

Análisis de las variantes genéticas IL-6 - 174G/C y FNT- α -308 G/A en pacientes con diagnóstico de sepsis bacteriana (Variantes IL-6 - 174G/C y FNT- α -308 G/A en sepsis bacteriana)

JHONN ALEXANDER CHICANGANA ANTE¹, ALFONSINA DEL CRISTO MARTÍNEZ², MÓNICA CHÁVEZ VIVAS³

Recibido para publicación: 09-10-2023. Versión corregida: 28-12-2023. Aprobado para publicación: 28-12-2023

Modelo de citación:

Chicangana-Ante J.A., del Cristo-Martínez A., Chávez-Vivas C.V. **Análisis de las variantes genéticas IL-6 – 174G/C y FNT- α -308 G/A en pacientes con diagnóstico de sepsis bacteriana.** Arch Med (Manizales). 2023. 23(2). <https://doi.org/10.30554/archmed.23.2.4971.2023>

Resumen

Introducción: la sepsis carece de manifestaciones clínicas específicas, por lo que requiere el empleo de marcadores moleculares de alta sensibilidad y especificidad que reflejen con precisión la evolución de la enfermedad. **Objetivos:** el objetivo de este estudio fue evaluar las variantes IL-6 -174G/C y FNT- α -308G/A en pacientes con diagnóstico de sepsis bacteriana en una unidad de cuidados intensivos. **Métodos:** se realizó un estudio observacional prospectivo que incluyó 100 pacientes con sepsis y 30 sujetos de control. Se recogieron muestras de sangre para medir las concentraciones de citoquinas IL-6 y TNF- α y detectar las variantes genéticas IL-6-174G/C y FNT- α -308A/G. Se realizó un análisis multivariado con los niveles de citocinas, la evolución de la sepsis, comorbilidades y la mortalidad como variables dependientes y las variantes genéticas analizadas como variables independientes. Se realizó análisis de supervivencia según el modelo de Kaplan-Meier. **Resultados:** el análisis multivariado mostró que el alelo G de IL-6-174 G/C fue un factor de riesgo para desarrollar sepsis debido a la infección por bacterias Gram negativas (62,3%; OR:2,619; IC95%1,095-6,259; p=0,030) y el genotipo GA de FNT- α -308G/A se asoció significativamente con el desarrollo de choque séptico (50%; OR:4,053; IC95%1,546- 10,623; p=0,004), HTA (53%; OR:3,359; IC 95% 1,253-9,008; p=0,016) e infección por bacterias Gram positivas (17,6%; OR:9,525; IC95%1,854-48,928; p=0,007). **Conclusión:** se encontró que

1 Facultad de Ciencia de la Salud. Programa Maestría en Epidemiología. Universidad Libre, Seccional Cali, Colombia. ORCID: 0009-0008-9932-9952

2 Facultad de Ciencia de la Salud. Programa de Enfermería. Grupo GIMMEIN, Universidad Libre, Seccional Cali, Colombia. ORCID: 0000-0002-8205-5747

3 Facultad de Salud. Programa de Medicina. Grupo de Investigación Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Libre, Seccional Cali, Colombia. ORCID: 0000-0001-9996-3744

Correspondencia: Mónica Chávez Vivas. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Seccional Cali. Campus Valle del Lili. Carrera 109 N.º 22-00; Valle del Lili A. A. 1040. Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. Correo electrónico: monikchavez@gmail.com - monica.chavezv@unilibre.edu.co

el genotipo GA de FNT- α -308G/A fue un factor de riesgo para el desarrollo de choque séptico.

Palabras clave: *sepsis; choque séptico; factor de necrosis tumoral alfa; interleucina-6; polimorfismo genético.*

Analysis of the genetic variants IL-6 - 174G/C and TNF- α -308 G/A in patients diagnosed with bacterial sepsis

Abstract

Introduction: *Sepsis lacks specific clinical manifestations, which is why it requires the use of highly sensitive and specific molecular markers that accurately reflect the evolution of the disease. Objectives:* *The objective of this study was to evaluate the IL-6 -174G/C and TNF- α -308G/A variants in patients diagnosed with bacterial sepsis in an Intensive Care Unit. Materials and methods:* *A prospective observational study was conducted that included one hundred patients with sepsis and thirty control subjects. Blood samples were collected to measure the concentrations of cytokines IL-6 and TNF- α and to detect the genetic variants IL-6-174G/C and TNF- α -308A/G. A multivariate analysis was performed with cytokine levels, sepsis progression, comorbidities and mortality as dependent variables and genetic variants analyzed as independent variables. Survival analysis was performed according to the Kaplan and Meyer model. Results:* *Multivariate analysis showed that the G allele of IL-6-174 G/C was a risk factor for developing sepsis due to infection by Gram-negative bacteria (62.3%; OR:2.619; IC95%1.095-6.259; p=0.030) and the GA genotype of TNF- α -308G/A was significantly associated with the development of septic shock (50%; OR:4.053; IC95%1.546- 10.623; p=0.004), arterial hypertension (53%; OR:3.359; IC 95% 1.253-9.008; p=0.016) and infection by Gram-positive bacteria (17,6%; OR:9.525; IC95%1.854-48,928; p=0.007). Conclusion:* *The GA genotype of TNF- α -308G/A was found to be a risk factor for the development of septic shock.*

Keywords: *Sepsis; septic shock; tumor necrosis factor alpha; interleukin-6; genetic polymorphism.*

Introducción

La sepsis es la causa más importante de morbilidad en pacientes con enfermedades infecciosas, especialmente en pacientes gravemente enfermos en la unidad de cuidados intensivos (UCI), que requieren un diagnóstico y tratamiento rápido [1,2]. Esta patología carece de manifestaciones clínicas específicas, lo que hace necesario disponer de indicadores de infección sensibles y específicos, que se

pueden recopilar fácilmente y que reflejan con precisión la gravedad de la infección y el pronóstico [2,3].

Un papel clave en la patogenia de la sepsis es el equilibrio de las citocinas pro y antiinflamatorias [4,5]. Algunos hallazgos sugieren que existe un alto nivel de correlación entre las variaciones genéticas de algunas citocinas con la variación en los niveles plasmáticos de estas citocinas, la susceptibilidad a la sepsis y riesgo

de muerte por sepsis en diferentes poblaciones del mundo [6-10].

