



Revista de la Facultad de Medicina

ISSN: 2357-3848

ISSN: 0120-0011

Universidad Nacional de Colombia

Prado-Díaz, Alfredo; Castillo, Andrés; Rojas, Diana Marcela; Chávez-Vivas, Mónica
Marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de sepsis, sepsis grave y choque séptico
Revista de la Facultad de Medicina, vol. 65, núm. 1, 2017, Enero-Marzo, pp. 145-155
Universidad Nacional de Colombia

DOI: 10.15446/revfacmed.v65n1.53876

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=576364351021>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UNEN
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

ARTÍCULO DE REVISIÓN

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v65n1.53876>

Marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de sepsis, sepsis grave y choque séptico

Molecular markers in the diagnosis and prognosis of sepsis, severe sepsis and septic shock

Recibido: 29/10/2015. Aceptado: 01/02/2016.

Alfredo Prado-Díaz¹ • Andrés Castillo² • Diana Marcela Rojas³ • Mónica Chávez-Vivas^{4,5}¹ Universidad Libre - Seccional Cali - Grupo de Investigación en Microbiología Molecular y Enfermedades Infecciosas (GIMMEIN) - Santiago de Cali- Colombia.² Universidad del Valle - Sede Cali - Facultad de Ciencias Naturales y Exactas - Departamento de Biología - Cali - Colombia.³ Universidad Andres Bello - Sede Santiago - Facultad de Medicina - Escuela de Nutrición y Dietética - Santiago de Chile - Chile.⁴ Universidad Santiago de Cali - Campus Pampalinda - Facultad de Salud - Departamento de Ciencias Biomédicas - Santiago de Cali - Colombia.⁵ Universidad Libre de Cali - Seccional Cali - Grupo de Investigación Instituto de Ciencias Biomédicas - Cali - Colombia.

Correspondencia: Mónica Chávez-Vivas. Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Salud, Universidad Santiago de Cali. Calle 5 No. 62-00. Celular: +57 3113773723. Santiago de Cali. Colombia. Correo electrónico: monikchavez@gmail.com.

| Resumen |

Introducción. A pesar de los importantes avances en el entendimiento de la patofisiología de la sepsis, la mortalidad que genera sigue siendo alta.**Objetivo.** Describir el estado del arte de los biomarcadores moleculares propuestos hasta el momento como potenciales marcadores para el diagnóstico y pronóstico de sepsis, sepsis grave y choque séptico.**Materiales y métodos.** Se analizaron los registros de los últimos 14 años que se encontraban en PubMed, en The New England Journal of Medicine (NEJM) y en Illinois Automatic Computer (ILLIAC) con los términos sepsis, genetic polymorphisms, genetic variation y molecular marker. Se clasificaron los artículos por año de publicación y solo se tuvieron en cuenta los publicados durante los últimos 10 años.**Resultados.** La búsqueda arrojó 3 370 referencias que cubren más de 30 genes con polimorfismos genéticos que pueden ser empleados como potenciales marcadores de polimorfismos. Estos fueron evaluados para su uso en las diferentes manifestaciones de sepsis, su diagnóstico y progresión. Se describen 20 genes marcadores: cuatro asociados con bacteremia (TLR-1, TLR-2, Proteína C y Selectina-E), nueve con sepsis (IL-1B, IL-1A, IL-6, TNF- α , TLR-1, MBL-1, Hsp70, PAI-1 y MIF-1), siete con sepsis grave (IL-1RN, IL-10, TNF- α , CD14, TREM-1, Caspasa 12 y DEFB-1), cinco con choque séptico (TNF-B, TLR-4, Hsp70, MBL-1 y CD14) y tres con disfunción multiorgánica (TLR-1, PAI-1 y Proteína C).**Conclusión.** Los polimorfismos genéticos, en su mayoría, han sido probados clínicamente como marcadores de diagnóstico y pronóstico en la sepsis con resultados prometedores por la alta especificidad y sensibilidad en la práctica clínica.**Palabras clave:** Sepsis; Biomarcadores; Polimorfismo genético; Polimorfismo de nucleótido simple; Repeticiones de minisatélite (DeCS).**Prado-Díaz A, Castillo A, Rojas DM, Chávez-Vivas M.** Marcadores moleculares en el diagnóstico y pronóstico de sepsis, sepsis grave y choque séptico. Rev. Fac. Med. 2017;65(1): 145-55. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v65n1.53876>.

| Abstract |

Introduction: Despite important progress in the understanding of the pathophysiology of sepsis, the mortality rates caused by this condition remain high.**Objective:** To describe the state of the art on molecular biomarkers proposed as potential markers for the diagnosis and prognosis of sepsis, severe sepsis and septic shock.**Materials and methods:** The terms sepsis, genetic polymorphisms, genetic variation and molecular marker were analyzed in the records of the last 14 years of PubMed, the New England Journal of Medicine (NEJM) and Illinois Automatic Computer (ILLIAC). The papers were classified by year of publication; only those published within the last 10 years were taken into account.**Results:** The search yielded 3390 references covering more than 30 genes with genetic polymorphisms that can be used as potential polymorphism markers. They were assessed for use in different manifestations, diagnosis and progression of sepsis. Twenty genetic markers are described: four associated with bacteremia (TLR-1, TLR-2, Protein C and Selectin-E), nine with sepsis (IL-1B, IL-1A, IL-6, TNF- α , TLR-1, MBL-1, Hsp70, PAI-1 and MIF-1), seven with severe sepsis (IL-1RN, IL-10, TNF- α , CD14, TREM-1, Caspase 12 and DEFB-1), five with septic shock (TNF-B, TLR-4, Hsp70, MBL-1 and CD14), and three with multiorgan dysfunction (TLR-1, PAI-1 and Protein C).**Conclusion:** In general, genetic polymorphisms have been clinically tested as diagnostic and prognostic markers of sepsis with

promising results due to the high specificity and sensitivity of the clinical practice.

Keywords: Sepsis; Biomarkers; Polymorphism, Genetic; Polymorphism, Single Nucleotide; Minisatellite Repeats (MeSH).

Prado-Díaz A, Castillo A, Rojas DM, Chávez-Vivas M. [Molecular markers in the diagnosis and prognosis of sepsis, severe sepsis and septic shock]. Rev. Fac. Med. 2017;65(1): 145-55. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v65n1.53876>.

Introducción

La sepsis, ya sea grave, en choque séptico o síndrome de disfunción multiorgánica, constituye en la actualidad la primera causa de mortalidad en los pacientes ingresados a unidades de cuidado intensivo (UCI), causando más del 60% de las muertes en este servicio (1-4).

En Colombia, la prevalencia de pacientes con sepsis en la UCI es del 12% y la tasa de mortalidad alcanza el 33.6% (4). En EE. UU., la incidencia de sepsis grave posoperatoria se ha triplicado, pasando del 0.3% para el año 2000 al 0.9% en el 2010 (2). En Europa, se reporta alrededor de un 29% de mortalidad en pacientes que desarrollaron sepsis y sepsis grave (1,3).

La sepsis no presenta manifestaciones clínicas específicas y su evaluación tiene limitaciones al establecer la severidad y al predecir el pronóstico de la enfermedad de manera efectiva. En la actualidad, los indicadores que se emplean para seguir la clínica de la infección incluyen: fiebre, recuento de leucocitos (WBC), determinación de proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina (PCT), entre otros parámetros (5,6).

La búsqueda de nuevos biomarcadores de alta sensibilidad y especificidad que ayuden a mejorar el diagnóstico y pronóstico de sepsis es un campo de estudio de la medicina molecular (7). Una aproximación a este tipo de investigaciones se basa en establecer como biomarcador a la variación en la concentración plasmática de las proteínas que participan en la respuesta inflamatoria durante la enfermedad (7-10). Sin embargo, también se propone el polimorfismo de los genes que codifican por estas proteínas como un biomarcador más confiable (11,12).

En el presente artículo se revisa el estado del arte de los biomarcadores moleculares propuestos hasta el momento como potenciales marcadores para el diagnóstico y pronóstico de la sepsis, sepsis grave y choque séptico.

