2.51–3.09)	1.86 (1.66–2.05)	<0.0001
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	13.9 (12.1–15.7)	10.7 (9.4–11.9)	0.004
Fibrinogen (mg/dl)	705.7 (652.9–758.5)	446.6 (405.5–487.7)	<0.0001
Prothrombin complex factors rate (%)	60.3 (56.2–64.3)	79.7 (76.3–83.1)	<0.0001
Activated partial thromboplastin time (seconds)	28.6 (25.8–31.3)	25.0 (23.4–26.6)	0.027
GENNOS2 (log <sub>10</sub> Or)	0.766 (0.488–1.041)	0.676 (0.375–0.976)	0.7
Plasma NOx ( $\mu\text{M}$ )	47.5 (40.4–55.9)	17.0 (14.7–19.7)	<0.0001
Source of infection			
Genito-urinary (%)	26 (28.9)	–	
Intra-abdominal (%)	22 (24.4)	–	
Lung (%)	16 (17.8)	–	
CNS (%)	12 (13.3)	–	
Skin-soft tissues (%)	8 (8.9)	–	
Endocarditis (%)	5 (5.6)	–	
Other location (%)	1 (1.1)	–	
Non-septic diagnosis			
Polytrauma (%)	–	40 (44.0)	
Cerebro-vascular attack (%)	–	46 (50.5)	
Other diagnosis (%)	–	5 (5.5)	

Values are expressed as mean (95% CI).  
GENNOS2 indicated NOS2 gene expression by neutrophils.



**Fig. 1.** Plasma NOx levels in septic and uninfected patients within 24 hours of admission to ICU according to hemodynamic failure status and outcome. Results are expressed as NOx ( $\mu\text{M}$ ), mean, (95% CI).

**Table 2**  
Genotypic and allelic frequencies of different NOS SNPs in septic and uninfected ICU patients.

SNP	Genotypic frequencies				Allelic frequencies			
	Genotype	Septic n (%)	Controls n (%)	p value	Allele	Septic n (%)	Controls n (%)	p value
NOS3 (E298D)	TT	39 (43.3)	27 (29.7)	<0.0001	T	129 (71.7)	102 (56.0)	0.004
	GT	51 (56.7)	48 (52.7)		G	51 (28.3)	80 (44.0)	
	GG	0 (0.0)	16 (17.6)					
NOS3 (-786T/C)	TT	26 (29.5)	41 (45.0)	0.10	T	98 (55.7)	119 (65.4)	0.06
	CT	46 (52.3)	37 (40.7)		C	78 (44.3)	63 (34.6)	
	CC	16 (18.2)	13 (14.3)					
NOS3 (27 bp-VNTR)	44	0 (0.0)	3 (3.3)	0.08	4	24 (13.3)	21 (11.5)	0.6
	45	24 (26.7)	15 (16.5)		5	156 (86.7)	161 (88.5)	
	55	66 (73.3)	73 (80.2)					
	p value							
NOS2A (exon22)	GG	21 (23.6)	34 (37.4)	0.046	G	110 (61.8)	125 (68.7)	0.2
	AG	68 (76.4)	57 (62.6)		A	68 (38.2)	57 (31.3)	
	AA	0 (0.0)	0 (0.0)					

**Table 3**  
Plasma NOx levels in different NOS SNP genotypes in septic and uninfected ICU patients.

SNP	Genotype	n All patients	n Septic	n Controls
NOS3 (E298D)	TT	5227.62 (22.51–33.90)	3237.89 (28.78–49.88)	2017.99 (14.17–22.84)
	GT	6832.13 (26.63–38.76)	4356.08 (46.30–67.91)	2517.12 (13.63–21.51)
	GG	1215.18 (10.91–21.11)	0 –	1215.18 (10.91–21.11)
	p value	0.006*	0.017	0.7
NOS3 (-786T/C)	TT	4726.39 (21.49–32.40)	2147.31 (36.09–62.03)	2618.23 (14.50–22.90)
	CT	5830.05 (24.31–37.16)	3750.07 (38.73–64.75)	2115.93 (12.68–20.01)
	CC	2527.40 (20.01–37.53)	1541.54 (28.49–60.56)	1016.42 (10.93–24.69)
	p value	0.7	0.7	0.7
NOS3 (27 bp-VNTR)	44	233.70 (2.01–565.78)	0 –	233.70 (2.01–565.78)
	45	3128.86 (21.14–39.38)	2148.61 (36.22–65.25)	1012.97 (8.75–19.23)
	55	9728.10 (24.23–32.58)	5347.15 (38.71–57.44)	4417.47 (14.98–20.38)
	p value	0.9	0.9	0.7
NOS2A (exon22)	GG	4026.02 (20.34–33.28)	1851.49 (35.07–75.59)	2217.06 (13.51–21.55)
	AG	9129.45 (25.13–34.50)	5846.76 (38.90–56.20)	3316.96 (14.02–20.52)
	AA	0 –	0 –	0 –
	p value	0.4	0.6	0.9

Values represent plasma NOx in  $\mu\text{M}$  and are reported as mean (95% CI), n = number of patients.

\* TT vs. GT p = 0.3; TT vs. GG p = 0.007; GT vs. GG p = 0.0003.

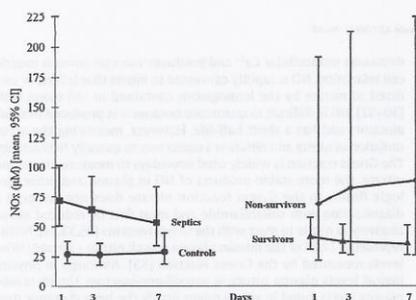


Fig. 2. Plasma NOx levels in septic and uninfected patients at days 1, 3 and 7 of ICU admission. Results are expressed as NOx ( $\mu\text{M}$ ), mean, (95% CI).

#### 4.3. Plasma NOx time course according to sepsis diagnosis and outcome

We measured plasma NOx over time in a subgroup of 14 septic and 15 control patients, on the 1st, 3rd and 7th days of their ICU admissions. We did not find statistically significant differences over time in all patients ( $p = 0.3$ ), in septic patients ( $p = 0.12$ ) or in uninfected control patients ( $p = 0.7$ ). The slopes of the plasma NOx curves over time did not show statistically significant differences between septic and control patients ( $p = 0.11$ ), although the plasma NOx over time curve of the controls was flat whereas that of septic was downward (Fig. 2).

Regarding the outcome, there were no significant differences in the course of plasma NOx over time in the patients who survived ( $p = 0.26$ ), and in those who died ( $p = 0.06$ ). However there were only 2 deaths and both patients experienced an increase in plasma NOx levels from day 1 to day 7 (mean  $68.8 \mu\text{M}$  and  $88.6 \mu\text{M}$ , respectively). On the other hand the slope of the plasma NOx curves did not differ significantly between survivors and non-survivors ( $p = 0.5$ ).

#### 4.4. NOS2A gene expression by neutrophils of septic and uninfected control patients

We did not find a significant difference in NOS2A gene expression by neutrophils from septic and uninfected patients (Table 1).

In addition, there were no differences in NOS2A expression between carriers of the different genotypes of the NOS2A and NOS3 (data not shown).

#### 4.5. ROC curves for plasma NOx in sepsis, hemodynamic failure and outcome

The measurement of plasma NOx on admission to the ICU was potentially useful for the detection of sepsis. The area of the ROC curve was  $0.837$  (95% CI  $0.778$ – $0.896$ ),  $p < 0.0001$ . The most discriminatory value of plasma NOx was  $25.17 \mu\text{M}$  (sensitivity  $78.9\%$ , specificity  $79.1\%$ ). The area of the ROC was  $0.77$  ( $0.701$ – $0.839$ ),  $p < 0.0001$  and the most discriminatory value of plasma NOx for predicting hemodynamic failure in septic patients was  $24.52 \mu\text{M}$  (sensitivity  $73.0\%$ , specificity  $72.8\%$ ). The predictive value of plasma NOx for a fatal outcome considering all patients was very poor (area  $0.526$ , 95% CI  $0.396$ – $0.656$ ,  $p = 0.7$ ), but improved if only the septic patients were considered (area  $0.753$ , 95% CI  $0.623$ – $0.883$ ,  $p = 0.027$ ).

#### 4.6. Multivariate analyses

##### 4.6.1. Sepsis, hemodynamic failure and survival

Logistic regression analyses revealed that the variables independently associated with a diagnosis of sepsis were: hemodynamic failure, higher plasma NOx, fibrinogen and neutrophils count values, lower prothrombin complex factors rate and the presence of the NOS3 (E298D) SNP, especially of the TT genotype, and the NOS2A (exon 22) SNP AG genotype (Table 4). Hemodynamic failure was independently associated with the presence of sepsis, higher number of organs that failed and fibrinogen values. Survival was associated only with lower APACHE II scores (Table 4).

Sepsis caused by Gram-negative bacteria did not significantly differ from that caused by Gram-positive microorganisms in the frequency of hemodynamic failure ( $p = 0.16$ ), survival ( $p = 0.4$ ), NOS3 (E298D) SNP ( $p = 0.9$ ), NOS3 (-786T/C) SNP ( $p = 0.07$ ), NOS3 (27 bp-VNTR) SNP ( $p = 0.9$ ), NOS2A (exon22) SNP ( $p = 0.7$ ), number of organs that failed ( $p = 0.5$ ) or plasma NOx levels ( $p = 0.6$ ).

