

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

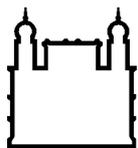
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA
(SNPs) EM GENES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E A
SUSCETIBILIDADE A FENÓTIPOS DA SEPSE PEDIÁTRICA

Guilherme Inocência Matos

RIO DE JANEIRO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA
(SNPs) EM GENES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E A SUSCETIBILIDADE
A FENÓTIPOS DA SEPSE PEDIÁTRICA**

POR

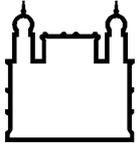
Guilherme Inocência Matos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador (es): Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof. Dr. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas

RIO DE JANEIRO

Fevereiro, 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Guilherme Inocêncio Matos

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA
(SNPs) EM GENES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E A SUSCETIBILIDADE
A FENÓTIPOS DA SEPSE PEDIÁTRICA**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof. Dr. Maria Ignez Capella Gaspar Elsas

Aprovada em: 15 / 02 / 2007

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Alda Maria da Cruz (Presidente)

Dr. Marcelo Távora Mira (Membro)

Dr. Fernando Augusto Bozza (Membro)

Dra. Ximena Illarramendi Rojas (Suplente)

Dr. Pedro Hernán Cabello (Suplente)

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2007

Dedico este trabalho à minha família pelo carinho incentivador e amor incondicional; e aos meus orientadores Dr. Milton Moraes e Dra. Maria Ignez Elsas pela “loucura” de se dedicarem à minha formação.

*“Você me pergunta pela minha paixão,
Digo que estou encantado com uma nova invenção”*

Belchior

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho, ao mesmo tempo que reflete um processo que se iniciou antes mesmo da minha graduação, é apenas mais um momento de reflexão dentro da formação que busco como cientista. Neste momento é importante ressaltar a contribuição que muitas pessoas tiveram nesse caminho, cada uma a sua maneira, embora muitas vezes nem imaginem o quanto foram importantes para mim. Por isso, gostaria de agradecer:

Aos amigos, professores e coordenadores do Colégio Pedro II;

Aos amigos do Departamento de Bacteriologia que convivi durante meu estágio como estudante do Programa de Vocação Científica (PROVOC), em especial aos meus orientadores Professor José Cavalcante de Albuquerque Ribeiro Dias e à Dra. Marise Dutra Asensi;

À Professora Julieta Vallim, pois graças a seu apoio e confiança continuei meu sonho de me tornar pesquisador;

Aos amigos e professores do Curso de Ciência Biológicas da UFRJ, em especial: Fernanda, Rafael, Jackline, Ronaldo, Raquel, Aline, Marianinha, Branquinho, Pedro Paulo, Léo, Aline, Raquel e Isabel.

Aos amigos do Banco de Leite Humano – IFF, pelo carinho durante meu período de estágio;

Aos funcionários e bolsistas do Departamento de Micobacterioses, pelo carinho, companherismo e incentivo que recebi durante o período que desenvolvi este trabalho, em especial a amiga Tatiana Silva e ao amigo Danielzinho pela “força” para a finalização desse trabalho;

À “Galera do Laboratório do Miltinho”: Alê, Dioginho, Vivi, Patrícia, Luana, Flávia, Xuxu, Alexandre Freire, Márcia Xavier, Karina, Valcemir, Cynthia; pela amizade, carinho e por terem me “aturado” todo esse tempo;

Ao Sr Paulo Sales pelo auxílio nas atividades de laboratório e amizade em todos os momentos, principalmente no “3º turno”;

A todos os meus amigos do Laboratório de Fisiopatologia Humana – IFF, em especial Carla, Ricardo pelo companherismo, pelo “chopp” e pelos vários “galhos quebrados”;

À Dra. Zina Maria Azevedo pela oportunidade de participação neste projeto;

À Dra. Maria Ignez Elsas pela oportunidade de trabalho, pelos conhecimentos adquiridos e, principalmente, pela confiança depositada em meu trabalho;

Ao Dr. Pedro Paulo Elsas por todo auxílio científico, principalmente na fase final de revisão desta dissertação;

À Dra. Elizabeth Sampaio pela receptividade no Laboratório de Hanseníase e pela orientação científica;

Ao Dr. Milton Ozório Moraes pela sempre presente orientação e, principalmente, pelas “conversas” em momentos importantes, sem as quais a conclusão deste trabalho não seria possível.

À minha “guria” pelo amor, apoio, companherismo, ajuda científica e, principalmente, por me fazer feliz!

À minha família, meus tios, primos, meu avô Ari, minha avó Mariza (*in memoriam*) e minha avó Cotinha, pela torcida e apoio em todos os momentos;

Ao meu irmão Thiago e minha irmã Mariana, pelo apoio em todos os momentos ou, simplesmente, por estarem sempre presentes na minha vida!

Aos meus pais, meus ídolos, pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos éticos e morais que norteiam minha vida profissional e por ainda acreditarem na solidariedade e amor entre as pessoas;

A Deus pelo equilíbrio em momentos importantes e por ter colocado essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

Lista de esquemas, tabelas e figuras

	Página
Esquema 1.1: Desenhos de estudo em Epidemiologia Genética de doenças infecciosas.	6
Esquema 3.1: Padrão de visualização das bandas após a digestão com <i>NcoI</i> (SNP -308)	27
Esquema 3.2: Padrão de visualização das bandas após a digestão com <i>NcoI</i> (SNP +252)	27
Esquema 3.3: Padrão de visualização das bandas após a digestão com <i>HaeIII</i> (SNP -159)	28
Esquema 3.4: Padrão de visualização das bandas após a digestão com <i>AluI</i> (SNP -173)	29
FIGURA 1.1: Influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica de eucariotos.	3
Figura 1.2: Resposta inflamatória característica da sepse.	11
Figura 1.3: Principal via de ativação do processo inflamatório da sepse.	12
Figura 1.4: Representação esquemática do <i>locus</i> do TNF (genes TNF α e β) dentro da região do HLA de classe III.	14
Figura 3.1: O princípio de funcionamento da PCR-ARMS.	30
Figura 4.1: Perfil de amostras de DNA extraídos de sangue total e <i>swab</i> .	32
Figura 4.2: Determinação dos genótipos para a posição TNF -308	33
Figura 4.3: Determinação dos genótipos para a posição LT α +252	33
Figura 4.4: Determinação dos genótipos para a posição TNF α -863	34
Figura 4.5: Determinação dos genótipos para a posição CD14 -159	34
Figura 4.6: Determinação dos genótipos para a posição MIF-173	35
Tabela 3.1 – Análise descritiva dos grupos de pacientes e controles	24
Tabela 4.1- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas nas populações estudadas	37
Tabela 4.2- Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com os níveis de gravidade	40

Tabela 4.3 -Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com os níveis de insuficiência respiratória	41
Tabela 4.4 - Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com o número de órgãos e/ou sistemas em disfunção	43
Tabela 4.5 - Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com o desfecho clínico final evolução clínica	44
Tabela 4.6 - Estimativa das frequências haplotípicas para o <i>locus</i> TNF nas populações estudadas	45

Lista de símbolos e abreviaturas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
`	Minutos
3'UTR	Região 3' não traduzida
5'UTR	Região 5' não traduzida
A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALI	Lesão Pulmonar Aguda
AP-1	Proteína Ativadora 1
ARDS	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
ARMS	Sistema de Amplificação Refratário a Mutação
C	Citosina
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
DMOS	Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeos (N= A, T, C, G ou U)
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
G	Guanina
GLU	Glutamina
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HLA	Antígeno leucocitário humano (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
HSP	Proteína de choque térmico
Iκκ	Inibidor kappa B quinase
IκB	Inibidor kappa B
IFN γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IRAK	Cinases associadas ao receptor da interleucina 1
LBP	Proteína ligadora de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo

LT α	Linfotoxina-alfa
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIF	Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de Sódio
NF κ B	Fator nuclear kappa B
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RFLP	Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RNApol	RNA polimerase
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEB	Stain Extraction Buffer
Seg	Segundos
SNP	Polimorfismos de base única
STR	Repetições curtas <i>in tandem</i>
T	Timina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
TE	Tris-EDTA
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF6	Fator associado ao receptor do TNF
U	Uracila
UPG	Unidade de Pacientes Graves do Instituto Fernandes Figueira
VAL	Valina
VNTR	Número variado de repetições <i>in tandem</i>

Resumo

A sepse pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica que ocorre durante o curso de uma infecção. Avanços recentes em estudos genômicos possibilitaram a descrição de polimorfismos genéticos que poderiam se correlacionar com a heterogeneidade das apresentações clínicas e a suscetibilidade de muitas doenças infecciosas, e também da sepse. Dentre estes se destacam os polimorfismos de base única (SNPs) localizados nos genes de mediadores inflamatórios que podem desempenhar um papel na regulação da expressão gênica. O nível de expressão de mediadores, por sua vez, poderia modular a resposta imunológica do indivíduo frente à infecções e, conseqüentemente, influenciar os desfechos clínicos. Neste estudo foram avaliados os SNPs nas posições -308 (G→A) e -863 (C→A) no gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), +252 (G→A) no gene da Linfotoxina-alfa (LT α), -173 (G→C) no gene do Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) e -159 (C→T) no gene do CD14 em relação a suscetibilidade e desfechos clínicos associados a sepse. Para tal, as frequências alélicas e genótípicas dos SNPs descritos foram comparadas em um desenho de estudo caso-controle. Foram estudados 228 pacientes com quadro clínico de sepse internados na Unidade de Pacientes Graves do Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ (UPG-IFF) e 79 pacientes sem sepse, de ambos os sexos, com idade variando entre 0 e 17 anos. A determinação molecular de todos os genótipos foi realizada utilizando-se técnica de PCR-RFLP e ARMS-PCR. Todos os *loci* estudados demonstraram estar em equilíbrio de acordo com o modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas e genótípicas foram comparadas através de modelos de regressão logística. Não foi observada associação de nenhum dos genótipos e alelos estudados com a suscetibilidade a sepse pediátrica *per se* nesse grupo de pacientes. Entretanto, foi observado que: a) possuidores do genótipo TNF-863 CA apresentavam risco aumentado em até três vezes de desenvolvimento de formas mais graves de Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas (DMOS); b) os carreadores do alelo -863A apresentaram duas vezes mais chance de desenvolver Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (do inglês ARDS) e risco aumentado em mais de três vezes de desenvolver formas graves de DMOS. Desta forma, o SNP TNF-863 parece se comportar como um marcador genético de valor prognóstico para a evolução da sepse pediátrica.

Abstract

Sepsis can be defined as systemic inflammatory response syndrome that occurs during the course of an infection. Recent advances in genomic studies made possible the description of genetic polymorphisms that could be correlated with the heterogeneity of the clinical presentations and the susceptibility to many infectious diseases, as well as sepsis. Amongst these are the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) located in the genes coding for inflammatory mediators that could be involved in the control of gene expression. The level of expression of these mediators could modulate the immunologic response of the individual against infection and, consequently, influence the clinical outcome. In this study we evaluated the SNPs in positions -308 (G→A) and - 863 (C →A) of the tumor necrosis factor-alpha (TNF α) gene, +252 (G→A) of the lymphotoxin-alpha (LT α) gene, -173 (G→C) in the Macrophage Migration Inhibitory Factor gene (MIF) gene and -159 (C→T) of the CD14 gene with respect to the clinical outcomes and susceptibility. For this, the allelic and genotypic frequencies of the SNPs were compared in a case-control study design. We enrolled 228 patients with the clinical diagnosis of sepsis clinical from the Intensive Care Unit of the Fernandes Figueira Institute-FIOCRUZ (UPG-IFF) and 79 patients without sepsis, of both genders, with age range between 0 and 17 years. The molecular determination of all the genotypes was carried out through PCR-RFLP and ARMS-PCR methods. All *loci* studied were in Hardy-Weinberg Equilibrium. The allelic and genotypic frequencies were compared using logistic regression techniques. No association of any genotypes and alleles studied with the sepsis was found. However, individuals heterozigotes (CA) for the TNF-863 SNP presented a three-fold increased risk of development of the most severe forms of Multiple Systems Organs Disfunction (MSOD). In addition the -863A carriers presented two-fold increased probability of developing Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), and a three-fold increase to develop the most severe forms of MSOD. In this way, the SNP TNF-863 seems to behave as an genetic marker of prognostic value concerning the evolution for the severity of pediatric sepsis.

Índice

	Página
Lista de esquemas, tabelas e figuras	ix
Lista de símbolos e abreviaturas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Estrutura e Variabilidade do Genoma Humano	1
1.2. Patologia molecular e variabilidade do genoma humano	3
1.2.1. <i>Doenças monogênicas e complexas</i>	3
1.2.2. <i>Epidemiologia Genética em Doenças Infecciosas</i>	4
1.3. Genética do hospedeiro e resposta a doenças infecciosas	8
1.4. Imunogenética da sepse	9
1.4.1. <i>Imunogenética do TNF e da LTα na sepse</i>	13
1.4.2. <i>Imunogenética do CD14 na sepse</i>	16
1.4.3. <i>Imunogenética do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) na sepse</i>	18
1.5. Estudos moleculares na sepse pediátrica	19
2. Objetivos	22
2.1. Geral	22
2.2. Específicos	22
3- Pacientes e Métodos	23
3.1-Desenho de Estudo	23
3.2- Pacientes estudados	23
3.3- Coleta das amostras	24

3.4- Extração de DNA de amostras de sangue total utilizando o reagente DNazol	25
3.5- Método para a extração de DNA de sangue total e <i>swab</i> utilizando solução SEB (<i>Stain Extraction Buffer</i>)	25
3.5.1- <i>Extração a partir de sangue total</i>	25
3.5.2- <i>Extração utilizando amostras colhidas com <u>swab</u> oral</i>	26
3.6- Método de genotipificação de SNPs baseados em PCR-RFLP	26
3.6.1- <i>SNP na posição -308 do promotor de TNF</i>	26
3.6.2- <i>SNP na posição +252 do gene de LTα</i>	27
3.6.3- <i>SNP na posição -159 do gene de CD14</i>	28
3.6.4- <i>SNP na posição -173 do gene de MIF</i>	28
3.7- Método de genotipificação baseados em ARMS-PCR	29
3.8- Análises estatísticas	30
3.8.1- <i>Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	30
3.8.2- <i>Estimativa de haplótipos em fase ambígua</i>	31
3.8.3- <i>Estudo caso-controle</i>	31
4. Resultados	32
4.1. Pacientes e Amostras	32
4.2. Genotipificação dos pacientes	32
4.3. Análise da distribuição das frequências genotípicas e alélicas nas populações estudadas	35
4.3.1. <i>Avaliação das frequências genotípicas e alélicas para suscetibilidade a sepse per se</i>	38
4.3.2. <i>Avaliação das frequências genotípicas e alélicas para severidade dentro da sepse pediátrica</i>	39
4.4. Análise da distribuição das frequências haplotípicas para o <i>locus</i> TNF nas populações estudadas	44

4.4.1. Avaliação das frequências haplotípicas do <u>locus</u> para <i>suscetibilidade a sepse per se</i>	45
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Estrutura das análises estatísticas e a avaliação da suscetibilidade a sepse <i>per se</i>	46
5.2. A Influência das variantes genéticas na severidade da sepse	52
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. Introdução

1.1. Estrutura e Variabilidade do Genoma Humano

Nos últimos anos, as modernas técnicas em biologia molecular trouxeram informações importantes acerca da estrutura e conteúdo do genoma humano. A seqüência do DNA humano possui aproximadamente $3,3 \times 10^9$ pares de bases (pb). Entretanto, apenas em torno de 28% do genoma é transcrito e menos de 5% é codificante (Lander *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2005). Um dado importante advindo desses estudos pós-genômicos é o grau de similaridade interindividual que gira em torno de 99,9% do conteúdo genômico total dentro do mesmo sexo, permitindo a existência de uma pequena variabilidade que possibilita diferentes apresentações nos mais diversos *loci* gênicos, fazendo com que estes possuam formas alternativas presentes em indivíduos saudáveis, os alelos (Burton *et al.*, 2005).

Diversos tipos de variantes na seqüência podem existir, e são classificados de diferentes formas, por exemplo, pela sua natureza física, pelo efeito na formação do produto gênico final ou mesmo pela associação com a suscetibilidade a doenças (Strachan & Read, 2002). Caso estas variações estejam localizadas em regiões não codificantes podem exercer influência na transcrição de genes (Moraes, 2003), se estiverem em regiões codificantes podem ser sinônimas (sem alteração da proteína) ou não sinônimas (com alteração na conformação final da proteína). Desta forma, estas diferentes formas alélicas estão sujeitas à seleção natural, constituindo-se, portanto, no substrato para a evolução adaptativa. Ou seja, o alelo de um dado gene que confere maior vantagem adaptativa ao indivíduo pode sofrer pressão seletiva positiva e se manter na população. Entretanto, os alelos novos podem aumentar ou diminuir sua freqüência através do fenômeno conhecido como deriva gênica. Novos alelos podem ser introduzidos em uma população através de migração ou transdução, mas sempre se originam em alguma espécie através de mutação, que pode ser considerada como a fonte última de variabilidade genética (Solé-Cava, 2001).

A existência de duas ou mais variantes (alelos) em freqüências significativas na população é denominada polimorfismo. Em consenso, entre geneticistas moleculares, refere-se a qualquer variante de seqüência presente em uma freqüência maior que 1% na população (Strachan & Read, 2002).

Os polimorfismos no DNA podem se comportar como marcadores genéticos que permitem estabelecer mapas genéticos estruturais, além de auxiliar na localização de *loci* que podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças. Tais marcadores possuem diferentes apresentações, contudo, sua principal utilidade se deve ao fato de existirem ao longo de todo o genoma. Estudos genômicos já identificaram diversos marcadores moleculares que vêm sendo aplicados em genética humana, tais como, microssatélites (STR- do inglês “Short Tandem Repeats”), minissatélites (VNTR – “Variable Number of Tandem Repeats”, da literatura em língua inglesa) e polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLPs do “Restriction Fragments of Lenth Polymorphims”) relacionados, principalmente, aos polimorfismos de base única (SNPs), os quais são mais

vastamente utilizados em estudos de identificação e caracterização de genes associados a doenças (Moraes, 2003) devido à sua abundância e distribuição uniforme ao longo de todo genoma.

Os SNPs são substituições de uma única base (apresentam variação bialélicas), podendo ocorrer transições ou transversões. Existem estimativas que um SNP ocorra em média a cada 250-1000 pb e são responsáveis por aproximadamente 90% das variantes que ocorrem ao longo da seqüência do DNA humano, tanto nas regiões codificantes quanto nas não codificantes. Desta forma, a importância evolutiva destes polimorfismos pode ser bem percebida pela sua contribuição à diversidade intra-específica. A elevada densidade e a estabilidade mutacional fizeram dos SNPs marcadores particularmente úteis para a genética de populações e para o mapeamento de genes de suscetibilidade para doenças complexas (Brookes, 1999).

Estudos recentes sugerem que 93% dos polimorfismos já encontrados no DNA estão presentes em todas as populações humanas estudadas, estando, os demais, restritos a populações isoladas (Weiss & Clark, 2002). Tal consideração é especialmente relevante no que se refere à influência desses polimorfismos na atividade funcional (Figura 1.1), com ação direta ou indireta sobre o fenótipo final do organismo.