Materiales y métodos

Se analizaron los registros de los últimos 14 años que se encontraban en PubMed, en The New England Journal of Medicine (NEJM) y en Illinois Automatic Computer (ILLIAC), clasificando los artículos por año de publicación e incluyendo solo artículos de investigación y de revisión que evaluaran o trataran las palabras clave: sepsis, genético polymorphisms, genetic variation y molecular marker. Solo se tuvieron en cuenta los artículos publicados durante los últimos 10 años.

Resultados

La búsqueda arrojó 3 370 referencias que cubren las generalidades de los biomarcadores de sepsis, las bases teóricas del polimorfismo genético y la publicación de más de 30 genes con polimorfismos considerados

marcadores de esta enfermedad. Sin embargo, en la revisión se tuvieron en cuenta 84 artículos que describieron los aspectos epidemiológicos y las bases teóricas de la sepsis; así como los biomarcadores que incluyen el polimorfismo en 17 genes candidatos, considerados como potenciales marcadores moleculares de susceptibilidad para el desarrollo de sepsis, choque séptico y de mortalidad.

Biomarcadores moleculares en sepsis

La variación en los niveles plasmáticos de las moléculas generadas por las células efectoras durante la respuesta inflamatoria a la sepsis incluye: especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolitos de nitrógeno (RNS), citocinas, quimiocinas y aumento en la expresión de receptores de superficie. Estos han sido considerados biomarcadores moleculares de gran utilidad para confirmar o descartar la enfermedad, así como para evaluar la evolución del paciente en una terapia específica (7-10).

Entre los mediadores, se destacan las citocinas cuya secreción se detecta desde los primeros momentos de la infección (11,12). Entonces, los altos niveles séricos de las interleucinas IL-1 β , IL-4 IL-6, IL-8, la proteína inflamatoria de macrófagos (MCP-1) y la osteopontina (OP) se consideran indicadores de un mal pronóstico de sepsis (13-17). En la Tabla 1 se describen posibles biomarcadores identificados en la búsqueda bibliográfica.

En modelos animales se ha demostrado que la IL-1 β es capaz de inducir varios de los síntomas del choque séptico y disfunción multiorgánica (10,13), mientras que las interleucinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) participan en la patogénesis de la sepsis grave (14-17).

El TNF- β (también llamado *linfotoxina alfa*) es una citocina que tiene efectos similares a los descritos para el TNF- α , aunque se ha encontrado que el nivel de esta citocina en el suero de pacientes que desarrollaron sepsis es significativamente mayor comparado con el de pacientes que no la desarrollaron durante un proceso infeccioso. Sin embargo, no es clara su función en la patogénesis de la sepsis (10,14).

La IL-1 β , OP y MCP-1 se encuentran en altos niveles plasmáticos en los pacientes sépticos (7-9) y el incremento de las IL-2 e IL-4 se relaciona con la severidad y el desarrollo de sepsis (14). El alto nivel plasmático de las IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, MCP-1 y TNF- α se considera un predictor de desarrollo fatal de la enfermedad (10,11,16,17).

La proteína de alta movilidad B1 (HMGB1) induce la activación de los macrófagos y monocitos y desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias y la regulación de moléculas de adhesión. Esta proteína se presenta en altos niveles en pacientes con sepsis (18); sin embargo, tiene una reactividad más lenta que el TNF y la IL-1 β , por lo que se desestima como biomarcador para pronosticar la enfermedad (19).

En los estudios realizados en torno a la función de los marcadores celulares de superficie, se destacan las proteínas del clúster de diferenciación (CD). La determinación sérica de las proteínas CD48 y CD69 en alto nivel se relaciona con el desarrollo de la sepsis y los bajos niveles de CD10 y CD11 con un mal pronóstico de la enfermedad (20). Del mismo modo, los altos niveles plasmáticos de CD14, CD18, CD25, CD28, CD40 y CD80 en pacientes con sepsis grave se reportan como un indicador de mal pronóstico de la enfermedad y conllevan casos fatales (21-24).

Otras moléculas de interés que se analizan como biomarcadores de sepsis son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen moléculas de patógenos (PAMP) y hacen parte de la inmunidad innata (25). Entre estos, se destaca la familia de receptores similar a Toll (TLR), con al menos 10 proteínas reconocidas en humanos; esta familia se expresa en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y en otras poblaciones celulares y desempeña un papel central en la respuesta inmune innata a la infección mediante el

reconocimiento de distintos antígenos bacterianos (26). Por ejemplo, el TLR4 identifica el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, mientras que el TLR2 es esencial en el reconocimiento del

péptidoglucano de las bacterias Gram positivas (25,26). El incremento en los niveles séricos de TLR2 y TLR4 se detecta en pacientes con sepsis y se relaciona con el mal pronóstico de la enfermedad (26).

Tabla 1. Posibles marcadores humorales en la sepsis.

Citocina	Ubicación cromosómica	Origen celular	Función	Posible partición en la fisiopatología de la sepsis
Proinflamatoria				
IL-1 β	2q14.1	Macrófagos, monocitos	Proliferación celular, diferenciación, apoptosis	Alta expresión en pacientes sépticos vs. pacientes no sépticos
IL-6	7p15.3	Linfocitos T, macrófagos, células endoteliales	Diferenciación celular, producción de citocinas	Severidad de la enfermedad, mortalidad
IL-8	4q13.3	Macrófagos, células epiteliales, células endoteliales	Quimiotaxis, angiogénesis	Mayor expresión en pacientes neutropénicos sépticos vs. pacientes neutropénicos febriles sin sepsis
IL-12	3q25.33	Células dendríticas, macrófagos, linfocitos B	Producción de IFN- γ , producción de TNF- α , diferenciación de Th1	Predictor de mortalidad a partir de la sepsis posoperatoria. Utilizado en el diagnóstico de la sepsis en pacientes pediátricos
IL-18	11q23.1	Macrófagos, monocitos, células dendríticas	Producción de IFN- γ , inmunidad antimicrobiana	Útil para distinguir entre la sepsis Gram positivas y Gram negativas. Mayor expresión en pacientes con trauma y sepsis vs. pacientes con solo trauma
TNF- α	6p21.33	Macrófagos, linfocitos T CD4, linfocitos NK	Producción de citocinas, antiinfección, necrosis tumoral	Útil para distinguir entre pacientes con choque séptico sobrevivientes y no sobrevivientes a los 28 días de la enfermedad
Antiinflamatoria				
IL-1Ra	2q14.1	Macrófagos, monocitos, células dendríticas	Inhibidor de IL-1 α y IL-1 β	Útil para diagnóstico precoz de sepsis antes de los síntomas en recién nacidos
IL-4	5q31.1	Linfocitos T, mastocitos, basófilos	Proliferación celular, diferenciación de Th2	Incrementa sus niveles asociados con el desarrollo de sepsis
IL-10	1q32.1	Células Th2, linfocitos B, monocitos	Inhibidor de la producción de citocinas proinflamatorias	Mayor expresión en el choque séptico vs. choque cardiogénico
IL-13	5q31.1	Células Th2	Inhibidor de la producción de citocinas proinflamatorias	Incrementa sus niveles en el choque séptico en la sepsis
TGF- β	19q13.2	Macrófagos, linfocitos B	Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias	Progresión de la enfermedad

IL: Interleucina; TGF: Factor de crecimiento tumoral.

Fuente: Elaboración propia.

Otro marcador es el receptor soluble de las células mieloides (sTREM-1) que hace parte de la superfamilia de receptores de las inmunoglobulinas. En los estudios de Arts *et al.* (27), se propone como biomarcador predictivo del desarrollo de sepsis grave.

Los altos niveles séricos del receptor soluble de la IL-1 se detectan en pacientes sépticos, mientras que los receptores solubles de la IL-2 α y el TNF- β se relacionan con desarrollo de choque séptico y disfunción multiorgánica (13,14).

Las moléculas inflamatorias que actúan sobre el endotelio también han sido estudiadas como biomarcadores. En este caso, el péptido adrenomedulina (ADM), regulado por el sistema del complemento, actúa como un potente vasodilatador con efectos bactericidas y ha sido señalado por algunos estudios como un buen predictor de la gravedad y la evolución de la sepsis, de acuerdo a la variación de sus niveles plasmáticos en pacientes sépticos (28,29). Los estudios también señalan a la molécula de adhesión leucocitaria del endotelio (ELAM-1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF) con un desarrollo fatal de la enfermedad (7,8,14).