##### 4.6.2. Plasma NOx

A linear regression analysis revealed that the variables independently associated with plasma NOx levels in the patients as a whole were: sepsis ( $p < 0.0001$ ), hemodynamic failure ( $p = 0.02$ ), lower number of neutrophils ( $p = 0.01$ ) and higher APACHE II score ( $p = 0.03$ ). These explanatory variables altogether accounted for 37.9% of the total variability of the plasma NOx levels, sepsis alone accounting for as much as 32.7% of such variability.

Table 4  
Logistic regressions results of variables associated with sepsis, hemodynamic failure and survival in septic and uninfected ICU patients.

Outcome variable	Explanatory parameters	p value	OR (95% CI)
Sepsis	NOx ( $\mu\text{M}$ )	0.0009	1.043 (1.018–1.070)
	Hemodynamic failure	0.0006	119.0 (79–1666.7)
	Fibrinogen (mg/dl)	0.0001	1.015 (1.007–1.022)
	Prothrombin complex factors rate (%)	0.001	0.880 (0.813–0.952)
	Neutrophils count ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0.014	1.136 (1.026–1.258)
	NOS2A (exon22) genotype AG vs. GG	0.009	13.69 (1.94–98.0)
	NOS3(E298D) genotypes	0.006	–
	NOS3(E298D) genotype GG vs. GT	0.998	–
	NOS3(E298D) genotype GG vs. TT	0.997	–
	NOS3(E298D) genotype TT vs. GT	0.001	42.07 (4.22–419.8)
Hemodynamic failure	Presence of sepsis	<0.0001	46.95 (11.15–198.02)
	Number of organs that failed	0.017	0.997 (0.9848–0.9995)
Survival	Fibrinogen (mg/dl)	0.017	0.936 (0.883–0.991)
	APACHE II score	0.023	0.936 (0.883–0.991)

Among the septic patients, the independent predictors of plasma NOx levels were the presence of hemodynamic failure ( $p = 0.01$ ) and the NOS3 (E298D) SNP ( $p = 0.02$ ), overall accounting for 13.4% of the total variability of plasma NOx.

## 5. Discussion

We report here an association of the NOS3 (E298D, rs1799983) and the NOS2A (exon 22) SNPs, either alone or in combination, with sepsis. This association might be related to increased plasma NOx levels in T allele carriers of the NOS3 (E298D) SNP that could enhance the development of hemodynamic failure and lead to a fatal outcome in septic patients. Some authors have suggested that the NOS3 (E298D) SNP may enhance human sepsis by impairing NO production by NOS3 in the microcirculation, an important adaptive mechanism for maintaining blood flow and vascular integrity [19]. Other authors have postulated that this NOS3 SNP might impair directly the endothelial function leading to microvascular injury [28]. Finally we cannot exclude the possibility of the presence of a linkage disequilibrium of the NOS3 (E298D) SNP with a nearby SNP affecting NOS activity enhanced by sepsis-produced cytokines. This fact might explain the increased plasma NOx levels we observed in carriers of the NOS3 (E298D) SNP. None of the SNPs studied here were associated with the survival of septic patients, although there were only 7 deaths in the sepsis group making it difficult to draw definitive conclusions about genetic associations with mortality.

An association of the NOS3 (E298D) SNP with sepsis has previously been described [18,19]. However those studies reported an association of this SNP with septic shock, organ dysfunction, and Gram-negative infections, but not with sepsis itself, as we did. We found no correlations between the carriage of the T allele of NOS3 (E298D) and septic shock, number of organs that failed or APACHE II scores. Similarly, we did not find differences in carriage of the T allele between patients with Gram-positive and Gram-negative sepsis. Interestingly, no carriers of the GG genotype of the NOS3 (E298D) SNP, which was related to lower plasma NOx levels in our series, were found among Chinese [19] or in our Spanish Caucasian septic patients.

This is the first report of an association between the NOS2A (exon 22) SNP and sepsis. An association of a SNP in exon 16 of the NOS2A gene with septic shock due to increased NOS2 activity was observed in Chinese patients [5]. The NOS2A (exon 22) SNP has been associated with neuropsychiatric disorders [26,29], but not with infections. We found that the AG genotype of this SNP was more frequent in septic than in uninfected patients. A potential influence of the NOS2A (exon 22) SNP on sepsis mediated by changes in the NOS2A gene expression by peripheral neutrophils could be a reasonable hypothesis. However no correlation between increased NOS2A gene expression (mRNA levels) in peripheral neutrophils and the carriage of the AG genotype of the NOS2 (exon 22) was observed. However, if there is a functional difference in the enzymatic activity of the NOS2 this could result in lower levels of intracellular NO independent of transcriptional regulation. However, we did not find an association of the NOS2A (exon 22) SNP with plasma NOx levels in septic patients so the explanation for this association remains unclear and needs further research.

NO is a critical mediator in the pathophysiology of septic shock by a dual mechanism. First, it is a mediator of the loss of vascular tone (vasoplegia) characteristic of the early, hyperdynamic phase of sepsis, and second, it contributes to the myocardial depression observed in late-stage sepsis. NO also plays an important role governing the interaction between platelets, leukocytes and the vascular endothelium and it is critical in local blood flow regulation. NO activates adenylate cyclase that leads to the formation of cGMP, which

decreases intracellular  $Ca^{2+}$  and produces vascular smooth muscle cell relaxation. NO is rapidly converted to nitrite that is further oxidized to nitrate by the hemoglobin contained in red blood cells [30–32]. NO is difficult to quantitate because it is produced in small amounts and has a short half-life. However, measuring the accumulation of nitrite and nitrate is a useful way to quantify NOS activity. The Griess reaction is widely used nowadays to measure nitrite and nitrate, the more stable products of NO in plasma and other biologic fluids. In the Griess reaction nitrate does not undergo diazotization with sulfanilamide and must first be reduced quantitatively to nitrite to react with the Griess reagents [25,33,34]. Nitrite represents 17.6% of the human plasma overall nitrite + nitrate (NOx) levels measured by the Griess reaction [35]. Although in physiological levels plasma nitrite is vasodilator-inactive, the increased plasma levels found in sepsis might justify the hemodynamic dysfunction observed in this condition [36–38]. Plasma NOx levels of our uninfected control patients (mean 17  $\mu$ M) were similar to those reported by others [35]. However the plasma NOx levels of our septic patients were lower (mean 47.5  $\mu$ M) than those previously reported [38–40]. This fact gives more value to our findings because, even so, we observed significant differences between septic and uninfected controls in our work.

The important role of NOx in the pathophysiology of sepsis was confirmed in our study, as there was a strong association between NOx and sepsis in both univariate and multivariate analyses. Elevated plasma NOx was associated with shock and survival in septic patients but not in non-infected patients. Although there was a clear trend toward decreasing plasma NOx levels over time in septic patients but not in controls, and toward increasing plasma NOx levels in the patients who died as compared with those who survived, the differences were not statistically significant. The low number of patients with sequential plasma NOx measurements, and particularly those with a fatal outcome, was probably responsible for this lack of statistical significance. The low mortality rate in this septic cohort of ICU patients with a mean of 3 organs that failed might be due to the very restrictive inclusion criteria we used in our study, excluding patients with cancer, HIV infection, transplantation or other causes of immunosuppression, patients normally included in previous ICU sepsis studies. These restrictive inclusion criteria have also limited greatly the number of septic patients enrolled and expanded the recruitment window of the study to more than 3 years. The main limitations of our study are the relatively small sample size, the low mortality rate and our only Caucasian population. More research in multi-ethnic larger populations of septic patients is needed to confirm our findings.

The recognition of NO as an important mediator of sepsis and septic shock has led to attempts to pharmacologically inhibit NO production as a useful adjunct in the treatment of this condition. In support of this concept some studies have shown that mutant (knockout, KO) C57BL6 mice lacking the NOS2 or NOS3 genes have less endothelial dysfunction, increased microvascular reactivity and decreased mortality from shock induced by injections of LPS [41–45]. However, other studies have shown that C57BL6 NOS2 KO mice had lower survival after cecal ligation and puncture-induced (CLP) sepsis [46]. A beneficial role of NO as a critical negative regulator of the NLRP3 inflammasome via the stabilization of mitochondria might explain the increased survival of wild-type and not in KO mice in that model [47]. Previous attempts to inhibit NO production with non-isoform specific inhibitors such as methylarginine or L-NMMA, nitroarginine or L-NNA, and NG-methyl-L-arginine hydrochloride or 546C88 were initially very promising in human septic shock, but the use of 546C88 in septic patients increased their mortality [48,49]. More encouraging results have been obtained with selective NOS1 and NOS2 inhibitors administered at selective time points after sepsis induction in animal models and may be useful for treating septic patients in the future [50–53].

## 6. Conclusions

We conclude that the NOS3 (E298D) and the NOS2A (exon 22) SNPs, individually and in combination, are associated with severe sepsis. In addition plasma NOx levels are associated with septic shock and fatal outcomes.

## Acknowledgments

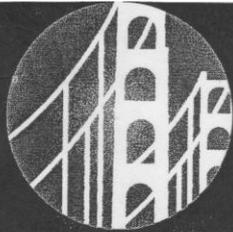
This work was supported by the Oviedo University research grants (UNIOV-12-MA-03 and SV-PA-13-ECOEMP-57) given to V.A. and by grants from Janssen Pharmaceuticals and Red Temática de Investigación de SIDA (RIS), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Plan Estatal I + D + i & European Regional Development Fund (ERDF) "Una manera de hacer Europa", grant (RD06/0006/0010).