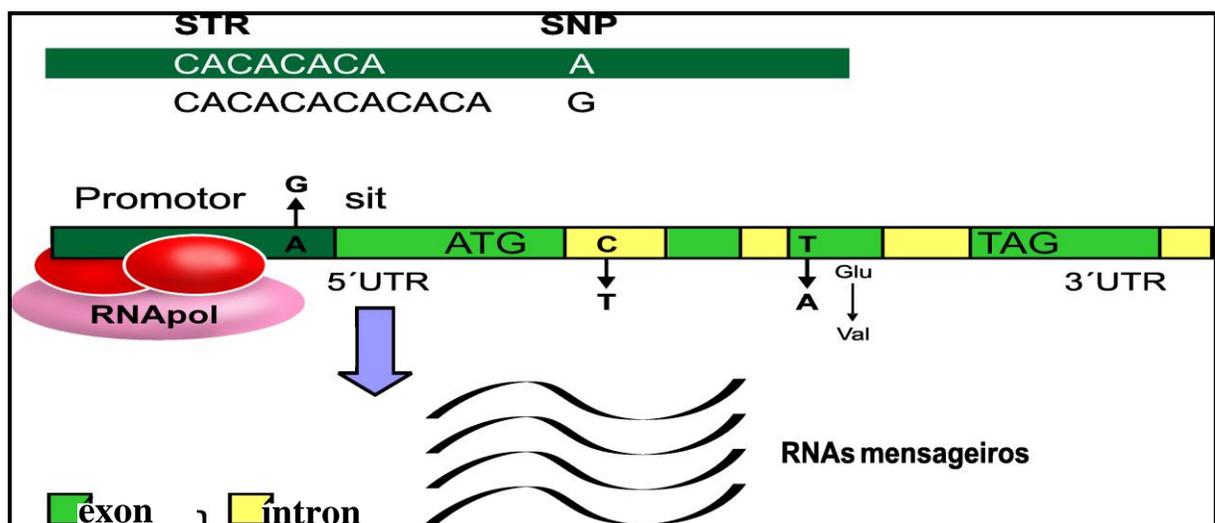


FIGURA 1.1: Influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica de eucariotos. Polimorfismos de base única. SNPs e STRs localizados no promotor do gene podem modular a expressão gênica através da alteração da afinidade de ligação da RNA polimerase. No interior de regiões codificantes, os SNPs podem se situar dentro de íntrons ou éxons. Caso se encontrem no interior de íntrons podem ser inócuos ou alterar os sítios de “splicing” gerando formas alternativas de proteínas. Já no interior dos éxons, podem modificar a seqüência de aminoácidos e alterar a estrutura final da proteína.

Alélos de SNPs podem ocorrer em combinações denominadas haplótipos (Cheung & Spielman, 2002). Acredita-se que a determinação de haplótipos, em comparação com os SNPs estudados separadamente, podem fornecer informações mais completas a respeito da complexa relação entre a variabilidade no DNA e o fenótipo. As análises haplotípicas tendem a se direcionar para mapeamentos finos do genoma, para localizar um gene de

suscetibilidade ou severidade através de desequilíbrio de ligação (LD) com os marcadores genéticos adjacentes, ou através da influência que o haplótipo inteiro tem no desenvolvimento do fenótipo sob investigação (Weiss & Clark, 2002; Ackerman *et al.*, 2003)

1.2. Patologia molecular e variabilidade do genoma humano

1.2.1. Doenças monogênicas e complexas

O conhecimento da influência da genética do hospedeiro no desenvolvimento de doenças ainda apresenta muitas lacunas. Entretanto, além de anomalias cromossômicas de baixa frequência na população, que se apresentam em sua maioria como síndromes com fenótipos bem característicos, são definidas outras duas formas de doenças genéticas. Doenças com padrão de herança dominante ou recessiva são amplamente conhecidas (Primose *et al.*, 2003). Nestes casos, são observados fenótipos com relação direta com genótipo, ou seja, os fenótipos estão presentes nos possuidores de genótipos de alta penetrância (como, por exemplo, na Fenilcetonúria, Anemia Falciforme, Distrofia Muscular de Duchenne, Fibrose Cística para citarmos os casos mais conhecidos).

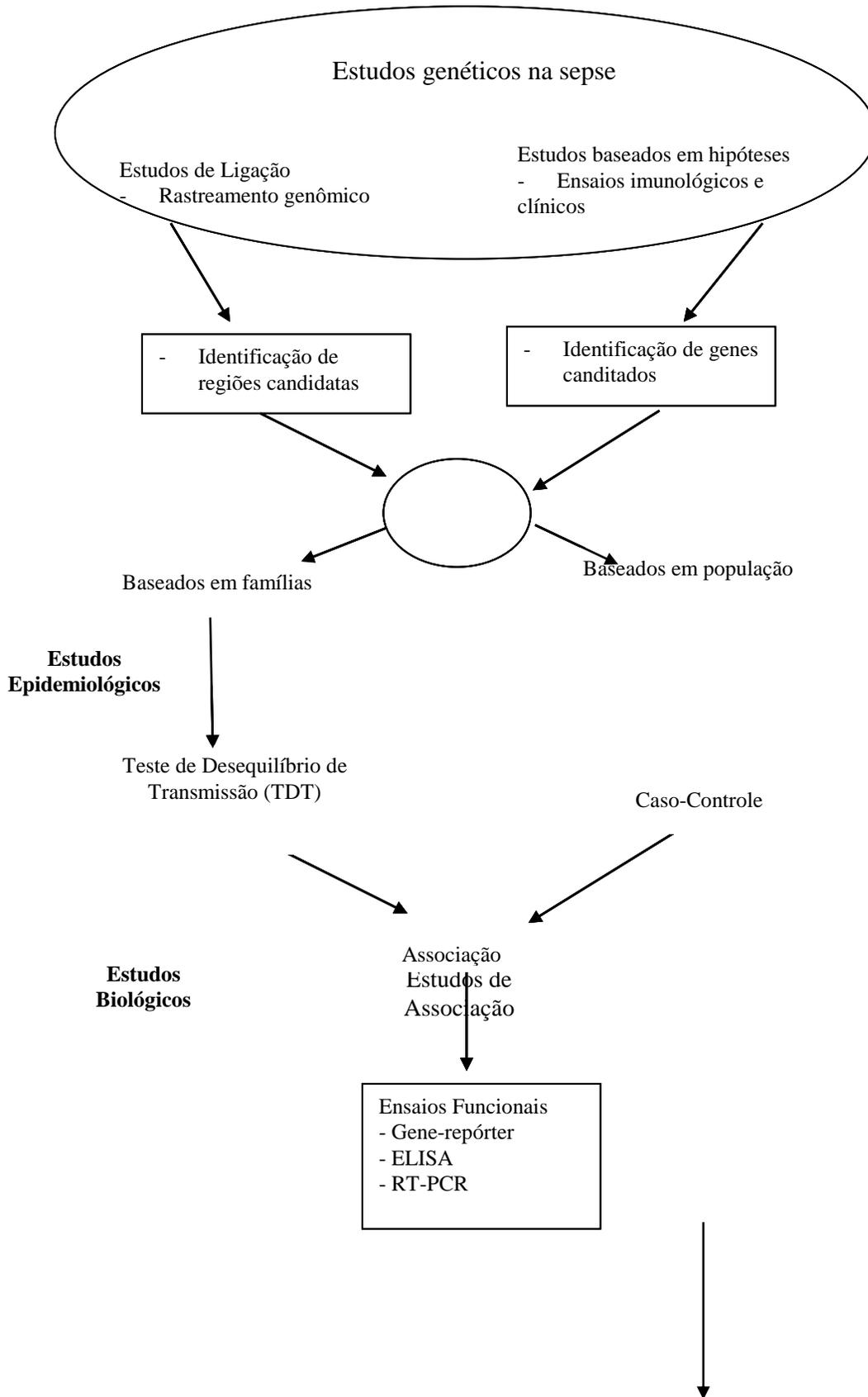
Contudo, na maioria dos casos o fenótipo final da doença é resultado da atividade e interação de muitos genes e, quase sempre, associado a fatores ambientais, sendo este tipo de doença caracterizada como complexa. Doenças infecciosas se encaixam neste grupo, pois apresentam esse intrincado mecanismo de interação dos genes envolvidos no desenvolvimento do fenótipo (Cooke & Hill, 2001; Moraes *et al.*, 2006). Desta forma, a variabilidade individual global encontrada no genoma humano exerce forte influência neste tipo de herança, visto que muitos genes podem apresentar polimorfismos embora, na maioria das vezes, as variantes individuais exerçam uma contribuição modesta na expressão final da característica. Em doenças de hereditariedade complexa essa relação genótipo-fenótipo é imperfeita. (Quirico dos Santos *et al.*, 2006). Assim, as associações com genes específicos são muito mais fracas e, portanto, mais difíceis de serem detectadas. Neste contexto, é possível que um mesmo fenótipo seja consequência de vários genótipos distintos e, muitas vezes, envolva genes (*loci*) diferentes, caracterizando uma situação conhecida como heterogeneidade genética (Moraes *et al.*, 2006).

1.2.2. Epidemiologia Genética em Doenças Infecciosas

A epidemiologia genética surge como uma disciplina fortemente associada à epidemiologia tradicional, e está direcionada ao estudo de determinantes genéticos e sua associação com o desenvolvimento de doenças, utilizando

uma abordagem populacional ou familiar. Embora o maior sucesso da genética seja encontrado no estudo de doenças monogênicas, com relação direta entre genótipo e fenótipo, o foco da epidemiologia genética está hoje nas doenças multi-fatoriais. Desta forma, tanto variantes em regiões codificantes quanto em não codificantes se apresentam como poderosas ferramentas para estudos dessa natureza (Strachan & Read, 2002; Burton *et al.* 2005).

Estudos nessa área da ciência vêm sendo realizados a partir da tentativa de se relacionar o *background* genético do indivíduo ao desenvolvimento de doenças, baseados no fato de que as leis mendelianas de herança fornecem um modelo biológico para o padrão de comportamento do gene entre parentes próximos. Assim, influências etiológicas podem ser desenhadas a partir da distribuição da doença e agregação fenotípica dentro de famílias estendidas (Burton *et al.*, 2005). Contudo, o estabelecimento de estudos em doenças complexas, com desenho clássico como estes sempre foram de difícil execução. Mesmo assim o conhecimento muito mais detalhado do genoma possibilitou desenhos de estudo onde marcadores genéticos como SNPs ou STRs são vastamente utilizados. No caso de doenças infecciosas, dentre elas a sepse, existem três metodologias mais frequentemente utilizadas: estudos de ligação, estudos de associação baseados em famílias ou em populações. Tais metodologias podem ser trabalhadas separadamente ou de maneira complementar. Uma visão geral da utilização desses processos no contexto da sepse encontra-se no esquema 1.1.



ESQUEMA 1.1: DESENHOS DE ESTUDO EM EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DA SEPSE. ESTUDOS DE LIGAÇÃO PODEM FORNECER REGIÕES CANDIDATAS QUE TERÃO SEUS POLIMORFISMOS ANALISADOS MAIS MINUCIOSAMENTE EM ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO. ESTES TAMBÉM PODEM SER INICIADOS ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM ATRAVÉS DE VIAS CANDIDATAS. AO FINAL, OS RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTIDOS DEVEM SER CONFIRMADOS POR ENSAIOS FUNCIONAIS. ADAPTADO DE ALCAÏS *ET AL.*, 2005.

Estudos de ligação utilizam exclusivamente famílias, e baseiam-se na verificação da probabilidade de determinado *locus* gênico estar ligado ao aparecimento do fenótipo da doença. Já os estudos de associação baseados

em família utilizam, na maior parte das vezes, um método denominado Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT). Para tal, seleciona-se um casal com uma ou mais crianças afetadas, sendo os genitores heterozigotos para o marcador em análise. O teste, então, compara o número de transmissões de um determinado alelo de um pai heterozigoto para um filho afetado com o número de transmissões do outro alelo. Desta forma, o resultado não é influenciado por eventuais estratificações presentes na população. O alelo associado pode ser um fator de suscetibilidade, ou pode estar em desequilíbrio de ligação com um alelo de suscetibilidade adjacente (Cardon & Bell, 2001; Strachan & Read, 2002).

Entretanto, a grande maioria dos estudos genéticos de doenças complexas utiliza análises de associação baseadas em populações. Através dessa metodologia, para determinar se um gene contribui para o fenótipo da doença, seus polimorfismos (SNPs ou STRs, por exemplo) são examinados por estudos denominados caso-controle. Nestes são verificadas diferenças nas frequências alélicas, genotípicas ou haplotípicas dos alelos dos marcadores em estudo, entre uma população de pacientes e seu respectivo grupo controle pareado (indivíduos saudáveis), ou seja, com características bastante semelhantes, de preferência da mesma região geográfica e, principalmente, expostas aos mesmos fatores desencadeantes (Hill, 2001; Segal & Hill, 2003).

Desta forma, idealmente, estudos de ligação fornecem indícios de regiões que podem estar associadas ao desenvolvimento da doença e os polimorfismos dessas regiões deverão ser investigados com maior detalhamento através de estudos de associação. Contudo, a maior parte dos estudos não realiza essas duas etapas, realizando uma análise com genes candidatos, que necessita de uma identificação prévia do gene que será analisado. Tais genes, em sua maioria, são eleitos para estudo porque codificam produtos que hipoteticamente influenciam a suscetibilidade ou o curso de uma doença em particular (Esquema 1.1). De uma maneira geral, um gene candidato poderia ser proposto caso a função biológica exercida por seu produto puder influenciar a patogênese da doença (Hill, 2001; Segal & Hill, 2003). No caso específico da sepse, os genes que codificam alguns dos mediadores do processo inflamatório característico da doença vem sendo amplamente estudados. Desta maneira, os estudos imunogenéticos da sepse realizados atualmente, caminham conjuntamente com o entendimento das bases imunológicas oriundo, por exemplo, de análises com modelos experimentais ou epidemiológicos da doença, o que traz importantes indícios acerca da escolha do candidato certo. Contudo, para a validação do achado epidemiológico o ideal é a confirmação dos dados através de análises funcionais.

1.3. Genética do hospedeiro e a resposta a doenças infecciosas

Doenças infecciosas são sabidamente multifatoriais, ou seja, seu desenvolvimento depende de múltiplos fatores ambientais e genéticos. Estes últimos são visíveis quando, os níveis de gravidade no curso da doença variam inter-individualmente, porém com óbvia relação com a intensidade de exposição ambiental. Isto pode ser consequência de uma regulação genética que implica na montagem de resposta imune parcialmente eficiente, resultando em formas brandas das doenças ou em respostas ineficientes que podem levar até mesmo a morte (Segal & Hill, 2003). Não obstante a ação de fatores ambientais, cada vez mais evidências apontam para uma contribuição da

genética do hospedeiro na suscetibilidade a doenças infecciosas. Tal fato é facilmente observável em diferentes doenças, quando uma pequena fração dos indivíduos expostos aos respectivos agentes etiológicos desenvolve a doença, ou seja, indivíduos de uma mesma população podem responder de forma distinta ao contato com o mesmo agente infeccioso. Análises utilizando grupos étnicos diferentes podem explicitar diferenças nos níveis de resposta a determinadas infecções, caracterizando o padrão de suscetibilidade em nível populacional (Cooke & Hill, 2001).

Estudos comparativos dos padrões de desenvolvimento de doenças infecciosas em gêmeos forneceram importantes avanços na identificação de características genéticas da resposta imunológica às infecções. Estudos encontraram elevada concordância no desenvolvimento de algumas doenças infecciosas entre gêmeos monozigóticos, incluindo tuberculose, hanseníase e hepatite B crônica quando comparados a gêmeos dizigóticos (Quirico dos Santos *et al.*, 2006). Da mesma forma, estudos utilizando filhos adotivos observaram maior correspondência no desenvolvimento de doenças infecciosas entre os pais biológicos e filhos, do que entre os filhos e seus pais adotivos. A mortalidade precoce dos pais biológicos por infecções se relaciona com um aumento de até seis vezes no risco de morte por infecção nos respectivos filhos (Sorensen *et al.*, 1988; Cooke & Hill, 2001).

As análises imunogenéticas da suscetibilidade a doenças infecciosas se concentraram inicialmente na investigação da associação com haplótipos do complexo HLA (Antígeno Leucocitário Humano). No entanto, em geral, associações entre HLA e doenças autoimunes e infecciosas são modestas, e a precisa associação alélica algumas vezes difere entre populações (Hill, 2001).

Neste contexto, a investigação da influência genética no controle do processo imunológico como um todo pode se relacionar, por exemplo, com a regulação da expressão de genes de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e seus receptores, moléculas de adesão e receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos na imunidade inata, assim como, o grau de herança de tais características. Tal fato começou a ser comprovado com estudos que buscavam analisar a herdabilidade dessas características, através de análises em famílias e em gêmeos monozigóticos. Westendorp e colaboradores (1997) identificaram uma forte influência genética na produção de citocinas produzidas através de ensaios *in vitro* após estímulo com endotoxinas, estando 60% da variação observada na produção da citocina fator de necrose tumoral (TNF) atribuída à herança genética. Desta forma, a variação interindividual na capacidade produtiva da citocina foi avaliada em relação aos polimorfismos genéticos previamente identificados no gene desta proteína. Entretanto nenhuma relação foi observada, em princípio, para os SNPs localizados nas posições -308 e -238 (Westendorp *et al.*, 1997).

1.4. Imunogenética da sepse

Sepse é uma condição inflamatória sistêmica grave, produzida em resposta a microrganismos patogênicos, assim como por seus componentes e produtos metabólicos. As manifestações clínicas incluem aumento ou diminuição da temperatura corporal, aumento da frequência cardíaca e da quantidade de leucócitos no sangue, aceleração da taxa respiratória, status neurológico alterado, choque e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas, o que

pode levar a um espectro de quadros de insuficiência respiratória. Estes podem variar desde brandos a agudos, como a Lesão Pulmonar Aguda (em inglês, ALI), e em casos mais extremos à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (em inglês, ARDS) (Bone *et al.*, 1992; Hotchkiss & Nicholson, 2006). O entendimento mais aceito da doença é que a sepse representa uma resposta inflamatória exacerbada na qual a defesa do hospedeiro mediada por citocinas induz injúria celular e orgânica. Esses conceitos vieram principalmente dos achados em modelos experimentais com animais, os quais sofreram injeção intravenosa de endotoxina ou bactérias vivas, buscando mimetizar as condições da sepse clínica (Deitch, 1998; Hotchkiss & Nicholson, 2006). A morte nesses modelos ocorreu em muitos casos, de forma que poderia ser atribuída a uma hiperprodução de citocinas. Esta suposição foi reforçada pelo fato de que terapias que reduziam os níveis dessas citocinas (bloqueadores de TNF, por exemplo) melhoraram as taxas de sobrevivência (Zeni *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 2006).

Na sepse, um foco primário de infecção pode originar focos secundários ou metastásicos com grave repercussão para o estado geral do paciente. Uma das vias melhor caracterizadas na sepse envolve a ativação do sistema imune inato pelo componente Lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram negativas. Esta ativação promove uma seqüência de eventos culminando na produção de mediadores inespecíficos, e determinando o quadro clínico e laboratorial da sepse, que pode variar em sua gravidade até atingir o nível de choque séptico.

Várias citocinas desempenham um papel significativo no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda ou crônica. Interleucina (IL)-1, TNF, Linfotoxina – alfa ($LT\alpha$), IL-6, Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (em inglês, MIF), IL-12 e muitas outras citocinas exibem efeitos redundantes e pleiotrópicos que, juntos, contribuem para a resposta inflamatória. A inflamação aguda é geralmente acompanhada por uma resposta sistêmica, conhecida como resposta de fase aguda, que é caracterizada por uma rápida alteração nos níveis das várias proteínas plasmáticas. Em algumas doenças, e também na sepse, a persistência da ativação imune pode resultar na inflamação crônica, que muitas vezes têm conseqüências patológicas (Goldsby *et al.*, 2002; Cohen, 2002). Uma visão esquemática do processo descrito acima pode ser obtida na Figura 1.2.