Las selectinas (proteínas de superficie expresadas por las células endoteliales y que facilitan el rodamiento leucocitario) se han relacionado con el desarrollo de sepsis, en especial la selectina S, la cual se ha propuesto como predictora de disfunción multiorgánica (7,8).

En los últimos años, se han estudiado las moléculas microARN (miARN) como potenciales marcadores de sepsis. Se trata de un

tipo de pequeños RNA endógenos no codificantes con alrededor de 22 nucleótidos de longitud que participan en importantes funciones biológicas al inhibir la expresión del ARN mensajero (ARNm) (30). Las miARN están involucradas en el desarrollo y la función específica de los tejidos; además, debido a su patrón de expresión único, son moléculas consideradas como potenciales marcadores en el diagnóstico o como blancos terapéuticos de muchas enfermedades (30,31). La expresión alterada de esta molécula se detecta en la circulación de pacientes con sepsis, por lo que se ha sugerido su utilidad como biomarcador de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (31).

A pesar del importante papel de las miARN en la patogenia de la sepsis, estas representan un valor limitado como biomarcadores ya que su expresión se induce también en otras enfermedades no infecciosas. Entonces, es necesario enfocarse en otros marcadores más específicos. De acuerdo a esta aproximación, los estudios se enfocan en estudiar los polimorfismos genéticos como marcadores moleculares de sepsis.

Polimorfismo genético

El polimorfismo genético corresponde al cambio en la secuencia de un gen y ocurre con una frecuencia superior a 1% en la población. Los polimorfismos pueden producirse en regiones codificantes y no codificantes del genoma (32). Existen dos clases de polimorfismos

genéticos: el que se genera por la sustitución de un nucleótido y se origina por la inserción o delección de uno o más nucleótidos, *single nucleotide polymorphism* (SNP), y el que se presenta cuando en un grupo un nucleótido se repite en bloques, *variable number tandem repeat* (VNTR) (30,31).

Una forma de clasificar los SNP se basa en el efecto que causan en la función de la proteína; de esta forma existen los ligados (SNP indicativos), que son variaciones que ocurren en regiones no traducidas a proteínas y que no afectan la función de estas. No obstante, pueden afectar la susceptibilidad de contraer una determinada enfermedad (32). Por ejemplo, los SNP en las regiones promotoras de un gen pueden alterar la afinidad de la unión de factores de transcripción y afectar la concentración de la proteína, mientras que los SNP generados en los extremos terminales del ARNm que no se traducen pueden alterar la estabilidad de estos últimos y, en consecuencia, la síntesis de la proteína (32).

Los SNP causativos son los que afectan de forma directa la función de la proteína, provocan una enfermedad, se presentan en la región codificante de un gen y pueden cambiar la secuencia de aminoácidos del producto proteico con la probabilidad que afecte su estructura y función. Este tipo de SNP es candidato para ser empleado como alelo modificador de la enfermedad (32,33).

En el caso de los VNTR, los que se detectan en la región codificante pueden generar proteínas no funcionales, mientras que, si se encuentran en regiones no codificantes, la alteración puede resultar en fragilidad cromosómica, silenciamiento de genes y modulación en los procesos de transcripción y traducción (32-34).

Se ha planteado que la presencia de algunos de estos polimorfismos genéticos estaría relacionada con la susceptibilidad del individuo al desarrollo de ciertas enfermedades (34-37). Así, por ejemplo, variaciones nucleotídicas en los genes PARK-2 o PACRG se relacionan con la progresión de la lepra (38). Algunas mutaciones específicas en el gen que codifica para el TLR parecen estar relacionadas con el desarrollo de la tuberculosis (39). Las mutaciones en los genes α -globina, β -globina, SLC4A1, mal/tirAP y darC se relacionan con la susceptibilidad a la malaria (40).

Variaciones nucleotídicas específicas también han sido detectadas por las proteínas que participan en la respuesta inflamatoria durante la infección en los genes que codifican. Tales variaciones se relacionan con susceptibilidad al desarrollo de la sepsis y progresión de la enfermedad (12,41,42).

Polimorfismos genéticos como biomarcadores de sepsis

Diversos estudios relacionan el polimorfismo genético de más de 30 genes con el desarrollo de sepsis, sepsis grave y choque séptico. En esta revisión se describen 20 de estos genes que codifican para las citocinas proinflamatorias, receptores celulares, enzimas, mediadores químicos, entre otros (41,42).

Polimorfismos estudiados en citocinas

Las citocinas se consideran mensajeras fisiológicas de la respuesta inmune, son activas en bajas concentraciones y se unen a receptores específicos en diferentes células, lo que ocasiona la liberación de mediadores secundarios y de otras citocinas, así como la expresión de múltiples moléculas que permiten la activación de diferentes poblaciones celulares (6-9,43). Diversos estudios han relacionado la presencia de ciertos polimorfismos en los genes que las codifican con la susceptibilidad a infecciones, las diferentes formas clínicas de la sepsis y la mortalidad (44-57).

IL-1

Las IL-1 son potentes citocinas proinflamatorias liberadas por los macrófagos que participan en la respuesta inflamatoria sistémica. Esta familia se encuentra conformada por dos agonistas (IL-1 α e IL-1 β) y por una antagonista (receptor antagonista IL-1: ILra) (6).

Los genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN codifican para IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra, respectivamente, y están localizados en los genes que codifican para los antígenos leucocitario humano (HLA) en el área q13-21 el cromosoma 2 (6). Se han identificado cinco polimorfismos relacionados con el riesgo de desarrollar sepsis: un SNP en la posición -889 de la región promotora del gen L-1A, dos SNP en la posición -31C y -511 de la región promotora y un SNP en la posición +3954 del exón 5 del gen IL-1B (44,45).

En el gen IL-1RN se ha detectado una región polimórfica en el intrón 2 con un VNTR de 86 pb que origina cinco alelos (A1, A2, A3, A4 y A5), los cuales son marcadores pronóstico para desarrollar sepsis grave (46). El estudio realizado por Fang *et al.* (47) encontró que el 54% de los individuos sanos presentan cuatro copias de las 86 pb repetidas (alelo A4) y el 34% dos copias (alelo 2). El alelo 2 se asocia con altos niveles séricos de IL-1ra en numerosas enfermedades donde la inflamación juega un papel central.

Algunos estudios analizados establecen la asociación entre el polimorfismo en IL-1 con el desarrollo de la sepsis; sin embargo, los resultados de estos son inconsistentes y no concluyentes (43,44). Por su parte, Zhang *et al.* (45) realizaron un metaanálisis con la literatura publicada relacionada con el polimorfismo en el gen IL-1 como factor de riesgo para el desarrollo de sepsis en las bases de datos de PubMed y Embase y en la web hasta junio del 2013; estos autores también encontraron que para el SNP en -889 IL-1A (rs1800587) una asociación significativa (OR=1.47; IC95%: 1.01-2.13; p=0.04), mientras que con los polimorfismos -511 IL-1B (rs16944) o -31 IL-1B (rs1143627) no se evidenció asociación. En el caso del SNP +3594 IL-1B (rs143634), el genotipo TT representó menor riesgo de sufrir la enfermedad (OR=0.59; IC95%: 0.36-0.97; p=0.04).

Para el VNTR en el gen IL-1RN se encontró una asociación significativa con el desarrollo de sepsis (OR=1.40; IC95%: 1.01-1.95; p=0.04); además, el incremento del VNTR estuvo relacionado con un mayor riesgo en la severidad de la enfermedad (45).

IL-6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica secretada por varias células, entre las que se destacan macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células T (6). El gen que codifica para la IL-6 se localiza en el cromosoma 7, generado por el cambio de una G por C en la posición -174 G/C de la región promotora, y se relaciona con una menor mortalidad por sepsis cuando los pacientes presentan el genotipo GG (48). También se han identificado los SNP en la posición +1753C/G y +2954 G/C, a los cuales no se les ha demostrado en forma concluyente su relación con el riesgo de desarrollar sepsis (7).