Entre estas variantes genéticas se ha descrito el polimorfismo -174G/C (rs1800795) en la región reguladora del gen de la interleucina-6 (IL-6), que contiene un sitio de unión al ADN de un factor de transcripción que interactúa con los complejos del receptor de estradiol para regular la expresión del gen IL-6. Se ha establecido asociación significativa entre este polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con los niveles de IL6 y la severidad de la sepsis, por lo que puede contribuir al riesgo de sepsis, especialmente en africanos y asiáticos [6]. Por otro lado, se describe que el genotipo homocigoto CC podría ser favorable en pacientes sépticos que muestran niveles más bajos de IL-6 en suero y un menor riesgo de muerte dentro de los 30 días [7].

También, en la región promotora del gen del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), se ha descrito la variante -308G/A (rs1800629) que estaría afectando la producción de la citocina, en la que el genotipo salvaje es GG, TNF1 (alelo G), y los portadores con el alelo mutante TNF2 (alelo A) corresponde al genotipo heterocigoto GA y el homocigoto AA, en este caso el alelo TNF2 se asocia con el desarrollo de sepsis [9, 10].

Debido a que estas variantes tienden a ser relativamente estables genéticamente, pueden ser utilizadas como excelentes marcadores biológicos en sepsis y, por lo tanto, deben ser evaluadas en las diferentes poblaciones. El objetivo de este estudio es, en efecto, evaluar las variantes genéticas -174G/C de la IL-6 y -308G/A del FNT- α como posibles marcadores de sepsis en pacientes con diagnóstico de sepsis bacteriana en la UCI de una institución de salud de la ciudad de Cali.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional prospectivo entre febrero y diciembre del 2019 con 100 muestras de pacientes con diagnóstico de

sepsis de acuerdo con los parámetros determinados en el tercer consenso de sepsis [11]. Se incluyó un grupo control de 30 pacientes sanos con el fin de establecer el nivel promedio normal de las citocinas.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con historias clínicas incompletas, que estén recibiendo previamente terapia antimicrobiana, que tengan como antecedentes enfermedades autoinmunes (lupus, espondiloartropatía, psoriasis), o pacientes que estén recibiendo previamente medicamentos inmunomoduladores (anti-TNF, metrotexate, sulfasalazina) o con shock refractario posinicio a reanimación con esteroides.

La disfunción de los sistemas orgánicos se definió con los siguientes criterios: disfunción renal: creatinina sérica $\geq 2,0$ mg/dl o producción de orina <0.5 ml/kg por hora a pesar de la reanimación adecuada con líquidos; disfunción hepática: bilirrubina sérica $> 2,0$ gr/dl o un aumento triple en las aminotransferasas séricas; coagulación intravascular diseminada (CID): cociente normalizado internacional (INR) >1.2 , dímero d elevado, plaquetas $<100\ 000/mm^3$; insuficiencia respiratoria: una relación PAO₂/FiO₂ <200 ; hipotensión: presión arterial sistólica 90 mmHg o la presión arterial media 70 mmHg a pesar de la reanimación adecuada de líquidos y vasopresores; disfunción del sistema nervioso central (SNC): alteración aguda del estado mental.

Variables sociodemográficas y clínicas

Las variables sociodemográficas fueron edad y sexo. Las variables clínicas incluyeron: agente etiológico informado, fecha de ingreso a la UCI, fecha de alta, comorbilidades (hipertensión arterial -HTA-, enfermedad pulmonar obstructiva crónica -EPOC-, diabetes mellitus tipo 2 -DM2-, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad del hígado, enfermedad neurológica y enfermedad renal crónica), parámetros físico-químicos (presión arterial, temperatura,

frecuencia cardíaca, etc.), recuento celular (hematocrito, recuento de leucocitos), y todos los parámetros incluidos en la escala qSOFA se analizaron con distribución de frecuencias y porcentajes.

Cuantificación de los niveles de citocinas en plasma

Entre los pacientes que se encontraban en la UCI con diagnóstico de sepsis bacteriana y que firmaron el consentimiento informado, se les tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo vacutainer (BD, Franklin Lakes, USA) con EDTA como anticoagulante y se centrifugó a 3000 g x 10 minutos, luego se almacenó a -20°C , que es la conservación más correcta para los estudios genéticos.

La determinación de los niveles plasmáticos de citocinas (IL-6 y TNF- α) se realizó en el momento de la admisión y a las 48 horas del ingreso en la UCI. También se obtuvo muestras de sangre de 30 personas sanas para establecer el límite de detección de cada citocina y el nivel promedio normal.

La sangre se recogió mediante venopunción en recipientes al vacío estériles de 15 ml que contenían EDTA (10 mmol/L) como anticoagulante. Los tubos se centrifugaron inmediatamente durante diez minutos a 3000 rpm y el plasma se almacenó en alícuotas a -70°C .

El análisis de las citocinas se realizó mediante un inmunoensayo enzimático con kit ELISA humano (Elabscience Biotechnology Inc. EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de detección fue de 7,81-500 pg/mL, con coeficientes de variación intra e interensayo por debajo del 5%. Las lecturas se realizaron en un lector óptico automatizado Spectramax a 450 nm. La sensibilidad del ensayo fue <2 pg/mL. Los niveles plasmáticos de estas citoquinas estuvieron por debajo del límite de detección en sujetos sanos. Los resultados se relacionaron con una curva dosis-respuesta obtenida con cada citocina humana recombinante, y la concentración se expresó en picogramos por mililitro (pg/mL).

Genotipificación de las variantes IL-6 174G/C y FNT- α -308A/G

A partir de 1,5 mL de suero/plasma se realizó la extracción del ADN con el DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No.69506 QIAGEN) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Una vez purificado el ADN se cuantificó su concentración espectrofotométricamente en Nanodrop 2000.

La genotipificación de las variantes IL-6-174G/C y FNT- α -308A/G se llevó a cabo mediante el empleo del ensayo de amplificación del cebador específico de secuencia por PCR (PCR-SSP). La variante IL-6 (-174G/C) se amplificó con los cebadores: IL-6-primer forward 174C 5'-CTG-CAG-TTT-TCC-CCC-TAG-TTG-TGT-CTT-GCC-3', primer forward 174G 5'-TCC-CCC-TAG-TTG-TGT-CTT-GCG-3', primer genérico reverse IL-6r 5'-TGA-GGG-TGG-GGC-CAG-AGC-3'. La variante FNT- α -308A/G se amplificó con los cebadores: primer forward 308A 5'-CTA-TCT-TTT-TCC-TGC-ATC-CTG-TCT-GGA-AA-3', primer forward 308G 5'-TTC-CTG-CAT-CCT-GTC-TGG-AAG-3' y el primer genérico reverse 308r 5'-GCC-ACT-GAC-TGA-TTT-GTG-TGT-AGG-3'. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 95°C durante cinco min seguido de 30 ciclos a 95°C durante 90 s, 56°C por 30 s para la variante IL-6 174G/C y 60°C por 90 s para la variante FNT- α (-308A/G), seguido por 72°C por 1 min, y finalmente por 10 min de extensión a 72°C . La amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador Bio-Rad. Los amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2%, visualizado con Syber Green, la presencia o ausencia de fragmentos se visualizó mediante un transiluminador UV.