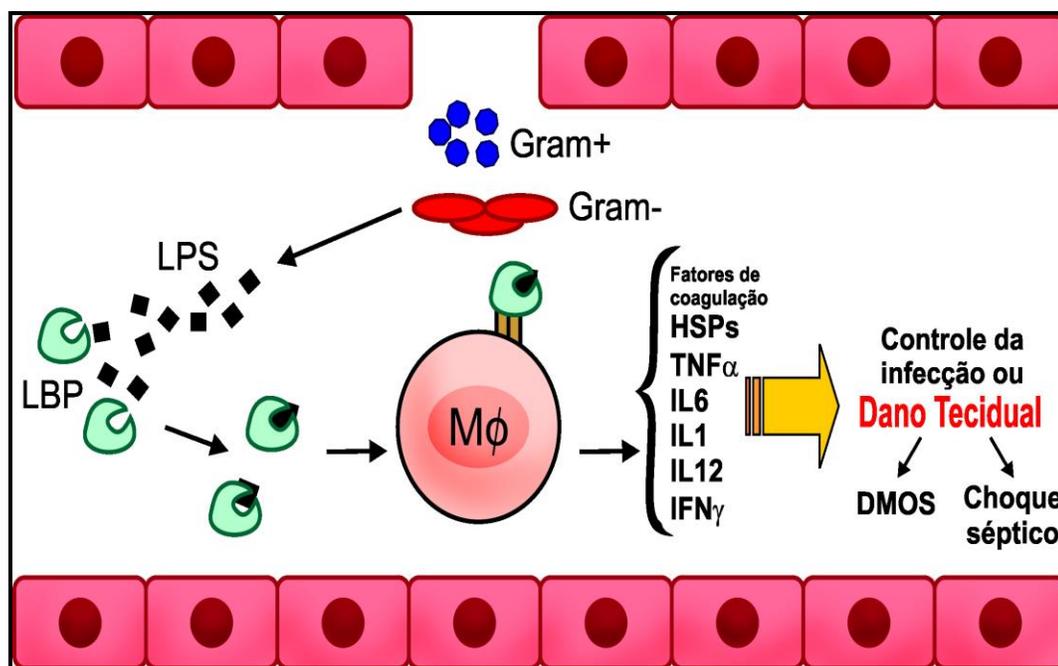


Figura 1.2: Resposta inflamatória característica da sepse. A infecção e o dano tissular gerados pela entrada de bactérias Gram positivas e Gram negativas induzem uma complexa cascata de eventos característica da resposta inflamatória. Na figura, o LPS (componente da parede celular de bactérias Gram negativas) liga-se à proteína ligadora de LPS (do inglês LBP), formando o complexo LPS-LBP. Este complexo tem o poder de ativar macrófagos, através de receptores específicos, que passam a sintetizar e liberar na circulação mediadores inflamatórios, tais como: fatores de coagulação, proteínas de choque térmico (em inglês, HSPs) e citocinas ($TNF\alpha$, IL-6, IL-1, IL-12 e $IFN\gamma$). Este mecanismo imunológico tem a função de controlar a infecção porém, se persistir em níveis elevados, pode gerar dano tecidual que promove Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas (DMOS) e choque séptico.

O sistema imune inato apresenta um mecanismo de vigilância para detectar a presença de patógenos e seus componentes no organismo. O reconhecimento e a sinalização do LPS pelas células fagocíticas, por exemplo, ocorre através da interação com a LBP (do inglês “LPS-Binding Protein”, proteína ligadora de LPS), com as moléculas de $CD14^+$ solúvel ou ligadas à membrana plasmática, e também com o complexo TLR4-MD2. Este processo de reconhecimento comanda uma rápida ativação de uma via de sinalização intracelular, que resulta na liberação dos mediadores pró-inflamatórios, dentre os principais o TNF (Heumann & Roger 2002). Tal processo está esquematizado na figura 1.3, que também apresenta os SNPs mais estudados nesses mediadores.

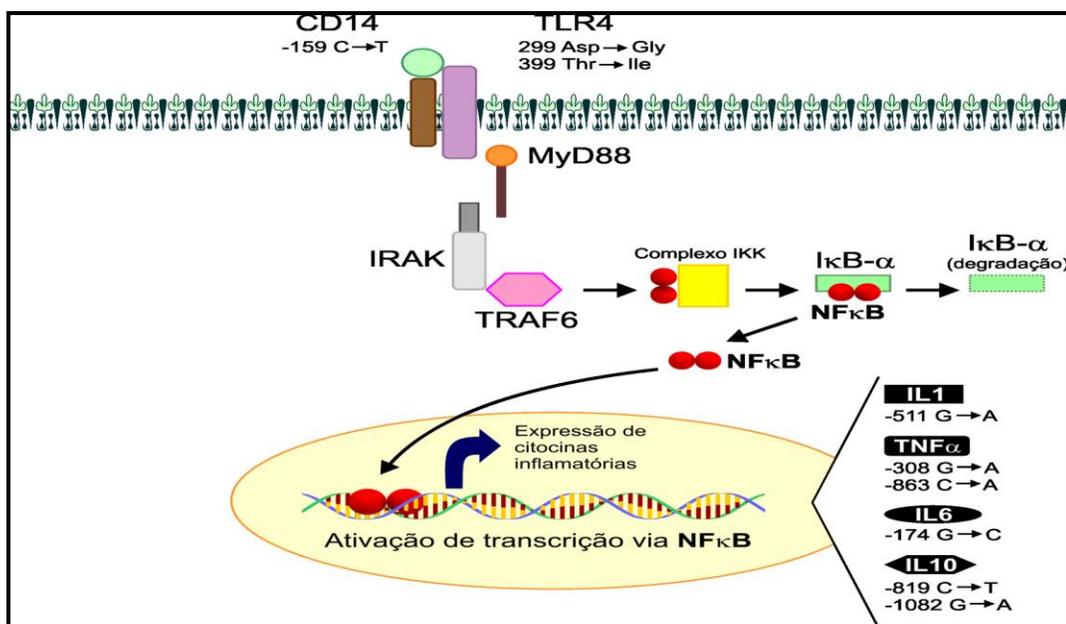


Figura 1.3: Principal via de ativação do processo inflamatório da sepse. Esta via é iniciada pela ativação de receptores do tipo toll 4 (do inglês TLR4) e CD14. Desta forma, uma cascata de ativação de proteínas intra-celulares é iniciada. Após a ativação de várias moléculas intermediárias o fator nuclear kappa B (do inglês NFκB) transloca para o núcleo a ativa vários genes de citocinas envolvidas na inflamação. Polimorfismos genéticos podem modular a expressão dessas moléculas (alguns dos quais estão representados na figura) o que os torna putativos candidatos para estudos de associação. Adaptado de Arcaroli *et al.*, 2005.

Entretanto, outra importante via de expressão de TNF e IL-1 é mediada por MAPK (em inglês, “Mitogen-activated protein kinase”) / AP-1 (em inglês, “Activator protein 1”) e requer a ativação pela citocina MIF. A regulação através da ação autócrina dessa proteína promove um aumento de expressão de receptores do tipo Toll 4 (em inglês, TLR4), o que permite uma amplificação da resposta pró-inflamatória na sepse. A ativação celular através de MIF na resposta imune mediada por citocinas em doenças inflamatórias estabelece um importante alvo no tratamento da doença, que pode permitir que pacientes não evoluam para quadros mais severos de insuficiência respiratória, como ARDS (Calandra *et al.*, 2003; Calandra & Roger, 2003; Bozza *et al.*, 2004).

Diversos estudos sugerem que a neutralização da atividade do TNF e da IL-1 com anticorpos monoclonais ou com os antagonistas possa prevenir o choque fatal decorrente do desenvolvimento nestas infecções bacterianas, sendo os primeiros resultados obtidos por experimentação em modelo animal (Goldsby *et al.*, 2002). Entretanto, muitos ensaios clínicos utilizando os mesmos alvos falharam na tentativa de promover melhoras clínicas em pacientes sépticos (Fisher *et al.*, 1996; Zeni *et al.*, 1997).

Desta forma, o entendimento da resposta inflamatória característica da sepse tem apresentado marcadores imunológicos que poderiam estar associados a diferentes evoluções clínicas em pacientes com mesmo diagnóstico

inicial. Os principais estudos epidemiológicos procuram avaliar a associação de polimorfismos nos genes dessas moléculas com a suscetibilidade a sepse ou diferenças no espectro clínico da doença.

1.4.1. Imunogenética do TNF e da LT α na sepse

O TNF é uma citocina secretada principalmente por macrófagos. Inúmeras funções biológicas têm sido atribuídas a esta citocina pleiotrópica. Uma de suas principais características foi definida a partir da observação da sua produção, que pode ser persistente em infecções crônicas; é capaz de induzir estado de choque letal e disfunção de múltiplos órgãos, quando a produção for aguda e atingir níveis sistemicamente elevados. Desta forma, também foi observado que a inibição dos efeitos tóxicos do TNF, utilizando anticorpos monoclonais específicos, conferia proteção contra choque séptico induzido por bactérias Gram negativas, em modelos animais (Tracey & Cerami, 1990). A ação do TNF na resposta inflamatória da sepse também foi observada no contexto da interação sinérgica com LPS ou bactérias vivas, na ativação inicial da resposta inespecífica, aumentando as chances de indução de necrose hemorrágica e choque letal em modelo murino. Tal efeito também pode ser observado para a ação da LT α , citocina funcionalmente e geneticamente relacionada ao TNF (Rothstein & Schreiber 1987 e 1988).

Os genes do TNF e LT α contêm ambos 4 éxons e estão (Figura 1.4) na região que abriga, dentro do complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA), os genes de classe III, uma região gênica altamente polimórfica presente no cromossomo 6p21. De maneira geral, os genes presentes no HLA apresentam uma alta densidade de polimorfismos, visto que o HLA humano deve possuir alta variabilidade em função da sua participação na apresentação de antígeno durante a resposta imunológica (Knight, 2003).

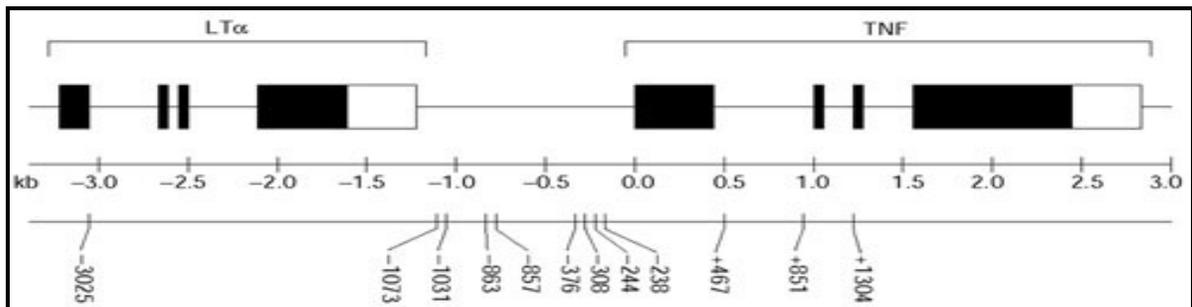


Figura 1.4: Representação esquemática do *locus* do TNF (genes TNF e LT α) dentro da região do HLA de classe III. Estão representados os principais SNPs utilizados na maior parte dos estudos do tipo caso-controle. Adaptado de Knight, 2003.

Os níveis circulantes de TNF e LT α podem ser regulados geneticamente, já que foi constatada variação ampla e estável de produção de TNF em indivíduos saudáveis (Louis *et al.*, 1998). Esses níveis apresentam fenótipos bem definidos que podem ser chamados de altos e baixos produtores de TNF. Este controle da expressão gênica tem sido atribuído, pelo menos parcialmente, a polimorfismos de base única (SNPs) presentes no *locus* do TNF (figura 1.1 e 1.4), principalmente aqueles localizados nas regiões promotoras, podendo-se verificar níveis diferenciais de RNAm e proteínas em indivíduos portadores de determinados alelos (Kroeger *et al.*, 2000 e 1997; Louis *et al.*, 1998; Basseggio *et al.*, 2004). Alguns SNPs, em particular nas posições -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -

308G/A, -244G/A e -238G/A tem sido relatados como associados a atividade funcional do gene (Bayley *et al.*, 2004). Da mesma maneira, estudos realizados no gene da $LT\alpha$ demonstram que o SNP +252, localizado no primeiro íntron do gene da $LT\alpha$, pode também ter influência na transcrição do gene do TNF, visto que também pode estar situado na posição -3025 do promotor do TNF, ou mesmo se encontrar em desequilíbrio de ligação com outros SNPs com ação funcional em outras posições do promotor deste gene (Majetschack *et al.* 2002). Mesmo assim, o conjunto de estudos funcionais até o momento realizado demonstra que a participação destes SNPs na regulação da expressão gênica ainda é controversa.

Neste contexto, um dos SNPs mais estudados está localizado na posição -308, que segundo a literatura, pode apresentar influência sobre a atividade transcricional do gene do TNF (Kroeger *et al.*, 2000; Basseggio *et al.*, 2004). De fato, Kroeger e colaboradores (1997) já haviam demonstrado que fatores transcricionais específicos se ligam preferencialmente a variante TNF2 (-308A), em vários tipos celulares, enquanto dados com ensaios de gene repórter sustentam que o alelo -308A induz níveis aumentados de proteína (Wilson *et al.*, 1995). Mesmo assim, após estímulo com endotoxina, em culturas de sangue total de indivíduos saudáveis (ou apresentando diversas patologias) não foi possível evidenciar um efeito do SNP -308 na produção de TNF (Bayley, *et al.*, 2001; Bayley *et al.*, 2004).

Particularmente na sepse, Stüber e colaboradores (1995) realizaram o primeiro trabalho avaliando a influência funcional e epidemiológica do SNP TNF -308, não encontrando qualquer associação entre alelos e a ativação gênica ou mesmo na incidência e na severidade da doença. As análises funcionais realizadas nesse estudo utilizavam construções contendo as variantes alélicas associadas a genes repórteres, e a atividade dessas construções gênicas foi avaliada após transfecção em linhagens de macrófagos. Entretanto, Tang e cols. (2000) observaram, que pacientes acometidos por choque séptico que carregavam o alelo -308A apresentavam maiores taxas de mortalidade. Buscando melhor entendimento da influência dos SNPs do *locus* do TNF na expressão da proteína, Stüber et al. (1996) observaram que indivíduos carregadores do genótipo AA na posição +252 do gene da $LT\alpha$ apresentavam níveis elevados da citocina TNF e escores mais elevados de DMOS comparado com os heterozigotos. Uma frequência aumentada do alelo $LT\alpha$ +252A e homozigotos AA também foi observada entre os não sobreviventes em um grupo de pacientes acometidos por sepse severa. Estudos conduzidos por Majetschak e colaboradores (2002) observaram que o desenvolvimento de sepse severa pós-traumática estava associada significativamente a pacientes homozigotos (AA e GG) para o *locus* +252. Os níveis séricos de $LT\alpha$ também estavam elevados nesse grupo de pacientes. Entretanto, outros estudos não conseguiram reproduzir qualquer associação, nem para o alelo -308 nem para o +252 (Calvano *et al.*, 2003; Rauchschalbe *et al.*, 2004). Estes achados demonstram a necessidade de estudos utilizando haplótipos no promotor deste gene, buscando uma caracterização mais completa da expressão gênica nesse *locus*.

Majetschak *et al.*, (2002) observaram que o haplótipo +252A/-308A estava associado negativamente ao desenvolvimento de sepse pós-traumática. Esse resultado sugeriu que este polimorfismo é compatível com a hipótese de tal SNP pertencer ativamente à região promotora do TNF ou exercer tal influência através de LD, visto que Heesen *et al.*, 2003 observaram níveis séricos de TNF aumentados em homozigotos para o alelo -308G.

Em sepse, dois trabalhos tipo caso-controle merecem destaque, principalmente porque apresentam tamanho amostral adequado bem como um desenho de estudo apropriado. Um desses estudos foi realizado com uma população de pacientes pediátricos nos EUA (Hedberg *et al.*, 2004), e outro realizado com uma população de adultos franceses (Mira *et al.* 1999). Os estudos relataram resultados semelhantes, evidenciando uma forte associação do alelo TNF -308A com a suscetibilidade ao choque séptico e morte, uma vez estabelecido o quadro da doença (Mira

et al., 1999; Hedberg *et al.*, 2004).

Outro SNP pouco estudado na sepse está localizado na posição -863 do gene de TNF. Análises funcionais têm demonstrado que a presença da transverso C→A está associada a baixos níveis séricos de TNF, sugerindo que tal polimorfismo também é fisiologicamente relevante para modulação da expressão de tal citocina. Tais achados foram feitos em ensaios funcionais com promotores ligados a genes repórteres, que demonstraram que o alelo -863A influencia a ligação de proteínas nucleares ao um elemento regulatório putativo que flanqueia o polimorfismo, diminuindo substancialmente as taxas de transcrição do gene TNF “*in vitro*” (Skoog *et al.*, 1999).

1.4.2. Imunogenética do CD14 na sepse

O reconhecimento de endotoxina (LPS) pela célula induz genes que codificam citocinas, moléculas de adesão, e outros mediadores pró-inflamatórios; em células mielóides e não-mielóides. Tais proteínas possuem a função de regular positivamente a resposta do hospedeiro para eliminar uma possível infecção bacteriana. Entretanto, dependendo da intensidade e ação, esses mesmos mediadores, além de controlar a infecção, podem induzir o quadro clínico de choque séptico (Ulevitch & Tobias, 1995).

Há evidências de que o receptor CD14, presente na superfície de macrófagos (preferencialmente), é um importante ligante de LPS. Esse reconhecimento ocorre em conjunto com a proteína solúvel LBP (do inglês, proteína ligadora de LPS) e de outro importante receptor, o TLR4 (Schumann, 1992; Ulevitch & Tobias, 1995). Neste contexto, um importante trabalho que suporta tal teoria foi realizado por Lee e colaboradores (1992), que demonstra que a transfecção do cDNA gerado a partir de mRNA codificando CD14 humano em células 70Z/3 resulta na expressão da proteína ancorada na membrana da célula transfectada. Quando em contato com o complexo LPS/LBP

as células transfectadas com os constructos de CD14 apresentavam uma capacidade de reconhecimento muito superior do que aquelas que foram transfectadas com o vetor sem o cDNA inserido.

A proteína CD14 é uma glicoproteína rica em leucina codificada por um gene de cópia única localizado no cromossomo 5q31.1. O *locus* do CD14 codifica dois produtos proteicos de 50 e 55 kD, que podem ser liberados no citoplasma, em sua forma solúvel, ou podem constituir a forma que fica ancorada na membrana de macrófagos. Ambas as isoformas são críticas para o reconhecimento do LPS e transdução de sinal via TLR4. Tanto a forma transmembrana quanto a solúvel da proteína foram associados à inflamação na sepse, bem como à elevada mortalidade para o choque séptico mediado por bactérias Gram negativas (LeVan *et al.*, 2001).

O gene de CD14 apresenta importantes variantes genéticas, que podem estar relacionadas com a expressão de diferentes fenótipos na sepse. Neste contexto, Sutherland e colaboradores (2005), demonstraram que o alelo -159T (do SNP -159 C/T) localizado no promotor do gene deste receptor está associado ao aumento da prevalência de infecção por bactérias Gram-negativas em pacientes criticamente enfermos. Da mesma forma, foi observado que o alelo -159T, assim como, o genótipo TT tem frequência significativamente aumentada em pacientes que desenvolveram choque séptico comparados com controles (Gibot *et al.*, 2002). Entretanto, outros estudos com este mesmo SNP não encontraram associação com o desenvolvimento de choque séptico (Zhang *et al.* 2005) ou sepse severa pós-traumática (Heesen, 2002; Ahrens *et al.*, 2004).