En un estudio realizado con pacientes quirúrgicos, la mortalidad en la sepsis fue significativamente inferior en los sujetos homocigóticos GG (OR=0.11; IC95%: 0.02-0.57). En esta misma investigación, los pacientes que fallecieron tenían niveles séricos de IL-6, es decir, significativamente superiores comparados con los de aquellos pacientes que sobrevivieron (genotipo GG) (49). Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos en un estudio realizado en un hospital alemán, en los que los pacientes portadores del genotipo homocigoto GG se asociaron con una mejora de la supervivencia en la sepsis en forma significativa (50).

También se ha encontrado un SNP en la posición +5174 de la región promotora de este gen y una asociación positiva con sepsis neonatal (51). Sin embargo, se necesita un mayor número de estudios para confirmar estos resultados.

IL-10

La IL-10 es la citoquina antiinflamatoria más potente que regula la disminución de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas secretadas por monocitos, neutrófilos y eosinófilos; previene la activación de células T; inhibe la expansión de células T, y potencia la liberación del modulador inflamatoria IL-1ra (6).

El gen de la IL-10 está localizado en el cromosoma 1, en la posición 1q31-1q32 (20). En la región de este gen se han determinado tres SNP: -1082A/G, -819C/T y -592C/A (52-55). El alelo A está relacionado con el polimorfismo -1082A/G y se asocia con susceptibilidad al desarrollo de sepsis (52); por el contrario, el genotipo -1082G/G se ha asociado con menor mortalidad (53,54), mientras que en el alelo G (-819T/G) se observó que los pacientes presentan mayores niveles de IL-10, con un notable incremento en la mortalidad causada por la sepsis grave (54).

El alelo generado por el SNP en -592A se asocia con bajos niveles de IL-10 y un mayor riesgo de mortalidad como consecuencia de la sepsis (55,56). Shu *et al.* (57) llevaron a cabo un estudio en China para investigar los SNP en las posiciones -592, -819 y -1082 y encontraron que estos se asociaban con una mayor incidencia de sepsis grave. Los pacientes con sepsis grave eran más propensos a tener el alelo A (-1082A) y los que sobrevivieron a esta presentaron menores niveles de IL-10 y mayor frecuencia del alelo G (-1082G), comparado con los controles (17% vs. 47.2%; $p=0.012$). En cuanto a las formas alélicas de los SNP -592 y -819 no se encontró asociación con el riesgo de mortalidad (57).

TNF

La TNF- α es una citocina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos y células T (6).

La TNF- β , también llamada linfocina α (LT- α), es una citoquina producida por los linfocitos T que activa las células endoteliales y los neutrófilos y actúa como mediador de la respuesta inflamatoria aguda y la activación de células T.

Los genes que codifican para las proteínas TNF- α y TNF- β están localizados dentro de los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) clase III, en el cromosoma 6 posición 6p21.3 (6). El papel de los polimorfismos de estos genes con susceptibilidad a la sepsis se ha evaluado en diferentes poblaciones de todo el mundo (7,8). También se han reportado varios SNP en la región promotora del gen que codifica para el TNF- α y algunos han sido relacionados con el desarrollo de sepsis. Los polimorfismos más estudiados se encuentran en el sitio -308 que genera el cambio nucleotídico G/A (58,59). Los alelos resultantes del SNP -308 G/A se denominan TNF1 y TNF2; las copias que contienen G corresponden al alelo TNF1 y las que poseen A corresponden al alelo TNF2 (58). Los mayores niveles plasmáticos del TNF- α se detectan en pacientes que murieron con un SNP T/A -308 y tenían una mayor susceptibilidad para desarrollar sepsis grave y choque séptico (59).

Un segundo polimorfismo fue detectado en la posición -238G/A en la unión con el represor, ubicado en la región promotora donde el alelo A sustituye al alelo más común G y se asocia con bajos niveles de expresión del gen (60). La variación 250 G/A se asocian con un

alto nivel de mortalidad en choque séptico en adultos y bacteremia en niños (61).

Dwyer *et al.* (62) examinaron la asociación de los polimorfismos en la región promotora del gen TNF- α y los niveles de ARNm en una cohorte de pacientes con sepsis grave y encontraron que en los pacientes homocigotos había mayor producción de ARNm para el alelo G (SNP en la posición -308) que en los que portaban el alelo A (SNP en la posición -863). Los pacientes portadores del haplotipo 1 (alelo A y G) también presentaron mayor nivel de ARNm, mientras que los portadores del haplotipo 4 (con C en la posición -863 y A en la posición -308) presentaron disminución en los niveles de ARNm. Los pacientes homocigotos para el alelo A en la posición -308 presentaron mayor mortalidad en la sepsis grave que los portadores del alelo G.

En el caso del gen que codifica para el TNF- β , se ha detectado un SNP G/A en la región +252 ubicada en un intrón. La variante alélica con G se denomina TNFB1 y está relacionada con una mayor producción de TNF- β , mientras que la variante con A se denomina TNFB2 y está relacionada con mayor producción de TNF- α (43).

Estudios llevados a cabo en alemanes caucásicos con shock séptico han demostrado que los pacientes con el alelo TNFB2 tienen una mayor capacidad secretora de TNF- α respecto al alelo TNFB1 y que el alelo TNFB2 también se asocia con un mayor riesgo de muerte. Entre los pacientes posoperatorios con sepsis severa, el 65% de los que no sobrevivieron eran homocigóticos para el alelo variante (TNFB2/B2) (9). Sin embargo, un estudio realizado en Brasil con 60 pacientes con sepsis y 148 donadores sanos de sangre estableció la relación del alelo TNFB2 con la susceptibilidad a la sepsis, pero no se encontró que este estuviera asociado con los biomarcadores inmunológicos y clínicos de la enfermedad (63).

Polimorfismos en receptores celulares

TLR

Existen estudios que han tratado de cuantificar los efectos en la variación genética en el TLR durante la respuesta inflamatoria a los PAMP y el riesgo a sufrir disfunción de órganos o muerte en pacientes con sepsis. Wurfel *et al.* (64) realizaron un estudio de cohorte en pacientes con sepsis analizando el polimorfismo del TLR-1 en la posición -7202A/G (rs5743551) y encontraron que el alelo G se relacionó con la elevada producción de citocinas. Este SNP se genera en la región codificante del gen y causa una mayor inducción del gen por la activación de NF- κ B. En consecuencia, el TLR1 se expresa en mayor medida en la superficie de la célula (64). Los pacientes con sepsis que presentaron el alelo G tuvieron un mayor riesgo de disfunción multiorgánica y de muerte (OR=1.82; IC95%: 1.7-3.9). En esta misma investigación, se realizó un estudio de casos y controles y se encontró que el alelo G estuvo asociado con el riesgo de sufrir lesión pulmonar aguda relacionada con sepsis (OR=3.40; IC95%: 1.59-7.27). Además, este alelo se encontró en mayor proporción en pacientes con sepsis por bacterias Gram positivas.

El polimorfismo del TLR-2 en la posición -16.933A, que provoca el cambio de arginina por glicina en la posición 753 del receptor (Arg753Gln), se relaciona con bacteremia ocasionada por bacterias Gram positivas con desarrollo de sepsis y choque séptico (65).

El SNP en la posición +896G del gen que codifica para el TLR-4 resulta en una sustitución de glicina por ácido aspártico en la posición 299 de la secuencia de aminoácidos (Asp299Gly) y se asocia con una mayor mortalidad en pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y con el desarrollo de

sepsis en pacientes con traumas o quemaduras (66). El otro SNP resulta en un cambio de treonina a isoleucina en la posición 399 de la secuencia de aminoácidos (Thr399Ile), este SNP desencadena una mayor prevalencia de infecciones por bacterias Gram negativas (67). Las variantes Asp299Gly e Ile399Thr reducen los niveles de IL-1 α y la respuesta a la endotoxina del lipopolisacárido (LPS) en pacientes infectados.

El estudio de Schröder & Schumann (68) identificó una asociación positiva entre el polimorfismo Thr399Ile y los nacimientos prematuros. Sin embargo, como la frecuencia de alélicas de este polimorfismo TLR4 es baja (6-10%), es necesario un mayor número de estudios epidemiológicos para comprobarlo.

