
FERNANDA CARREGARO

Estudo de polimorfismos genéticos na susceptibilidade e na resposta à sepse

Dissertação apresentada a Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
para a obtenção de título de mestre em
Biotecnologia Aplicada à Farmácia

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Farmácia
Orientador: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

RIBEIRÃO PRETO
2008

RESUMO

CARREGARO, F. **Estudo de polimorfismos genéticos na susceptibilidade e na resposta à sepse.** 2008. 105f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

Polimorfismos em genes codificando proteínas envolvidas no reconhecimento de microrganismos e na resposta imune contra patógenos podem influenciar na quantidade ou na função da proteína produzida em resposta ao estímulo bacteriano. Existem evidências de que alguns destes polimorfismos genéticos modificam a resposta do paciente à sepse. No presente estudo, foram estudados polimorfismos presentes em genes que, sabidamente ou supostamente, apresentam um efeito biológico importante na sepse com o objetivo de identificar marcadores associados com a sepse e com a evolução clínica favorável ou com a morte. Entre esses polimorfismos estão aqueles presentes nos genes *TNF α* , *TNFB*, *IL1RN*, *HSP70*, *IL6*, *IL10*, *CD14*, *TLR4*, *TLR2*. As técnicas utilizadas compreenderam PCR em tempo real usando sondas com marcação fluorescente (VIC e FAM), PCR usual, digestão com enzimas de restrição e eletroforese. Os 97 pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico estudados foram tratados na UTI do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Também foram estudadas amostras de 207 indivíduos saudáveis coletadas no Hemocentro do mesmo hospital. Os polimorfismos *IL6-597*, *HSP70-2* e o haplótipo do gene *IL6* apresentaram valores estatisticamente significativos. Os dados obtidos sugerem que os polimorfismos *IL6-597* e o haplótipo *IL6 -174/-1753/-2954/-597* estão associados com a evolução clínica da sepse, enquanto o polimorfismo do gene *HSP70* está associado com bacteremia. A associação de polimorfismos em pacientes com sepse deverá ser avaliada em um maior número de pacientes no Brasil para ampliar nosso conhecimento sobre variantes genéticas e seus efeitos no curso clínico da sepse. Associações de polimorfismos com sepse e susceptibilidade a infecção podem ser no futuro utilizadas como marcadores moleculares para prognóstico.

Palavras-chave: Citocinas, resposta, polimorfismos, interleucina, sepse, susceptibilidade

ABSTRACT

CARREGARO, F. **Study of genetic polymorphisms in the susceptibility and in the response to sepsis.** 2008. 105p. (Master's Degree Dissertation). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

Polymorphisms in genes codifying proteins involved in the recognition of microorganisms and in the answer of pathogens can influence the amount or the function of the protein produced in response to bacterial incentive. There are evidences that some of these genetic polymorphisms modify the patient's answer to sepsis. In the present study, we studied polymorphisms present in genes that, knowingly or supposedly, has an important biological effect in sepsis with the objective of identifying markers associated with sepsis and with the favorable clinical evolution or with the death. Among those polymorphisms they are those presents in the genes *TNF α* , *TNF β* , *IL1RN*, *HSP70*, *IL6*, *IL10*, *CD14*, *TLR4*, *TLR2*. The used techniques were Real time PCR using fluorescent probes (VIC and FAM), PCR, digestion with restriction enzymes and electrophoresis. The 97 patients with sepsis, severe sepsis and septic shock studied were those treated in INTENSIVE CARE UNIT of the Base's Hospital of Sao Jose do Rio Preto. And 207 healthy individuals' samples were collected in Hemocentro of the same hospital. The polymorphisms of the genes *IL6-597*, *HSP70-2* and the haplotype of the gene *IL6* presented estatistical significant values. The polymorphism *IL6-597* and the haplotype *IL6 - 174/-1753/-2954/-597* can be associated with the clinical evolution of sepsis, while the polymorphism of the gene *HSP 70* can be associated with bacteremia. The association of polymorphisms in patients with sepsis will have to be evaluated in bigger samples of patients in Brazil to extend our knowledge on genetic variants and its effect in the clinical course of sepsis. Associations of polymorphisms with sepsis and susceptibility to infection can be in the future used as molecular marker for prognostic.

Key-words: cytokines; outcome; polymorphisms; interleukin; sepsis; susceptibility.