Análisis estadístico

Las frecuencias de los genotipos, alelos y fenotipos se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado. Para las variables con distribución normal se utilizaron la media y la desviación estándar (DE); para las variables con

distribución no normal se utilizaron la mediana y los percentiles 25-75. Se realizaron análisis de regresión logística multivariado para los polimorfismos IL-6-174 G/C y FNT- α -308A/G y la evolución de la sepsis (controlando las comorbilidades, tipo de bacteria aislada, los niveles plasmáticos de la IL-6 y el FNT- α y sobrevida), para Odds Ratios (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%.

Se realizaron curvas de sobrevida durante la estancia hospitalaria en la UCI de los grupos de pacientes con genotipos de las variantes IL-6-174G/C y FNT- α -308A/G, usando el método de Kaplan-Meier. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ empleando el paquete estadístico SPSS®, versión 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) para Windows®.

Resultados

En la población estudiada se encontró que la edad promedio de los pacientes fue de 53,22 años y el 58% de ellos fueron hombres.

Las comorbilidades más representativas fueron la HTA y la DM2 con una prevalencia del 42% y 29%, respectivamente.

El foco de sepsis más frecuente fue el pulmonar (32%), seguido por la cavidad abdominal (25%), y el agente etiológico más aislado correspondió a bacterias Gram negativas con el 55% de los casos.

El 32% desarrollaron choque séptico y la insuficiencia respiratoria fue la disfunción orgánica más significativa entre los pacientes que desarrollaron choque séptico (11%, $p=0,016$). El promedio de estancia en la UCI fue de seis días, y el 13% de los pacientes fallecieron ($p=0,014$) como se muestra en la Tabla 1.

Niveles de la citocina al ingreso y después de 48 horas del ingreso a la UCI

Los niveles de las citoquinas en plasma para individuos sanos fueron indetectables o $< 8,12$ pg/mL para la IL-6 y $< 9,1$ pg/mL para el FNT- α . Niveles plasmáticos determinados

en los pacientes, mayor a este valor, fueron considerados altos.

Al ingreso en la UCI los pacientes que desarrollaron choque **séptico mostraron** un nivel promedio de la IL-6 y el FNT- α más alto (85,00 pg/mL y 210,00pg/mL, respectivamente) que los pacientes que tenían sepsis (77,50 pg/mL y 62,00 pg/mL, respectivamente), esta diferencia fue significativa ($p < 0,05$). La misma tendencia se observó después de 48 horas del ingreso de los pacientes a la UCI (Tabla 1).

El análisis de la variante genética IL-6-174G/C arrojó la siguiente distribución de los genotipos: el genotipo heterocigoto GC representó el 35%, los genotipos homocigotos GG y CC se detectaron en el 34% y 31% de los pacientes, respectivamente.

Los pacientes portadores de los genotipos GG y GC presentaron significativamente altos niveles plasmáticos de la IL-6 durante las primeras 48 horas del ingreso a la UCI ($p < 0,05$), como se muestra en la Tabla 2. Sin embargo, el nivel promedio de la IL-6 en los pacientes homocigotos CC fue más alto que el de los pacientes con genotipos GG o GC, y el de los pacientes con genotipos GG fue más alto que el de los pacientes con genotipo GC, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 1).

Los pacientes portadores del genotipo CC presentaron menor frecuencia de infección por bacterias Gram negativas que los portadores de los genotipos GC o GG ($p=0,028$).

La frecuencia de distribución de los genotipos en la variante genética FNT- α -308G/A, fue de la siguiente forma: el genotipo homocigoto AA representó el 35%, seguido del genotipo heterocigoto AG con el 34%, y el genotipo GG con 31%.

Los pacientes portadores del genotipo GG presentan menor frecuencia de las comorbilidades HTA y DM2 ($p=0,008$ y $p=0,0017$, respectivamente).

Artículo de Investigación

<https://doi.org/10.30554/archmed.23.2.4971.2023>

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con sepsis y choque séptico

Variabales	Total n=100	Sepsis n= 68 (%)	Choque séptico n=32 (%)	p-value
Género M/F	58/42	42/26	16/16	0,266
Edad, promedio +/-DS	53,22+/-,88	54,07+/-20045	51,41+/-16,278	0,002*
Foco séptico (%)				
Pulmón	32	24 (35,3)	8 (25)	0,303
Tracto urinario	19	10 (14,7)	9 (28,1)	0,111
Cavidad abdominal	25	19 (27,9)	6 (18,8)	0,322
Tejidos blandos	5	4 (5,9)	1 (3,1)	0,555
Foco desconocido	4	3 (4,4)	1 (3,1)	0,800
Comorbilidades (%)				
HTA	42	29 (42,6)	13 (40,6)	0,848
DM2	29	21 (30,9)	8 (25)	0,545
ECV	15	9 (13,2)	6 (18,8)	0,471
Cáncer	3	1 (1,5)	2 (6,2)	0,191
EPOC	21	15 (22)	6 (18,8)	0,705
Enfermedad gastrointestinal	12	10 (14,7)	2 (6,3)	0,225
Enfermedad neurológica	8	4 (5,9)	4 (12,5)	0,255
Disfunción orgánica (%)				
Falla renal	15	8 (11,8)	7 (21,9)	0,187
Insuficiencia respiratoria	11	-	11 (16,1)	0,016*
Procesos hematológicos	7	4 (5,9)	3 (9,4)	0,523
Agente etiológico (%)				
Bacterias Gram-positivas	9	6 (8,8)	3 (9,4)	0,928
Bacterias Gram-negativas	55	36 (52,9)	19 (59,4)	0,546
Evolución				
Promedio de estancia en la UCI +/- de	6 +/-7,542	6 +/- 7,516	5 +/- 7,726	0,121
días de estancia en la UCI > 6 días	40	26 (38,2)	14 (43,8)	0,600
IL-6 pg/ml al ingreso [25th-75 th percentiles]	77,50 [7,00-222,50]	77,50 [7,00-230,00]	85,00 [50,00-181,25]	0,002*
IL-6 48h pg/mL [25th-75 th percentiles]	57,50 [7,00-125,00]	23,50 [7,00-125,00]	70,00 [7,00-125,00]	0,002*
FNT- α pg/mL al ingreso [25th-75 th percentiles]	122,00 [60,00-210,00]	62,00 [58,00-200,00]	210,00 [115,25-230,00]	0,001*
FNT- α pg/mL a 48h [25th-75 th percentiles]	64,00 [60,00-210,00]	61,50 [60-110,00]	230,00 [210,00-250,00]	P<0,000*
Fallecido	13	5 (7,4)	8 (25)	0,014*

DM2: diabetes mellitus tipo 2, HTA: hipertensión arterial; ECV: enfermedad cardiovascular; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

*Significancia estadística: $p < 0,05$

El nivel promedio del FNT- α en el plasma de los pacientes con el genotipo GA fue el más alto, sin relevancia estadística significativa (Figura 1).