CD14

La molécula CD14 es una glicoproteína receptora de 53 KDa que se expresa en la superficie de las células monocíticas. Además de esta forma celular, existe la forma soluble (CD14s), que induce la cascada inflamatoria cuando se une al LPS de las bacterias Gram negativas (6).

El gen que codifica para la molécula CD14 presenta un SNP en la región promotora en -159T/C y se establece como un marcador predictivo de mortalidad y de sepsis grave en pacientes quemados (65). El alelo T se encontró relacionado con un incremento de choque séptico y el genotipo TT fue un factor de riesgo para la mortalidad (OR=5.3) (69).

TREM-1

La proteína TREM hace parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresan en los granulocitos polimorfonucleares y en monocitos maduros. Su expresión se induce por la infección por bacterias y hongos (7-9).

El VNTR rs2234237, detectado en el gen que codifica para la proteína TREM-1, se asocia con mortalidad en pacientes sépticos; los VNTR rs7768162 y rs9471535 del gen TREM-1 se relacionan con sepsis grave y el rs2234237 se asocia con una elevada mortalidad a los 28 días en los pacientes con sepsis (70). Se plantea entonces que el TREM-1 puede ser empleado como un biomarcador ideal de fatalidad para el diagnóstico y pronóstico de sepsis.

Polimorfismos genéticos en efectores moleculares de la inflamación

Lectina de unión a manosa (MBL)

La MBL es una lectina que reconoce los motivos de polisacáridos de varios patógenos y su función principal es participar en la opsonización (6).

Los SNP en posición -221C y -550C en la región promotora del gen que codifica para la MBL están relacionados con bajos niveles de la proteína en pacientes que desarrollaron sepsis y choque séptico (71). También se han identificado polimorfismos en la región codificante del gen que generan tres cambios aminonucleotídicos en las posiciones 52TGT, 54GAC, y 57GAA de la proteína MBL (se denominan variantes D, C y B, respectivamente), lo que ocasiona la inestabilidad en el plegamiento de la proteína y el desarrollo de pielonefritis, bacteremia y choque séptico a causa de la infección por *Escherichia coli* (72).

HSP70

La familia de la proteína Hsp70 actúa como inhibidor de mediadores inflamatorios producidos por la vía de activación del factor nuclear

kappa, beta (NF- κ B). Esta se encuentra codificada por tres genes (HSPA1B, HSPA1A, y HASA1L) ubicados en la región HLA en el cromosoma 6, cercanos a la región codificante por las proteínas TNF- α y del complemento (6).

Se han detectado los polimorfismos en la región codificante del gen HSPA1B en la posición +1267 (alelo A) y en la posición -179 (alelo C). El haplotipo -179C/+1267A se relaciona con la producción significativa de HSPA1B y TNF- α como respuesta a la exposición a bacterias Gram negativas (73). Sapru *et al.* (74) demostraron que los pacientes con el genotipo AA en la posición +1267 presentaron mayor riesgo de desarrollar choque séptico que aquellos quienes presentaron el alelo G, ya fuera homocigoto o heterocigoto.

β -defensina humana 1 (DEFB1)

El DEFB1 es un péptido con actividad microbicida y citotóxica, secretado por los neutrófilos y mediador multifuncional en la infección y la inflamación. Este péptido se ha explorado en gran medida en los estudios *ex vivo* (6).

En el gen DEFB1 se detecta un SNP en la posición -44G que genera sepsis grave y mayor mortalidad por esta enfermedad (75). Fang *et al.* (76) investigaron las variaciones en el gen asociadas con el desarrollo de la sepsis y encontraron seis polimorfismos: el genotipo con los alelos -44G/-44G se asoció significativamente con la incidencia de sepsis grave; el alelo -20G y el genotipo GG se relacionaron con la susceptibilidad a la sepsis grave, mientras el genotipo con los alelos -1816G/-1816G-alelo influyó en el resultado de la sepsis grave; los haplotipos -20A/-44C/-52G mostraron un papel protector contra la sepsis grave, y el haplotipo -20G/-44G/-52G fue un factor de riesgo para el desarrollo fatal de la sepsis grave.

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)

Se trata de una glicoproteína de 50 kilodalton que pertenece a la familia de inhibidores de serina proteasa que promueve la coagulación; el PAI-1 actúa como una proteína de fase aguda durante la inflamación y sus niveles se relacionan con aumento de la gravedad de los pacientes con sepsis (6,7,10).

En el gen que codifica para esta proteína se han encontrado variaciones nucleotídicas en su región promotora; lo que produce el genotipo 4G/4G, que se relaciona con un incremento de los niveles plasmáticos del PAI, desarrollo de sepsis, disfunción orgánica y mortalidad (77). Binder *et al.* (78) demostraron que la predisposición genética para producir altos niveles de PAI-1 (la 4G/4G genotipo) se asocia con un mal pronóstico de la sepsis grave. El alelo 4G de PAI-1 se vincula a concentraciones plasmáticas elevadas de PAI-1 y a una baja supervivencia de los pacientes, mientras que el polimorfismo 4G/5G se vincula con el desarrollo de meningococemia sistémica y coagulación intra-vascular diseminada (78).

Factor inhibitorio de migración del macrófago (MIF)

Este factor es producido por diversas células y juega un papel importante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, así como en desórdenes autoinmunes (6). En pacientes con sepsis, se han detectado niveles séricos altos de MIF y se correlacionan con la severidad de la enfermedad (7,8).

El SNP detectado en la posición -173C del gen que codifica para MIF se relaciona con el desarrollo de sepsis en pacientes con neumonía asociada a la comunidad, al igual que una secuencia repetida detectada en la posición -794 CATT, lo que provoca un aumento en los niveles de la proteína (79).

Caspasa 12

Las caspasas son enzimas claves en la mediación de los eventos proteolíticos en las cascadas de inflamación y muerte celular por apoptosis. En este grupo se encuentra la caspasa 12 (Csp-12), la cual se relaciona filogenéticamente con las caspasas de maduración de citocinas (caspasas 1, 4 y 5), conocidas como *caspasas inflamatorias* (6).

Saleh *et al.* (80) detectaron un SNP en el exón 4 del gen que codifica para la caspasa 12 con un cambio 125T>C, el cual conduce a la alteración de un codón de terminación por una arginina, lo que a su vez origina la síntesis de una proteína truncada (Csp-12S) o una proteína más larga (Csp-12L). Esta forma larga se relaciona con desarrollo de sepsis grave.

Un estudio realizado por Mejía *et al.* (81) en 81 pacientes de Medellín con diagnóstico de sepsis, 23 individuos sanos de una población afroamericana del Chocó y 24 individuos sanos provenientes de Medellín buscó analizar el polimorfismo 125T>C de la Csp-12 y encontró que el alelo L es más frecuente en individuos afroamericanos y, en una menor proporción, en los mestizos, lo que indica que la población afroamericana de Colombia podría tener mayor susceptibilidad a sepsis grave que las poblaciones mestizas.

Polimorfismo genético en el sistema de coagulación del hospedero

Proteína C

Los niveles endógenos y plasmáticos de la proteína C en pacientes con sepsis se asocian en forma inversa con la evolución de la enfermedad y la mortalidad (6).

El gen que codifica para la proteína C se encuentra localizado en el cromosoma 2q13-14 y los polimorfismos se han identificado en la región no traducida 5' en las posiciones -1654CT y -1641AG, ambos afectan la transcripción y se relacionan con severidad de sepsis (82). El haplotipo CA en este SNP se ha asociado con un mayor riesgo de disfunción orgánica y muerte, mientras que el haplotipo CG se relaciona con mayor frecuencia en los pacientes con meningococemia (83).

Selectina E

La selectina E es una proteína de superficie que se expresa en las células endoteliales y que media el rodamiento de los leucocitos (6).

Jilma *et al.* (84) investigaron el efecto del cambio Ser128Arg de la selectina E que se produce en la inflamación y la coagulación en voluntarios humanos que recibieron dosis de LPS. Los marcadores de la coagulación fueron más altos en individuos con el polimorfismo en comparación con los controles con el genotipo normal. El cambio se relacionó con un incremento en la inflamación y la coagulación de los pacientes infectados con bacterias Gram negativas.