I- INTRODUÇÃO



O organismo humano está sujeito a invasões por microrganismos constantemente, o que pode causar uma infecção letal. Entretanto, a habilidade do sistema imune em combater estes microrganismos é de suma importância para a sobrevivência. O papel dos fatores genéticos na determinação da susceptibilidade a infecções tem se tornado mais evidente pelo fato de que certas pessoas parecem ser mais predispostas ou não a certa infecção (TEXEREAU et al., 2005).

Os mecanismos da resposta inflamatória sistêmica causada por uma infecção levam a alta taxa de mortalidade, correspondendo à primeira causa de óbito em unidades de terapia intensiva. A união de sinais e sintomas decorrentes de uma inflamação sistêmica secundária a um processo infeccioso com presença de microrganismo, confirmado ou suspeito, é denominada sepse (SILVA; VELASCO, 2007; KING, 2007)

Em estudos prévios, a sepse era associada com infecções causadas por bactérias gram-negativas, mas dados recentes internacionais mostram que na grande maioria dos casos ocorrem por gram-negativos e positivos. Em apenas alguns casos estão associados com fungos, incluindo *Candida*, que possui uma taxa de mortalidade de 40% (KING, 2007; BOCHUD et al., 2004).

Mesmo com o grande progresso em estudos visando melhorar a sobrevivência dos pacientes, os resultados do tratamento da sepse continuam sendo desalentadores. Há quatro fatores primários que representam dificuldades potenciais envolvendo o uso de modificadores da resposta biológica em pacientes com sepse. Inicialmente, a resposta fisiológica no paciente estressado é complexa, não permitindo uma única intervenção. Segundo, a população é heterogênea e fatores importantes, como idade, co-morbidade, natureza da lesão original e a presença ou ausência de lesão simultânea podem modular a eficácia de uma terapia

específica. Terceiro, a duração da intervenção terapêutica é difícil de ser padronizada, levando a resultados diferentes, pois os processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios ocorrem paralelamente. Quarto, a presença de polimorfismos genéticos na população em geral tem identificado subgrupos de indivíduos que respondem diferentemente ao mesmo estresse (MINNICH; MOLDAWER, 2004).

1.1. Definição dos estados de infecção

Segundo a *Consensus Conference do American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (1992), *sepse* é a resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso, *sepse grave* corresponde à presença de disfunção orgânica secundária à sepse e, por fim, *choque séptico* é definido como instabilidade cardiovascular que requer vasopressores. SIRS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica) trata-se de um conjunto de sinais e sintomas que traduz a reação do organismo à presença da infecção (Silva, 2006). Os termos síndrome séptica e septicemia são também utilizados em algumas publicações, o que pode confundir o leitor quando da análise de dados epidemiológicos, levando à observação de diferentes taxas de ocorrência e de mortalidade. A utilização correta dos termos que definem sepse, bem como a avaliação do paciente durante toda a internação é importante por que o mesmo paciente pode, ao longo de sua internação, evoluir para diferentes estágios da mesma doença, desde sepse até choque séptico.

As definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico podem ajudar numa possível evolução linear no quadro clínico dos pacientes, iniciando com SIRS e evoluindo até choque séptico (SILVA; VELASCO, 2007). A transição de sepse

grave para choque séptico é acompanhada por uma desregulação entre o sistema de fornecimento de oxigênio e a demanda, na qual resulta em vários graus de déficit de perfusão (hipoxia tecidual global), incluindo o choque circulatório (RIVERS et al., 2007). Na prática, porém, é muito difícil identificar essa progressão. Além disso, não é possível prever qual paciente desenvolverá choque séptico ou não, o que dificulta a identificação do diagnóstico de cada paciente (SILVA; VELASCO, 2007).

A dificuldade de confirmar um estado de sepse reflete diretamente na demora da compreensão dos fenômenos subjacentes (SILVA; VELASCO, 2007). Entre outras razões, a falha tem sido atribuída a modelos animais que não reproduzem adequadamente o processo fisiopatológico em humanos (VENET et al., 2007). De fato, estudos clínicos são mais complexos devido não só a dificuldade de isolar o agente etiológico devido ao uso de antibióticos, mas a diversos fatores, como sexo, idade, nutrição e co-morbidades associadas (SILVA; VELASCO, 2007; VENET et al., 2007).