These results were presented in part at the 54th ICAAC Meeting, ASM, Washington DC, September 5–9, 2014, abstract E-932.

Dr. Joshua Fierer, Infectious Diseases Division, VAMC and University of California, San Diego, USA critically reviewed this manuscript.

## References

- [1] J. Valles, J. Rello, A. Ochavavia, J. Garnacho, M.A. Alcalá, Community-acquired bloodstream infection in critically-ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival, *Chest* 123 (2003) 1615–1624.
- [2] D.C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock, *N. Engl. J. Med.* 369 (2013) 840–851.
- [3] D. Annane, S. Sanquer, V. Sébille, A. Faye, D. Djuranovic, J.C. Raphaël, et al., Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock, *Lancet* 355 (2000) 1143–1148.
- [4] N. Matsuda, Y. Hattori, Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction, *J. Smooth Muscle Res.* 43 (2007) 117–137.
- [5] Z. Wang, K. Feng, M. Yue, X. Lu, Q. Zheng, H. Zhang, et al., A non-synonymous SNP in the NOS2 associated with septic shock in patients with sepsis in Chinese populations, *Hum. Genet.* 132 (3) (2013) 37–46.
- [6] T. Tsukada, K. Yokoyama, T. Arai, F. Takemoto, S. Hara, A. Yamada, et al., Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 190–193.
- [7] X.L. Wang, A.S. Sim, R.F. Badenhop, R.M. McCredie, D.E. Wilcken, A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene, *Nat. Med.* 2 (1996) 41–45.
- [8] A.D. Hingorani, C.F. Liang, J. Faribene, A. Lyon, S. Monteith, A. Parsons, et al., A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK, *Circulation* 100 (1999) 1515–1520.
- [9] M.S. Joshi, C. Mineo, P.W. Shaul, J.A. Bauer, Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear, *FASEB J.* 21 (2007) 2635–2663.
- [10] Y. Miyamoto, Y. Saito, M. Nakayama, Y. Shimazaki, T. Yoshimura, M. Yoshimura, et al., Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2629–2637.
- [11] X.L. Wang, M.C. Mahaney, A.S. Sim, J. Wang, J. Blangero, et al., Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 3147–3153.
- [12] V. Asensi, E. Valle, A.H. Montes, M.G. Ocaña, A. Astudillo, V. Alvarez, et al., The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis, *Nitric Oxide* 16 (2007) 44–53.
- [13] M.A. Gonzalez-Gay, J. Llorca, E. Sanchez, M.A. Lopez-Nevoit, M.M. Amoli, C. Garcia-Porrúa, et al., Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain, *Rheumatology (Oxford)* 43 (2004) 1182–1185.
- [14] J.D. Macficking, R.J. North, R. Lacourse, J.S. Mudgett, S.K. Shah, C.F. Nathan, Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 5243–5248.
- [15] W. Xu, S. Humphries, M. Tomita, T. Okuyama, M. Matsuki, D. Burgner, et al., Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease, *Nitric Oxide* 4 (2000) 379–383.
- [16] M.R. Hobbs, V. Udhayakumar, M.C. Levesque, J. Booth, J.M. Roberts, A.N. Tkachuk, et al., A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children, *Lancet* 360 (2002) 1468–1475.
- [17] G. Orozco, E. Sánchez, M.A. López-Nevoit, A. Caballero, M.J. Bravo, P. Morata, et al., Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphisms in human brucellosis, *Microbes Infect.* 5 (2003) 1165–1169.
- [18] R. Huttunen, M. Hurme, J. Laine, C. Eklund, R. Vuento, J. Aittoniemi, et al., Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP) polymorphism is associated with hypotension in patients with *E. coli* bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism, *Shock* 31 (2009) 448–453.
- [19] P. Ma, Y. Zhu, H. Qiu, J. Liu, Y. Wang, L. Zeng, Endothelial nitric oxide synthase 894G→T but not -786T→C gene polymorphism is associated with organ dysfunction and increased mortality in patients with severe sepsis, *J. Trauma* 71 (2011) 872–877.
- [20] U. Celik, D. Yildizdas, E. Alhan, T. Celik, G. Atrila, Y. Sertdemir, et al., Genetic dilemma: eNOS gene intron 4αβ VNTR polymorphism in sepsis and its clinical features in Turkish children, *Turk. J. Pediatr.* 50 (2008) 114–119.
- [21] R.C. Bone, W.J. Sibald, C.L. Spring, The ACCP-SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure, *Chest* 101 (1992) 1481–1483.
- [22] M.M. Levy, M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, et al., 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Intensive Care Med.* 31 (2003) 1250–1256.
- [23] J.C. Marshall, D.J. Cook, N.V. Christou, G.R. Bernard, C.L. Sprung, W.J. Sibald, Multiple Organ Dysfunction Score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome, *Crit. Care Med.* 23 (1995) 1638–1652.
- [24] R.P. Dellinger, Cardiovascular management of septic shock, *Crit. Care Med.* 31 (2003) 946–955.
- [25] G. Giovannoni, J.M. Land, G. Keir, E.J. Thompson, S.J. Heales, Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels, *Ann. Clin. Biochem.* 34 (1997) 193–198.
- [26] C. Leveque, A. Elbaz, J. Clavel, F. Richard, J.S. Vidal, P. Amouyel, et al., Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 79–86.
- [27] A.H. Montes, E. Valle-Garay, V. Alvarez, M. Pevida, E. García Pérez, J. Paz, et al., A functional polymorphism in MMP1 could influence osteomyelitis development, *J. Bone Miner. Res.* 25 (2010) 912–919.
- [28] C. Antoniadis, D. Tousoulis, C. Vasiladiou, E. Stefanadi, K. Marinou, C. Stefanadis, G. genetic polymorphism G894T on the eNOS gene is associated with endothelial function and vWF levels in premature myocardial infarction survivors, *Int. J. Cardiol.* 107 (2006) 95–100.
- [29] P. Galecki, M. Maes, A. Florkowski, A. Lewinski, E. Galecka, M. Bienkiewicz, et al., Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder, *J. Affect. Disord.* 129 (2011) 175–182.
- [30] S. Moncada, A. Higgins, The L-arginine-nitric oxide pathway, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 2002–2012.
- [31] J.R. Parratt, Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia, *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (Suppl. A) (1998) 31–39.
- [32] M.A. Titheradge, Nitric oxide in septic shock, *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 437–455.
- [33] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, R. Colombo, A. Milanzi, R. Rossi, Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma, *Free Radic. Res.* 38 (2004) 1235–1240.
- [34] D. Tsikas, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research, *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 851 (2007) 51–70.
- [35] H. Moshage, B. Kok, J.R. Huizenga, P.L. Jansen, Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation, *Clin. Chem.* 41 (1995) 892–896.
- [36] T. Lauer, M. Preik, T. Raffaf, B.E. Strauer, A. Deussen, M. Feilisch, et al., Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2001) 12814–12819.
- [37] I. Doughty, J.A. Carcillo, S. Kaplan, J. Janosky, Plasma nitrite and nitrate concentrations and multiple organ failure in pediatric sepsis, *Crit. Care Med.* 26 (1998) 157–162.
- [38] I. de Werra, C. Jaccard, S.B. Corradin, R. Chioléro, B. Versin, H. Gallati, et al., Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia, *Crit. Care Med.* 25 (1997) 607–613.
- [39] O.A. Strand, A. Leone, K.E. Giercksky, K.A. Kirkeben, Nitric oxide indices in human septic shock, *Crit. Care Med.* 28 (2000) 2779–2785.
- [40] C. Mitaka, Y. Hirata, K. Yokoyama, H. Wakimoto, M. Hirokawa, T. Nosaka, et al., Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome, *Shock* 19 (2003) 305–309.
- [41] S.S. Gross, R.G. Kilbourn, O.W. Griffith, NO in septic shock: good, bad or ugly? Learning from iNOS knockouts, *Trends Microbiol.* 4 (1996) 47–49.
- [42] S.M. Hollenberg, M. Broussard, J. Osman, J.E. Parrillo, Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Circ. Res.* 86 (2000) 774–778.
- [43] S.D. Chauhan, G. Segara, P.A. Vo, R.J. Macalister, A.J. Hobbs, A. Ahluwalia, Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice, *FASEB J.* 17 (2003) 773–775.
- [44] T.C. Bailey, C. Cavanagh, S. Mehta, J.F. Lewis, R.A. Veldhuizen, Sepsis and hyperoxia effects on the pulmonary surfactant system in wild-type and iNOS knockout mice, *Eur. Respir. J.* 20 (2002) 177–182.
- [45] L. Connelly, M. Madhan, A.J. Hobbs, Resistance to endotoxaemic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10040–10046.



SAN FRANCISCO, CA  
SEPTEMBER 12-15, 2009



# FINAL PROGRAM

49TH INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY®

*ASM's Premier Annual Meeting on Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*



B-427

**Variations of Serum Matrix  
Metalloproteases and Their Inhibitors  
Correlate with the Presence of Sepsis and  
Poor Clinical Outcome in ICU Patients**

G. MARTIN <sup>1</sup>, A. H. MONTES <sup>1</sup>, E. VALLE-GARAY <sup>1</sup>, J.  
COLLAZOS <sup>2</sup>, F. TABOADA <sup>1</sup>, **V. ASENSI**<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Hosp. Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ. Sch.  
Med., Oviedo, Spain, <sup>2</sup>Hosp. de Galdacano, Galdacano,  
Spain.