Com relação à influência funcional deste SNP, pacientes carreadores do genótipo -159TT apresentavam níveis séricos aumentados de CD14 solúvel (Baldini *et al.*, 1999; Kabesch *et al.*, 2004). Entretanto, a afirmação da influência na atividade transcricional do alelo -159T não foi confirmada por de la Fontaine e colaboradores (2006), que não encontraram presença níveis plasmáticos aumentados de CD14 em carreadores do alelo -159T. Nesse contexto, também vale destacar um trabalho mais recente realizado por Liang *et al.* (2006) que não observaram qualquer influência na atividade transcricional do gene em presença de outras variantes genéticas no promotor do CD14 além do SNP -159 (-550, -1359 e -1145), através de ensaios utilizando genes repórteres e transfecção em diferentes linhagens celulares.

1.4.3- Imunogenética do Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) na sepse

O MIF foi identificado em seus primeiros estudos, como um mediador sintetizado por linfócitos que possuía a capacidade de inibir a migração de células mononucleares *in vitro*. Esta citocina apresenta capacidade de concentrar macrófagos em sítios de reação de hipersensibilidade do tipo tardia (Martin, 2000). O MIF é uma citocina produzida por células T e macrófagos e possui uma função central na regulação da imunidade inata e adaptativa e, desta forma, está implicada na sepse, tumorigênese e doenças autoimunes. Quando estimulados com LPS e outras

moléculas indutoras pró-inflamatórias como, TNF e IFN γ , macrófagos produzem MIF, induzindo por sua vez adesão celular, fagocitose e *killing* de células tumorais e parasitas intracelulares (Calandra & Roger, 2003)

A influência exercida pelo MIF está relacionada à sua capacidade de regulação da expressão de TLR4. Através da regulação positiva da expressão basal de TLR4 em macrófagos mobilizados, MIF facilita o reconhecimento de bactérias produtoras de endotoxinas e habilita células do sistema imune inato a uma imediata liberação de citocinas pró-inflamatórias (Calandra & Roger, 2003).

Essa hipótese foi investigada em modelos experimentais de choque séptico e em humanos com sepse bacteriana. Em camundongos, os níveis de MIF estavam aumentados no fluído peritonial e na circulação sistêmica de animais infectados por *Escherichia coli* e peritonite polimicrobiana (Calandra *et al.*, 2000). Dados semelhantes foram obtidos em estudos com pacientes que tiveram acompanhamento clínico e laboratorial para a produção de citocinas, visando uma caracterização imunológica da doença. Desta forma, um importante trabalho utilizando uma população brasileira de pacientes sépticos, realizado por Bozza e colaboradores (2004), demonstrou que os níveis plasmáticos de MIF estavam relacionados com os piores prognósticos, em pacientes criticamente enfermos com sepse ou choque séptico. Neste estudo, os níveis plasmáticos de MIF estavam de 4 a 6 vezes mais elevados em pacientes enfermos comparados com controles. Resultados semelhantes também foram obtidos em outros trabalhos, por exemplo, que demonstraram uma alta expressão de MIF que se difundia no espaço inter-alveolar onde reforçava a resposta pró-inflamatória e o dano decidual, em pacientes com quadro de ARDS. (Donnelly *et al.*, 1997; Calandra *et al.*, 2003). Outro dado obtido tanto em humanos quanto em modelo murino foi a observação de que a deficiência ou imunoneutralização do MIF acarreta proteção contra choques fatais endotóxicos, exotóxicos e infectivos. A imunoneutralização do MIF ainda produz efeitos anti-inflamatórios em modelos experimentais de doenças auto-imunes, semelhante ao observado em modelos utilizando animais *knockout* para o gene MIF (Bozza *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2003; Calandra & Roger, 2003).

O gene do MIF humano é relativamente pequeno, possuindo 3 éxons separados por pequenos íntrons, seu tamanho total não alcança 1Kb e está localizado no cromossomo 22q11.2 (Paralkar & Wistow, 1994). O principal SNP estudado está localizado no promotor do gene na posição -173 (uma transversão G/C) e tem sido estudado em doenças infecciosas e auto-imunes. Este SNP foi identificado, inicialmente, por Donn e colaboradores (2001). Neste trabalho os carreadores do alelo -173C possuíam risco aumentado de desenvolvimento de artrite reumatóide sistêmica juvenil quando comparados com controles saudáveis. Subsequentemente, em 2002, o mesmo grupo confirmou os achados epidemiológicos, através de ensaios funcionais. Os autores observaram uma expressão gênica diferenciada em relação aos alelos presentes na posição -173 em duas linhagens celulares, linfoblastos T e células epiteliais. Além disso, os níveis séricos da citocina estavam aumentados nos carreadores do alelo -173C (Donn *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos para a artrite reumatóide (De Benedetti *et al.*, 2003), bem como, para poliartrite inflamatória (Barton *et al.*, 2003) e colite ulcerativa (Nohara *et al.*, 2004). Apesar desses achados, obtidos em estudos de doenças inflamatórias, nenhum estudo imunogenético semelhante foi realizado para a sepse (Renner *et al.*, 2005).

1.5. Aspectos clínicos e moleculares na sepse pediátrica

A menor parte dos pacientes sépticos evolui a óbito durante a fase inicial do desenvolvimento da doença. O quadro inicial de infecção descontrolada provoca uma resposta inflamatória exacerbada, onde uma terapia anti-inflamatória pode ser eficiente para controlar o quadro clínico da doença. Entretanto, a maior parte dos pacientes sobrevive à fase inicial da doença devido ao desenvolvimento de uma resposta hipo-inflamatória, ou seja, um estado imuno-supressivo que não promove a erradicação da infecção inicial, assim como, de infecções secundárias (Hotchkiss & Karl, 2003).

A magnitude e duração do estado inicial hiper-inflamatório são determinadas por alguns fatores, incluindo a quantidade e virulência dos microorganismos invasores, a predisposição genética do hospedeiro e outras condições médicas co-existent (co-morbididades) (Hotchkiss & Karl, 2003). Desta forma, é bastante comum a caracterização do estado clínico de pacientes criticamente enfermos através de distúrbios em sua homeostase. A medida desses distúrbios é estimada pela mensuração de uma ou várias variáveis fisiológicas e sua comparação com uma faixa de normalidade. Os dados obtidos através da medição dessas variáveis fisiológicas fornecem os valores que serão utilizados na construção de *scores* compostos, que podem ser de vários tipos, principalmente, prognósticos e de desfechos (Lacroix & Cotting, 2005).

Scores prognósticos foram desenvolvidos para melhor descrever a severidade da doença em diferentes grupos de pacientes. Esses *scores* consideram algumas co-morbididades e distúrbios fisiológicos na entrada do paciente na unidade de tratamento intensivo ou durante as etapas randomização dos procedimentos clínicos. Esses tipos de *scores* foram desenvolvidos para maximizar a predição do risco geral de morte dentre os diferentes grupos de pacientes, dados os níveis de severidade. Já os *scores* de desfecho foram desenvolvidos para uma melhor descrição da severidade do quadro clínico durante o período de internação do paciente, ou seja, têm como objetivo maximizar a descrição do curso clínico dos diferentes grupos de pacientes. Em pacientes pediátricos, o número de órgãos em disfunção é frequentemente utilizado para descrever a severidade dos casos de Disfunção de Múltiplos Órgãos (DMOS), ou seja, DMOS com o maior número de órgãos em disfunção deve ser mais severo. Desta forma, há certamente uma relação entre o número de órgãos em falência e as taxas de mortalidade. Entretanto, essa taxa não é regulada somente em função do número de sistemas comprometidos, mas também pelo risco relativo e pelo grau de disfunção de cada sistema envolvido (Lacroix & Cotting, 2005). Neste intuito, também é importante ressaltar que os níveis de insuficiência respiratória diagnosticados, como a Lesão Pulmonar Aguda (ALI) e em casos extremos a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS), também são utilizados como importantes marcadores clínicos de severidade da doença.

A prevalência de sepse nos pacientes pediátricos internados na Unidade de Pacientes Graves - IFF (UPG), associada à mortalidade descrita para ARDS constituem dois dos principais fatores responsáveis pela taxa de mortalidade registrada na unidade. Estudos reportam que sepse severa é responsável por mais de 250.000 mortes

anualmente, a partir de uma população de pacientes acometidos pela sepse de 750.000 casos em todo o mundo (Papadakos, 2004; Cohen, 2002).

O estudo fisiopatológico dos pontos de vista molecular e imunológico é necessário para que se possa compreender a grande variação na evolução clínica entre os pacientes rotulados com o mesmo diagnóstico de sepse. Esta variação se torna evidente quando pacientes com mesmo diagnóstico, que sob a influência de fatores desencadeantes comuns, mesma idade e co-morbidade, tratados com os mesmos protocolos clínicos, evoluem de formas tão distintas, muita vezes desfavoravelmente para DMOS e óbito. Desta forma, podemos considerar a possibilidade de SNPs presentes nos genes de citocinas que modulam a resposta inflamatória característica da sepse, como fatores que podem explicar essa heterogeneidade (Wheeler & Wong, 2001)

Nos pacientes pediátricos criticamente enfermos, o desenvolvimento de estudos dessa natureza permite a compreensão fisiopatológica dos mecanismos envolvidos, a implementação de protocolos de pesquisa clínica e a abordagem terapêutica racional, direcionada com imunomoduladores. O conhecimento das condições clínicas baseadas em estudos moleculares e imunológicos permite a estratificação dos pacientes com potencial de maior gravidade para os quais é necessária uma terapia mais intensiva. Desta forma, a determinação de polimorfismos que podem estar relacionados diretamente ao aumento da expressão de citocinas moduladoras da resposta imune, com conseqüente repercussão no prognóstico, pode auxiliar na determinação de sub-grupos homogêneos de pacientes, o que possibilita uma intervenção terapêutica mais efetiva e uma possível diminuição nas taxas de morbi-mortalidade.

2. Objetivos

2.1. Geral

Desenvolver um estudo baseado em populações (caso-controle) para avaliar a associação entre alelos de SNPs nos genes do TNF (-863C/A; -308G/A), LT α (+252 G/A); CD14 (-159C/T) e MIF (-173G/C) e a ocorrência de sepse e o prognóstico de pacientes pediátricos internados na Unidade de Pacientes Graves do Instituto Fernandes Figueira - FIOCRUZ.

2.2. Específicos

Avaliar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas (quando indicado) no grupo de pacientes e controles estudados dos SNPs nas posições +252 do gene de LT α , -863 e -308 do promotor do gene *TNF*; -159 no promotor do gene de CD14 e -173 do promotor do gene de MIF nos casos de sepse pediátrica da UPG-IFF e controles pareados por faixa etária.

Comparar as frequências dos SNPs (alélicas, genotípicas e haplotípicas) entre os grupos de casos e controles.

Analisar as frequências dos SNPs (alélicas, genotípicas e haplotípicas) dentro do grupo de pacientes após estratificação em função do *score* de gravidade, dos níveis de insuficiência respiratória e mortalidade.

3- Pacientes e Métodos

3.1-Desenho de Estudo

Um grupo de pacientes internados na Unidade de Pacientes Graves do Instituto Fernandes Figueira- FIOCRUZ (UPG-IFF) submetidos à diferentes intervenções clínicas, dependendo do nível de gravidade do quadro clínico foi estudado. Esses pacientes tiveram seu acompanhamento clínico, incluindo o diagnóstico da sepse, a identificação das complicações, a classificação por escores e níveis de gravidade, e a monitoração respiratória e metabólica, realizadas pela equipe da UPG-IFF, sob a coordenação da Dra. Zina Maria Almeida de Azevedo, chefe da UPG, que é igualmente a coordenadora do Projeto que participa do Programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde Pública (PDTSP) ao qual está vinculada a presente pesquisa. Deste grupo foram colhidas amostras de sangue periférico e de células de mucosa oral (colhidas com auxílio de *swab*) obtidas no momento da internação, para a extração do DNA e a realização dos procedimentos de genotipagem molecular. Os mesmos procedimentos de coleta e genotipagem foram realizados em um grupo controle, caracterizado por pacientes não sépticos do ambulatório de cirurgia eletiva, que seriam submetidos à cirurgias eletivas. Tratou-se, dessa forma, de um estudo caso-controle em Epidemiologia Molecular do tipo associação baseado em populações.

3.2- Pacientes estudados

O presente estudo foi realizado com 228 pacientes pediátricos de ambos os sexos (135 do sexo masculino e 93 do sexo feminino), que apresentavam quadro clínico de sepse, compreendendo uma faixa etária de 0 a 17 anos (média de idade 2,7 anos e DP= \pm 3,93), selecionados com base nos parâmetros clínicos estabelecidos para inclusão no estudo na Unidade de Pacientes Graves do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ que constituíram o grupo denominado como pacientes. O grupo designado como controle era composto por 44 pacientes internados na UPG-IFF (28 do sexo masculino e 16 do sexo feminino com média de idade de 4,0 anos e DP= \pm 3,98) sem quadro clínico de sepse e 35 pacientes selecionados do ambulatório de cirurgia infantil-IFF (30 do sexo masculino e 5 do sexo feminino com média de idade de 4,2 anos e DP= \pm 3,43) submetidos a cirurgias eletivas. Todos os responsáveis pelos participantes do projeto tiveram que preencher o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após serem prestados todos os esclarecimentos referentes ao processo de coleta e utilização das amostras, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - IFF (Projeto número 0063.0.008.00-02 CEP-IFF).

Pacientes que apresentavam doenças inflamatórias crônicas, tratamento com esteróides ou drogas imunossupressoras durante o último mês, ou AIDS (do inglês Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) não foram incluídos neste estudo.

Tabela 3.1 – Análise descritiva dos grupos de pacientes e controles

Sepse(n=228)																	
Sepse						Sepse Grave						Choque Séptico					
42						98						86					
ARDS		ALI		Não ARDS/ALI		ARDS		ALI		Não ARDS/ALI		ARDS		ALI		Não ARDS/ALI	
0		23		19		28		55		15		36*		40		10	
alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito	alta	obito
0	0	22	1	19	0	26	2	51	4	12	3	28	7	36	3	10	0
Controle (n=79)																	
Não Sepse (UPG)						Não Sepse (Cirurgia Eletiva)											
44						35											
ARDS		ALI		Não ARDS/ALI		ARDS		ALI		Não ARDS/ALI		ARDS		ALI		Não ARDS/ALI	
0		0		44		0		0		35							

* 1 paciente não foi preenchido quanto a alta e óbito

3.3- Coleta das amostras

Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue total obtidos por venopunção com a utilização de seringa estéril que foram armazenados em frascos contendo o anti-coagulante EDTA. No caso de pacientes que sofreram transfusão de sangue recente, foram coletados *swabs* para obtenção de células da mucosa oral. Nos pacientes internados na UPG-IFF esta coleta foi feita durante a internação, logo após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos responsáveis. No caso da população de controles as amostras foram obtidas no momento da coleta dos exames pré-operatórios, tanto para sangue total quanto para *swab*.

3.4- Extração de DNA de amostras de sangue total utilizando o reagente DNAzol

O DNA foi extraído a partir de 600µL de sangue total fresco ou descongelado de coletado com tampão EDTA como anticoagulante, vertidos em criotubo com capacidade para 1,5 mL. Ao tubo foi adicionado 1mL de NaCl 0,9%, o tubo foi homogeneizado por inversão seguindo-se uma centrifugação a 14000 rpm por 10', sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 500µL de solução hipotônica (TE – 10mM Tris; 1mM EDTA). Em seguida o material foi centrifugado a 4000 rpm por 10' e o sobrenadante descartado. Para lise das células, 600µL de DNAzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)

foram adicionados ao novo *pellet*, o qual foi dissolvido por pipetagem da mistura. Após a lise, para a precipitação do DNA, 800µL de etanol absoluto foram adicionados à solução, que foi homogeneizada por inversão, e colocada em repouso por 30'. A mistura foi então centrifugada a 14000 rpm por 10', e o sobrenadante descartado. Após secagem à temperatura ambiente, o *pellet* foi redissolvido em 300µL de solução alcalina (8 mM NaOH), incubado a 56°C por 30' e posteriormente armazenado a -20°C.

3.5- Método para a extração de DNA de sangue total e *swab* utilizando solução SEB (*Stain Extraction Buffer*)

3.5.1- Extração a partir de sangue total

Foram colocados 500µL de sangue total fresco ou descongelado em tubos *Eppendorf* com capacidade para 1,5mL, sendo então, adicionado 1mL de solução de NaCl 0,9% e o volume resultante centrifugado a 14.000 rpm por 10', com o sobrenadante descartado. Uma segunda lavagem foi realizada homogeneizando-se o *pellet* por pipetagem com solução TE (10mM Tris; 1mM EDTA) e o material sendo centrifugado a 4000 rpm por 10', com o sobrenadante descartado. Após isto, foram adicionados, dentro de cada tubo, 550µL de solução de lise SEB (10mM de Tris-HCl, 10mM de EDTA, 50mM NaCl, 2% de SDS e Proteinase K 0,3 mg/mL). A preparação foi agitada em *vortex* por 10 segundos e incubada a 56°C *overnight*. Após a incubação, foram adicionados 550µL da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi agitada novamente por 10 segundos e, posteriormente, centrifugada a 4000rpm por 1 minuto. Transferiu-se, então, a fase aquosa da solução para outro tubo com capacidade para 1,5mL e neste, foi adicionado NaCl para concentração 150mM e 550µL de etanol absoluto a 4°C, para promover a precipitação do DNA. Após 15 minutos para precipitação do DNA, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm e o etanol descartado. Finalmente, o *pellet* contendo o DNA foi ressuspensão em 100µL de TE (Tris-5mM; EDTA-0,1mM) e armazenado a -20°C, para posterior utilização nos experimentos de genotipificação.

3.5.2-Extração utilizando amostras colhidas com *swab* oral

As amostras de DNA total foram extraídas a partir do algodão retirado do *swab*, o qual foi depositado em tubos *Eppendorf* com capacidade para 1,5mL, para que fossem adicionados 550µL de solução de lise SEB. A solução foi homogeneizada em *vortex* por 10 segundos e incubada a 56°C *overnight*. 550µL de solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adicionados, após a incubação, e a solução agitada novamente por 10 segundos e, posteriormente, centrifugada a 4000rpm por 1 minuto. A fase aquosa da solução resultante dessa centrifugação foi transferida para outro tubo com capacidade para 1,5mL e neste, foi adicionado NaCl para concentração 150mM e 550µL de etanol absoluto a 4°C, para precipitação do DNA. Após 30 minutos de precipitação do DNA, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 4000rpm e o etanol descartado. O *pellet* final, após secagem em temperatura ambiente, foi ressuspensão em 30µL de TE (5mM; 0,1mM).

3.6- Método de genotipificação de SNPs baseados em PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*): SNPs -308 (TNF), +252 (LT α), -159 (CD14) e -173 (MIF).

3.6.1- SNP na posição -308 do promotor de TNF

Para amplificação da região que flanqueia o nucleotídeo -308, situada no promotor do gene do TNF, as reações foram realizadas utilizando 0,3 μ M de cada iniciador (5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' sense; 5'-GCA ATA GGT TTT GAG GGC CAT-3' antisense), 200 μ M de dNTP, 1U *Taq* polimerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, tampão da enzima 1X e 10-100ng de DNA purificado, em um volume final de 25 μ L. Cada reação de PCR seguiu as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C - 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C - 1 min; 57°C - 1 min 72°C - 1 min (Santos *et al.*, 2002). Para genotipificação o produto de PCR foi digerido por *NcoI* (2U), uma mistura contendo 10 μ L do produto amplificado em um volume final de 20 μ L, segundo as recomendações dos fabricantes (Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C por 12-15h em banho-maria. O padrão de bandas gerado após digestão do fragmento amplificado de 107pb e eletroforese em gel de agarose 3,5% e coloração com brometo de etídio está representado no Esquema 3.1.