En la Tabla 2, se resumen los principales SNP determinados como marcadores.

Susceptibilidad genética a sepsis en las poblaciones

Debido a los SNP y los VNTR, el polimorfismo genético ocasiona una heterogeneidad alélica y de locus entre las poblaciones. La acción combinada de estos biomarcadores determina el grado de respuesta a la sepsis, el cual varía en cada persona. El fenotipo final encontrado en el paciente puede ser el reflejo de los SNP que se han heredado juntos durante miles de años de evolución (haplotipos) y que han evolucionado interaccionando entre sí.

Tabla 2. Polimorfismos genéticos y fenotípicos clínicos relacionados con sepsis.

Gen	Región del SNP	Alelos	Enfermedad asociada	Referencia
Citocinas				
IL-1β	Promotor	-31C/T	Sepsis grave en quemados	Chen <i>et al.</i> (44)
	Promotor	-511C/T	Sepsis grave	Zhang <i>et al.</i> (45)
	Exón 5	3953 C/T	Sepsis	Zhang <i>et al.</i> (45)
IL-1α	Intrón 2	VNTR 86 pb	Sepsis grave	Fang <i>et al.</i> (47)
	Exón 2	2018	Sepsis	Zhang <i>et al.</i> (45)
IL-6	Promotor	174G/C	Sepsis neonatal	Chauhan <i>et al.</i> (49)
IL-10	Promotor	1082G/A	Sepsis neonatal	Kang <i>et al.</i> (54)
		819C/T	Sepsis neonatal	Qiang <i>et al.</i> (57)
		-592C/A	Sepsis neonatal	
	Promotor	-592 C/C	Sepsis	Qiang <i>et al.</i> (57)
TNF-α	Promotor	-308G/A	Choque séptico	O'keefe <i>et al.</i> (58)
			TNF1 alelo con G y TNF2 alelo con A	Teuffel <i>et al.</i> (59)
	Promotor	-238G/A		Schueller <i>et al.</i> (60)
TNF-α	Promotor	250 G/A	Choque séptico en adultos y bacteriemia en niños	Odwyer <i>et al.</i> (62)
TNF-β	Intrón1	252G/A	Sepsis grave	Delongui <i>et al.</i> (63)
			TNFB1 variante alélica con G	Delongui <i>et al.</i> (63)
			TNFB2 variante alélica A	Delongui <i>et al.</i> (63)
Receptores				
TLR-1	Promotor	-720 A/G	Sepsis, síndrome de disfunción multiorgánica	Wurfel <i>et al.</i> (64)
TLR-2	Exón	2258G/T	Choque séptico por Gram-positivas	Shutterland <i>et al.</i> (65)
TLR-4	Exón	896G	Sepsis en pacientes con traumas o quemaduras	Wang <i>et al.</i> (66)
CD14	Promotor	-1595C/T	Sepsis en población China	Wang <i>et al.</i> (66)
	Promotor	-260C/T	Sepsis neonatal	Baier <i>et al.</i> (56)
	Promotor	-159C/T	Choque séptico	Zhang <i>et al.</i> (69)
Otras proteínas				
Hsp70-2	Región codificante	1267 G/A	Sepsis	Ramakrishna <i>et al.</i> (73)
Proteína C	Promotor	-1654CT, -1641AG	Síndrome de disfunción multiorgánica	Chen <i>et al.</i> (82)
TREM-1		Rs2234237 A/T	Sepsis grave	Jung <i>et al.</i> (70)
Caspasa 12	Exón4	125 T/C	Sepsis grave	Saleh <i>et al.</i> (80)
DEFB1	Promotor	-44G C/T	Sepsis grave	Cheng <i>et al.</i> (75)

Gen	Región del SNP	Alelos	Enfermedad asociada	Referencia
MBL	Promotor	-550C, -221G	Pielonefritis, bacteriemia y choque séptico por E. coli	Gordon <i>et al.</i> (71); Smithson <i>et al.</i> (72)
PAI-1	Promotor	4G/4G	Síndrome de disfunción multiorgánica	Biender <i>et al.</i> (78)
MIF	Promotor	-173 C/T	Sepsis asociada a neumonía	Tende <i>et al.</i> (79)
Selectina E		561 A/C	Inflamación y bacteriemia	Jilma <i>et al.</i> (84)

Fuente: Elaboración propia.

Los SNP o VNTR han estado asociados a diversas poblaciones como la asiática y europea, así como algunos países de África y diversos lugares de América. Ciertos SNP relacionados con sepsis se pueden acentuar en algunas poblaciones que presentan una mayor gravedad y mortalidad cuando la enfermedad se ha manifestado. Por ejemplo, los SNP -1641 A/T y 1654C/G en el gen IL-6 se relacionan con un incremento en los niveles de IL-6, desarrollo de sepsis y disfunción orgánica en la población china (85,86). Una variante detectada en la posición -572 con un cambio de C por G en la región promotora de este gen reduce su actividad transcripcional y se asocia con un bajo riesgo de desarrollar sepsis, específicamente en el grupo étnico han de China (87).

Chen *et al.* (75) y Chen *et al.* (88) encontraron SNP en los genes Trem-1 y Defb1 en este grupo han con predisposición a desarrollar sepsis grave. También se estudiaron los polimorfismos en las regiones codificantes de los genes Itr4, cd14, TNF e IL-10 en la población japonesa (89) y un VNTR (rs2069912) en el gen que codifica para la proteína C reactiva en poblaciones de indígenas de Norteamérica y de Asia Oriental con un desarrollo fatal en sepsis grave (90).

En poblaciones africanas y americanas se ha encontrado la variación del gen de la IL-6 en la posición -174 G/C y en la posición -260 C/T de la molécula CD14 como marcadores predictivos de mortalidad en sepsis inducida por ventilación mecánica prolongada (87). En las poblaciones caucásicas se ha identificado el alelo -376G/A del gen TNF- α que se relaciona con una mayor producción de la citocina (91).

En el caso del SNP 125T/C, en el gen que codifica para la caspasa 12 (proteína implicada en la muerte celular programada), la frecuencia del alelo L es mucho mayor en poblaciones afroamericanas, donde este alelo se ha detectado abriendo la posibilidad que esta población pudiese tener mayor susceptibilidad a desarrollar sepsis grave (81). Todas estas asociaciones permiten un análisis más profundo a la hora de relacionar el genotipo de un paciente con la susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, es necesario evaluar todos estos marcadores con el fin de obtener un patrón de susceptibilidad que permita definir los marcadores con un alto porcentaje en el desarrollo de la sepsis.

Conclusión

La sepsis es un problema de salud pública que debe ser intervenido con estrategias oportunas para disminuir el porcentaje de mortalidad. La búsqueda de nuevos biomarcadores para evaluar la severidad de la enfermedad y predecir el pronóstico de los pacientes es un desafío importante que proporciona una nueva idea para enfrentar la sepsis.

El empleo de los biomarcadores moleculares tiene su fundamento en el hecho que cada paciente tiene su propio acervo genético con distinto grado de respuesta a las enfermedades, por lo que constituye un papel importante en la determinación de la susceptibilidad para el resultado de enfermedades tan complejas como la sepsis.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Financiación

Ninguna declarada por los autores.

Agradecimientos

A la Dirección Seccional de Investigaciones de la Universidad Libre por el apoyo logístico.