**Background:** Matrix-metalloproteases (MMPs) and their tissue-inhibitors (TIMPs) participate in extracellular matrix remodelling and degradation. They are also amplifiers and regulators of the immune responses raised in sepsis. Their role in the clinical outcome of septic patients is controversial.

**Methods:** 48 adult patients with severe sepsis and 51 age and sex-matched controls with non-infectious pathologies (mostly trauma and cerebrovascular strokes) admitted to the ICU of the HUCA during 2007-8 were enrolled in a prospective study and followed during their hospital stay. All septic patients had positive hemocultures at admission. MMPs (-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) and TIMPs (-1, -2, -4) were measured by ELISA microarrays in serum obtained within the first 24h of hospital stay.

**Results:** Eleven patients (11.1%) died, only 1 with sepsis. MMPs (-3, -8 -9, -10) and TIMP-2 were significantly different in septic compared to non-infected patients (means  $\pm$  SD, ng/ml: MMP-3:  $3.7 \pm 5.9$  vs.  $1.6 \pm 1.8$ ,  $p=0.0008$ ; MMP-8:  $10.2 \pm 6.1$  vs.  $3.6 \pm 3.3$ ,  $p<0.0001$ ; MMP-9:  $40.8 \pm 20.1$  vs.  $52.8 \pm 17.2$ ,  $p=0.002$ ; MMP-10:  $0.4 \pm 0.8$  vs.  $0.05 \pm 0.06$ ,  $p=0.0001$ ; TIMP-2:  $12.3 \pm 5.5$  vs.  $9.6 \pm 4.6$ ,  $p=0.009$ ). High MMP-8 (OR 1.56), low MMP-9 (OR 0.92) serum levels and high neutrophil counts (OR 1.10) were associated with the diagnosis of sepsis by multivariate analysis. Female gender (OR 10.33), high TIMP-4 (OR 11.76) and a diagnosis different from sepsis (OR 76.92) were the only factors associated with death by logistic regression. **Conclusions:** Although MMP -8 and -9 serum levels variations associated with the presence of sepsis, only high serum levels of TIMP-4 could be used to predict a poor clinical outcome in ICU patients

**Objectives:**

Upon completion of this Symposium Session, the participants should be able to:

- Discuss important considerations when dosing echinocandins and azoles in children and neonates;
- Identify the advantages of antifungal prophylaxis in the neonatal ICU;
- Discuss the disadvantages of antifungal prophylaxis in the neonatal ICU; and
- Provide analytic review of the more common IFIs in pediatric leukemia and SCT recipients.

Level: Intermediate

**039(A1) Slide Session**

**Antifungal Disposition, Exposure Response and Safety**

Saturday, 4:00 p.m.–6:30 p.m.

Room 132

UAN Number: 388-000-09-111-L01-P

Moderators: MARC H. SCHEETZ, PharmD.  
Northwestern Mem. Hosp., Chicago, IL.

MAIKEN C. ARENDRUP, MD, PhD.  
Statens Serum Inst., Copenhagen, Denmark.

**Objectives:**

Upon completion of this Slide Session, the participant should be able to:

- Review most recent data on antifungal PK/PD from pre-clinical and clinical perspectives; and
- Provide examples of application of PK/PD tools in antifungal development and clinical applications.

**Presentations:**

**4:00 p.m.**

**A1-418a State-of-the-Art Miniature**

THOMAS J. WALSH, MD.  
NIH, Bethesda, MD.

**4:30 p.m.**

**A1-419 Identification of the In Vivo Pharmacodynamic (PD) Target for Echinocandins against *C. albicans* (CA), *C. glabrata* (CG), and *C. parapsilosis* (CP) in the Neutropenic Murine Disseminated Candidiasis Model**

D. ANDES<sup>1</sup>, A. LEPAK<sup>2</sup>, D. DIEKEMA<sup>3</sup>, M. PFALLER<sup>4</sup>, K. MARCHILLO<sup>1</sup>, J. BOHRMULLER<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Univ. of Wisconsin, Madison, WI, <sup>2</sup>Univ. of Iowa, Iowa City, IA.

**4:45 p.m.**

**A1-420 Permeability of the Blood Brain Barrier (BBB) to Amphotericin B (AMB) Is Focally Increased in Experimental Hematogenous Candida Meningoencephalitis (HCME)**

V. J. PYRGOS<sup>1</sup>, V. PETRAITIS<sup>1,2</sup>, R. PETRAITIS<sup>1,2</sup>, D. MICKIENE<sup>1,2</sup>, M. COTTON<sup>1</sup>, L. GREENE<sup>1</sup>, T. AGHAMOLLA<sup>1</sup>, J. VALDEZ<sup>1</sup>, M. MOCANU<sup>1</sup>, N. BRUNDANT<sup>1</sup>, M. DONOGHUE<sup>1</sup>, D. BENJAMIN<sup>1</sup>, M. HARDWICK<sup>1</sup>, S. SHOHAM<sup>1</sup>, T. J. WALSH<sup>1</sup>,<sup>1</sup>NCI, Bethesda, MD, <sup>2</sup>ASP SAIC, Frederick, MD, <sup>3</sup>Wash Hosp. Ctr., Washington, DC, <sup>4</sup>Duke Univ., Durham, NC.

**5:00 p.m.**

**A1-421 MRI Voriconazole Brain Concentrations**

M. HENRY<sup>1</sup>, N. BOLO<sup>2</sup>, R. VILLAFUERTE<sup>3</sup>, R. LABADIE<sup>1</sup>, H. SCHLAMM<sup>4</sup>, E. ANDREWS<sup>1</sup>, P. GLUE<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Caritas St. Elizabeth's Med. Ctr., Boston, MA, <sup>2</sup>McLean Hosp., Boston, MA, <sup>3</sup>Pfizer PGRD, New York, NY, <sup>4</sup>Pfizer Inc., New York, NY, <sup>5</sup>Univ. of Otago, Dunedin, New Zealand.

**5:15 p.m.**

**A1-422 Intrapulmonary Pharmacokinetics of Micafungin in Lung Transplant Patients**

T. WALSH<sup>1</sup>, S. GOUTELLE<sup>2</sup>, R. JELLIFFE<sup>3</sup>, J. GOLDEN<sup>1</sup>, E. LITTLE<sup>1</sup>, C. DEVOE<sup>1</sup>, D. MICKIENE<sup>1</sup>, J. CONTE<sup>4</sup>,<sup>1</sup>NIH, Bethesda, MD, <sup>2</sup>USC, Los Angeles, CA, <sup>3</sup>UCSF, San Francisco, CA, <sup>4</sup>American Hlth. Sci., San Francisco, CA.

**5:30 p.m.**

**A1-423 Bronchopulmonary Disposition of Intravenous (IV) Voriconazole (VRC) and Anidulafungin (ANID) Given in Combination to Healthy Adults**

J. L. CRANDON<sup>1</sup>, M. A. BANEVICIUS<sup>1</sup>, A. F. FANG<sup>2</sup>, P. H. CROWNOVER<sup>3</sup>, R. F. KNAUFT<sup>4</sup>, J. POPE<sup>1</sup>, J. RUSSOMANNO<sup>1</sup>, E. SHORE<sup>1</sup>, D. P. NICOLAU<sup>1</sup>, J. L. KUTI<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Ctr for Anti-Infect. Res. & Dev., Hartford, CT, <sup>2</sup>Pfizer Inc., New York, NY, <sup>3</sup>Hartford Hosp., Hartford, CT.

**5:45 p.m.**

**A1-424 Exposure-Response (E-R) Relationships for Efficacy of Micafungin in Patients with Invasive Candidiasis (IC)**

D. R. ANDES<sup>1</sup>, P. G. AMBROSE<sup>2</sup>, J. P. HAMMEL<sup>3</sup>, S. A. VAN WART<sup>4</sup>, D. BUELL<sup>1</sup>, L. KOVANDA<sup>1</sup>, S. M. BHAVNANI<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Univ. of Wisc., Madison, WI, <sup>2</sup>ICPD/Ordway Res. Inst., Latham, NY, <sup>3</sup>Astellas Pharma US, Deerfield, IL.

**6:00 p.m.**

**A1-425 Influence of Food Intake on Posaconazole Plasma Concentrations: Evidence of Posaconazole TDM**

C. EIDEN<sup>1</sup>, J. MENIANE<sup>1</sup>, H. PEYRIERE<sup>1</sup>, S. EYMARD-DUVERNAF<sup>1</sup>, P. CEBALLOS<sup>2</sup>, N. FEGUEUX<sup>3</sup>, M. COCIGLIO<sup>1</sup>, J. REYNES<sup>4</sup>, D. HILLAIRE-BUYS<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Med. Pharmacology and Toxicology Unit, CHU Montpellier, France, <sup>2</sup>Clinical Adult Hematology Unit, CHU Montpellier, France, <sup>3</sup>IRD, Montpellier, France, <sup>4</sup>Infectious Diseases Unit, CHU Montpellier, France.

**6:15 p.m.**

**A1-426 Incidence of Hepatotoxicity with Use of Off-Label Oral Treatment Doses of Voriconazole for Invasive Fungal Infections (IFI)**

E. GORSKI, J. ESTERLY, M. POSTELNICK, S. TRIFILIO, M. FOTIS, M. SCHEETZ, Northwestern Mem. Hosp., Chicago, IL.

**040(B) Slide Session**

**Immune Response in Bacterial Infections**

Saturday, 4:00 p.m.–6:30 p.m.