Esquema 3.1: Padrão de visualização das bandas após a digestão com *NcoI* (SNP -308)

Homozigoto (GG)		Heterozigoto (GA)		Homozigoto (AA)	
87 bp	=====	107 bp	=====	107 bp	=====
20 bp	=====	87 bp	=====		
		20 bp	=====		

3.6.2- SNP na posição +252do gene de LT α

Para amplificação da região do que da LT α flanqueando a posição +252 foram utilizados 0,3 μ M de cada iniciador (5'-CCG TGC TTC GTG TTT GGA CTA-3' sense; 5'-AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C-3' antisense), 200 μ M de dNTP, 1U *Taq* polimerase (Invitrogen), 1,25mM MgCl₂ e tampão da enzima 1X, em um volume final de 25 μ L. As condições de ciclagem foram: 94°C - 3 min seguido de 35 ciclos de 94°C - 45 seg; 62°C - 45 seg e 72°C - 1 min e 30 seg; e 72°C - 5 min de extensão final. O fragmento amplificado gerado ao final do processo possuía 782 pb (Stüber *et al.*, 1995). A digestão para verificação do produto de PCR (10 μ L) foi realizada com enzima de restrição *NcoI* (2U) em um volume final de 20 μ L, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C por 12-15h em banho-maria e o padrão de bandas gerado após digestão do fragmento amplificado foi verificado em eletroforese em gel de agarose 2,0% e coloração com brometo de etídio (Esquema 3.2).

Esquema 3.2- Padrão de visualização das bandas após a digestão com *NcoI* (SNP +252)

Homozigoto (GG)		Heterozigoto (GA)		Homozigoto (AA)	
586 bp	=====	782 bp	=====	782 bp	=====
196 bp	=====	586 bp	=====		
		196 bp	=====		

3.6.3- SNP na posição -159 do gene de CD14

O SNP -159 do gene do CD14 foi amplificado utilizando-se 0,3µM de cada iniciador (5'-CTA AGG CAC TGA GGA TCA TCC-3' sense; 5'-CAT GGT CGA TAA GTC TTC CG-3' antisense), 200µM de dNTP, 1U *Taq* Polimerase (Invitrogen), 1,5mM MgCl₂ e tampão da enzima 1X, em um volume final de 25µL. As condições de ciclagem foram: 94°C - 5 min seguido de 42 ciclos de 94°C - 30 seg; 55°C - 1 min e 72°C - 1 min; e 72°C - 7 min de extensão final. O fragmento gerado ao final da ciclagem continha 418 pb. (Baldini *et al.*,1999). A digestão do produto de PCR (10µl) foi realizada com 2U da enzima *Hae*III em um volume final de 20µL; seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C por 12-15h em banho-maria e o padrão de bandas gerado após digestão do fragmento amplificado foi verificado em eletroforese em gel de agarose 2,0% e coloração com brometo de etídio (Esquema 3.3).

Esquema 3.3: Padrão de visualização das bandas após a digestão com *Hae*III (SNP -159)

Homozigoto (CC)	Heterozigoto (CT)	Homozigoto (TT)
263 bp 	418 bp 	418 bp 
155 bp 	263 bp 	
	155 bp 	

3.6.4- SNP na posição -173 do gene de MIF

AMPLIFICAÇÃO

Para o SNP -173, localizado no gene do MIF, foi amplificado um fragmento de 170 pb utilizando 0,3µM de cada iniciador (5'-AAG AAA GAC CCG AGG CGA G -3' sense; 5'- CCC GAG TGG GGA AGT CAC-3' antisense), 200µM de dNTP, 0,6U *Taq* Polimerase (Invitrogen), 1,5mM MgCl₂ e Tampão da enzima 1X, em um volume final de 25µL. As condições de ciclagem foram: 94°C - 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C - 30 seg; 60°C - 30 seg e 72°C - 30 seg; e 72°C - 5 min de extensão final. A digestão do produto de PCR (10µl) foi realizada com a utilização da endonuclease de restrição *Alu*I (3U), segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen). Cada reação continha um volume final de 20µL. A reação foi incubada a 37°C por 12-15h em banho-maria. O padrão de bandas gerado após digestão e eletroforese em gel de agarose 3,5% e coloração com brometo de etídeo está representado no Esquema 3.4.

Esquema 3.4: Padrão de visualização das bandas após a digestão com *Alu*I (SNP -173)

Homozigoto (CC)	Heterozigoto (GC)	Homozigoto (GG)
111 bp 	170 bp 	170 bp 
59 bp 	111 bp 	
	59 bp 	

3.7- Método de genotipificação baseados em ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutational System*) para o SNP - 863 (Ye *et al.*, 2001)

Para genotipificação do polimorfismo na posição - 863 foi utilizada a técnica de ARMS-PCR, que tem como princípio uma amplificação alelo-específica. Sendo assim, após a amplificação são gerados dois fragmentos específicos, cada um correspondendo a um alelo (C ou A), presente na fita molde. Foram realizadas duas reações paralelas, cada uma utiliza um iniciador *sense* que amplifica, somente, na presença de um alelo específico (C ou A) presente na fita molde na posição -863, contendo, ambas as reações, o mesmo iniciador *antisense*. Desta forma, após a amplificação será gerado um fragmento de aproximadamente 200pb, em cada reação em que o iniciador encontrar o nucleotídeo necessário ao pareamento (Figura 3.1). Em cada reação foram utilizados 0,15µM de cada iniciador, 200µM de dNTP, 1U *Taq* Polimerase, 1,5mM MgCl₂, tampão da enzima 1X, em um volume final de 15µL. Cada reação seguiu as seguintes condições de amplificação: 94°C - 5 min, 94°C -45 seg, 62°C - 1 min (30 ciclos) e 72°C - 5 min.

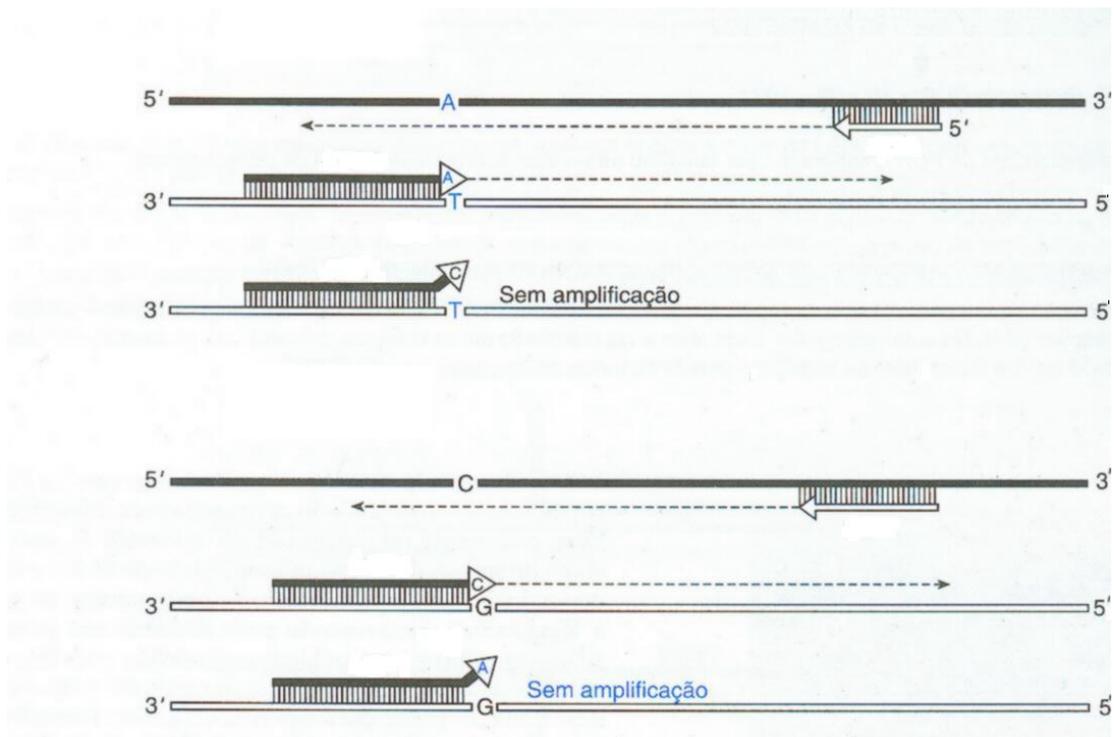


Figura 3.1- O princípio de funcionamento da PCR-ARMS. Demonstração do pareamento alelo-específico nas extremidades 3' dos iniciadores. Adaptado de Strachan & Read 2002.

3.8- Análises estatísticas

3.8.1- Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As freqüências alélicas e genótípicas foram utilizadas para testar se os alelos encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Este modelo é bastante utilizado em genética de populações, para a análise de um gene com dois alelos, utilizando as freqüências alélicas observadas para se calcular as freqüências genótípicas esperadas para uma população em equilíbrio (de acordo com as premissas do EHW), através da expressão matemática $p^2 + 2pq + q^2$. Destina-se a verificar possíveis desvios amostrais e,

primordialmente, em estudos dessa natureza, falhas durante o procedimento de genotipagem. Com o intuito de verificar se a população se encontra em equilíbrio, é então realizado o teste do qui-quadrado (com 01 grau de liberdade e nível de significância $<0,05$), comparando as frequências genotípicas observadas e esperadas com o auxílio do software Excel (Microsoft Office, Windows).

3.8.2- Estimativa de haplótipos em fase ambígua

Os haplótipos foram definidos a partir da combinação dos genótipos formadores determinados para os três polimorfismos de LT α /TNF (+252/-863/-308), ou seja, as frequências haplotípicas foram determinadas baseando-se na presença de oito haplótipos possíveis (2³). A presença de duplos heterozigotos (fase ambígua devido a ausência da informação familiar) dificulta a definição das frequências haplotípicas. Ou seja, não é possível determinar a combinação alélica em indivíduos que são heterozigotos para duas posições. Desta maneira, para melhor estimar estas frequências entre os SNPs foram realizadas análises de máxima verossimilhança, utilizando o algoritmo EM no programa EH (Terwilliger & Ott, 1994) que estima frequências haplotípicas a partir da inferência por probabilidade da ocorrência em fase de dois ou mais *loci*.

3.8.3- Estudo caso-controle

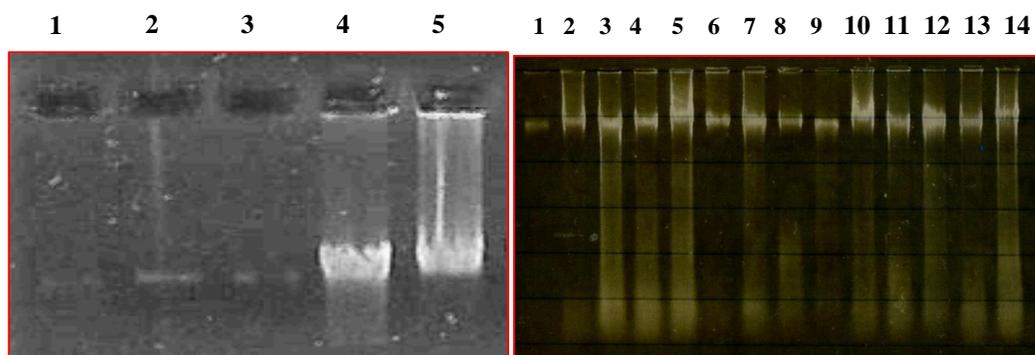
As comparações entre as distribuições genotípicas e alélicas entre pacientes e controles e entre os grupos de pacientes de diferentes desfechos clínicos foram realizadas, através dos modelos de regressão logística GLM, para genótipos e LRM, para alelos (do inglês “generalized regression model” e “logistic regression model”, respectivamente). Desta forma, todos os estudos comparativos foram realizados através de modelos de regressão logística, com cálculo de Odds Ratio (OR) com ajustes para a co-variável sexo, conforme descrito em Moraes e cols (2004). Todas as análises referentes a polimorfismos, tanto em isolado quanto formando haplótipos, foram realizadas com o auxílio do *software* para análises estatísticas, *The R Foundation for Statistical Computing*, versão 2.4.0 (Ihaka *et al.*, 1996; R Development Core Team, 2005).

As análises de GLM utilizam o homozigoto mais freqüente e alelo mais freqüente como *baseline* (base para comparação), ou seja, os valores de OR relativos de cada genótipo são obtidos pela comparação com o genótipo base, o mesmo acontecendo em outro modelo de GLM quando são comparados carreadores dos alelos mais freqüentes (*baselines*) *versus* carreadores dos alelos menos freqüentes. Entretanto, nas análises comparativas de frequências alélicas, feitas por LRM, são atribuídos pesos diferentes para os homozigotos (peso 1) e heterozigotos (peso 0,5).

4. Resultados

4.1. Pacientes e Amostras

Foram estudadas amostras de DNA extraídas como descrito em Pacientes e Métodos, obtidas de sangue total ou *swab* oral oriundas de 228 pacientes que apresentavam quadro clínico de sepse internados na UPG-IFF. Outros 44 pacientes também internados na UPG-IFF e 35 pacientes oriundos do Ambulatório de Cirurgia Eletiva-IFF, mas sem quadro clínico de sepse, constituíram o grupo controle (Figura 4.1 A). A extração de DNA da mucosa bucal (Figura 4.1 B) foi realizada quando os indivíduos apresentavam diferentes quadros de insuficiência respiratória e complicações clínicas associadas à sepse, tendo por isso sido submetidos a diversos procedimentos invasivos, inclusive transfusão sanguínea, o que contra-indicava a retirada de amostras de sangue para análise. Contudo, o DNA de pacientes não transfundidos foi extraído de sangue total (Figura 4.1 A). Os resultados de ambos os métodos de extração demonstram DNA de boa integridade para os procedimentos de genotipificação.



A **B**
 Figura 4.1- Perfil de amostras de DNA extraídas de sangue total e swab. Eletroforese em gel de agarose (1%) de DNA após coloração em solução de brometo de etídio 0.5 µg/mL e visualização por transiluminação por luz ultra-violeta A- 1 - 5 DNA extraído de sangue total de 5 diferentes pacientes. B- 1 - 14 DNA extraído de mucosa bucal de 14 diferentes pacientes.

4.2. Genotipificação dos pacientes

A presença dos polimorfismos analisados foi verificada através da metodologia de PCR-RFLP, com exceção do SNP TNF -863, que foi genotipado por PCR-ARMS. Foram utilizados iniciadores específicos que amplificavam fragmentos adjacentes ao SNP (como descrito em Pacientes e Métodos). Os fragmentos determinantes da presença de cada alelo polimórfico foram visualizados em eletroforese em gel de agarose. O padrão de bandas característico para o TNF -308 pode ser visualizado na figura 4.2, para o LTα +252 na

figura 4.3, para o TNF -863 na figura 4.4, para o CD14 -159 na figura 4.5 e para o MIF -173 na figura 4.6.

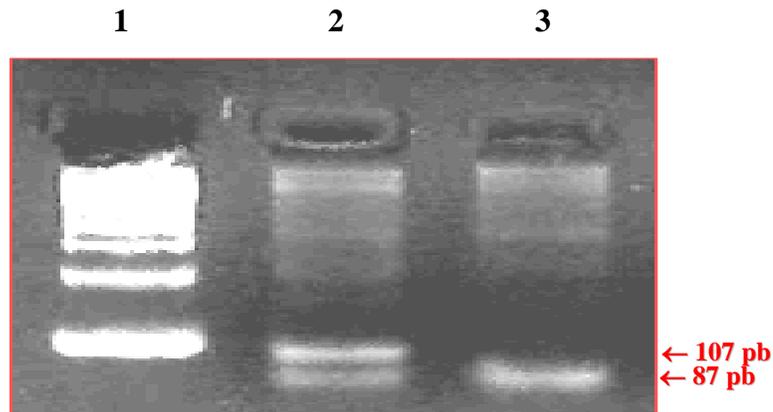


Figura 4.2: Determinação dos genótipos para a posição TNF -308 em gel de agarose 3,5% após coloração do DNA em solução de brometo de etídio 0.5 µg/mL. A digestão com enzima de restrição *NcoI*. 1- Marcadores de peso molecular de 123 pb; 2- exemplo de indivíduo heterozigoto GA; 3- exemplo de indivíduo homozigoto GG. O fragmento de 20 pb gerado após a digestão do homozigoto GG e do heterozigoto GA não é retido em gel de agarose nesta concentração.

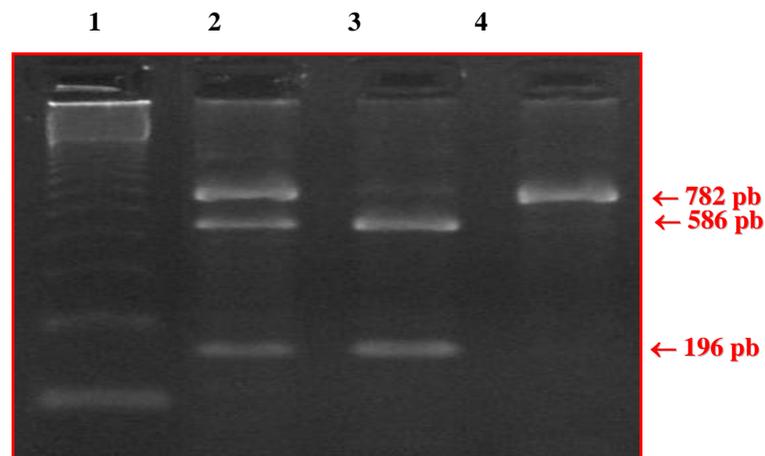


Figura 4.3: Determinação dos genótipos para a posição LTα +252 em gel de agarose 3,5% após coloração do DNA em solução de brometo de etídio 0.5 µg/mL. A digestão com enzima de restrição *NcoI*. 1- Marcadores de peso molecular de 123 pb; 2- exemplo de indivíduo heterozigoto GA; 3- exemplo de indivíduo homozigoto GG e 4- exemplo de indivíduo homozigoto AA.

1 2 3 4

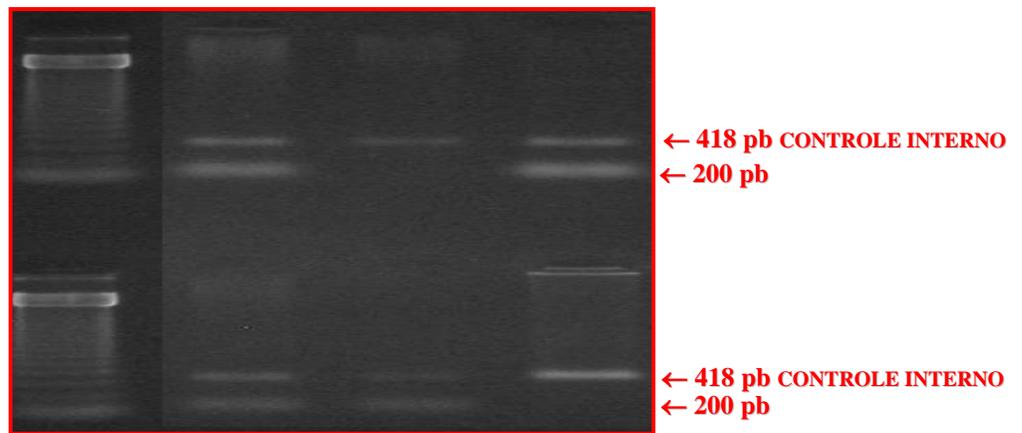


Figura 4.4: Determinação dos genótipos para a posição TNF -863 em gel de agarose 2,0% após coloração do DNA em solução de brometo de etídio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 1- Marcador de peso molecular de 123 pb; 2- exemplo de indivíduo heterozigoto CA; 3- exemplo de indivíduo homozigoto CC e 4- exemplo de indivíduo homozigoto AA.