Los pacientes portadores del genotipo homocigoto AA presentaron altos niveles plasmáticos

del FNT- α , durante las primeras 48 horas desde el ingreso del paciente a la UCI ($p < 0,001$) (Tabla 2). A los pacientes con el genotipo GG se les detectaron altos niveles de la citocina solo al momento del ingreso a la UCI ($p = 0,008$) y los pacientes con el genotipo AG a las 48 horas ($p = 0,03$).

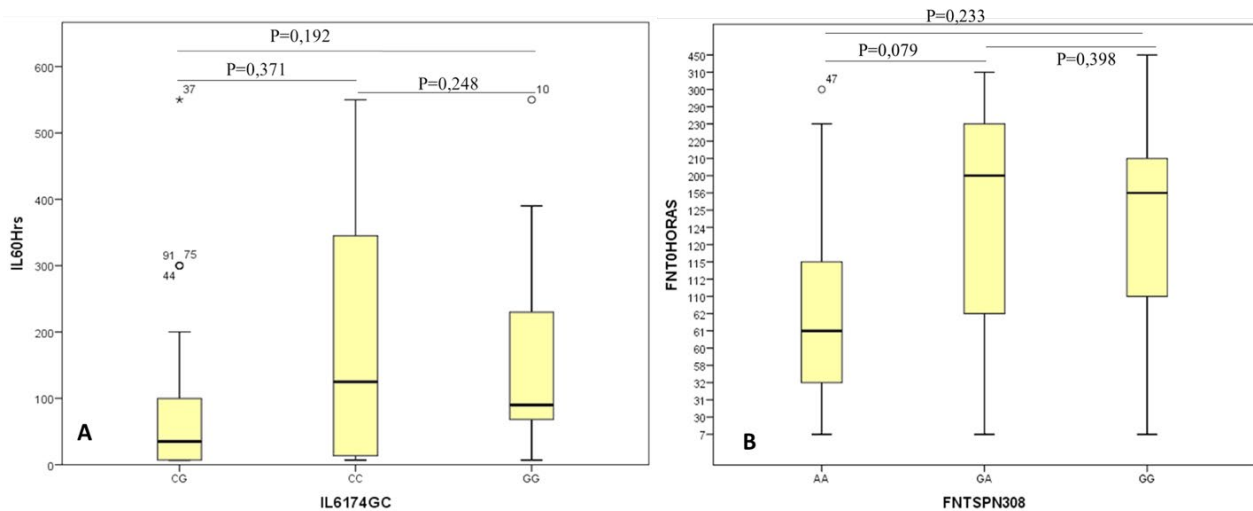


Figura 1. Niveles plasmáticos de la citocinas IL-6 y FNT-α según los genotipos de A. variante genética IL-6(-174 G/C) y B. variante genética FNT-α (-308 G/A).

Tabla 2. Características de los pacientes sépticos según genotipo de los polimorfismos IL-6 (-174 G/C) GG: 34, CC: 31, GC: 35 y FNT-α (-308 A/G) AA: 35, AG: 34, GG: 31.

Variables	IL-6 -174 G/C			FNT-α -308 G/A		
	Genotipo			Genotipo		
	GG	GC	CC	AA	AG	GG
Femenino	14 (41,2)	15 (41,2)	13 (41,9)	16 (45,7)	13 (38,2)	13 (41,9)
Masculino	20 (58,8)	20 (57,1)	18 (58,1)	19 (54,3)	21 (61,8)	18 (58,1)
Foco séptico (%)						
Pulmón	11 (32,3)	13 (37,1)	8 (25,8)	10 (28,3)	15 (44,1)	7 (22,6)
Tracto urinario	5 (14,7)	7 (20)	7 (22,6)	3 (8,6)	7 (20,6)	9 (29)
Abdomen	8 (23,5)	9 (25,7)	8 (25,8)	11 (31,4)	7 (20,6)	7 (22,6)
Infecciones de tejidos blandos	1 (2,9)	2 (5,7)	2 (6,4)	3 (8,6)	1 (2,9)	1 (3,2)
Comorbilidades (%)						
HTA	13 (38,2)	17 (48,6)	12 (38,7)	17 (48,6)	18 (52,9)	7 (22,6)*
DM2	9 (26,5)	13 (37,1)	7 (22,6)	14 (40)	11 (32,3)	4 (12,9)*
ECV	6 (17,6)	5 (14,3)	4 (12,9)	6 (17,1)	5 (14,7)	4 (12,9)
Cáncer	-	1 (2,8)	2 (6,4)	-	1 (2,9)	2 (6,4)
EPOC	7 (20,6)	7 (20)	7 (22,6)	6 (17,1)	9 (26,5)	6 (19,3)
Enfermedad gastrointestinal	3 (8,8)	4 (11,4)	5 (16,1)	5 (14,3)	4 (11,8)	3 (9,7)
Enfermedad neurológica	3 (8,8)	2 (5,7)	3 (9,7)	2 (5,7)	3 (8,8)	3 (9,7)
Disfunción orgánica (%)						
Falla renal aguda	8 (23,5)	5 (14,3)	2 (6,4)	6 (17,1)	4 (11,8)	5 (16,1)
Insuficiencia respiratoria	5 (14,7)	5 (14,3)	1 (3,2)	4 (11,4)	6 (17,6)	1 (3,2)
Proceso hematológico	2 (5,9)	3 (8,6)	2 (6,4)	3 (8,6)	3 (8,8)	1 (3,2)
Agente etiológico (%)						
Bacteria Gram positiva	5 (14,7)	1 (2,8)	3 (9,7)	1 (2,8)	6 (17,6)	2 (6,4)
Bacteria Gram negativa	21 (61,8)	22 (62,8)	12 (38,7) ¹	17 (48,6)	19 (55,9)	19 (61,3)