Marriott Salon 9

UAN Number: 388-000-09-112-L01-P

Moderators: ANNA NORRBY-TEGLUND, PhD.  
Karolinska Inst., Stockholm, Sweden.

VICTOR ASENSI, MD, PhD.  
Hosp. Central de Asturias, Oviedo Univ. Med. Sch., Oviedo, Spain.

**Objectives:**

Upon completion of this Slide Session, the participant should be able to:

- Evaluate serum response markers observed in patients with bacterial infections;
- Review platelet and neutrophil markers of infection; and
- Discuss T-cell and macrophage antigens involved in the response to bacterial infection.

**Presentations:**

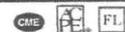
- 4:00 p.m.
- 427 **Variations of Serum Matrix Metalloproteases and Their Inhibitors Correlate with the Presence of Sepsis and Poor Clinical Outcome in ICU Patients**  
G. MARTIN<sup>1</sup>, A. H. MONTES<sup>1</sup>, E. VALLE-GARAY<sup>1</sup>, J. COLLAZOS<sup>2</sup>, E. TABOADA<sup>1</sup>, V. ASENSI<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Hosp. Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ. Sch. Med., Oviedo, Spain, <sup>2</sup>Hosp. de Galdacano, Galdacano, Spain.
- 4:15 p.m.
- 428 **Clq and Mannose-Binding Lectin (mbl-2) Gene Polymorphisms among Type 2 Diabetes Mellitus Patients and Controls in a Genetically Homogeneous Population**  
G. GOULIELMOS, M. APERGI, C. CHOULAKI, M. CHRISTOFAKI, E. PETRAKI, A. VALACHIS, J. PAPADAKIS, D. P. KOFTERIDIS SR.; PAGNI Univ. Hosp., Heraklion, Greece.
- 4:30 p.m.
- 429 **Neutrophil Derived Hyper-Resistinemia in Severe Group A Streptococcal (GAS) Infections**  
L. JOHANSSON<sup>1</sup>, A. LINNÉR<sup>1</sup>, J. SUNDÉN-CULLBERG<sup>1</sup>, A. HAGGAR<sup>1</sup>, H. HERWALD<sup>2</sup>, C. TREUTIGER<sup>1</sup>, A. NORRBY-TEGLUND<sup>3</sup>; <sup>1</sup>Karolinska Inst., Stockholm, Sweden, <sup>2</sup>Lund Univ., Lund, Sweden.
- 4:45 p.m.
- 430 **Thrombospondin-1 Acts as a Host Defense Protein**  
S. NIEMANN, A. BERTLING, N. SPEHR, M. F. BRODDE, H. ROBENEK, K. JURK, C. VON EIFF, A. UEKOTTER, G. PETERS, C. HEILMANN, B. E. KEHREL; Univ. of Muenster, Muenster, Germany.
- 5:00 p.m.
- 431 **Increased Immune Inhibitory Receptor CEACAM1 Expression on CD4+ T-Cells in Neonatal Late Onset Sepsis**  
M. VAN DER FLIER<sup>1</sup>, D. B. SHARMA<sup>2</sup>, S. ESTEVAO<sup>3</sup>, D. ROOK<sup>4</sup>, J. B. VAN GOUDOEVER<sup>5</sup>, N. G. HARTWIG<sup>6</sup>; <sup>1</sup>UMC St. Radboud Nijmegen, Nijmegen, Netherlands, <sup>2</sup>Erasmus MC-Sophia, Rotterdam, Netherlands.
- 5:15 p.m.
- 432 **High Dose Tobramycin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced MUC5AC Production in Human Lung Epithelial Cells**  
S. NAKAMURA, K. YANAGIHARA, Y. MORINAGA, N. ARAKI, K. YAMADA, M. SEKI, K. IZUMIKAWA, H. KAKEYA, Y. YAMAMOTO, S. KOHNO; Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan.
- 5:30 p.m.
- 433 **Sweep of the Intestinal Microflora Induced by Oral Administration of Antibiotics Impairs Host Response to LPS Through Down-Regulation of the Surface Toll-Like Receptors Expressions on the Peritoneal Macrophages**  
T. UMENAI<sup>1</sup>, H. HIRAI<sup>1</sup>, N. SHIME<sup>1</sup>, T. NAKAYA<sup>2</sup>, Y. TANAKA<sup>3</sup>, J. IMANISHI<sup>4</sup>; <sup>1</sup>Kyoto Prefectural Univ. of Med., Kyoto, Japan, <sup>2</sup>Res. Inst. for Microbial Diseases, Osaka Univ., Osaka, Japan.
- 5:45 p.m.
- 434 **Pleural Effusion of Patients with Pleural Tuberculosis Has High Frequency of IL-7 Alpha-Receptor**  
D. A. OLIVEIRA<sup>1</sup>, R. F. S. MOREIRA<sup>1</sup>, L. H. OKAMURA<sup>2</sup>, F. FIGUEROA<sup>3</sup>, F. F. ARCURI<sup>4</sup>, L. F. R. MEDICI<sup>5</sup>, J. B. AFUJNE<sup>6</sup>, M. T. G. SAVIOLI<sup>7</sup>, M. T. M. GIRET<sup>8</sup>, F. A. F. MELO<sup>9</sup>, D. S. RODRIGUES<sup>10</sup>; <sup>1</sup>Univ. Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Inst. Clemente Ferreira, Sao Paulo, Brazil.

6:00 p.m.

- B-435 **Gene Expression Profiling of Pathologic Lesion in *Mycobacterium Leprae* Infected Animal Model: Differential Regulation of CORO1A Between Live and Heat-Killed *M. leprae***  
G. CHAE, S. KIM, S. JIN, T. KIM, S. LEE; Catholic Med. Coll., Seoul, Republic of Korea.

Late-breaking presentations are listed behind the Late-Breakers tab of this Final Program.

#### 041(L1) Slide Session



#### Emerging Issues in Meningitis and Encephalitis

Saturday, 4:00 p.m.–6:30 p.m.

Room 135

UAN Number: 388-000-09-113-L01-P

Moderators: JONATHAN COHEN, MB FRCP, FRCPATH, BSMS, Brighton, United Kingdom.

PATRICIA MUÑOZ, MD, PhD, Hosp. Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

#### Objectives:

Upon completion of this Slide Session, the participant should be able to:

- Review new treatment modalities for meningitis;
- Identify new approaches to meningitis; and
- Identify emerging causes of meningitis and encephalitis.

#### Presentations:

4:00 p.m.

- L1-436 **Dexamethasone and Long-Term Outcome in Patients with Tuberculous Meningitis**

M. E. TOROK<sup>1,2</sup>, N. D. BANG<sup>3</sup>, T. T. H. CHAU<sup>4</sup>, N. T. B. YEN<sup>5</sup>, G. E. THWAITES<sup>6</sup>, N. H. DUNG<sup>7</sup>, T. T. HIEN<sup>8</sup>, N. T. CHINH<sup>9</sup>, H. T. T. HOANG<sup>10</sup>, M. WOLBERS<sup>11</sup>, J. J. FARRAR<sup>12</sup>; <sup>1</sup>Cambridge Univ. Hosp. NHS Fdn. Trust, Cambridge, United Kingdom, <sup>2</sup>Oxford Univ. Clinical Res. Unit, Ho Chi Minh City, Viet Nam, <sup>3</sup>Pham Ngoc Thach Hosp., Ho Chi Minh City, Viet Nam, <sup>4</sup>Hosp. for Tropical Diseases, Ho Chi Minh City, Viet Nam, <sup>5</sup>Imperial Coll., London, United Kingdom, <sup>6</sup>Ctr. for Tropical Med., Univ. of Oxford, Oxford, United Kingdom.

4:15 p.m.

- L1-437 **Impact of Adjunctive Corticosteroids on the Clinical Outcome of Adult Pneumococcal Meningitis in the Region of High Resistance Rates to Penicillin and Ceftriaxone**

S. MOON<sup>1</sup>, D. CHUNG<sup>2</sup>, S. KIM<sup>3</sup>, H. CHANG<sup>4</sup>, H. LEE<sup>5</sup>, D. JUNG<sup>6</sup>, Y. KIM<sup>7</sup>, S. JUNG<sup>8</sup>, S. RYU<sup>9</sup>, S. HEO<sup>10</sup>, C. MOON<sup>11</sup>, H. KI<sup>12</sup>, J. SON<sup>13</sup>, K. KWON<sup>14</sup>, S. SHIN<sup>15</sup>, J. LEE<sup>16</sup>, S. LEE<sup>17</sup>, J. RHEE<sup>18</sup>, J. LEE<sup>19</sup>, M. JOUNG<sup>20</sup>, E. JOO<sup>21</sup>, Y. HA<sup>22</sup>, C. KANG<sup>23</sup>, K. PECK<sup>24</sup>, J. SONG<sup>25</sup>; <sup>1</sup>Samsung Med. Ctr., Seoul, Republic of Korea, <sup>2</sup>Korean Network for Study of Infectious Disease, Seoul, Republic of Korea.

4:30 p.m.