Referencias

1. Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care.* 2013;17(2):R65. <http://doi.org/bwk2>.
2. Bateman BT, Schmidt U, Berman MF, Bittner EA. Temporal trends in the epidemiology of severe postoperative sepsis after elective surgery: a large, nationwide sample. *Anesthesiology.* 2010;122(4):917-25. <http://doi.org/cts2vv>.
3. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-53. <http://doi.org/c4ppj2>.
4. Ortiz G, Dueñas C, Rodríguez F, Barrera L, de La Rosa, Dennis R, *et al.* Epidemiology of sepsis in Colombian intensive care units. *Biomedica.* 2014;34(1):40-7. <http://doi.org/bwk3>.
5. Iwashyna TJ, Odden A, Rohde J, Bonham C, Kuhn L, Malani P, *et al.* Identifying patients with severe sepsis using administrative claims: patient-level validation of the angus implementation of the international consensus conference definition of severe sepsis. *Med Care.* 2014;52(6):e39-43. <http://doi.org/bwk4>.
6. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol.* 2008;214(2): 211-23. <http://doi.org/fqnh7b>.
7. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(1):23-36. <http://doi.org/bwk5>.
8. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15. <http://doi.org/b2xxjh>.
9. Tsallik EL, Jaggars LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, *et al.* Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *J Emerg Med.* 2012;43(1):97-106. <http://doi.org/bj4v3n>.
10. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2):R49. <http://doi.org/c5vg76>.
11. Chávez M, Vallejo S. Susceptibilidad genética para el desarrollo de la sepsis bacteriana grave y choque séptico. *Rev. Cienc. Salud.* 2013 [cited 2016 Dec 31];11(1):93-103. Available from: <https://goo.gl/U2yoqK>.
12. Tumangger H, Jamil KF. Contribution of genes polymorphism to susceptibility and outcome of sepsis. *Egypt J Med Hum Gen.* 2010;11(2):97-103. <http://doi.org/d5xqg9>.
13. Gaydou L, Bertuzzi R, Moretti E. Sepsis as a stressor: association with serum levels of cortisol, C reactive protein and interleukin 1 β . *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2009 [cited 2016 Dec 31];43(3):299-305. Available from: <https://goo.gl/t1GL92>.
14. Kurt AN, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. *Mediators Inflamm.* 2007 [cited 2016 Dec 31];2007:31397. Available from: <https://goo.gl/XQ4mnK>.

15. Naffaa M, Makhoul BF, Tobia A, Kaplan M, Aronson D, Azzam ZS, *et al.* Procalcitonin and interleukin 6 for predicting blood culture positivity in sepsis. *Am J Emerg Med.* 2014;32(5):448-51. <http://doi.org/bwk6>.
16. Socha LA, Gowardman J, Silva D, Correcha M, Petrosky N. Elevation in interleukin 13 levels in patients diagnosed with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 2006;32(2):244-50. <http://doi.org/c6wv5x>.
17. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34(4):1225-33. <http://doi.org/btbkjh>.
18. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):331-42. <http://doi.org/b4tqcz>.
19. Karlsson S, Pettilä V, Tenhunen J, Laru-Sompa R, Hynninen M, Ruokonen E. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34(6):1046-53. <http://doi.org/cqsxkx>.
20. Du J, Li L, Dou Y, Li P, Chen R, Liu H. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates. *PLoS One.* 2014;9(7):e102647. <http://doi.org/bwk7>.
21. Aalto H, Takala A, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H. Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. *Scand J Infect Dis.* 2007;39(6-7):596-603. <http://doi.org/cf3crs>.
22. Ebdrup L, Krog J, Granfeldt A, Tønnesen E, Hokland M. Dynamic expression of the signal regulatory protein alpha and CD18 on porcine PBMC during acute endotoxaemia. *Scand J Immunol.* 2008;68(4):430-7. <http://doi.org/drv5k9>.
23. Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, Ejima Y, Hoshi K, Shibusawa M, *et al.* Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J Exp Med.* 2008;216(1):61-8. <http://doi.org/dqmp3n>.
24. Nolan A, Weiden M, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, Mehta N, *et al.* CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(3):301-8. <http://doi.org/bpfqxp>.
25. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14. <http://doi.org/c44tzh>.
26. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock.* 2008;29(3):315-21. <http://doi.org/bq3bh3>.
27. Arts RJ, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *J Leukoc Biol.* 2013;93(2):209-15. <http://doi.org/bwmd>.
28. Cehn YX, Li CS. The predictive value of adrenomedullin for development of severe sepsis and septic shock in emergency department. *BioMed Res Int.* 2013;2013:960101. <http://doi.org/bwfmf>.
29. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care.* 2005;9(6):R816-24. <http://doi.org/c7v27t>.
30. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):78. <http://doi.org/bwmg>.
31. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, *et al.* MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One.* 2009;4(10):e7405. <http://doi.org/dh95mf>.
32. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, *et al.* A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061-73. <http://doi.org/fmk7rw>.
33. Lee PH. Prioritizing SNPs for disease-gene association studies: algorithms and systems. [Doctoral Thesis]. Kingston, Ontario: Queen's University, Canada; 2009 [cited 2017 Jan 01]. Available from: <https://goo.gl/tHRTcD>.
34. Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(8):565-75. <http://doi.org/bwmw>.
35. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(3):175-88. <http://doi.org/bwmx>.
36. Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Ann Rev Genet.* 2006;40:469-86. <http://doi.org/bmsf2b>.
37. Murray MF. Susceptibility to infectious diseases: the importance of host genetics. *Clin Infect Dis.* 2005;40(2):338-9. <http://doi.org/b6bm4f>.
38. Chopra R, Kalaivasan P, Ali S, Srivastava AK, Aggarwal S, Garg VK, *et al.* PARK2 and proinflammatory/anti-inflammatory cytokine gene interactions contribute to the susceptibility to leprosy: a case-control study of North Indian population. *BMJ Open.* 2014;4(2):e004239. <http://doi.org/bwmz>.
39. Naderi M, Hashemi M, Hazire-Yazdi L, Taheri M, Moazeni-Roodi A, Eskandari-Nasab E, *et al.* Association between toll-like receptor2 Arg677Trp and 597T/C gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(5):516-20. <http://doi.org/f2fp4x>.
40. Min-Oo G, Fortin A, Pitari G, Tam M, Stevenson MM, Gros P. Complex genetic control of susceptibility to malaria: positional cloning of the Char9 locus. *J Exp Med.* 2007;204(3):511-24. <http://doi.org/fr38rs>.
41. Cornell TT, Wynn J, Shanley TP, Wheeler DS, Wong HR. Mechanisms and regulation of the gene expression response to sepsis. *Pediatrics.* 2010;125(6):1248-58. <http://doi.org/bc7ztf>.
42. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care.* 2009;13(2):210. <http://doi.org/cb5524>.
43. Stuber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. *Clin Infect Dis.* 2005;41(Suppl 7):S416-20. <http://doi.org/dqr3gs>.
44. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet.* 2006;15(4):519-29. <http://doi.org/cnw5hm>.
45. Zhang A, Pan W, Gao J, Yue C, Zeng L, Gu W, *et al.* Associations between interleukin-1 gene polymorphisms and sepsis risk: a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2014;15:8-22. <http://doi.org/bwm2>.
46. Arman A, Soyul O, Yildirim A, Furman A, Ercelen N, Aydogan H, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist gene VNTR polymorphism is associated with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(5):293-8. <http://doi.org/bjh467>.
47. Fang F, Pan J, Li Y, Xu L, Su G, Li G, *et al.* Association between interleukin-1 receptor antagonist gene 86-bp VNTR polymorphism and sepsis: a meta-analysis. *Hum Immunol.* 2015;76(1):1-5. doi: <http://doi.org/bwm3>.
48. Chauhan M, McGuire W. Interleukin-6 (-174C) polymorphism and the risk of sepsis in very low birth weight infants: meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(6):F427-9. <http://doi.org/bgw7k8>.
49. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, *et al.* Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(1):32-7. <http://doi.org/dgphf7>.
50. Martín-Loeches I, Violan JS, Blanquer J, Aspa J, Rodríguez-Gallego C, Rodríguez-de Castro F, *et al.* Effect of the IL-6 promoter polymorphism -174 G/C on risk and outcome of pneumonia. *Crit Care.* 2008;12(Suppl 2):P465. <http://doi.org/fk94tw>.
51. Ahrens P, Kattner E, Köhler B, Härtel C, Seidenberg J, Segerer H, *et al.* Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2004;55(4):652-6. <http://doi.org/bjmhk2>.