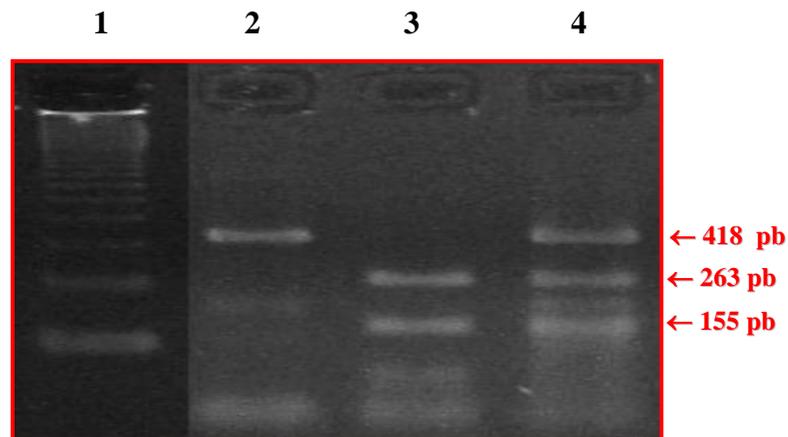


Figura 4.5: Determinação dos genótipos para a posição CD14 -159 em gel de agarose 3,5% após coloração do DNA em solução de brometo de etídio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A digestão com enzima de restrição *HaeIII*. 1- Marcador de peso molecular de 123 pb; 2- exemplo de indivíduo homozigoto TT; 3- exemplo de indivíduo homozigoto CC e 4- exemplo de indivíduo heterozigoto CT.

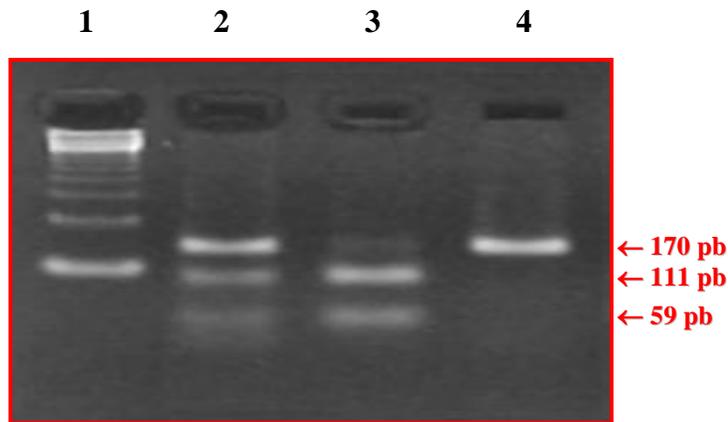


Figura 4.6: Determinação dos genótipos para a posição MIF-173 em gel de agarose 3,5% após coloração do DNA em solução de brometo de etídio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A digestão com enzima de restrição *AluI*. 1- Marcador de peso molecular de 123 pb; 2- exemplo de indivíduo heterozigoto CG; 3- exemplo de indivíduo homozigoto CC e 4- exemplo de indivíduo homozigoto TT.

4.3. Análise da distribuição das frequências genotípicas e alélicas nas populações estudadas

Os resultados obtidos após as genotipificações foram armazenados em planilhas do “software Microsoft Office Excel 2003” e posteriormente todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do “software” para análises estatísticas “R” versão 2.4.0, R Development Core Team, 2005). A distribuição das frequências alélicas e genotípicas dentre as diferentes populações de pacientes e controles, para cada um dos SNPs estudados podem visualizadas na Tabela 4.1. A análise de frequências realizadas para todos os *loci*, confirmou dados previamente descritos na literatura, em diferentes populações mundiais, com relação aos genótipos e alelos mais freqüentes.

Após o cálculo das frequências genotípicas e alélicas, o modelo estatístico do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi testado para cada um dos *loci*. A comparação entre a frequência genotípica observada e a esperada para o EHW foi realizado utilizando o teste comparativo do qui-quadrado. Desta forma, foi constatado que a população de pacientes estudada, ou seja, internados na UPG encontra-se dentro dos parâmetros estabelecidos para o EHW, em relação aos cinco *loci* estudados (G.L.: 1; $p > 0,05$). Da mesma maneira, a população total de controles (internados na UPG que não apresentavam quadro de sepse mais indivíduos saudáveis oriundos do Ambulatório de Cirurgias Eletivas) não apresentou desvio com relação ao modelo de EHW (G.L.: 1; $p > 0,05$). Esses achados permitiram, primariamente, inferir ausência de falhas com relação aos procedimentos utilizados para genotipificação. Entretanto, quando o grupo total de controles é separado em pacientes internados na UPG e que não apresentam sepse, e indivíduos saudáveis oriundos do

Ambulatório de Cirurgia Eletiva, esta última população apresenta desvio em relação ao EHW para o *locus* MIF -173 (G.L.: 1; p= 0,02771). Possivelmente, esse dado deve-se a um provável desvio amostral que se tornou mais evidente em função do reduzido número de indivíduos presentes nesta população, o que evidencia a necessidade da realização das análises para suscetibilidade *per se* utilizando somente dois grupos: pacientes com quadro clínico de sepse *versus* população total de controles, ou seja, qualquer indivíduo da presente população que não apresente quadro de sepse.

Também com relação à tabela 4.1, foram comparadas as frequências alélicas e genotípicas, através de modelos de regressão logística com e sem correção para sexo (GLM para genótipos e carreadores de alelos, e LRM para frequências alélicas), encontradas nos dois grupos de controles, para que fossem verificadas diferenças genéticas significativas entre esses dois grupos, o que poderia inviabilizar a formação de um grupo controle único. Desta forma, somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas no modelo GLM para comparação de frequências genotípicas, para o SNP MIF-173 (p= 0,012 com e sem correção para sexo) e, também, para o modelo de GLM para comparação da distribuição de carreadores de alelos (p= 0,0241 sem correção e p= 0,0204 quando corrigido para sexo). Também foi encontrada uma diferença “borderline” significativa para o SNP +252, somente no modelo GLM para carreadores de alelos quando este foi corrigido para sexo (p= 0,0473). Portanto, as análises de suscetibilidade a sepse *per se* utilizando um único grupo de controles (controles cirurgia + controles UPG) não foi inviabilizada para a maioria dos *loci* estudados.

Tabela 4.1- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas nas populações estudadas

SNP	Pacientes (%)	Controles Totais* (%)	Controles Cirurgia (%)	Controles UPG (%)
LTA + 252				
GG	42 (0,19)	8 (0,11)	3 (0,09)	5 (0,12)
GA	97 (0,43)	40 (0,54)	22 (0,67)	18 (0,44)
AA	87 (0,38)	26 (0,35)	8 (0,24)	18 (0,44)
TOTAL	226	74	33	41
G	0,4	0,38	0,42	0,34
A	0,6	0,62	0,58	0,66
TNF - 863				

	CC	129 (0,75)	35 (0,67)	12 (0,55)	23 (0,77)
	CA	39 (0,23)	16 (0,31)	9 (0,41)	7 (0,23)
	AA	4 (0,02)	1 (0,02)	1 (0,05)	0 (0,00)
TOTAL		172	52	22	30
	C	0,86	0,83	0,75	0,88
	A	0,14	0,17	0,25	0,12
TNF - 308					
	GG	177 (0,79)	63(0,84)	30 (0,88)	33 (0,80)
	GA	42 (0,19)	10(0,13)	4 (0,12)	6 (0,15)
	AA	4 (0,02)	2(0,03)	0 (0,00)	2 (0,05)
TOTAL		223	75	34	41
	G	0,89	0,91	0,94	0,88
	A	0,11	0,09	0,06	0,12
MIF - 173					
	GG	105 (0,54)	35 (0,54)	10 (0,37)	25 (0,66)
	GC	71 (0,37)	28 (0,43)	17 (0,63)	11 (0,29)
	CC	17 (0,09)	2 (0,03)	0 (0,00)	2 (0,05)
TOTAL		193	65	27	38
	G	0,73	0,75	0,69	0,8
	C	0,27	0,25	0,31	0,2
CD14 - 159					
	CC	87 (0,38)	27 (0,35)	13 (0,38)	14 (0,33)
	CT	99 (0,44)	42 (0,55)	19 (0,56)	23 (0,53)
	TT	40 (0,18)	8 (0,10)	2 (0,06)	6 (0,14)
TOTAL		226	77	34	43
	C	0,6	0,62	0,66	0,59
	T	0,4	0,38	0,34	0,41

**Controles cirurgia + controles UPG*

4.3.1. Avaliação das frequências genótípicas e alélicas para suscetibilidade a sepse per se

Com base também na distribuição dos dados presentes na tabela 4.1 e após as comparações realizadas entre os dois grupos de pacientes que não apresentavam quadro de sepse (controles totais), foram realizadas análises para verificar a associação das variantes genótípicas e alélicas com a suscetibilidade à doença. Nenhum dos genótipos ou alelos estudados apresentou-se estatisticamente associado ao desenvolvimento da sepse *per se* ($p>0,05$), quando avaliados todos os modelos de análises utilizados com e sem correção para sexo.

Entretanto, vale ressaltar que nas análises comparativas realizadas entre os dois grupos controles foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao SNP MIF -173. Neste intuito, para resguardar quaisquer equívocos com relação à utilização de análises somente com o grupo de controles totais, foram realizadas as mesmas análises entre o grupo de pacientes e cada grupo de controles separadamente. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre pacientes sépticos da UPG e pacientes também internados na UPG que não apresentaram quadro de sepse.

As análises foram repetidas entre os pacientes sépticos vindos da UPG e os não sépticos oriundos do Ambulatório de Cirurgia Eletiva- IFF, apresentando importantes achados. Através do modelo de GLM utilizando distribuição genotípica, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses dois grupos, quando analisado o SNP LTA +252 (p global = 0,035, com e sem correção para sexo). Particularmente, o genótipo GA encontra-se mais frequente no grupo de controles comparado aos pacientes ($p = 0,0395$ com OR: 0,4054 (0,1717 – 0,9575) sem correção para sexo; e $p = 0,0232$ com OR: 0,3627 (0,1511 – 0,8707) com correção para sexo, o que sugere proteção ao desenvolvimento da sepse em indivíduos possuidores do genótipo GA.

Resultados semelhantes foram observados para o SNP MIF -173, o qual apresentou diferenças genotípicas estatisticamente significativas (p global = 0,009). Os genótipos heterozigotos (GC) apresentaram frequência elevada no grupo de controles em relação aos pacientes $p = 0,0309$ com OR: 0,3978 (0,1722 – 0,9187) sem correção para sexo; e $p = 0,0254$ com OR: 0,3786 (0,1616 – 0,8873) com correção para sexo.

Da mesma forma, foi observado no modelo de GLM para carreadores de alelos quando analisado o SNP TNF -863, frequência elevada de carreadores do alelo A no grupo de pacientes $p = 0,0478$ com OR: 0,4 (0,1614 – 0,9912) sem correção para sexo. Contudo, estes resultados também devem ser analisados com cuidado em virtude do tamanho amostral do grupo controle. Além disso, quando a mesma análise foi realizada com correção para sexo os valores saíram da faixa de significância estatística $p = 0,0962$ com OR: 0,4567 (0,1814 – 1,1500).

4.3.2. Avaliação das frequências genótípicas e alélicas para severidade dentro da sepse pediátrica

Na tabela 4.2 encontra-se a distribuição dos genótipos para todos os SNPs de acordo com o nível da gravidade “Proportional Odds”, que compara as frequências genótípicas de um grupo com o seguinte, que apresenta nível de gravidade imediatamente superior. Este tipo de teste possibilita a observação de uma possível associação entre o nível de gravidade da doença e a presença de determinado genótipo. Sendo assim, após a realização das comparações não foi observada diferença estatisticamente significativa nas frequências genótípicas encontradas em cada grupo para nenhum dos SNPs estudados ($p > 0,05$).

Com o intuito de melhor avaliar a influência das variantes genéticas em estudo na expressão do quadro mais severo de sepse (choque séptico), os pacientes também foram divididos em dois grandes grupos: aqueles que apresentaram choque séptico e os que não apresentaram tal quadro clínico e, desta forma, foram analisados utilizando os modelos de regressão logística, já descritos nas análises de suscetibilidade *per se*. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genótípicas, alélicas e de carreadores entre os grupos de pacientes que apresentaram choque séptico e aqueles que não apresentaram ($p > 0,05$).

Tabela 4.2- Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com os níveis de gravidade

SNP	Genótipo	Níveis de gravidade da sepse						Total
		Sepse		Sepse Grave		Choque Séptico		
		Freq		Freq		Freq		
LTA +252	GG	8	0,20	21	0,22	11	0,14	216
	GA	17	0,43	39	0,41	36	0,45	
	AA	15	0,38	36	0,38	33	0,41	
		40		96		80		
TNF -863	CC	19	0,68	66	0,80	36	0,68	164
	CA	9	0,32	15	0,18	15	0,28	
	AA	0	0,00	2	0,02	2	0,04	
		28		83		53		
TNF -308	GG	31	0,79	77	0,79	62	0,81	213
	GA	7	0,18	17	0,18	15	0,19	
	AA	1	0,03	3	0,03	0	0,00	
		39		97		77		
MIF -173	GG	20	0,59	47	0,55	36	0,51	
	GC	10	0,29	32	0,38	27	0,39	
	CC	4	0,12	6	0,07	7	0,10	

		34		85		70		189
CD14 -159	CC	18	0,46	31	0,32	34	0,43	
	CT	16	0,41	44	0,45	36	0,45	
	TT	5	0,13	22	0,23	10	0,13	
		39		97		80		

Como já discutido, a severidade do quadro clínico, muitas vezes, relaciona-se com o comprometimento de sistemas importantes para a homeostasia do organismo. Nesse sentido, indubitavelmente, a classificação dos níveis de insuficiência respiratória são imprescindíveis para a descrição da severidade clínica do paciente. Desta forma, o pólo de maior gravidade respiratória é ocupado pela Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS), precedido pela Lesão Pulmonar Aguda (ALI) e, anteriormente, por todos os casos mais brandos.

A tabela 4.3 expõe a distribuição genotípica dos pacientes de acordo com a classificação quanto ao nível de insuficiência respiratória que possuem. Entretanto, com o intuito de aumentar o poder estatístico de análise e avaliar a influência mais fidedigna dos SNPs, aqui em estudo, no desenvolvimento mais grave de insuficiência respiratória, os pacientes foram divididos em dois grupos para análise: ARDS presente ou ARDS ausente. Com isso, após realizados de todas as análises realizadas pelos modelos de GLM e LRM, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição das frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos, com exceção do SNP TNF -863. Uma frequência elevada de carreadores do alelo -863A dentro do grupo de pacientes que desenvolveram ARDS foi observada. Esta diferença “borderline” estatisticamente $p = 0,0461$ com OR: 2,1141 (1,0129 – 4,4123) sem correção para sexo, varia após a correção para sexo, $p = 0,0584$ com OR: 2,0543 (0,9746 – 4,3301).

Tabela 4.3- Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com os níveis de insuficiência respiratória

SNP	Genótipo	Níveis de Insuficiência Respiratória				Total
		ARDS	Freq	Não ARDS	Freq	
LTA +252	GG	11	0,17	29	0,19	
	GA	25	0,39	67	0,44	
	AA	28	0,44	57	0,37	

		64		153		217
TNF -863	CC	30	0,64	92	0,78	
	CA	16	0,34	23	0,19	
	AA	1	0,02	3	0,03	
		47		118	165	
TNF -308	GG	53	0,85	118	0,78	
	GA	8	0,13	31	0,20	
	AA	1	0,02	3	0,02	
		62		152	214	
MIF -173	GG	31	0,55	72	0,54	
	GC	21	0,38	48	0,36	
	CC	4	0,07	13	0,10	
		56		133	189	
CD14 -159	CC	22	0,34	61	0,40	
	CT	32	0,50	65	0,42	
	TT	10	0,16	27	0,18	
		64		153	217	

Outra forma de mensurar e classificar clinicamente o nível de enfermidade do paciente é a estimativa do número de órgão e/ou sistemas em disfunção que, certamente, apresenta relação com o seu comprometimento clínico. Desta forma, a tabela 4.4 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com seu genótipo e o número de órgãos e/ou sistemas em disfunção, em uma faixa compreendida entre 0 a 6, inclusive. Contudo, a estratificação dos pacientes nessas categorias, definidas por esses dois parâmetros, dificulta qualquer tipo de análise comparativa. Sendo assim, todo o universo de pacientes que possuíam registro de dados para esses dois parâmetros foram subdivididos em dois grandes grupos baseados no número de órgãos e/ou sistemas em disfunção: de 0 a 3 e de 4 a 6.

A partir dessa subdivisão foram aplicados os modelos de análise baseados em GLM e LRM, os quais somente encontraram diferenças estatisticamente significativas para o SNP -863 (p global= 0,037). Estas análises mostraram que o genótipo CA estava aumentado no grupo de pacientes mais graves, ou seja, aqueles que apresentavam de 4 a 6 órgãos em disfunção $p = 0,0138$ com OR: 3,7742 (1,3116 – 10,8604) sem correção para sexo; e $p = 0,0269$ com OR: 1,2097 (1,1484 – 9,7862) com correção para sexo. Comportamento semelhante foi observado para carreadores do alelo -863A frequência mais elevada na faixa de pacientes mais graves $p = 0,0097$ com OR: 3,8713 (1,3875 – 10,8013) sem correção para

sexo; e $p = 0,0198$ com OR: 3,4451 (1,2175 – 9,7487) com correção para sexo. A significância não foi encontrada no modelo utilizando LRM $p = 0,0627$ com OR: 2,9842 e (0,9439 – 9,4352) sem correção para sexo; e $p = 0,0973$ com OR: 2,6809 (0,8357 – 8,6005) com correção para sexo.

Tabela 4.4- Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com o número de órgãos e/ou sistemas em disfunção

SNP	Genótipo	Número de órgãos em disfunção				Total
		0-3	Freq	4-6	Freq	
LTA +252	GG	37	0,2	3	0,1	
	GA	77	0,41	15	0,5	
	AA	73	0,39	12	0,4	
	Total	187		30		
TNF -863	CC	114	0,77	8	0,47	
	CA	31	0,21	8	0,47	
	AA	3	0,02	1	0,06	
	Total	148		17		
TNF -308	GG	147	0,8	24	0,8	
	GA	33	0,18	6	0,2	
	AA	4	0,02	0	0,0	
	Total	184		30		
MIF -173	GG	85	0,53	18	0,64	
	GC	63	0,39	6	0,22	
	CC	13	0,08	4	0,14	
	Total	161		28		
CD14 -159	CC	71	0,35	12	0,39	
	CT	85	0,42	12	0,39	
	TT	45	0,23	7	0,22	
	Total	201		31		

A tabela 4.5 mostra a distribuição genotípica dos pacientes de acordo com o desfecho clínico final, nesse caso, óbito ou alta. Entretanto, a análise realizada para avaliar a influência genética nesse parâmetro encontrou sérias limitações, visto que seu poder estatístico foi diminuído em função do baixo número de pacientes que evoluíram a óbito (menos de 10% do total de pacientes acometidos, comparado mais de 30% descrito na literatura internacional) (Papadakos, 2004; Cohen, 2002). Os resultados obtidos, em sua maioria, foram não significativos. A única exceção foi observada no modelo de GLM comparando-se frequências genotípicas (p global= 0,0478, com e sem correção para sexo) geradas pelo SNP MIF -173.