- L1-438 **Severe Bacterial Meningitis: Ventricular Drainage and Intensive ICP-Treatment Improves Outcome**

M. GLIMAKER<sup>1</sup>, B. JOHANSSON<sup>2</sup>, M. WANECZEK<sup>3</sup>, A. ELMI<sup>4</sup>, B. BELLANDER<sup>5</sup>; <sup>1</sup>Med., Stockholm, Sweden, <sup>2</sup>Anesthesiology, Stockholm, Sweden, <sup>3</sup>Neurosurgery, Stockholm, Sweden.

ICAAAC 2013 | ASM

file:///G:/ICAAAC%202013%20DENVER%20COMPLETE/ICAAAC%202013%20%20ASM%20%20SI.LIDE%20A

Home  
Advanced Search  
2013  
2012  
2011  
ASM Website  
ICAAAC Website  
Help

ICAAAC2013  
SANDICAC | SEPT 16-17 | DENVER, CO

B-1430

## The MMP13 (-77A/G) Polymorphism Associates With the Presence of Sepsis in ICU Patients

G. Martín<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>1</sup>, A. H. Montes<sup>1</sup>, J. Collazos<sup>2</sup>, J. A. Carton<sup>1</sup>, F. Taboada<sup>1</sup>, E. Valle-Garay<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Hosp Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, SPAIN, <sup>2</sup>Hosp. de Galdacano, Vizcaya, SPAIN.

**Background:** Matrix-metalloproteinases (MMPs) and their tissue-inhibitors (TIMPs) participate in extracellular matrix remodelling and degradation. They are also regulators of the immune responses raised in sepsis. No MMPs polymorphisms (SNP) have been associated with sepsis so far. **Methods:** 89 adult patients with severe sepsis and 90 age and sex-matched controls with non-infectious pathologies (mostly trauma and cerebrovascular strokes) admitted to the ICU of the HUCA were enrolled in a prospective study and followed during their hospital stay. All septic patients had positive hemocultures at admission. APACHE score was calculated at ICU admission for all the patients. MMP1 (-1607 1G/2G), MMP3 (-1612 5A/6A) and MMP13 (-77A/G) SNPs were genotyped by PCR. MMPs (-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) and TIMPs (-1, -2, -4) were measured by ELISA microarrays in serum obtained during the first day of ICU stay. **Results:** MMP13 AA homozygotes (59.6 % vs. 42.9%) were significantly more frequent in septic patients compared to non-infected controls ( $\chi^2 = 4.37$ , OR [95% CI] 0.51[0.27-0.96],  $p=0.037$ ). Carriers of the MMP13 AA genotype had slightly higher MMP-13 serum levels compared to carriers of the AG genotype ( $0.37 \pm 1.9$  vs.  $0.13 \pm 0.13$  pg/ml,  $p=0.3$ ). MMP-13 serum levels were slightly although not significantly increased in septic patients compared to controls ( $0.41 \pm 1.96$  vs.  $0.11 \pm 0.12$  pg/ml,  $p=0.2$ ). Four patients (13.8%) died, only 1 with sepsis, 3 of them carriers of the MMP13 AG genotype. No associations of the MMP1 or MMP3 SNPs with sepsis, APACHE score or mortality were found. **Conclusions:** We report for the first time an association between a MMP SNP and sepsis. More research is needed in order to clarify the role of MMP13 in sepsis development.

Inicio | Bandera de entrada... | P14 | Memoria | gen... | Amazon Music | 4 Explorador de... | ICAAAC2013 | ASM... | ES | 2013

ICAAAC 2013 | ASM

file:///G:/ICAAAC%202013%20DENVER%20COMPLETE/ICAAAC%202013%20%20ASM%20%20SLIDE%20A

ICAAAC2013  
5th ICAAC | SEPT 04-13 | DENVER, CO

Home  
Advanced Search  
2013  
Category Index  
Author Index  
Keyword Index  
Invited Speakers  
Late Breakers  
2012  
2011  
ASM Website  
ICAAAC Website  
Help

**B-1431**

**Time Course Variations of Serum Matrix Metalloproteases and Their Tissue Inhibitors and Its Association With the Presence of Sepsis and Poor Clinical Outcome in ICU Patients**

G. Martín<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>1</sup>, A. H. Montes<sup>1</sup>, J. Collazos<sup>2</sup>, V. Carcabal<sup>1</sup>, F. Taboada<sup>1</sup>, E. Valle-Garay<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Hosp Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, SPAIN, <sup>2</sup>Hosp. de Galdacano, Vizcaya, SPAIN.

**Background:** Matrix-metalloproteases (MMPs) and their tissue-inhibitors (TIMPs) participate in extracellular matrix remodelling and degradation. They are also regulators of the immune responses raised in sepsis. Their role in the clinical outcome of septic patients is controversial and their dynamic changes remain unexplored. **Methods:** 14 adult patients with severe sepsis and 15 age and sex-matched controls with non-infectious pathologies (mostly trauma and cerebrovascular strokes) admitted to the ICU of the HUCA were enrolled in a prospective study and followed during their hospital stay. All septic patients had positive hemocultures at admission. APACHE score was calculated at the ICU admission for all the patients. MMPs (-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) and TIMPs (-1, -2, -4) were measured by ELISA microarrays in serum obtained during the days 1, 3 and 7 of ICU stay. **Results:** Four patients (13.8%) died, only 1 with sepsis. Serum MMPs (-1, -8, -9, -10) and TIMP-4 levels were significantly different throughout the ICU stay in septic patients (p<0.02) but no significant dynamic changes were observed among the non-infected controls. The presence of sepsis associated with increased serum levels of MMP-3 and -8 (p<0.0001), and the APACHE score with decreased serum levels of MMP-1 (p=0.03) and increased of MMP-1, -2, -8 and TIMP-1 and -2 (p<0.04). Fatal outcome associated with increased serum levels of MMP-1 and -13 by Pearson correlation (p<0.01). Serum MMP-8 levels at day 1 and 3 and TIMP-4 levels at day 7 were the only

Inicio  
Bandera de entrada...  
F114 Memoria Gen...  
Amazon Music  
Explorador de...  
ICAAAC 2013 | ASM ...  
ES  
20128



B-1431

## Time Course Variations of Serum Matrix Metalloproteases and Their Tissue Inhibitors and Its Association With the Presence of Sepsis and Poor Clinical Outcome in ICU Patients

G. Martín<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>1</sup>, A. H. Montes<sup>1</sup>, J. Collazos<sup>2</sup>, V. Carcabá<sup>1</sup>, F. Taboada<sup>1</sup>, E. Valle-Garay<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Hosp Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, SPAIN, <sup>2</sup>Hosp. de Galdacano, Vizcaya, SPAIN.

**Background:** Matrix-metalloproteases (MMPs) and their tissue-inhibitors (TIMPs) participate in extracellular matrix remodelling and degradation. They are also regulators of the immune responses raised in sepsis. Their role in the clinical outcome of septic patients is controversial and their dynamic changes remain unexplored. **Methods:** 14 adult patients with severe sepsis and 15 age and sex-matched controls with non-infectious pathologies (mostly trauma and cerebrovascular strokes) admitted to the ICU of the HUCA were enrolled in a prospective study and followed during their hospital stay. All septic patients had positive hemocultures at admission. APACHE score was calculated at the ICU admission for all the patients. MMPs (-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) and TIMPs (-1, -2, -4) were measured by ELISA microarrays in serum obtained during the days 1, 3 and 7 of ICU stay. **Results:** Four patients (13.8%) died, only 1 with sepsis. Serum MMPs (-1, -8, -9, -10) and TIMP-4 levels were significantly different throughout the ICU stay in septic patients ( $p < 0.02$ ) but no significant dynamic changes were observed among the non-infected controls. The presence of sepsis associated with increased serum levels of MMP-3 and -8 ( $p < 0.0001$ ), and the APACHE score with decreased serum levels of MMP-1 ( $p = 0.03$ ) and increased of MMP-1, -2, -8 and TIMP-1 and -2 ( $p < 0.04$ ). Fatal outcome associated with increased serum levels of MMP-1 and -13 by Pearson correlation ( $p < 0.01$ ). Serum MMP-8 levels at day 1 and 3 and TIMP-4 levels at day 7 were the only variables significantly associated with sepsis by logistic regression ( $p < 0.0001$ ) although none with mortality. **Conclusions:** Early increase of MMP-8 and late decrease of TIMP-4 are associated with sepsis although do not seem to play any role in the patients clinical outcome.