1.2. Impacto Econômico da Sepse

A sepse vem aumentando em frequência à medida que a população envelhece e que mais cirurgias e procedimentos invasivos são realizados. A maior sobrevivência de pacientes pode causar maior risco de desenvolver sepse. Estima-se que no Brasil sejam diagnosticados anualmente cerca de 400.000 novos casos de sepse grave e 17% dos leitos de terapia intensiva sejam ocupados por estes pacientes (ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA, 2007).

Embora a taxa de mortalidade na sepse venha declinando, ainda continua extremamente elevada. Isso se deve a alguns fatores como o de ser complexa e de reconhecimento freqüentemente tardio e muitas vezes por um tratamento inapropriado. Estima-se que cerca de 17 bilhões de reais sejam gastos, anualmente, no tratamento destes pacientes. Desta maneira, torna-se necessário obter maior conhecimento para que seja possível desenvolver melhores estratégias de intervenção nas unidades de terapia intensiva (ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA, 2007).

1.3. Genética e Fisiopatologia da Sepse

Estudos genéticos e epidemiológicos sugerem uma forte influência genética na resposta a sepse. Acredita-se que a desregulação do sistema imune tenha um papel central para que a sepse se desencadeie, sendo assim, estudos genéticos enfocam genes envolvidos na cascata de coagulação e inflamação. Polimorfismos com troca de uma única base nitrogenada (SNPs) que ocorre ao longo de todo o genoma, incluindo regiões promotoras, gênicas ou intergênicas, podem alterar a expressão ou função de produtos gênicos (JESSEN et al., 2007; SUFFREDINI; CHANOCK, 2006).

A cascata de inflamação e ativação do sistema de coagulação associados com a deficiente fibrinólise leva a alterações na circulação microvascular podendo ocasionar disfunção orgânica, sepse grave, síndrome de disfunção múltipla de órgãos e até morte (SCHLICHTING; MCCOLLAM, 2007). Tal cascata pode ser estimulada por invasão de microrganismos (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003), e começa quando, na resposta a infecção, o sistema imune inato é ativado pelo

reconhecimento de substâncias estranhas denominadas Padrões Moleculares Associados à Patógenos (Pamps) (SCHLICHTING; MCCOLLAM, 2007).

Os Pamps são produtos derivados existentes em bactérias patógenas, não patógenas e comensais. Eles incluem moléculas de superfície, tais como endotoxinas (em geral, LPS) e motivos internos que são liberados durante a lise da bactéria (*Heat Shock Proteins*-HSPs e fragmentos de DNA) (ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2007). Os Pamps são reconhecidos pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), que estão presentes em células do sistema imune inato e agem como sensores, e as reconhecem como sinais de perigo exógeno, como exemplo, o *CD14* (Cluster of Differentiation-14) e os *toll-like receptors* (TLRs) (SILVA; VELASCO, 2007). Os PRRs desencadeiam uma via de sinalização intracelular que estimula os macrófagos a secretar citocinas inflamatórias (SCHLICHTING; MCCOLLAM, 2007).

Citocinas são proteínas que agem de diversas formas, podendo ativar a própria célula que a produziu, assim como outras células. Seus efeitos incluem indução de proliferação, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular, com ação sobre diferentes tipos celulares (SILVA; VELASCO, 2007).

Durante a lesão a célula produz citocinas pro-inflamatórias (por exemplo, $TNF\alpha$, $TNF\beta$, IL1 e IL6) e anti-inflamatórias (por exemplo, IL10, IL1RN, IL4, IL13). Citocinas pro-inflamatórias estimulam um aumento de neutrófilos que se aderem ao endotélio e aumentam a produção de óxido nítrico (NO). Neutrófilos podem causar danos aos tecidos quando interagem com moléculas intermediárias reativas de oxigênio (ROS). Quando ROS se associam com o NO resultam na formação de peroxinitrito, que contribui para o aumento do dano celular (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

Para controlar a resposta pro-inflamatória, a produção de uma série de moléculas imunorregulatórias, conhecidas como citocinas anti-inflamatórias, são ativadas e funcionam como um inibidor específico de citocinas pro-inflamatórias. Em geral, tais citocinas protegem o hospedeiro da resposta inflamatória sistêmica induzida por toxinas, mas deixa-o mais suscetível a diversos tipos de infecções (SILVA; VELASCO, 2007).