52. Cardoso CP, de Oliveira AJ, Botoni FA, Porto IC, Alves-Filho JC, de Queiroz-Cunha F, *et al*. Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):453-60. <http://doi.org/bwm4>.
53. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:165974. <http://doi.org/bwm5>.
54. Kang X, Kim HJ, Ramirez M, Salameh S, Ma X. The septic shock-associated IL-10 -1082 A>G polymorphism mediates allele-specific transcription via poly (ADP-ribose) polymerase 1 in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3718-24. <http://doi.org/dwfx6f>.
55. Stanilova SA, Miteva LD, Karakolev ZT, Stefanov CS. Interleukin-10 -1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med*. 2006;32(2):260-6. <http://doi.org/fw2xm7>.
56. Baier RJ, Loggins J, Yanamandra K. IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Med*. 2006;4:10. <http://doi.org/bs9x6d>.
57. Shu Q, Fang X, Chen Q, Stuber F. IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis. *Chin Med J*. 2003 [cited 2017 Jan 01];116(11):1756-9. Available from: <https://goo.gl/egAcHM>.
58. O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS. The G/A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor- α promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. *J Trauma*. 2002;52(5):817-26. <http://doi.org/frwppz>.
59. Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor- α promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2010;38(1):276-82. <http://doi.org/c5zb57>.
60. Schueller AC, Heep A, Kattner E, Kroll M, Wisbauer M, Sander J, *et al*. Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis. *Biol Neonate*. 2006;90(4):229-32. <http://doi.org/dq3q6z>.
61. Ávila-Paskulin DD, Fallavena PR, Paludo FJ, Borges TJ, Picanço JB, Dias FS, *et al*. TNF -308G>A promoter polymorphism (rs1800629) and outcome from critical illness. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(3):231-8. <http://doi.org/f2j8nw>.
62. Odwyer M, White M, McManus R, Ryan T. TNF α promoter single nucleotide polymorphisms may influence gene expression in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2007;11(Suppl 2):P448. <http://doi.org/bjk69d>.
63. Delongui F, Carvalho CM, Ehara MA, Kaminami M, Bonametti AM, Maeda JM, *et al*. Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med*. 2011;2(2):349-56. <http://doi.org/ccxj6r>.
64. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, Radella F, Strout J, Kajikawa O, *et al*. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(7):710-20. <http://doi.org/b5bnwz>.
65. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med*. 2005;33(3):638-44. <http://doi.org/dcnksm>.
66. Wang H, Wei Y, Zeng Y, Qin Y, Xiong B, Qin G, *et al*. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *BMC Med Genet*. 2014;15:123. <http://doi.org/bwm6>.
67. Van der Graaf CA, Netea MG, Morré SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, *et al*. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/ Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw*. 2006 [cited 2017 Jan 02];17(1):29-34. Available from: <https://goo.gl/2iV3Tn>.
68. Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(3):156-64. <http://doi.org/ffwvmv>.
69. Zhang A, Yue C, Gu W, Du J, Wang H, Jiang J. Association between CD14 Promoter -159C/T Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(8):e71237. <http://doi.org/bwm7>.
70. Jung ES, Kim SW, Moon CM, Shin DJ, Son NH, Kim ES, *et al*. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Life Sci*. 2011;89(9-10):289-94. <http://doi.org/d4r72t>.
71. Gordon AC, Waheed U, Hansen TK, Hitman GA, Garrard CS, Turner MW, *et al*. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome. *Shock*. 2006;25(1):88-93. <http://doi.org/bn52zj>.
72. Smithson A, Muñoz A, Suárez B, Soto SM, Perello R, Soriano A, *et al*. Association between mannose-binding lectin deficiency and septic shock following acute pyelonephritis due to *Escherichia coli*. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(3):256-61. <http://doi.org/c8dd9q>.
73. Ramakrishna K, Pugazhendhi S, Kabeerdoss J, Peter JV. Association between heat shock protein 70 gene polymorphisms and clinical outcomes in intensive care unit patients with sepsis. *Indian J Crit Care Med*. 2014;18(4):205-11. <http://doi.org/bwnr>.
74. Sapru A, Quasney MW. Host Genetics and Pediatric Sepsis. *Open Infl J*. 2011 [cited 2017 Jan 02];4(Suppl 1-M10):82-100. Available from: <https://goo.gl/aOC6VY>.
75. Chen QX, Lv C, Huang LX, Cheng BL, Xie GH, Wu SJ, *et al*. Genomic variations within DEFBI are associated with the susceptibility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Genes Immun*. 2007;8(5):439-43. <http://doi.org/dvj4pb>.
76. Fang X, Lv C, Chen Q, Huang L. Contribution of genomic variations within human β -defensin 1 to incidence and outcome of severe sepsis. *Crit Care*. 2007;11(Suppl 2):P447. <http://doi.org/dckc5j>.
77. García-Segarra G, Espinosa G, Tassies D, Oriola J, Aibar J, Bové A, *et al*. Increased mortality in septic shock with the 4G/4G genotype of plasminogen activator inhibitor 1 in patients of white descent. *Intensive Care Med*. 2007;33(8):1354-62. <http://doi.org/bncrns>.
78. Binder A, Endler G, Müller M, Mannhalter C, Zenz W, European Meningococcal Study Group. 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism associates with disseminated intravascular coagulation in children with systemic meningococemia. *J Thromb Haemost*. 2007;5(10):2049-54. <http://doi.org/b457jf>.
79. Yende S, Angus DC, Kong L, Kellum JA, Weissfeld L, Ferrell R, *et al*. The influence of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms on outcome from community-acquired pneumonia. *FASEB J*. 2009;23(8):2403-11. <http://doi.org/cj8dt2>.
80. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, *et al*. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*. 2004;429(6987):75-9. <http://doi.org/frbn5z>.
81. Mejía SP, Grajales PJ, Jaimes FA, Bedoya G, López J, Arango JC, *et al*. Presencia de un polimorfismo de la CSP-12 relacionado con susceptibilidad a sepsis grave en una muestra de tres poblaciones colombianas. *Iatreia*. 2010 [cited 2017 Jan 02];23(2):127-34. Available from: <https://goo.gl/S11MJn>.
82. Chen QX, Wu SJ, Wang HH, Lv C, Cheng BL, Xie GH, *et al*. Protein C -1641A/-1654C haplotype is associated with organ dysfunction and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Hum Genet*. 2008;123(3):281-7. <http://doi.org/bjm9h4>.
83. Marsik C, Sunder-Plassmann R, Jilma B, Kovar FM, Mannhalter C, Wagner O, *et al*. The C-reactive protein (+)1444C/T alteration modulates

- the inflammation and coagulation response in human endotoxemia. *Clin Chem*. 2006;52(10):1952-7. <http://doi.org/c64cgg>.
84. **Jilma B, Marsik C, Kovar F, Wagner OF, Jilma-Stohlawetz P, Endler G.** The single nucleotide polymorphism Ser128Argn in the E-selectin gene is associated with enhanced coagulation during human endotoxemia. *Blood*. 2005;105(6):2380-3. <http://doi.org/b764z8>.
 85. **Gao J, Zhang A, Pan W, Yue C, Zeng L, Gu W, et al.** Association between IL-6 -174G/C Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118843. <http://doi.org/bwns>.
 86. **Tischendorf JJ, Yagmur E, Scholten D, Vidacek D, Koch A, Winograd R, et al.** The interleukin-6 (IL6)- 174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the ex vivo secretion of IL6. *Int J Immunogenet*. 2007;34(6):413-8. <http://doi.org/fpkk6s>.
 87. **Gu W, Du DY, Huang J, Zhang LY, Liu Q, Zhu PF, et al.** Identification of interleukin-6 promoter polymorphisms in the Chinese Han population and their functional significance. *Crit Care Med*. 2008;36(5):1437-43. <http://doi.org/bfs46j>.
 88. **Chen Q, Zhou H, Wu S, Wang H, Lv C, Cheng B, et al.** Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum Immunol*. 2008;69(3):220-6. <http://doi.org/bmnxg3>.
 89. **Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, et al.** Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res*. 2005;129(2):322-8. <http://doi.org/cqp73t>.
 90. **Russell JA, Wellman H, Walley KR.** Protein C rs2069912 C allele is associated with increased mortality from severe sepsis in North Americans of East Asian ancestry. *Hum Genet*. 2008;123(6):661-3. <http://doi.org/ftc95d>.
 91. **Garnacho-Montero J, Garnacho-Montero MC, Ortiz-Leyba C, Aldabó T.** Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med Intensiva*. 2005;29(3):185-91. <http://doi.org/dn24w2>.