Tabela 4.5- Distribuição genotípica dos pacientes de acordo com o desfecho clínico final evolução clínica

desfecho clínico final

SNP	Genótipo	Alta	Freq	Óbito	Freq	Total
LTA +252	GG	34	0,17	6	0,30	
	GA	86	0,44	5	0,25	
	AA	75	0,38	9	0,45	
		195		20		
TNF -863	CC	113	0,75	9	0,64	
	CA	33	0,22	5	0,36	
	AA	4	0,03	0	0,00	
		150		14		
TNF -308	GG	155	0,80	15	0,79	
	GA	35	0,18	3	0,16	
	AA	3	0,02	1	0,05	
		193		19		
MIF -173	GG	98	0,57	5	0,29	
	GC	59	0,35	9	0,53	
	CC	14	0,08	3	0,18	
		171		17		
CD14 -159	CC	75	0,38	8	0,42	
	CT	87	0,44	8	0,42	
	TT	34	0,17	3	0,16	
		196		19		

4.4. Análise da distribuição das frequências haplotípicas para o *locus* *tnf* nas populações estudadas

A tabela 4.6 mostra a estimativa das frequências haplotípicas para o *locus* do TNF, utilizando os três (SNP de LT α e TNF combinados) ou os dois SNPs do *locus* TNF (+252 e -308), através do pacote estatístico “Haplostats” do software para análises estatísticas “R”, versão 2.4.0. Tais estimativas, entretanto, foram realizadas com o maior número possível de indivíduos, visto que nem todos os pacientes tiveram seus genótipos determinados para os 3 *loci* do TNF. Sendo assim, para os haplótipos com 3 SNPs foram utilizados 162 pacientes e 51 controles (30 oriundos da UPG e 21 da Cirurgia Eletiva); e os haplótipos com 2 SNPs utilizaram 212 pacientes e 71 controles (39 oriundos da UPG e 32 da Cirurgia Eletiva). As frequências mais elevadas foram encontradas para os haplótipos formados pelos alelos mais frequentes em cada posição, estes foram utilizados como base para comparação dos modelos de GLM.

Tabela 4.6- Estimativa das frequências haplotípicas para o *locus* TNF nas populações estudadas

SNPs	Haplótipos	Totais	Frequências Estimadas	
			Controles Gerais	Pacientes
308/863/252	AAG	0	0	0,0001
	ACA	0,00474	0,02206	NA
	ACG	0,10389	0,07101	0,11412
	GAA	0,13231	0,14627	0,12672
	GAG	0,01269	0,02763	0,00971
	GCA	0,46964	0,45635	0,47352
	GCG	0,27673	0,27668	0,27593
308/252	AA	0,00457	0,02116	NA
	AG	0,10397	0,07191	0,11403
	GA	0,6018	0,60267	0,60024
	GG	0,28965	0,30427	0,28573

4.4.1. Avaliação das frequências haplotípicas do *locus* para suscetibilidade a sepse *per se*

As frequências presentes na tabela 4.6 foi utilizada para análises comparativas entre pacientes e controles totais, com a finalidade de avaliar a associação de haplótipos com a suscetibilidade a sepse *per se*. Sendo assim, as análises de GLM com e sem correção para sexo, utilizando as frequências haplotípicas estimadas para o grupo de pacientes e de controles totais não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Com isso, os presentes dados sugerem que nenhum dos haplótipos encontrados no presente estudo para o *locus* do TNF, está associado a suscetibilidade ou proteção a sepse.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estrutura das análises estatísticas e a avaliação da suscetibilidade a sepse *per se*

Um dos principais desafios desta recém-chegada era Pós-Genômica é desenvolver metodologias que permitam o melhor entendimento das informações genéticas individuais de herança complexa principalmente aquelas relacionadas à resposta a processos patogênicos. Segundo Burton e colaboradores (2005) a extensa informação obtida a respeito do genoma humano pode ser utilizada em estudos de epidemiologia genética. Uma vez que se sabe que duas versões de um gene potencialmente associado ao desenvolvimento de uma característica podem estar presentes em um indivíduo, a procura de uma associação entre variantes genéticas e a doença de interesse não são fundamentalmente diferentes de uma exploração de uma associação doença-exposição vista na epidemiologia tradicional (Burton *et al.*, 2005). Os resultados deste trabalho foram obtidos em um modelo de estudo vastamente utilizado em estudos genéticos de associação. Os estudos de associação basearam-se na comparação entre as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas em determinados *loci* de uma população de pacientes e seu grupo controle pareado.

O presente estudo permitiu a observação da distribuição das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas (no caso do *locus* do TNF) de polimorfismos localizados nas posições +252 LT α , -863 e -308 do gene TNF, -173 do MIF e do -159 do CD14 em uma população brasileira (na área metropolitana do Rio de Janeiro) de pacientes pediátricos com e sem quadro clínico de sepse; e em controles saudáveis. Além disso, trata-se de um estudo em Genética Epidemiológica do tipo caso-controle baseado em populações. As comparações entre os grupos permitiram a avaliação de uma possível suscetibilidade à sepse *per se* conferida por tais SNPs, assim como, a influência dos mesmos na heterogeneidade das apresentações clínicas da doença dentro do grupo de pacientes sépticos.

Em estudos de associação para a investigação de suscetibilidade a doença *per se* dessa natureza, para cada população de pacientes que se pretende estudar deve-se utilizar uma população controle com perfeito pareamento de características. Neste estudo, o grupo controle foi selecionado a partir de crianças dentro da mesma faixa etária e que não apresentem quadro clínico de sepse. Entretanto, o número amostral em tal grupo não foi o ideal. Além disso, o número de meninos no grupo de controles era proporcionalmente maior do que nos pacientes, principalmente, quando observados os indivíduos do grupo controle arrematado no ambulatório de cirurgia eletiva. Desta forma, com a finalidade de superar tal deficiência, todas as análises estatísticas presentes neste trabalho foram realizadas com e sem correção para sexo, o que trouxe maior confiabilidade aos resultados.

Para estudos caso-controle que usam controles independentes, as ferramentas analíticas disponíveis para a epidemiologia clássica podem também ser utilizadas em estudos genéticos dessa mesma natureza. Os modelos de regressão logística são mais apropriados para muitas análises, na tentativa de inferir a associação

entre genótipos ou alelos de SNPs com uma determinada doença (Moraes *et al.*, 2006). Recentemente, um método que combine os modelos lineares generalizados (GLM) com o algoritmo de estimativas de Máxima Verossimilhança (EM) foi proposto (Schaid *et al.*, 2002), no qual um *escore* estatístico é usado para i) inferir a associação de haplótipos de fase ambígua; ii) fazer um estudo de associação, e, iii) incluir co-variáveis no modelo (Schaid *et al.*, 2002 e Moraes *et al.*, 2006). A utilização de tais modelos diminui a possibilidade de ocorrência de análises múltiplas, o que tornaria necessária a utilização de ferramentas de correção. Este foi um importante aspecto para empregá-los no presente trabalho, para SNPs individuais e para haplótipos.

Moraes *et al.*, 2006 sugerem que uma característica chave que deve ser assegurada em estudos genéticos de associação é o cálculo de um tamanho de amostra apropriado. O tamanho amostral não deve ser pequeno ao ponto de não permitir a execução de testes com poder suficiente para detectar uma diferença clínica significativa; nem deve ser maior do que o necessário para fornecer o poder adequado para testar o fenômeno que está sendo estudado, para evitar o desperdício de tempo e de recursos. O tamanho de amostra, no entanto, depende de diversos fatores: o poder desejado, a probabilidade de erro do tipo I, o valor da diferença a ser testado e a variação da variável a ser estudada na população-fonte. Simulações em programas estatísticos adequados ajudam a encontrar um tamanho de amostra apropriado. Grandes tamanhos de amostra são requeridos para detectar diferenças sutis, sugerindo que muitos dos estudos já realizados na sepse apresentam baixo poder estatístico (Moraes *et al.*, 2006). Embora não tenhamos feito esses cálculos a priori, baseados em dados de literatura, conclui-se que o tamanho amostral presente tanto no grupo de pacientes quanto no grupo de controles, principalmente, não permite que os dados aqui apresentados demonstrem um poder estatístico alto. Entretanto, cálculos ad hoc podem ser feitos com as frequências encontradas para se definir o poder com os resultados deste trabalho (Stüber *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000 e Majetsckak *et al.*, 2002). O reflexo estatístico dessa deficiência na amostragem, no presente estudo, pode ser visualizado quando observados valores significativos, porém *borderlines* ou quando os intervalos de confiança das ORs obtidas são grandes.

Com vistas à manutenção de um poder estatístico minimamente satisfatório, análises utilizando dados combinados, que tenderiam a diminuir ainda mais o número amostral e gerar resultados inconclusivos, não foram realizados. Por exemplo, uma análise multivariada envolvendo alelos em diferentes *loci* gênicos poderia mostrar melhor o efeito da influência conjunta dessas variações (que possuem baixa penetrância) na suscetibilidade à sepse *per se* e na expressão do fenótipo final da doença. Uma análise comparativa das frequências estimadas para os haplótipos do *TNF* dentro de grupo de pacientes com os desfechos clínicos poderia ser bastante informativo para o entendimento das bases genéticas do hospedeiro na severidade da sepse. Entretanto, nenhuma delas pôde ser realizada porque uma série de genotipagens em pacientes diferentes não funcionou e com isso a combinação de dados incompletos diminuiria muito o número de amostras passíveis de serem testadas.

O número amostral excessivamente baixo presente em alguns grupos (principalmente os dois grupos controles separados e o grupo de pacientes que foi a óbito), comprometeu as análises que utilizavam tais dados do *TNF*. Com esta ressalva, no entanto, os genótipos LTA +252 GA e o MIF-173 GC, assim como o alelo -863A, pareceram proteger contra o desenvolvimento da sepse *per se* quando comparamos o grupo de pacientes sépticos com o de pacientes não sépticos oriundos do Ambulatório de Cirurgia Eletiva- IFF. Entretanto, a sugestão de uma possível proteção ao desenvolvimento da doença conferida pelo genótipo MIF-173 GC deve ser analisada de maneira cautelosa visto que, esse grupo de controles apresenta número bastante reduzido de indivíduos e também demonstrou desvio em relação ao modelo do EHW; o que pode ser reflexo de desvios amostrais obtidos aleatoriamente.

Trabalhos da literatura ainda não demonstraram associação dos SNPs aqui estudados com a suscetibilidade a sepse *per se*. Merece destaque um estudo realizado em uma população francesa, utilizando indivíduos saudáveis e pacientes com quadro de choque séptico internados em UTI de diversas instituições de saúde do país, que encontrou uma forte associação do alelo *TNF* -308A com suscetibilidade ao choque séptico e morte, uma vez presente o quadro da doença (Mira *et al.*, 1999). Da mesma forma, um outro estudo norte-americano, mais recente, com neonatos de baixo peso submetidos à ventilação mecânica também concluiu que o mesmo alelo não afeta o desenvolvimento da sepse, mas pode aumentar o risco de morte após o estabelecimento da doença (Hedberg *et al.*, 2004). Esses resultados são compatíveis com os dados obtidos no presente trabalho, quando foram comparados pacientes e controles totais que não apontaram diferenças estatisticamente significativas, ou seja, nenhuma das variantes genéticas (genótipos, alelos e haplótipos) aqui estudadas parece estar relacionada à suscetibilidade ou proteção a sepse.

A presença de associação baseada na comparação de dois grupos deve sempre considerar necessária a obediência ao modelo do EHW. Este modelo é bastante utilizado para caracterização da dinâmica dos genes em estudos de genética de populações. Segundo Beiguelman (1994), o que torna possível explicar o processo evolutivo dos seres vivos em termos mendelianos é justamente a desobediência a este modelo teórico. Após as populações se beneficiarem de fatores evolutivos (mutação, seleção natural, fluxo gênico de populações migrantes e deriva genética), elas buscam um novo equilíbrio genético, a fim de manter a estabilidade das frequências genotípicas. Em consequência disso, em grandes populações vivendo em um ambiente relativamente estável, não sujeitas a migrações intensas, nem apresentando alta taxa de casamentos consanguíneos, é de se prever que, durante um intervalo de tempo relativamente longo, que a maioria das características hereditárias que não servem para estimular cruzamentos preferenciais deve estar em EHW, ou se aproximar dele. As taxas de mutação são sabidamente muito baixas e a pressão de seleção atua, geralmente, de modo muito lento. Apesar de a lei ser baseada em um modelo teórico, ela descreve suficientemente bem o

que ocorre com grande número de genótipos em populações reais, pelo menos em um determinado intervalo de tempo. Evidentemente, quando não se consegue demonstrar que uma população está em EHW, deve-se investigar as causas desse desvio dentre os fatores evolutivos e o efeito de casamentos preferenciais. Contudo, no modelo de estudo aqui apresentado, a ausência da condição de equilíbrio deve significar presença de desvios amostrais ou falhas ocorridas durante os procedimentos de genotipagem. Além disso, em função da condição de equilíbrio em que se encontram as populações, é possível sugerir a inexistência de estratificação, ou mesmo, que este grupo em estudo não se encontra incluído em processos seletivos para a fixação de nenhum dos alelos em estudo. Desta forma, é importante a constatação da condição de EHW nas populações no momento da análise para descartar os problemas descritos acima, o que pode inviabilizar a aceitação de dados significativos. É o caso dos resultados obtidos no presente trabalho com relação ao LTA +252 GA, MIF-173 GC e o alelo -863A e sua ação protetora ao desenvolvimento da sepse.

Baseado nessa mesma preocupação, Németh e colaboradores (2004) analisaram vários trabalhos, publicados entre 1999 e 2003 em uma importante revista de terapia intensiva, quanto a presença e cálculos corretos para o EHW. Estes estudos investigavam a influência de diferentes variantes genéticas no desenvolvimento e na severidade de quadros clínicos frequentes em unidades de terapia intensiva, a maior parte deles associada à sepse. Os autores observaram que alguns trabalhos não reportavam desvios com relação ao EHW ou apresentavam cálculos equivocados. Tal achado mostra que alguns dos dados obtidos em estudos genéticos na sepse publicados até o momento devem ser analisados com ressalvas. Por isso, o presente trabalho também procurou explorar resultados obtidos pela comparação de frequências de SNPs que não apresentavam desvio quanto ao EHW nas populações de estudo.

Outro fator importante que deve ser considerado em estudos dessa natureza é a arregimentação do grupo controle. Para Cardon e Bell (2001), a seleção deste grupo é crucial para evitar confundimentos. Qualquer diferença sistemática encontrada nas frequências alélicas entre pacientes e controles pode sugerir associação com doença, mesmo quando estes somente refletem a história evolutiva e migratória, diferenças entre gêneros, cruzamentos preferenciais e outros processos independentes. Em alguns casos, quando são observadas diferenças nas frequências alélicas entre pacientes e controles, a evidência resultante pode ser altamente significativa, porém não relacionada com a real influência do alelo sob investigação. Segundo Cordell & Clayton (2005) uma maneira plausível de evitar este problema é medir a associação em uma população extremamente miscigenada. Na impossibilidade desse recurso, qualquer estratificação e efeitos de miscigenação poderiam ser reduzidos combinando-se (no desenho experimental ou na análise, ou em ambos) pela região geográfica e por quaisquer marcadores da origem étnica. Desse modo, as comparações podem ser feitas, considerados certos limites, dentro das subpopulações homogêneas.

Entretanto, na população brasileira, as origens étnicas distintas e altamente miscigenadas dificultam uma estratificação baseada em características morfológicas (Parra *et al.*, 2003). Estudos anteriores, utilizando marcadores moleculares no cromossomo Y e no DNA mitocondrial, já demonstraram a inexistência de grupos

étnicos perfeitamente diferenciáveis, possuindo estes uma natureza trihíbrida, com origens ameríndias, européias e africanas (Pena *et al.*, 2000). Desta forma, qualquer estudo referente à população brasileira deve considerar um alto grau de mestiçagem, estando os alelos, em sua maioria, igualmente distribuídos em razão da inexistência de grupos separados, o que justifica a ausência de separação de grupos étnicos no presente estudo. Além disso, a distribuição em subpopulações para a realização de análises de tipo diminuiria ainda mais o poder estatístico do trabalho.

O desenho e as análises devem levar em consideração a estratificação populacional, muitas vezes críptica, que pode inflacionar os resultados estatísticos. Uma estratégia que pode ser empregada é o uso do método analítico utilizado para controlar as taxas de falsos positivos que é o controle genômico (CG). A utilização de CG é bastante conveniente quando um número modesto de genes candidatos é avaliado e *loci* suplementares são incluídos para controle (Devlin *et al.*, 2004; Mira *et al.*, 2004). Nenhuma forma de estratificação populacional foi utilizada nesse estudo, contudo a utilização de controles genômicos indubitavelmente contribuiria para a verificação de associações mais fidedignas. Mais uma vez, o número amostral reduzido dificultou esse tipo de análise.

5.2. A Influência das variantes genéticas na severidade da sepse

Outro aspecto importante a ser analisado em estudos de genética epidemiológica é a influência das variações pontuais no desenvolvimento do quadro clínico da doença. Muitos trabalhos em sepse têm demonstrado que SNPs do hospedeiro podem estar associados a dados evolutivos importantes para o curso da doença, como por exemplo: desenvolvimento de quadros mais brandos ou agudos de insuficiência respiratória (ARDS), tipo de sepse desenvolvida e predisposição ao choque séptico, número de órgãos em disfunção e óbito (Arcaroli *et al.*, 2005).

Os SNPs melhor estudados na sepse são aqueles localizados na posições +252 e -308 no *locus* do TNF. A influência destes na atividade transcricional do gene do TNF tem sido sugerida em muitos estudos, porém os resultados ainda são controversos (Stüber *et al.*, 1995; Louis *et al.*, 1998; Kroeger *et al.*, 2000 e 1997; Majetschak *et al.*, 2002; de Jong *et al.*, 2002 e Baseggio *et al.*, 2004). Da mesma forma, estes polimorfismos têm sido associados ao desenvolvimento de desfechos clínicos na sepse, como risco aumentado de choque séptico e morte. Contudo, os dados epidemiológicos também são contraditórios. Também deve-se considerar que alguns dos trabalhos que encontraram associação significativa apresentavam um tamanho amostral muito reduzido (Stüber *et al.*, 1995; Mira *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2002; Majetschak *et al.*, 2002; Hedberg *et al.*, 2004).

Como foi apresentado, a maior parte dos estudos demonstra a importância de tais polimorfismos no desenvolvimento de determinados quadros clínicos na sepse. Entretanto, observando os presentes dados foi possível afirmar que os SNPs LTA+252 (n= 216) e TNF -308 (n=213) não estão associados ao desenvolvimento de choque séptico nem de nenhuma forma de sepse em particular (sepse “simples”, sepse grave além de choque séptico). Da mesma forma, não parecem influenciar o desenvolvimento de ARDS (n= 217 para +252 e n= 214 para -308) nem das formas mais graves de DMOS, ou seja, a partir de 4 órgãos em disfunção (n= 217 para +252 e n= 214 para -308). É importante ressaltar, que esses resultados foram provenientes de populações com tamanhos amostrais superiores aos descritos na literatura.

O polimorfismo TNF -863 (C/A) parece exercer uma importante influência na atividade transcricional do gene. Skoog e colaboradores (1999) demonstraram, através de análises por EMSA e constructos com genes repórteres em células U937, HepG2 e monócitos humanos, que o fator transcricional que se liga à região promotora do TNF compreendida entre os nucleotídeos -876 e -845, reduz sua ligação em presença do alelo -863A. Também menores níveis séricos da citocina foram encontrados em carreadores do alelo -863A em relação ao alelo mais freqüente (-863C). Baseado neste achado e considerando que os pacientes com os quadros mais graves da doença apresentam níveis mais elevados da citocina, o alelo -863A deveria estar associado à proteção ao desenvolvimento de formas mais severas de insuficiência respiratória e DMOS, o que não foi observado no presente estudo. Apesar de sua importância funcional ter sido observada em vários trabalhos, nenhum estudo ainda conseguiu demonstrar sua associação com a gravidade da sepse pediátrica.