O desequilíbrio entre fatores de defesa do hospedeiro e fatores de virulência da bactéria, comum no ambiente hospitalar, em razão da terapia invasiva e do uso de antimicrobianos, pode propiciar o surgimento de um processo infeccioso. Seguida a interação do microrganismo invasor e o hospedeiro, há a ativação da resposta imune inata envolvendo tanto componentes celulares quanto humorais (VILLAR et al., 2004).

A interação de lipopolissacarídeos presentes em bactérias gram-negativas com receptores TLR4 acoplados com o CD14, e de peptidoglicanos presentes em bactérias gram-positivas com receptores TLR2, resulta na ativação do sistema imune inato, seguida da ativação do fator de transcrição NF- κ B (SRISKANDAN; ALTMANN, 2008; TEXEREAU et al., 2005; SATURNINO; ANDRADE; 2007; LEAVER et al, 2007).

O NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição que modula a expressão de mediadores imunoregulatórios envolvidos na resposta inflamatória aguda, estimulando a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, sintases de óxido nítrico e componentes do sistema complemento (SILVA; VELASCO, 2007; ABRAHAM, 2005). Quando produzidas em grandes quantidades na sepse, essas citocinas pro-inflamatórias ativam fagócitos em todo o organismo, culminando em uma inflamação sistêmica (SILVA; VELASCO, 2007).

Para impedir danos de estresse oxidativo e do excesso de inflamação, e para manter o equilíbrio do sistema imune, ocorre a ativação da transcrição de genes com função citoprotetora (por exemplo, o HSP70) e de genes anti-inflamatórios, que irão estimular uma redução da produção de citocinas pro-inflamatórias (Figura 3) (SILVA; VELASCO, 2007).

A imunidade pode se dividir em dois tipos: a resposta inata em que participam defensas, fagócitos, a resposta *toll-like* e citocinas; e a imunidade adaptativa em que participam linfócitos T e B e células NK (Natural Killer). A barreira mecânica, a imunidade celular e humoral que são importantes para o organismo podem ser quebradas por sondas e cateteres usados em métodos de diagnóstico e terapêutico (ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA, 2007). Além disso, o desenvolvimento clínico da infecção sofre efeito também de fatores ambientais que incluem algumas características da superfície do cateter, formação de biofilme, trombose, composição do sangue e a resposta imunológica (SHANKS et al., 2006).

1.4. Polimorfismos Genéticos e Sepses

Diferenças genéticas entre indivíduos podem afetar a probabilidade desses desenvolverem sepsis ou a subsequente melhora em relação à sobrevivência (CLARK; BAUDOIN, 2006; VILLAR et al., 2004). Conseqüentemente, variações genéticas ou mutações que interferem na função do sistema imune de identificar microrganismos poderiam explicar a habilidade do mesmo na resposta a uma infecção, na diversidade da apresentação clínica da sepsis, na resposta a certo tratamento médico e na predisposição genética de cada indivíduo (VILLAR et al., 2004; GAO et al., 2007).

Muitos pesquisadores têm utilizado a detecção da presença de SNPs para avaliar o risco de desenvolver sepse. A estimativa do número total de SNPs em todo o genoma humano é mais de 10 milhões, mas apenas uma pequena porcentagem (2-3%) é conhecida por alterar a função ou a expressão gênica. O estudo de SNPs em genes associados a fisiopatologia e a patogenia de doenças é muito importante, pois a variação nesses genes pode predispor a susceptibilidade ou proteção (SUFFREDINI; CHANOCK, 2006; LIN; ALBERTSON, 2004; CLARK; BAUDOUIN, 2006).

Outra abordagem para estudar SNPs é em forma de haplótipos. Haplótipos são grupos de SNPs que estão em desequilíbrio de ligação dentro de um gene ou segmento de DNA e que são herdados como uma unidade (SUTHERLAND et al., 2005a). Como exemplo, o haplótipo G/A/A no gene beta-fibrinogênio está associado com baixa mortalidade e baixa disfunção orgânica em pacientes sépticos (MANOCHA et al., 2007).