Artículo de Investigación

<https://doi.org/10.30554/archmed.23.2.4971.2023>

Variables	IL-6 -174 G/C Genotipo			FNT-α -308 G/A Genotipo		
	GG	GC	CC	AA	AG	GG
Evolución (%)						
Sepsis	23 (67,6)	25 (71,4)	20 (64,5)	34 (97,1) ³	17 (50) ⁴	17 (54,8)
Choque séptico	11 (32,3)	10 (28,6)	11 (35,5)	1 (2,8)	17 (50)	14 (45,2)
Fallecido	7 (20,6)	4 (11,4)	2 (6,4)	2 (5,7)	8 (23,5)*	3 (9,7)
≥ 7 días	17 (50)	12 (37,1)	11 (35,5)	15 (42,8)	14 (41,2)	11 (35,5)
Niveles plasmáticos altos al ingreso a UCI	27 (79,4)*	13 (37,1)*	20 (64,5)	11 (31,4)*	23 (67,6)	24 (6,4)*
Niveles plasmáticos altos a las 48 horas	24 (70,6)*	10 (28,6)*	14 (45,2)	7 (20)*	21 (61,8)*	19 (61,3)

DM2: diabetes mellitus tipo 2; HTA: hipertensión arterial; ECV: enfermedad cardiovascular; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
*Significancia estadística: $p < 0,05$.

El análisis multivariado IL-6-174 G/C después de ajustar el tipo de agente etiológico, niveles de la IL-6 y evolución de la sepsis, mostró que el alelo G fue un factor de riesgo para desarrollar sepsis debido a la infección por bacterias Gram negativas (62,3%; OR: 2,619; IC95% 1,095-6,259; $p=0,030$), mientras que el genotipo CC fue un factor protector (38,7%; OR: 0,382; IC95% 0,160-0,913; $p=0,030$) (Tabla 3).

El genotipo GG fue un factor de riesgo por presentar altos niveles de la IL-6 a las 48 horas del ingreso a la UCI (70,5%; OR: 6,000; IC95% 2,035-17,687; $p=0,001$), mientras que el alelo C fue un factor protector (OR: 0,167, IC 95% 0,057-0,491, $p=0,001$).

El análisis multivariado en la variante genética FNT-α-308 G/A se llevó a cabo después de ajustar las variables de evolución de la sepsis, sobrevida de los pacientes, niveles del FNT-α y las comorbilidades, y permitió establecer que el genotipo AA fue significativo entre los pacientes con sepsis (97%; OR: 21,43; IC 95% 2,697-170,335; $p=0,004$), mientras que el genotipo GA se asoció en forma significativa con el desarrollo de choque séptico (50%; OR: 4,053 IC 95% 1,546-10,623; $p=0,004$), HTA (53%; OR: 3,359 IC 95% 1,253- 9,008; $p=0,016$) e infección por bacterias Gram positivas (17,6%; OR: 9,525 IC 95% 1,854- 48,928; $p=0,007$) como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Análisis multivariado de la variante IL-6-174 G/C en pacientes con sepsis y choque séptico

Variables	Sepsis/choque séptico n= (%)	IL-6- alta al ingreso n (%)	IL-6- alta 48 horas después n (%)	Gram negativos n (%)	Controles sanos (n=30) (%)
Alelo					
G	69,5 / 30,4	58	49,2	62,3 ¹	16 (53,3)
C	68,1 / 32	50	36,3 ²	51,5	25 (83,3)
Genotipo					
CC	64,5 / 35,4	64,5	45,1	38,7 ³	14 (46,7)
CG	71,4 / 28,5	37,1 ⁴	28,5	62,8	11 (36,7)
GG	67,6 / 32,3	79,4	70,5 ⁵	61,7	5 (16,7)

¹ OR: 2,619, IC95% 1,095-6,259, $p=0,030$

² OR: 0,167, IC 95% 0,057-0,491, $p=0,001$

³ OR: 0,382, IC95% 0,160-0,913, $p=0,030$

⁴ OR: 0,226, IC95% 0,094-0,543, $p=0,001$

⁵ OR: 6,000, IC95% 2,035-17,687, $p=0,001$

Tabla 4. Análisis multivariado de la variante FNT- α (-308 G/A) en pacientes con sepsis y choque séptico

Variables	Sepsis/choque séptico n=68/32 (%)	Fallecido n (%)	FNT- α - alta admisión n (%)	FNT- α - alta a las 48 horas n (%)	Gram positivo n (%)	HTA n (%)	DM2 n (%)	Controles sanos (n=30) n (%)
Alelo								
G	34/31	11 (17)	47 (72,3)	40 (61,5)	8 (12,3)	25 (38,5)	15 (23)	24 (80)
A	51/18	10 (14,5)	34 (49)	28 (40,5)	7 (10,1)	35 (51)	25 (36,2)	24 (80)
Genotipo								
AA	34(97) ¹ /1(3)	2 (5,7)	11 (31,4)	7 (20)	1 (2,9)	17 (48,5)	14 (40)	6 (20)
GA	17(50)/ 17 50) ²	8 (23,5)	23 (67)	21 (62)	6 (17,6) ³	18 (53) ⁴	11 (32,3)	18 (60)
GG	17 (54,8)/14 (45,1)	3 (9,7)	24 (77,4)	19 (61,3)	2 (6,4)	7 (22,5)	4 (13)	6 (20)