Home | ICAAC 2014 | ASM | www.icaaconline.com/ahp/icaac2014abstr acts/data/index.htm

Washington, DC | September 5-9

ICAAC 2014

Advanced Search

2014

Category Index

Author Index

Keyword Index

Late Breakers

Published Online

2013

ASM Website

ICAAC Website

Copyright

Help

E-932

## Endothelial (NOS3 E298D) And Inducible (NOS2 Exon 22) Nitric Oxide Synthase Polymorphisms, As Well As Plasma NOx, Influence Sepsis Development

G. Martin<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>2</sup>, A. H. Montes<sup>3</sup>, J. Collazos<sup>4</sup>, V. Alvarez<sup>5</sup>, L. Perez-Is<sup>6</sup>, J. A. Carton<sup>2</sup>, F. Taboada<sup>2</sup>, E. Valle-Garay<sup>6</sup>, <sup>1</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>2</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain, <sup>3</sup>Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain, <sup>4</sup>Hosp. de Galdacano, Galdacano, Spain, <sup>5</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>6</sup>Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain

**Background:** Nitric oxide (NO) influences susceptibility to infection and hemodynamic failure (HF) in sepsis. NOS3 and NOS2 SNPs might modify plasma nitrite/nitrate (NOx) levels, sepsis development, hemodynamics and survival. **Methods:** 90 severely septic and 91 non-infected ICU patients were prospectively studied. NOS3 (E298D), NOS3 (-786 T/C), NOS3 (27 bp-VNTR), and NOS2A (exon 22) SNPs and plasma NOx levels were assessed. **Results:** 21 patients (11.6%) died, 7 with sepsis. TT homozygotes and T allele carriers of NOS3 (E298D) and AG carriers of the NOS2A (exon 22) SNPs were more frequent among septic compared to non-infected ICU patients (p<0.05). Plasma NOx was higher in septic, especially in septic with HF or fatal outcome (p<0.006). Plasma NOx was higher in carriers of the T allele of the NOS3 (E298D) SNP (p=0.006). Sepsis independently associated with HF, increased NOx, peripheral neutrophils, and fibrinogen levels, decreased prothrombin and the presence of the NOS3 (E298D) and NOS2A (exon 22) SNPs. A low APACHE II score was the only variable associated with sepsis survival. NOx independently associated with sepsis, HF, decreased neutrophils and higher APACHE. **Conclusions:** NOS3 (E298D) and NOS2A (exon 22) SNPs, individually and in combination, and plasma NOx, associated with sepsis development. NOx associated with HF and fatal outcome.

Inicio | Bandeja de entrada | 2014 | Memoria gener... | Amazon Music | ICAAC 2014 | ASM | ES | 20:01

## Endothelial (MOS3 E298D) and inducible (MOS2 exon 22) nitric oxide synthase polymorphisms, as well as plasma NOx, influence sepsis development.

G. Martín<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>1</sup>, A. H. Montes<sup>2</sup>, J. Colazo<sup>3</sup>, V. Alvarez<sup>1</sup>, L. Pérez-Iz<sup>2</sup>, J. A. Carton<sup>1,2</sup>, F. Taboada<sup>1,2</sup>, E. Valle-Garay<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Hosp. Univ. Central de Asturias, <sup>2</sup> Oviedo Univ. Sch. Med., Oviedo, Spain, <sup>3</sup> Hospital de Galdakano, Vizcaya, Spain

Conflicto de intereses: no aplica

### ABSTRACT

- ❖ **Introduction:** Nitric oxide (NO) influence susceptibility to infection and hemodynamic failure (HF) in sepsis. MOS3 and MOS2 SNPs might modify plasma nitro/nitrate (NOx) levels, sepsis development.
- ❖ **Methods:** 90 severely septic and 91 noninfected ICU patients were prospectively analyzed. MOS3 (E298D), MOS2 (786 T/C), MOS1 (27-9p-A/TTR), and MOS4 (exon 22) SNP, and plasma NOx levels were assessed.
- ❖ **Results:** 21 patients (11.6%) died, 7 with sepsis. T/T homozygotes and T allele carriers of MOS3 (E298D) and G/A carriers of the MOS2 (exon 22) SNPs were more frequent among septic compared to noninfected patients (p=0.003 and p=0.002, respectively). Plasma NOx was higher in carriers of the T allele of the MOS3 (E298D) SNP independently associated with HF, increased NOx, peripheral neutrophils, and fibrinogen levels, decreased prothrombin and the presence of the MOS3 (E298D) and MOS4 (exon 22) SNPs. A low APACHE II score was the only variable associated with sepsis survival. NOx independently associated with sepsis, HF, decreased prothrombin, APACHE II score and mortality.
- ❖ **Conclusions:** MOS3 (E298D) and MOS2 (exon 22) SNPs, individually and in combination, and plasma NOx, associated with sepsis development. NOx associated with HF and fatal outcome.
- ❖ **Keywords:** nitric oxide, nitric oxide synthase, polymorphisms, sepsis, hemodynamic failure, survival

### INTRODUCTION

- ❖ Sepsis shock is the most common cause of death in the ICU.
- ❖ NO by regulating vascular tone and permeability and myocardial function, plays a key role in sepsis pathophysiology. NO synthesis is regulated by nitric oxide synthase (NOS) activity.
- ❖ Severe sepsis (MOS3) SNPs might modify NOS activity and NO production and play a role in sepsis development (as suggested (1,5)).

### OBJECTIVES

- ❖ To investigate whether MOS3 and MOS2 SNPs might influence sepsis susceptibility, mortality and/or the presence of hemodynamic failure (HF).
- ❖ In order to answer these questions different MOS3 and MOS24 SNPs in septic and non-infected ICU controls were genotyped.
- ❖ Plasma nitrate/nitrite (NOx) levels were also assessed at ICU admission and in time course in a subgroup of septic and uninfected controls.

### PATIENTS

- ❖ 90 adult septic ICU patients that fulfilled the 1992 IDSCC criteria were enrolled (4/5). All septic patients had positive blood culture or a microbiologically-demonstrated source of bacterial infection.
- ❖ Different adult patients admitted to the ICU after polytrauma or cerebrovascular attack were used as controls (Table 1).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of ICU septic and uninfected patients

Characteristic	Septic (n=90)	Uninfected (n=91)
Age (years)	62.5 ± 15.2	61.8 ± 14.5
Male (%)	78	75
APACHE II score	20.5 ± 4.5	18.5 ± 3.5
SAPS II score	35.5 ± 8.5	32.5 ± 7.5
SOFA score	10.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Survival (%)	79	85
ICU mortality (%)	11	5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5

Table 2. Demographic and clinical characteristics of different MOS2 SNPs in ICU septic and uninfected patients

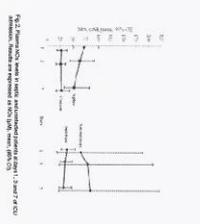
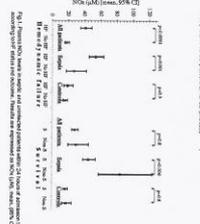
SNP	Septic (n=90)	Uninfected (n=91)
T/T	45 (50%)	48 (53%)
T/C	40 (44%)	38 (42%)
C/C	5 (6%)	5 (5%)
Allele frequency	T: 0.75, C: 0.25	T: 0.75, C: 0.25
Genotype frequency	T/T: 0.50, T/C: 0.44, C/C: 0.06	T/T: 0.53, T/C: 0.42, C/C: 0.05
Survival (%)	79	85
ICU mortality (%)	11	5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5

Table 3. Demographic and clinical characteristics of MOS3 SNPs in ICU septic and uninfected patients

SNP	Septic (n=90)	Uninfected (n=91)
T/T	45 (50%)	48 (53%)
T/C	40 (44%)	38 (42%)
C/C	5 (6%)	5 (5%)
Allele frequency	T: 0.75, C: 0.25	T: 0.75, C: 0.25
Genotype frequency	T/T: 0.50, T/C: 0.44, C/C: 0.06	T/T: 0.53, T/C: 0.42, C/C: 0.05
Survival (%)	79	85
ICU mortality (%)	11	5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5
ICU LOS (days)	12.5 ± 5.5	10.5 ± 4.5

Table 4. Plasma NOx expression levels of septic and uninfected patients

Characteristic	Septic (n=90)	Uninfected (n=91)
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5
Plasma NOx (µM)	12.5 ± 3.5	8.5 ± 2.5



### METHODS

- ❖ Different MOS3 and MOS24 SNPs were DNA genotyped.
- ❖ Plasma NOx levels were measured at ICU admission and at days 1, 3 and 7 in 29 septic and control patients.
- ❖ Neutrophils MOS2 gene expression in septic and uninfected ICU controls was also measured.

### RESULTS

- ❖ 21 patients (11.6%) died, 7 with sepsis.
- ❖ SNP4 results
- ❖ T/T homozygotes and T allele carriers of the MOS2 (exon 22) SNPs were more frequent among septic compared to controls (p=0.003) (Table 1).
- ❖ Plasma NOx was higher in carriers of the T allele of the MOS3(E298D) SNP (p=0.006) (Table 2).
- ❖ Plasma NOx Time Course
- ❖ There were no significant differences in the course of NOx over time between septic and controls or among survivors and those who died (p=0.3)(Fig.2)
- ❖ Neutrophil MOS24 gene expression
- ❖ There were no differences in neutrophil MOS24 gene expression between septic and controls or among survivors and those who died (p=0.3)(Table 1)
- ❖ Multivariate logistic regression
- ❖ Sepsis independently associated with HF, increased plasma NOx, peripheral neutrophils and fibrinogen levels, decreased prothrombin and the presence of the MOS3 (E298D) and MOS4 (exon 22) SNPs
- ❖ A low APACHE II score associated with sepsis survival (Table 4).
- ❖ NOx independently associated with sepsis, HF, decreased neutrophils and higher APACHE II score.

### CONCLUSIONS

- ❖ MOS3(E298D) and MOS24 (exon 22) SNPs, individually and in combination, and plasma NOx, associated with sepsis development.
- ❖ NOx associated with HF and fatal outcome.

### REFERENCES

- ❖ 1. Hultman H, et al. Shock. 2009; 31:448-53
- ❖ 2. Ma P et al. J Trauma. 2011; 71:872-7.
- ❖ 3. Wang Z et al. J Trauma. 2013; 132:337-46.
- ❖ 4. Ebova HC et al. Chest. 1992; 101:148-54.
- ❖ 5. Levy MM et al. Intensive Care Med. 2003; 31:1250-6.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Oviedo University research grants LRU10/12/04, 01 and 02 and 11-CCO10-07 (grant 10/14) and by grant from Regional Government of Asturias (grant 10/14/10/14) and 10/14/10/14 (grant 10/14/10/14).