Polimorfismos em antígenos leucocitários humanos (HLA) estão associados com a susceptibilidade à infecção. Esses polimorfismos presentes em genes que influenciam a resposta inflamatória são fortes candidatos como determinantes genéticos da susceptibilidade a sepse e ao choque séptico (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

A inflamação e a coagulação estão intimamente relacionadas com as moléculas produzidas, como citocinas, tornando assim importante o estudo dos polimorfismos genéticos que podem ser a chave para o entendimento da susceptibilidade genética à sepse (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

TNF α

O TNF α (fator de necrose tumoral α) tem um papel importante na patogênese da resposta inflamatória aguda, e estudos mostram relação do alto nível de TNF α com a gravidade da sepse (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003). Além de induzir a expressão das moléculas de adesão no endotélio vascular dentro das áreas infectadas, o TNF α também induz as células endoteliais a produzir moléculas como o fator ativador plaquetário, que pode desencadear a coagulação do sangue e o bloqueio dos vasos sanguíneos locais. Isso restringe o vazamento do plasma do sangue e impede os patógenos de entrar no sangue e disseminar a infecção pelo corpo. Porém nos casos em que a infecção se dissemina no sangue, as próprias ações do TNF α que contêm a infecção local tão efetivamente podem tornar-se catastróficas (PARHAM, 2001).

O TNF α produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e linfócitos T, é a primeira citocina liberada em resposta a endotoxina, atingindo níveis séricos máximos uma a duas horas após a infusão de LPS. O TNF α pode induzir a liberação de IL1, IL6, IL8, IL10, antagonista de receptor de IL1 (IL1RN) e receptor de TNF solúvel (TNFR solúvel) (SILVA; VELASCO, 2007).

O loco gênico do *TNF α* está posicionado próximo ao *TNF β* . O SNP na região -308 parece ter uma significância funcional por afetar a regulação do *TNF α* em nível transcricional (Malleo et al., 2007). Tal polimorfismo presente na região promotora consiste de um G (*TNF α -308G*) no alelo mais freqüente e um A (*TNF α -308 A*) no alelo incomum (selvagem), o que pode modificar sua expressão gênica (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003). O alelo *TNF α -308 A*, revisto por Malleo e

colaboradores (2007), é considerado como um potente ativador de transcrição (o que resulta em níveis elevados de TNF α), e está correlacionado com alta taxa de morbidade e mortalidade em muitas doenças inflamatórias e auto-imunes, e inclusive em choque séptico.

TNF β

O TNF β é produzido e liberado por linfócitos. O polimorfismo do *TNF β* existente na posição 252 no primeiro intron do gene consiste de G (*TNF β - 252G*) num alelo e de A (*TNF β - 252 A*) no outro alelo. Indivíduos homocigotos AA para *TNF β* secretam níveis altos de TNF α em resposta à sepse. Estudos *in vitro* confirmam a associação deste polimorfismo com elevada secreção de TNF α em resposta à endotoxina (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

Estudos *in vitro* com monócitos estimulados por LPS demonstraram que homocigotos AA tiveram maior produção de TNF α e IL1 em comparação com heterocigotos e homocigotos GG. O genótipo AA tem sido correlacionado com muitas doenças auto-imunes, como lúpus eritematoso (RAUCHSCHWALBE et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2005; FUGGER et al., 1989)

A detecção da homocigose para o genótipo *TNF β -252 AA* pode ser uma ferramenta útil para avaliar pacientes com alto risco para desenvolver a sepse. Esta estratégia pode identificar pacientes que podem se beneficiar do tratamento anti-TNF, sendo este um excelente marcador para o desenvolvimento de uma terapia direcionada (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

IL1RN

A IL1 é uma importante citocina pro-inflamatória, que aumenta a concentração de plaquetas no plasma, prostaglandinas e NO. Estes são potentes vasodilatadores e induzem choque séptico (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003). Outro gene candidato para sepse e choque séptico é o antagonista do receptor de IL1 (*IL1RN*). Este gene está localizado no cromossomo 2 como parte do complexo gênico do *IL1*. Um polimorfismo no intron 2 é causado por um número variável de repetições *in tandem* (VNTR) de 86 pb. Neste sítio polimórfico foram encontrados cinco diferentes alelos, mas apenas o alelo 1, consistindo de quatro cópias da seqüência (*IL1RN1*) e o alelo 2, consistindo de duas repetições (*IL1RN2*), são os mais comuns na população (KAPETANOVIC et al., 2007).