¹OR: 21,43, IC 95% 2,697-170,335, $p=0,004$

²OR: 4,053, IC 95% 1,546-10,623, $p=0,004$

³OR: 9,525, IC 95%1,854-48,928, $p=0,007$

⁴OR: 3,359, IC 95% 1,253-9,008, $p=0,016$

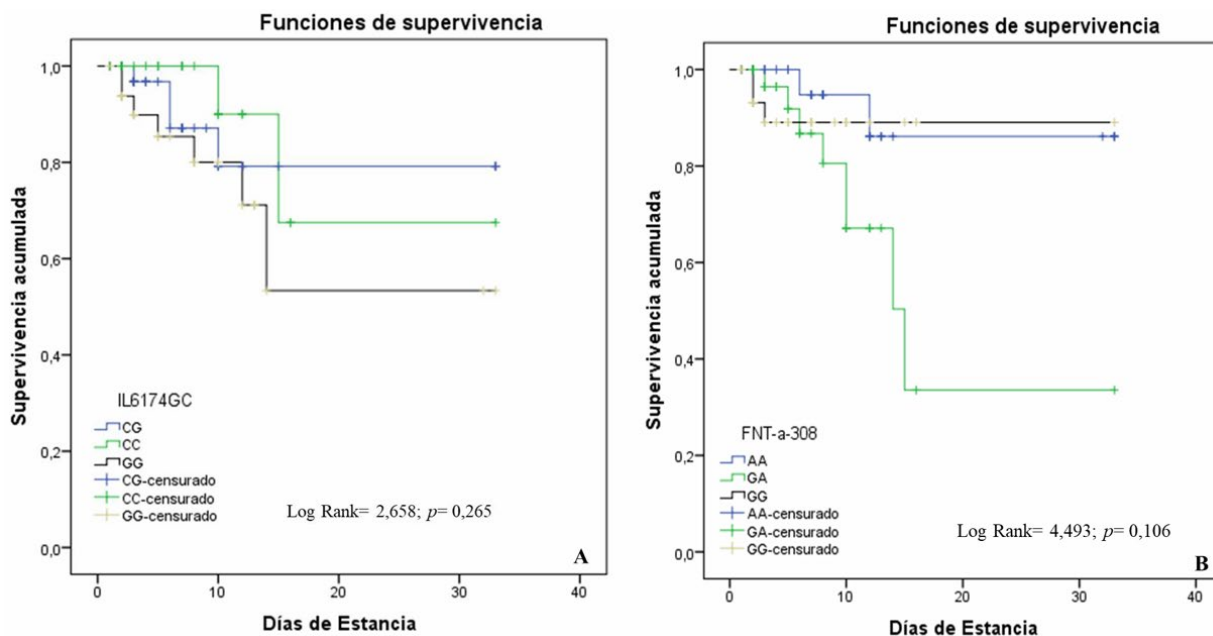


Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la proporción acumulada de la sobrevivencia de los pacientes durante la estancia en la UCI según los genotipos: A variante genética IL-6 (-174 G/ C), B. FNT- α (-308 G/ A).

El análisis de Kaplan-Meier muestra que los pacientes con los genotipos GG de la variante IL-6-174G/C y GA de la variante FNT- α -308G/A presentaron menor sobrevivencia durante la estancia en la UCI, pero presentaron significancia estadística (Figura 2).

Discusión

A pesar de los importantes avances en la comprensión de la fisiopatología de la sepsis

bacteriana, las tasas de mortalidad causadas por esta afección siguen siendo altas [1, 2, 12, 13]. Entre los factores atribuidos a esta situación se encuentra el envejecimiento de la población, como se evidencia en los reportes de países latinoamericanos [14-16], asiáticos [17], norteamericanos [1, 18] y europeos [1, 19], con una edad promedio que oscila entre los 63 y los 75 años. Sin embargo, en este estudio, el promedio de edad fue de 53,22 años, lo que indica que

este tipo de proceso patológico está ocurriendo en personas más jóvenes en nuestro medio.

Se determinó un ligero predominio de pacientes masculinos (58%), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p=0,266$). Estos resultados son concordantes con los reportados en Argentina [14], Brasil [15], Colombia [16], Estados Unidos [18] y España [19].

El pulmón fue el foco séptico informado con mayor frecuencia (32%). Este resultado es similar con los reportes de la literatura que establecen a la neumonía como el proceso infeccioso adquirido en la comunidad o asociado a la atención de la salud como la principal causa de sepsis (cerca del 50% de los casos) [14,19]. Este hallazgo sugiere que las neumonías deben ser tratadas con mucho cuidado, porque se han convertido en fuentes principales de complicaciones que desencadenan en sepsis.

Se ha sugerido que el estado inflamatorio del paciente séptico se agrava con la presencia de enfermedades inflamatorias crónicas preexistentes, lo que condiciona la mala evolución de la enfermedad por el incremento del daño tisular y el estrés metabólico que causa más debilidad al paciente [4,5]. En este sentido, se determinó que la hipertensión arterial y la DM2 fueron las comorbilidades crónicas más frecuentes entre la población de pacientes evaluada.

Aunque los eventos que ocurren durante la inflamación y la sepsis son complejos [5], se considera que las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6 son críticas en la fisiopatología de la sepsis y juegan un papel fundamental en la progresión de la enfermedad, porque son reguladores de la respuesta inmune a la infección y el trauma [4]. Por lo que comprender el perfil de citoquinas en pacientes con sepsis puede ser muy útil en el diagnóstico de la gravedad de la enfermedad, la predicción de la mortalidad y un mejor manejo del paciente [19,20].

Con el fin de investigar el papel patogénico de las citocinas TNF- α y la IL-6 en la inestabi-

lidad hemodinámica de pacientes con sepsis, se analizaron a los pacientes con desarrollo temprano (dentro de las primeras 48 horas) de choque séptico. Se encontró un aumento significativo en el TNF- α , IL-6 en el plasma en pacientes con deterioro hemodinámico temprano. Otros investigadores también han encontrado niveles elevados de TNF- α e IL-6 en el choque séptico en pacientes de España [20], Rumania [21] y Bélgica [22].

Gogos et al. encontraron, además, que la gravedad de la enfermedad estaba relacionada con los niveles séricos del TNF- α solo al ingreso a la UCI [23].

En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de la IL-6 y TNF- α entre los pacientes sobrevivientes y fallecidos, en contraste con lo hallado en los pacientes griegos, los niveles séricos de TNF- α fueron significativamente más altos en pacientes que fallecieron ($p<0,01$) [23].

Debido a que se ha sugerido que las variaciones interindividuales relacionadas con la susceptibilidad y el resultado de la sepsis grave/choque **séptico**, se pueden explicar en parte por polimorfismos de los genes que codifican proteínas como la IL-6 y TNF- α implicadas en la mediación y el control de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria durante la sepsis [4-10]. En este trabajo se estudió el papel de las variantes IL-6-174G/C y FNT- α -308G/A en el resultado de la sepsis.