Home x ICAAC 2014 | ASM x  
 www.icaaconline.com/ehp/icaac2014abstracts/data/index.htm

Washington, DC | September 5-9

ICAAC 2014

Advanced Search

2014  
 Category Index  
 Author Index  
 Keyword Index  
 Late Breakers  
 Published Online

2013  
 Category Index  
 Author Index  
 Keyword Index  
 Invited  
 Late Breakers  
 ASM Website  
 ICAAC Website  
 Copyright  
 Help

E-935

## The Tnf- $\alpha$ (-238 G/a) Polymorphism Seems To Protect Against Development Of Severe Sepsis

G. Martin<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>2</sup>, A. H. Montes<sup>3</sup>, J. Collazos<sup>4</sup>, V. Alvarez<sup>5</sup>, J. A. Carton<sup>6</sup>, F. Taboada<sup>6</sup>, E. Valle-Garay<sup>7</sup>, <sup>1</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain, <sup>2</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain, <sup>3</sup>Oviedo Univ Med Sch, Biochemistry and Molecular Biol., Oviedo, Spain, <sup>4</sup>Hosp. de Galdacano, Galdacano, Spain, <sup>5</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>6</sup>Hosp Univ. Central de Asturias, Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain, <sup>7</sup>Oviedo Univ Med Sch, Oviedo, Spain

**Background:** Primary responses in sepsis-mediated inflammation are regulated by proinflammatory cytokines. Variations in the cytokine genes might modify their transcription or expression, plasma cytokine levels and response to sepsis. Activation protein-1 (AP-1) and NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) regulate cytokines gene expression in sepsis. **Methods:** 90 severely septic and 91 non-infected patients were prospectively studied. IL-1 $\alpha$  (-889 C/T), IL-1 $\beta$ (+3954 C/T), IL-6(-174 G/C), TNF- $\alpha$  (-238 G/A), TNF- $\alpha$  (-308G/A), IL-8 (-251A/T) and IL-10 (-1082 G/A) SNPs, plasma IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) levels, and AP-1 and NF- $\kappa$ B gene expression by neutrophils were assessed. **Results:** A allele carriers of TNF- $\alpha$  (-238 G/A) SNP were less frequent among septic patients (p<0.0003). IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels were higher (p<0.005), and AP-1 and NF- $\kappa$ B gene expressions lower (p<0.03), in septic patients. Sepsis was independently associated with higher fibrinogen, neutrophil counts and IL-8 levels, lower prothrombin, absence of the variant A allele of the TNF- $\alpha$  (-2398G/A) SNP, and hemodynamic failure. Death was independently associated with a higher APACHE II score, higher IL-8 levels and the diagnosis of sepsis. **Conclusions:** TNF- $\alpha$  (-238G/A) SNP seems to protect against sepsis development. Higher IL-8 levels are predictive of sepsis and mortality.

Inicio Banda de entrada... P14 Memoria Gen... Amazon Music 2 Google Chrome Capturas de pantalla ES 2013

# TNF- $\alpha$ (-238 G/A) polymorphism seems to protect against development of severe sepsis.

Poster#: E-935

G. Martín<sup>1</sup>, V. Asensi<sup>1, 2</sup>, A. H. Montes<sup>2</sup>, J. Collados<sup>3</sup>, V. Alvarez<sup>2</sup>, J. A. Carrón<sup>1, 2</sup>, F. Taboada<sup>1, 2</sup>, E. Valle-Garay<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Hosp. Univ. Central de Asturias, <sup>2</sup> Oviedo Univ. Sch. Med., Oviedo, Spain, <sup>3</sup> Hospital de Galdacano, Vizcaya, Spain

\*Contact: v.asensi@uniovi.es

## ABSTRACT

- Introducción: Primary responses in sepsis-induced inflammation are regulated by pro-inflammatory cytokines. Interleukin (IL) cytokines genes might modify their transcription or expression, plasma cytokines gene expression in sepsis.
- Methods: 90 severely septic and 91 non-infected patients were prospectively studied. *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *APACHE II* and *APACHE II* score were studied. *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A) SNPs, plasma IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) levels, and *AP-1* and *NF- $\kappa$ B* gene expression by microarray were studied.
- Results: A allele carriers of *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A) SNP were less frequent among septic patients (p=0.0003). IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels were higher (p<0.005) and *AP-1* and *NF- $\kappa$ B* gene expressions lower (p<0.05), in septic patients. Sepsis was independently associated with higher fibrinogen, neutrophils count and IL-8 levels, lower prothrombin, absence of the variant A allele of the *AP-1* and *IL-8* genes, higher IL-8 transcriptional balance. Sepsis was independently associated with a higher *APACHE II* score, higher IL-8 transcriptional balance. Sepsis was independently associated with a higher *APACHE II* score, higher IL-8 transcriptional balance. Sepsis was independently associated with a higher *APACHE II* score, higher IL-8 transcriptional balance.
- Conclusions: *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A) SNP seems to protect against sepsis development. Higher IL-8 levels are predictive of sepsis and mortality.
- Keywords: cytokines, *TNF- $\alpha$*  (-238 G/A), polymorphisms, *AP-1*, *NF- $\kappa$ B*, neutrophils, sepsis.

## INTRODUCTION

- Sepsis shock is the most common cause of death in the ICU.
- Primary responses in sepsis-mediated inflammation are regulated by pro-inflammatory cytokines.
- SNPs in the cytokines gene promoter area might modify their transcription or expression or plasma cytokine levels and play some role in sepsis development and/or outcome (1-5).

## OBJECTIVES

- To investigate whether different cytokines gene promoter SNPs might influence sepsis susceptibility level or mortality without changes in plasma cytokines or neutrophil activating transcription factors.
- In order to answer these questions different cytokine SNPs in septic and non-infected ICU controls were genotyped.
- Plasma cytokine levels were also assessed at ICU admission and in time course in a subgroup of *AP-1* and *IL-8* gene expression by peripheral neutrophils at ICU admission in both groups were also measured.

## PATIENTS

- 90 adult septic ICU patients that fulfilled the 1992 ISCC criteria were enrolled (8/10). All septic patients had positive blood culture or a microbiologically-demonstrated source of bacterial infection.
- Uninfected adult patients admitted to the ICU after polytrauma or cardio-vascular attack were used as controls (Table 1).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of septic patients

Characteristic	Septic (n=90)	Controls (n=91)
Age (years)	62.5 (15.2)	61.8 (14.5)
Male (%)	78	75
APACHE II score	22.5 (5.2)	18.5 (4.5)
APACHE II score > 20 (%)	65	15
SOFA score	10.5 (3.5)	5.5 (2.5)
SOFA score > 10 (%)	55	10
ICU stay (days)	12.5 (8.5)	10.5 (7.5)
ICU mortality (%)	15	5
30-day mortality (%)	25	10
60-day mortality (%)	35	15
90-day mortality (%)	45	20

Table 2. Genetic characteristics of septic patients

SNP	Septic (n=90)	Controls (n=91)
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> (-238 G/A)	45 (50%)	55 (60%)
<i>IL-8</i> (-251 G/A)	40 (44%)	45 (50%)
<i>AP-1</i> (-307 G/A)	35 (39%)	40 (44%)
<i>IL-6</i> (-596 G/A)	30 (33%)	35 (39%)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i> (-489 G/A)	25 (28%)	30 (33%)
<i>MCP-1</i> (-2518 G/A)	20 (22%)	25 (28%)
<i>IL-10</i> (-1082 G/A)	15 (17%)	20 (22%)
<i>IL-15</i> (-325 G/A)	10 (11%)	15 (17%)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i> (-2486 G/A)	5 (6%)	10 (11%)
<i>AP-1</i> (-307 G/A)	35 (39%)	40 (44%)
<i>IL-8</i> (-251 G/A)	40 (44%)	45 (50%)
<i>AP-1</i> (-307 G/A)	35 (39%)	40 (44%)
<i>IL-6</i> (-596 G/A)	30 (33%)	35 (39%)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i> (-489 G/A)	25 (28%)	30 (33%)
<i>MCP-1</i> (-2518 G/A)	20 (22%)	25 (28%)
<i>IL-10</i> (-1082 G/A)	15 (17%)	20 (22%)
<i>IL-15</i> (-325 G/A)	10 (11%)	15 (17%)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i> (-2486 G/A)	5 (6%)	10 (11%)

Table 3. Comparison of gene expression between septic patients and controls

Gene	Septic (n=90)	Controls (n=91)
<i>IL-6</i>	202.8 (46.0)	104.8 (37.0)
<i>IL-8</i>	1018.0 (310.0)	684.0 (310.0)
<i>IL-10</i>	14.5 (4.5)	14.5 (4.5)
<i>IL-15</i>	31.5 (14.0)	31.5 (14.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	51.5 (24.0)	51.5 (24.0)
<i>MCP-1</i>	81.5 (40.0)	81.5 (40.0)
<i>AP-1</i>	111.5 (50.0)	111.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	221.5 (100.0)	221.5 (100.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-10</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-15</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>MCP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>AP-1</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-6</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)
<i>IL-8</i>	121.5 (50.0)	121.5 (50.0)