O alelo *IL1RN2*, revisto por Holmes, Russell e Walley (2003), ocorre com uma freqüência alta em pacientes com sepse severa comparada com indivíduos normais, sendo assim, um excelente marcador genético como fator de risco para a sepse.

Estudos identificaram grupos com homozigose para o alelo *TNF β -252 A* e para o alelo *IL1RN2* com uma taxa de 100% de mortalidade para a sepse, o que sugere uma interação importantíssima de *TNF α* e *IL1RN* (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

IL-10

A interleucina 10 (IL10) é um potente anti-inflamatório endógeno importante na regulação da homeostase do sistema imune (WATTANATHUM et al., 2005;

NIETERS et al., 2006). Esta citocina é predominantemente produzida pelas células T- auxiliares. Sua produção é desencadeada pelo TNF e endotoxinas, causando uma redução na regulação de citocinas pró - inflamatórias (em geral, interferon γ , TNF) e prevenindo apoptose (HÖRNER et al., 2007; GARNACHO-MONTERO et al., 2006).

A IL10 diminui a produção de IL1, IL6 e TNF α pelos monócitos. Mudança nos níveis sérico de IL10 indica pouca melhora em pacientes com SIRS (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003). Foram encontrados três SNPs na região promotora, nas seguintes posições: -1082 G/A, -819T/C e -592 A/C (ZHANG et al., 2005). Os polimorfismos da região promotora, *IL10-592 A* e *IL10-819 T* estão associados com a baixa produção de IL10 e uma melhor resposta à terapia com interferon- γ em hepatite C (Holmes; Russell; Walley, 2003). Garnacho-montero e colaboradores mostraram que pacientes homocigotos GG do polimorfismo na região -1082 possuem grande risco de desenvolver o choque séptico, mas não foi encontrada nenhuma relação do polimorfismo com a mortalidade. O alelo A do SNP da região -1082 está associado com uma diminuição da produção de IL10 (Wattanathum et al., 2005).

Helminen e colaboradores (2001) encontraram que a susceptibilidade a infecção com o vírus Epstein-Barr está associado não somente com o alelo A do polimorfismo *IL10-1082*, mas também com o haplótipo -1082A/-819C/-592C. Outra pesquisa que reforça os dados acima (WATTANATHUM et.al, 2005) mostra que o haplótipo (-592C/-734G/-3367G) é equivalente ao da pesquisa anterior e que está significativamente associado com o aumento da mortalidade em pacientes que tiveram sepse a partir de uma pneumonia.

TLR 4

O receptor de membrana 4 (TLR 4 – *toll-like receptor 4*) é o principal receptor de lipopolissacarídeos (LPS), e parece ser essencial na ativação da resposta imune inata induzida por LPS. Quando o LPS se liga a proteínas ligantes de LPS (LPB) e ao *CD14*, seguido por um acoplamento do TLR 4, forma um complexo que inicia uma cascata de sinalização, resultando na inflamação sistêmica mediada por monócitos e macrófagos (MICHEL et al., 2003); incluindo a produção de citocinas (tais como, TNF α , IL1, IL6 e IL8) e quimiocinas, o que estimula a liberação de metabólitos do ácido araquidônico e a geração de ROS e Nitrogênio (SCHMITT et al., 2002).

Estudos sugerem que a sinalização alterada via TLR4 tem um papel central na resistência bacteriana tanto quanto para o desenvolvimento de sepse e choque séptico (INGALLS et al., 2000; LORENZ et. al, 2002). O TLR4 é uma proteína transmembrana que inicia uma cascata de sinalização que estimula a resposta inata do sistema imune a endotoxina (BARBER et al., 2006).

A frequência do polimorfismo no loco *TLR4* (Asp299Gly) parece influenciar a incidência de infecções de gram-negativos em pacientes cirúrgicos, e pacientes com choque séptico (KUMPF et al., 2006). A transição de adenina para guanina (A \rightarrow G) no nucleotídeo 896 do RNA mensageiro do *TLR4* humano que ocorre no domínio extracelular da proteína *TLR4* resulta na substituição de asparagina por glicina no resíduo do aminoácido 299 (Asp299Gly). Portadores do alelo G neste loco exibem reduzida resposta ao LPS, aumentando assim o risco para o choque séptico e a susceptibilidade a sepse com gram-negativos (BARBER et al., 2004; EVERETT et al., 2007).