Foi observado no presente trabalho que existe uma freqüência elevada de possuidores do genótipo -863 CA no grupo de pacientes com falência em um maior número de órgãos. Esta mesma associação provavelmente não foi observada para o genótipo -863 AA porque a freqüência do mesmo no grupo de pacientes é demasiadamente baixo, o que dificulta as análises estatísticas. De uma maneira geral o alelo -863A parece estar associado às formas mais graves de sepse. Carreadores desse alelo apresentam duas vezes mais chances de desenvolver ARDS. Da mesma forma, o conjunto de resultados também sugere fortemente que os carreadores do alelo -863A possuem um risco três vezes mais elevado de pertencerem ao grupo de pacientes que apresentam um número maior de órgãos em disfunção. |

A freqüência relativamente mais elevada do alelo C na população de pacientes menos graves pode refletir, dentre outros fatores, uma vantagem adaptativa em relação à resistência imunológica a infecções modulada pela produção elevada de TNF. Neste contexto, a hipótese aventada por Netea e colaboradores (2003) para explicar os prognósticos mais severos apresenta outro ponto de vista. O foco relativo a esta hipótese se mantém na produção de citocinas pró-inflamatórias na resposta imunológica da sepse. Para estes autores, os pacientes que possuem maior risco de desenvolvimento de quadros mais severos de sepse e morte são aqueles que possuem uma produção baixa e/ou insuficiente de citocinas na resposta imuno-inflamatória inicial. Esta resposta inicial não consegue controlar a proliferação dos microrganismos, o que provoca uma

resposta inflamatória secundária exacerbada, culminando em efeitos deletérios ao organismo. A partir deste ponto vista os marcadores moleculares para os prognósticos mais graves seriam invertidos, ou seja, o alelo -863A (baixo produtor) poderia ser de risco.

Contudo, trabalhos mais recentes demonstram que talvez a regulação da expressão gênica do TNF, influenciada pelo SNP -863, seja dependente do tipo celular. Estudos mais recentes buscaram elucidar o mecanismo no qual este SNP participa. Este polimorfismo afeta a afinidade de ligação ao gene dos dímeros que participam do complexo NFκB. Usando ensaios com genes repórteres em adenovírus, Udalova *et al.* (2000) encontraram que a variante -863A liga-se ao dímero p50-p50 resultando, na redução da expressão de genes induzíveis por LPS em monócitos primários humanos. Esses achados incorporam-se como fortes evidências experimentais de que p50-p50 pode inibir os efeitos transativadores do p50-p65. Ilustram, também, o potencial para a modulação da expressão gênica do processo inflamatório humano através de sutis alterações de nucleotídeos que alteram as afinidades de ligação relativas das diferentes apresentações do complexo NFκB. Este estudo foi realizado em células COS-7 e mostram que a habilidade de ligar p50-p50 reduz o efeito “enhancer” deste local de ligação ao NFκB. No entanto, Skoog e colaboradores 2006 utilizando células THP-1 e macrófagos primários humanos, mostraram que os dois complexos p50-p50 e p50-p65 ligam-se às duas variantes alélicas (alelos -863 A ou C), enquanto que o alelo -863 A somente permite a ligação do complexo p50-p65.

Como observado, a influência funcional deste SNP ainda não foi completamente elucidada. Desta forma, a confirmação dos presentes dados significativos deve ainda ser realizada através de diferentes metodologias. Ensaios funcionais devem ser repetidos, principalmente fazendo a dosagem do TNF em pacientes sépticos dessa população. Outra forma de confirmação dos dados epidemiológicos é a replicação do estudo utilizando outras amostras dessa mesma população.

Os presentes dados permitem ainda sugerir que os fatores seletivos que poderiam estar contribuindo para a alteração das frequências observadas nos marcadores genéticos associados à expressão do TNF devem atuar de forma independente para cada uma das posições. Isto é incompatível com os achados de Ackerman e colaboradores (2003), que analisaram vários polimorfismos no promotor (incluindo -308 e -863) e na região codificante do TNF. Revelaram se tratar de um *locus* haplotipicamente diversificado, onde a presença de marcadores (SNPs) está fracamente associada entre si, apesar da frequência diferenciada de determinados haplótipos, o que se relaciona com os alelos mais frequentes somente.

O fator de diferenciação de macrófagos CD14 fora aventado como um importante candidato para estudos genéticos na sepse principalmente por ser ligante de LPS e induzir a resposta inflamatória via NFκB. Alguns estudos observaram associação funcional do SNP CD14 -159 (C/T), assim como, sua influência nas taxas de mortalidade e choque séptico (Baldini *et al.*, 1999 e Gibot *et al.*, 2002). Os resultados aqui

apresentados para este SNP não corroboram estas associações, ou seja, nenhum dos genótipos e das formas alélicas geradas por esse SNP sugeriam risco aumentado de desenvolvimento de nenhum dos desfechos clínicos analisados. Vale ressaltar que pode existir um importante viés na literatura com relação às publicações dessa área, visto que trabalhos que apresentam resultados com associações significativas são mais valorizados.

A citocina MIF tem sido apontada como um importante fator participante da fisiopatologia da sepse. O polimorfismo situado na posição -173 (G/C) do gene do MIF parece influenciar a expressão gênica e, conseqüentemente, alguns estudos têm observado sua associação com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, principalmente artrite reumatóide (Renner *et al.*, 2005). Entretanto, nenhum trabalho ainda foi realizado para investigar sua influência deste SNP na suscetibilidade e/ou na severidade a sepse.

Embora preliminares, os dados aqui apresentados sugerem que este SNP poderia ser alvo de estudos genéticos mais aprofundados na sepse, utilizando populações diferentes e ensaios funcionais. O presente estudo não observou associação entre nenhum dos genótipos e alelos gerados por este SNP e o desenvolvimento de choque séptico, nem com alguma forma intermediária de sepse. Também não foi detectada associação com o desenvolvimento de ARDS e um número mais elevado de órgãos em disfunção (entre 4 e 6). Entretanto, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição de genótipos e carreadores do alelo -173C entre os grupos entre pacientes que evoluíram a óbito ou alta. Porém, em função do baixo número amostral, o resultado pode ter sido superestimado durante as análises. Isto é coerente com a impossibilidade de estimar a OR, que está contida em um intervalo de confiança que compreende de 0 ao infinito.

A utilização das metodologias de obtenção e análise de resultados aqui descritos permitiu que fossem gerados importantes dados sobre a genética da sepse pediátrica, além de gerar novas perspectivas. A melhor compreensão da fisiopatologia da sepse no nível molecular poderá ser melhor elucidada com a investigação de um maior número de genes candidatos, como outras citocinas e/ou receptores envolvidos na modulação da resposta imunológica da sepse. O conhecimento mais aprofundado do comportamento das variantes genéticas em pacientes sépticos pode contribuir para elaboração de protocolos de tratamentos mais específicos e eficazes.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados aqui apresentados sugerem que os SNPs LTA+252, TNF-308, TNF-863, MIF-173 e CD14-159 não estão associados a suscetibilidade a sepse pediátrica *per se* nesta população.
- Apesar da necessidade de estudos confirmatórios o SNP TNF-863 parece se comportar como um importante marcador genético para a severidade da sepse pediátrica neste grupo de pacientes.
- Os resultados das análises para o SNP MIF -173 sugerem que este deve ser um importante alvo em futuros estudos genéticos na sepse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman H, Usen S, Mott R, Richardson A, Joof FS, Katundu P, Taylor T, Ward R, Molyneux M, Pinder M, Kwiatkowski DP. Haplotypic analysis of the TNF locus by association efficiency and entropy. **Genome Biology**. 2003 4(4): R24.

[Ahrens P](#), [Kattner E](#), [Kohler B](#), [Hartel C](#), [Seidenberg J](#), [Segeer H](#), [Genetic Factors in Neonatology Study Group](#), et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. **Pediatr Res**. 2004 Apr;55(4):652-6.

Alcais A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol**. 2005 Feb;17(1):44-8.

Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. **Shock**. 2005. Oct;24(4):300-12.

Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 1999 May;20(5):976-83.

Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. **J Med Genet**. 2004 Nov;41(11): 808-13.

Barton A, Lamb R, Symmons D, Silman A, Thomson W, Worthington J, Donn R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism is associated with susceptibility to but not severity of inflammatory polyarthritis. **Genes Immun**. 2003 Oct; 4(7): 487-91.

Baseggio L, Bartholin L, Chantome A, Charlot C, Rimokht R, Salles G. Allele specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumor necrosis factor-alpha promoter. **Eur J Immunol**. 2004; 31: 15-19.

Bayley J-P, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes Immun.** 2004; 5(5): 315-329.

Bayley JP, Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TWJ, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF- α promoter. **CYTOKINE.** 2001; 14(6): 316- 323.

Beiguelman, B. **Dinâmica dos Genes Nas Famílias e Nas Populações.** 2 ed. Ribeirão Preto: Editora da Sociedade Brasileira de Genética; 1994. 472 pp.

Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. **Crit Care Med.** 1992 Jun;20(6):724-6.

Bozza FA, Gomes RN, Japiassu AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. **Shock.** 2004 Oct; 22(4):309-13.

Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. **J Exp Med.** 1999 Jan 18;189(2):341-6.

Brookes AJ. The essence of SNPs. **GENE.** 1999; 234: 177-186.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. [Lancet.](#) 2005 Sep 10-16; 366(9489):941-51.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. **Nat Med.** 2000 Feb; 6(2): 164-70

Calandra T, Froidevaux C, Martin C, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis. **J Infect Dis.** 2003 Jun 15; 87 Suppl 2: S385-90.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat Rev Immunol.** 2003 Oct; 3(10): 791-800.

Calvano JE, Um JY, Agnese DM, Hahm SJ, Kumar A, Coyle SM, Calvano SE, Lowry SF. Influence of the TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms upon infectious risk and outcome in surgical intensive care patients. **Surg Infect (Larchmt).** 2003 Summer; 4(2): 163-9.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. **Nat Rev Genet.** 2001; 2: 91-99.

Cheung VG, Spielman RS. The genetics of variation in gene expression. **Nat Genet.** 2002; supp 32: 522-525.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature.** 2002; 420: 885 - 891.

Cooke GS, Hill AVS. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet.** 2001; 21: 967-977.

Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. **Lancet.** 2005 Sep 24-30; 366(9491): 1121-31.

De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, Lunt M, Thomson W, Ravelli A, Donn R, Martini A; British Paediatric Rheumatology Study Group. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum.** 2003 May; 48(5): 1398-407.

de Jong BA, Westendorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. **Genes Immun.** 2002 Feb;3(1):25-9.

de la Fontaine L, Schwarz M, Plischke H, Kleindienst N, Gruber R. Lack of association of the CD14/C-159T polymorphism with susceptibility and serological activity parameters of rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol.** 2006 Jan-Feb; 35(1): 20-2.

[Deitch EA](#). Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**. 1998 Jan; 9(1): 1-11.

Devlin B, Bacanu SA, Roeder K. Genomic Control to the extreme. **Nat Genet**. 2004 Nov; 36(11):1129-30.

Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, Zeggini E, Lunt M, Stevens A, Shelley E, Lamb R, Ollier WE, Thomson W, Ray D; British Paediatric Rheumatology Study Group. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum**. 2002 Sep; 46(9): 2402-9.

Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis Rheum**. 2001 Aug; 44(8): 1782-5.

Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. **Nat Med**. 1997 Mar; 3(3): 320-3

Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. **N Engl J Med**. 1996 Jun 27; 334(26): 1697-702.

[Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L.](#) Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. **Crit Care Med.** 2002 May; 30(5): 969-73.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. **Kuby Immunologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2002. xxvii + 662 pp.

Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor α -308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. **Pediatr Infect Dis.** 2004 J; 23: 424-428.

[Heesen M, Bloemeke B, Schade U, Obertacke U, Majetschak M.](#) The -260 C-->T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. **Intensive Care Med.** 2002 Aug; 28(8): 1161-3.

Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: Association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. **Crit Care Med.** 2003 Jan; 31(1): 211-4.

Heumann D. & Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clin Chim Acta.** 2002; 323(1-2): 59-72.

Hill AVS. Immunogenetics and genomics. **Lancet.** 2001; 357: 2037- 2041.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med.** 2003 Jan 9; 348(2): 138-50.

[Hotchkiss RS, Nicholson DW.](#) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nat Rev Immunol.** 2006 Nov; 6(11): 813-22.

Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, Mutius E, Bein G. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. **Allergy.** 2004 May; 59(5): 520-5.

Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. **Clinical Science**. 2003; 104: 493- 501.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immun**.1997; 34(5): 391-399.

Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. **CYTOKINE**. 2000; 12(2): 110-119.

Lacroix J, Cotting J; for the Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators (PALISI) Network. Severity of illness and organ dysfunction scoring in children. **Pediatr Crit Care Med**. 2005 May; 6(3 Suppl): S126-34.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, International Human Genome Sequencing Consortium., et al. . Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. 2001 Feb 15; 409(6822): 860-921.

Lee JD, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, Ulevitch RJ. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **J Exp Med**. 1992 Jun 1; 175(6): 1697-705.

LeVan, T. D.; Bloom, J. W.; Bailey, T. J.; Karp, C. L.; Halonen, M.; Martinez, F. D.; Vercelli, D. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. **J. Immun**. 2001; 167: 5838-5844.

Liang XH, Cheung W, Heng CK, Liu JJ, Li CW, Lim B, Wang de Y. CD14 promoter polymorphisms have no functional significance and are not associated with atopic phenotypes. **Pharmacogenet Genomics**. 2006 Apr; 16(4): 229-36.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Loius R, Belaiche J. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol**.1998; 113: 401-406.

Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B, Heesen M. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2002 Nov; 9(6): 1205-11.

Martin TR. MIF mediation of sepsis. **Nat Med.** 2000 Feb; 6(2): 140-1.

Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with Septic Shock susceptibility and mortality. **JAMA.** 1999; 282(6): 561-568.

Mira MT, Alcaïs A, VanThuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH, Phuong MC, Huong NT, Ba NN, Khoa PX, Sarno EN, Alter A, Monpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Doré C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van de Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* e *PACRG*. **Nature.** 2004; 427(6975): 636-640.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev.** 2006 Sep; 77(3): 189-202.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Huizinga TW, Sarno EN. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun.** 2004 Nov; 5(7): 592-5.

Moraes, M. O. **Biologia Molecular na Prática Médica e Biológica.** 1. ed. Rio de Janeiro: Núcleo de produção Editorial Aquarius NADC Fundação Bio-Rio, 2003. v. 1. 150 p.

Németh E, Vasarhelyi B, Gyorffy B, Kocsis I. Unreported deviations of genotype distributions from Hardy-Weinberg equilibrium in articles published in Critical Care Medicine between 1999 and 2003. **Crit Care Med.** 2004 Jun; 32(6): 1431-3.

Netea MG, van der Mer JWM, van Deuren M, Kullberg, BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis síndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trend Immun.** 2003; 24 (5): 254-258.

Nohara H, Okayama N, Inoue N, Koike Y, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Higaki S, Yanai H, Yoshida T, Hibi T, Okita K, Hinoda Y. Association of the -173 G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis. [J Gastroenterol.](#) 2004; 39(3): 242-6

Papadakos PJ, Haitsma JJ. The tomb markers of the ICU. **CHEST.** 2004; 125(6): 1980-1982.

Paralkar V, Wistow G. Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Genomics.** 1994 Jan 1; 19(1): 48-51.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003; 100(1): 177-82.

Pena SD. **Homo brasiliis.** 1 ed. Riberão Preto, São Paulo: Funpec Editora. 2002. 192 pp.

Primose, **S. B. Princípios de análise do genoma: um guia para mapeamento e sequenciamento de DNA de diferentes organismos.** 2. ed. Ribeirão Preto, SP: Funpec Editora. 2003. v. 1. 193 pp.

Quirico-Santos, T. ; Kubelka, C. ; Cruz, A. M. ; Lannes-Vieira, J. ; Moraes, M. O. . Tropical infectious diseases. In: Koen Vandebroek. (Org.). **Cytokine Gene Polymorphisms in Multifactorial Conditions.** 1 ed. Boca Raton: CRC LLC Press, 2006, v. 28, p. 413-429.

[Rauchschwalbe SK](#), [Masezick T](#), [Mittelkotter U](#), [Schluter B](#), [Patzig C](#), [Thiede A](#), [Reith HB](#). Effect of the LT-alpha (+250 G/A) polymorphism on markers of inflammation and clinical outcome in critically ill patients. [J Trauma.](#) 2004 Apr; 56(4): 815-22

Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. **Crit Care Med.** 2002 Oct; 30(10): 2216-21.

Renner P, Roger T, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. **Clin Infect Dis.** 2005 Nov 15; 41 Suppl 7: S513-9.

[Rothstein JL, Schreiber H.](#) Relationship of tumour necrosis factor and endotoxin to macrophage cytotoxicity, haemorrhagic necrosis and lethal shock. **Ciba Found Symp.** 1987; 131: 124-39.

[Rothstein JL, Schreiber H.](#) Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1988 Jan; 85(2): 607-11.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** 2002 Dec 1; 186(11): 1687-91.

Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM & Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. **Am J Hum Genet.** 2002; 70: 425-434.

Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. **Res Immunol.** 1992 Jan; 143(1): 11-5.

Segal S, Hill AVS 2003. Genetic susceptibility to infectious disease. **Trends Microbiol.** 2003 Sep; 11(9): 445-8.

Skoog T, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific chromatin remodeling of the tumor necrosis factor-alpha promoter. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006 Dec 22; 351(3): 777-83.

Skoog T, Hooft FMV, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (C->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. **Hum Mol Gen.** 1999; 8(8): 1443-1449.

Sole-Cava, A. M. Biodiversidade Molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R.. (Org.). **Biologia Molecular e Evolução.** São Paulo: Holos, 2001, v. , p. 171-192.

[Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW.](#) Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. **N Engl J Med.** 1988 Mar 24; 318(12): 727-32.

Stracham T & Read AP. **Human Molecular Genetics.** 3 ed. Editora Garland Science. 2003. New York, 674pp.

Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. **Crit Care Med.** 1996 Mar; 24(3):381-4.

Stüber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, Nedospasov SA. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. **J Inflamm.** 1995-1996; 46(1): 42-50.

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 Mar; 33(3): 638-44.

Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, Lui WY, Chiu JH, Lee TY. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. **Crit Care Med.** 2000; 28(8): 2733-6.

Terwilliger JD and Ott J. Linkage disequilibrium between alleles at marker loci In: **Handbook of human genetics linkage**. The John Hopkins University Press Baltimore and London. 1994, pp 188-193.

[Tracey KJ](#), [Cerami A](#). Metabolic responses to cachectin/TNF: A brief review. **Ann N Y Acad Sci**. 1990; 587: 325-31.

Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, Kwiatkowski D. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. **Mol Cell Biol**. 2000 Dec; 20(24): 9113-9.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**. 1995; 13: 437-57.

Weiss KM & Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends Genet**. 2002 Jan; 18(1): 19-24.

Westendorp RGJ, Langermans JAM, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbrouke JP. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**. 1997 Jan 18; 349(9046): 170-3.

Wheeler DS, Wong HR. The impact of molecular biology on the practice of pediatric critical care medicine. **Pediatr Crit Care Med**. 2001 Oct; 2(4): 299-310.

Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. **J Inflamm**. 1995; 45(1): 1-12.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Res**. 2001 Sep 1; 29(17): E88-8.

[Zeni F](#), [Freeman B](#), [Natanson C](#). Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. **Crit Care Med**. 1997 Jul; 25(7): 1095-100.

Zhang DL, Zheng HM, Yu BJ, Jiang ZW, Li JS. Association of polymorphisms of IL and CD14 genes with acute severe pancreatitis and septic shock. **World J Gastroenterol.** 2005 Jul 28; 11(28): 4409-13.