Los pacientes portadores de los genotipos GG en la variante IL-6-174G/C mostraron mayor riesgo de presentar altos niveles plasmáticos de la IL-6 durante las primeras 48 horas al ingreso a la UCI, y el alelo C fue un factor protector. En concordancia con el estudio multicéntrico realizado en el 2008 y 2009 entre la población española, donde reportaron que en los sujetos con sepsis portadores del genotipo CC tenían los niveles **séricos** de IL-6 significativamente más bajos, siendo un factor protector [7]. En este mismo estudio se determinó que

los pacientes con este genotipo mostraron un menor riesgo de muerte dentro de los 30 días que aquellos con el genotipo GG (OR= 0,21; IC del 95% 0,053-0,838; $p=0,03$) o GC (OR= 0,28; IC del 95% 0,074-0,074; $p=0,06$). Mostafa et al. encontraron iguales resultados en pacientes egipcios, el genotipo CC sería un factor protector para la severidad de la enfermedad y la mortalidad temprana [8]. Sin embargo, en este estudio no se encontró asociación entre el polimorfismo presentado en la variante IL-6-174G/C con la severidad de la enfermedad o mortalidad. Así mismo, en el metaanálisis realizado por Hu et al., aunque no se encontró asociación significativa entre el polimorfismo IL-6 (-174G/C) y el riesgo de sepsis en la población total (C vs. G: OR=1,04, IC 95 % =0,79–1,38; CC vs. GG: OR:0,86, 95 % IC=0,53–1,41; CG vs. GG: OR:0,99, IC 95%=0,79–1,24), cuando se estratificaron los pacientes según el origen étnico, se observó una asociación estadísticamente significativa en asiáticos y africanos con el riesgo de sepsis [6]. Por lo que sería importante realizar un estudio más amplio que permita estratificar los genotipos de los pacientes de acuerdo con la etnicidad.

Un resultado que se observó fue que el alelo G se constituyó en un factor de riesgo para presentar sepsis debido a la infección por bacterias Gram negativas, y el genotipo CC fue un factor protector. Se sabe que la IL-6 participa en el inicio de la respuesta de fase aguda durante la infección bacteriana, y los polimorfismos en el gen que la codifica pueden afectar el nivel sérico de IL-6 y con ello la respuesta efectiva a la infección [4,5]. Pero no existen estudios que relacionen polimorfismos específicos en la IL-6 con la susceptibilidad a la infección bacteriana.

El TNF- α es otra citocina de fase aguda que puede eliminar las células dañadas durante la sepsis para mantener la homeostasis en el estado patológico [4]. Las variaciones nucleotídicas en el gen que la codifica pueden causar cambios funcionales del TNF- α y provocar trastornos en la respuesta inflamatoria durante

la sepsis, concretamente se ha relacionado el polimorfismo TNF- α -308 G/A con el aumento en el nivel de expresión de TNF- α y la severidad de la sepsis [9,10].

En el estudio realizado por Song et al. se encontró, en individuos de la población Han de China con sepsis grave, que el genotipo GG tenía significativamente menores concentraciones séricas de FNT- α [24]. En contraste, en este estudio, a los pacientes sépticos con el genotipo GG se les detectaron altos niveles de la citocina solo al momento del ingreso a la UCI, a los que presentaron el genotipo heterocigoto AG a las 48 horas del ingreso a la UCI, y a los portadores del genotipo homocigoto AA durante las primeras 48 horas desde el ingreso del paciente a la UCI. En pacientes sépticos rumanos, solo los portadores del GG se correlacionaron con niveles más altos de TNF- α en el choque séptico [21]. En este estudio, los niveles de la citocina no presentaron asociación significativa en los pacientes que desarrollaron choque séptico.

Aunque nuestro estudio no evaluó el riesgo de desarrollar sepsis, existe controversia en torno a esta asociación. En pacientes de la provincia de Shandong, China, se determinó asociación del genotipo GA con la susceptibilidad a la sepsis (OR OR=2,501, IC95%1,405-5,988; $p=0,035$) [25]. De otra parte, en un metaanálisis se estableció asociación entre el polimorfismo del gen TNF- α -308G/A y el riesgo de sepsis en pacientes caucásicas (OR: 1,50, IC 95% 1,13–2,00; $p=0,006$), pero no en pacientes asiáticos [26]. El metaanálisis publicado en el año 2022 no encontró influencia de esta variante sobre el riesgo de sepsis en poblaciones asiáticas ni caucásicas [10].

Sin embargo, en este estudio el genotipo GA fue un factor de riesgo para el desarrollo de choque séptico, lo cual es concordante con el resultado del metaanálisis que analizó poblaciones asiáticas y caucásicas y encontró asociación de los genotipos GA y AA con el desarrollo de sepsis grave y choque séptico [26], así como también en pacientes hindúes

[27] y franceses [28]. Pero en pacientes caucásicos rumanos no se encontró asociación de los genotipos de esta variante con el desarrollo de choque séptico [21].

Montes et al. observaron en pacientes españoles sépticos un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los SNP de las variantes TNF- α -308 G/A y TNF- α -238 G/A, lo que indica que la variante TNF- α -308 G/A estaría siendo influenciada por TNF- α -238 G/A, o viceversa, sobre la susceptibilidad a la sepsis grave [29]. El estudio realizado en pacientes caucásicos rumanos no se encontró asociación entre los SNP de TNF- α -308 G/A o -238 G/A y el desarrollo de choque séptico [21].

Un estudio similar a este demostró, en pacientes chinos, que el alelo A de TNF- α -308G/A y alelo C de IL-6 -174G/C fueron factores de riesgo de susceptibilidad al choque **séptico inducido por neumonía**, pues tenían mayor riesgo de desarrollar sepsis (OR= 4,28, IC 95% 2,24-8,18; $p=0,01$; OR: 2,42, IC95%,1,08-5,45; $p=0,01$, respectivamente). Aunque en este estudio el foco séptico más prevalente fue el pulmón, pero no se encontró relación alguna entre los alelos de las variantes estudiadas y el desarrollo de choque séptico.

Por otro lado, se logró establecer que los genotipos GG de la variante IL-6-174GC y GA de FNT- α -308G/A presentaron menor sobrevivencia durante la estancia en la UCI, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las variantes estudiadas entre los sobrevivientes y los fallecidos en coherencia con lo reportado en otros estudios [20-30].

Conclusión

El alelo G de la variante genética IL6-174G/C se asoció significativamente con el desarrollo de sepsis debida a infecciones por bacterias Gram negativas. Mientras que, el genotipo GA en la variante FNT- α -308G/A fue un factor de riesgo para el desarrollo de choque séptico en la población evaluada.

Debilidades

Una de las limitantes del presente estudio fue que se llevó a cabo en un solo centro hospitalario, por lo cual consideramos importante en el futuro realizar investigaciones multicéntricas y ampliar el rango muestral, así como tener en cuenta otros mediadores inflamatorios que participan en el síndrome antiinflamatorio compensatorio, con el fin de explorar la contribución de los factores hereditarios a la incidencia y el resultado de la septicemia.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener conflicto de interés alguno.