CD14

O CD14 é um receptor da imunidade inata de polissacarídeos, peptideoglicanos e ácidos lipoprotéicos. O CD14 pode ser encontrado ancorado na membrana (mCD14) em associação com os TLRs na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos e na forma solúvel (sCD14) no soro. O nível sérico do CD14 solúvel aumenta durante o choque séptico e está associado com maior taxa de mortalidade (SUTHERLAND et al., 2005b; LIN et al., 2007).

O mCD14 e o sCD14 são cruciais na transdução de sinal dependente de LPS. O CD14 reconhece o estímulo de LPS, que é amplificado pela ligação LPS-proteína, e assim transmite um sinal para o complexo TLR4-MD2 (MD-2 é outra proteína que parece ser importante na sinalização de LPS). A união desse complexo é importante para a ativação da produção de citocinas inflamatórias, como *TNF α* , *IL1*, *IL6*, *IL8* e *IL12*, bem como de citocinas anti-inflamatórias, tal como *IL10* (Lin et al., 2007; DA SILVA CORREIA et al., 2001).

A transição de C \rightarrow T na posição 159 (correspondendo à posição -260) no promotor do gene *CD14* tem sido associado com o aumento da densidade de ligantes CD14 na membrana de monócitos e ao aumento sérico do CD14 solúvel (LIN et al., 2007), o que parece alterar o reconhecimento do hospedeiro a patógenos (SUTHERLAND et al., 2005b). Homozigotos de *CD14 T* têm maior nível CD-14 circulante (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

TLR2

O *TLR2* é um PRR de bactérias gram-positivas. Esse receptor é um contato direto entre os neutrófilos, macrófagos/monócitos e células T com a bactéria gram-positiva. A ligação de ácidos lipoprotéicos com o receptor estimula uma cascata de sinalização intracelular que irá ativar NFKappa-B e a transcrição de citocinas pro - inflamatórias (SUTHERLAND et al., 2005b).

Quando o *TLR2* se liga ao *CD14* há a formação de um complexo receptor de endotoxina. O receptor IL-1 associado com kinase é recrutado para o complexo *TLR2/CD14*. Variantes alteradas de *TLR2* falham ao recrutar o *IL1* danificando a sinalização de endotoxinas (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003).

Após a ativação da resposta do sistema imune inato, o *TLR2* parece ser importante para a resolução da inflamação e da geração de um balanço homeostático do sistema imune depois da invasão. Variantes genéticas podem contribuir para esse desequilíbrio e conseqüentemente predispor a imunopatologias. Uma excessiva ativação da resposta do sistema anti-inflamatório pode levar a uma imunossupressão e persistência do microrganismo no hospedeiro (NIETERS et al., 2006). O polimorfismo *TLR2 Thr16933Ala*, por exemplo, está associado com alta prevalência em infecções de bactérias gram-positivas e sepse (VERSTAK; HERTZOG; MANSELL, 2007).

HSPs

Proteínas de choque térmico (heat shock proteins-HSP), ou proteínas de estresse, são expressas em resposta ao choque térmico e a uma variedade de

outros estímulos, incluindo os lipopolissacarídeos e a mediadores envolvidos na patogênese da sepse grave. Na inflamação sistêmica, a indução dessas proteínas protege as células da citotoxicidade do TNF (SCHROEDER et al., 1999). Tais proteínas protegem as células de fatores estressantes, como hipoxia, radicais de oxigênio, endotoxinas, infecções e febre. A atividade citoprotetora pode ser atribuída em parte pela capacidade dessas moléculas em estabilizar as estruturas de proteínas intracelulares através de sua função como chaperona (BRUEMMER-SMITH; STÜBER; SCHROEDER , 2001).

Três genes que codificam os membros da família das proteínas HSP70 estão localizados no loco dentro do grupo de antígenos leucocitários de classe III (MHC classe III) no cromossomo 6, próximo ao loco do TNF (SCHROEDER et al., 1999). A região do MHC de classe III contém três genes codificadores de proteínas de choque térmico da família de 70kDa (HSP70s). Os três genes, *HSP70-1*, *HSP70-2* e *HSP70-HOM* codificam HSP70s citossólicas, que possuem diversas funções, como chaperonina, o que torna essas proteínas possíveis candidatas no envolvimento do processamento de antígenos endógenos (JENKINS et al., 2000).