Fuentes de financiación

Este proyecto fue financiado por la Dirección Nacional de Investigaciones de la Universidad Libre de Colombia, CAP-CLI-061/2022. JACA participó en la redacción del manuscrito y análisis de información, ACM en la recolección y análisis de la información y redacción del manuscrito, y MChV en la planeación, revisión crítica y aprobación de la versión final del manuscrito

Referencias

1. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23(1):196. doi: 10.1186/s13054-019-2478-6.
2. Perner A, Rhodes A, Venkatesh B, Angus DC, Martin-Loeches I, Preiser JCh, et al. Sepsis: frontiers in supportive care, organization and research. *Intensive Care Med*. 2017;43(4):496–508. doi:10.1007/s00134-017-4677-4.
3. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal S, Masur H. Sepsis: Time to reconsider the concept. *Crit Care Med*. 2008;36:964–966. doi: 10.1097/ccm.0b013e318165b886.
4. Bozza F, Salluh J, Japiassu A, Soares M, Assis E, Gomes R, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49. doi: 10.1186/cc5783.
5. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):36-44. doi: 10.4161/viru.25436.
6. Hu P, Chen Y, Pang J, Chen X. Association between IL-6 polymorphisms and sepsis. *Innate Immun*. 2019;25(8):465-472. doi: 10.1177/1753425919872818.
7. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, Barrios Y, Solé-Violán J, Ferreres J, et al. Association between interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C), serum interleukin-6 levels and mortality in severe septic patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1861. doi: 10.3390/ijms17111861.
8. Mostafa M, ELshourbagy E, Shahat A. Association between interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C), serum interleukin-6 levels and severity of sepsis. *Egypt J Med Microbio*. 2022;31(3):77-81. doi: 10.21608/ejmm.2022.247222.
9. Georgescu AM, Banescu C, Azamfirei R, Hutanu A, Moldovan V, Badea I, et al. Evaluation of TNF-A genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):221. doi: 10.1186/s12879-020-4910-6.
10. Niu H, Li F, Ma H, Xiu L, Chen J, Hang M. Does tumor necrosis factor alpha promoter -308 A/G polymorphism has any role in the susceptibility to sepsis and sepsis risk? A meta-analysis. *Adv Clin Exp Med*. 2022;31(5):557–565. doi:10.17219/acem/144198.
11. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic choque (sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
12. 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;12:917–925. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181cea3d0.
13. Sakr Y, Jaschinski U, Wittebole X, Szakmany T, Lipman J, Namendys-Silva SA, et al. Sepsis in intensive care unit patients: worldwide data from the intensive care over nations audit. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(12):ofy313. doi: 10.1093/ofid/ofy313.
14. Rojas Cabrera E, Peranovich A. Mortalidad por sepsis y causas potencialmente asociadas en Argentina. Análisis con perspectiva sociodemográfica, período 2005-2019. *Rev Salud Publica Parag*. 2022;12(1):39-47. doi: 10.18004/rspp.2022.junio.39.
15. Lobo SM, Rezende E, Mendes CL, Oliveira MC. Mortality due to sepsis in Brazil in a real scenario: the brazilian icus project. *Rev Bras Ter Intens*. 2019;31(1):1-4. doi: 10.5935/0103-507X.20190008.
16. Ortiz G, Dueñas C, Rodríguez F, Barrera L, De la Rosa, Dennis R. Epidemiology of sepsis in colombian intensive care units. *Biomédica*. 2014; 34:40-7. doi: 10.1590/S0120-41572014000100007.
17. Southeast Asia Infectious Disease Clinical Research Network. Causes and outcomes of sepsis in southeast Asia: a multinational multicentre cross-sectional study. *Lancet Glob Health*. 2017;5(2):e157-e167. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30007-4.
18. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. *JAMA*. 2017;318(13):1241-1249. doi: 10.1001/jama.2017.13836.

19. Azkárate I, Choperena G, Salas E, Sebastián R, Lara G, Elósegui I. et al. Epidemiología y factores pronósticos de la sepsis grave/shock séptico. Seis años de evolución. *Medic Intens.* 2016;40(1):18–25. doi:10.1016/j.medin.2015.01.006.
20. Ríos-Toro JJ, Márquez-Coello M, García-Álvarez JM, Martín-Aspas A, Rivera-Fernández R, Sáez de Benito A, et al. Soluble membrane receptors, interleukin 6, procalcitonin and C reactive protein as prognostic markers in patients with severe sepsis and septic shock. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175254. doi: 10.1371/journal.pone.0175254.
21. Georgescu AM, Banescu C, Azamfirei R, Hutanu A, Moldovan V, Badea I, et al. Evaluation of TNF- α genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression. *BMC Infect Dis.* 2020 Mar 14;20(1).
22. Byl B, Devière J, Saint-Hubert F, Zech F, Gulbis B, Thys JP. Evaluation of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and C-reactive protein plasma levels as predictors of bacteremia in patients presenting signs of sepsis without shock. *Clin Microb and Infec.* 1997;3(3):306–13. doi: 10.1111/j.1469-0691.1997.tb00618.x.
23. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000;181(1):176-80. doi: 10.1086/315214.
24. Song Z, Song Y, Yin J, Shen Y, Yao C, Sun Z, et al. Genetic variation in the TNF gene is associated with susceptibility to severe sepsis, but not with mortality. *PLoS One.* 2012;7(9):e46113. doi: 10.1371/journal.pone.0046113.
25. Fu Y, Chen Y, Bai N, Liu R, Li D. Correlation of TNF- α gene polymorphisms with sepsis susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016;9(2):2335-2339.
26. Wang H, Guo S, Wan C, Yang T, Zeng N, Wu Y, et al. Tumor necrosis factor-A -308 G/A polymorphism and risk of sepsis, septic shock, and mortality: an updated meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(55):94910-94919. doi: 10.18632/oncotarget.20862.
27. Kothari N, Bogra J, Abbas H, Kohli M, Malik A, Kothari D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine.* 2013;61(2):676-681. doi: 10.1016/j.cyto.2012.11.016.
28. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.* 1999;282(6):561-568. doi: 10.1001/jama.282.6.561.
29. Montes H, Valle-Garay E, Collazos MG, Álvarez MA, Pérez-Is L, Carton JA, et al. The TNF- α (-238 G/A) polymorphism could protect against development of severe sepsis. *Innate Immun.* 2021;27(5):409-420. doi: 10.1177/17534259211036186.
30. Feng B, Mao ZR, Pang K, Zhang S, Li L. Association of tumor necrosis factor A-308G/A and interleukin-6-174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J Crit Care.* 2015;30(5):920-923. doi:10.1016/j.jcrc.2015.04.123.