Na sepse grave e na disfunção orgânica, os polimorfismos genômicos do *HSP70* junto com a possível consequência de expressão alterada da proteína HSP, podem influenciar na função do sistema protetor do organismo. A susceptibilidade ao dano dos órgãos ou a sobrevivência na sepse grave deve depender da capacidade do organismo de expressar proteínas de choque térmico (SCHROEDER et al., 1999).

O polimorfismo *HSP70-2* na região -1267 com uma substituição de Adenina para Guanina (A >G) está relacionado com várias doenças inflamatórias e auto-

imunes. E o genótipo homozigoto AA pode estar associado com um maior risco de desenvolver choque séptico (TEMPLE et al., 2004).

Schroeder e colaboradores (1999) não viram nenhuma diferença significativa nos estudos dos polimorfismos localizados no gene *HSP70* na susceptibilidade ou melhora na sepse grave, mas identificaram uma ligação entre o homozigoto *HSP70-2AA* com mortalidade relacionada com o genótipo homozigoto *TNFβ (GG)* em pacientes com sepse grave.

IL6

A *IL6* é conhecida por ser importante em muitos processos celulares. Sua função inclui atividades pro e anti-inflamatórias, regulação da ativação de células T, indução da produção de anticorpos, ativação da coagulação e estimulação da hematopoese. Variantes genéticas dentro da região promotora têm sido mostrados com função de regular a produção de *IL6* circulante, podendo influenciar a atividade do *IL6 in vivo* (BARBER et al., 2006).

A *IL6* é uma citocina pro-inflamatória associada com o aumento da ocorrência de choque e morte em pacientes sépticos. Na região promotora do gene *IL6*, encontrado no cromossomo 7, há um polimorfismo com mudança de G para C na posição -174 (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003; MÜLLER-STEINHARDT; EBEL; HARTEL, 2007) e outro na posição -597 com mudança de G para A (MÜLLER-STEINHARDT; EBEL; HARTEL, 2007). Na região intrônica, há dois polimorfismos, um na posição -1753(C→G), e outro na posição -2954(G→C) (SUTHERLAND et al, 2005a).

Sutherland e colaboradores (2005a) analisaram haplótipos (-174 /-1753 /-2954) do gene *IL6*, e encontraram 3 haplótipos diferentes (C/C/G, G/G/G e G/C/C)

que mostraram significância com aumento da mortalidade e disfunção orgânica em pacientes que tiveram SIRS.

Um aumento na concentração plasmática de IL-6 é encontrado em pacientes com sepse, e uma alta quantidade dessa citocina está associada com o aumento da mortalidade (MICHALEK et al., 2007). Tischendorf e colaboradores (2007) concluíram que o polimorfismo *IL6-174 A/G* está associado com choque séptico, sendo que o alelo C está correlacionado com baixos níveis séricos de *IL6* em pacientes, e o inverso ocorre em ex-vivo depois do estímulo com LPS. O genótipo – 174 GG foi associado com a melhora da sobrevivência em pacientes sépticos. Entretanto o seu papel, em relação ao SIRS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica), sepse e choque séptico ainda não está claro (SUTHERLAND et al,2005a).

A interleucina 6 tem papel importante na sepse e causa a secreção de proteínas de fase aguda e ativação de células B. Os altos níveis de *IL6* no plasma estão relacionados com um quadro clínico mais grave da sepse (HÖRNER et al., 2007).

II – CONCLUSÕES

O polimorfismo -597 (A/G) no gene *IL6* e o haplótipo *IL6* (-174/-1753/-2954/-597) estão associados com sepse, o que evidencia a importância da citocina *IL6* no desenvolvimento ou susceptibilidade a sepse.

O alelo A do *HSP70-2* está associado com infecção por bactérias na sepse sugerindo assim um papel citoprotetor para a chaperona *HSP70* durante a sepse e consequentemente está relacionado com susceptibilidade a sepse.

III- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ABRAHAM, E. Alterations in Cell Signaling in Sepsis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p:S459–64, 2005.
- ADIB-CONQUY M, CAVAILLON JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 581, n. 581, p. 3723-33, Jul. 2007
- AGNESE, D.M., CALVANO, J.E., HAHM, S.J., COYLE, S.M., CORBETT, S.A., CALVANO, S.E. AND LOWRY, S.F. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, n.186, p.1522–1525, 2002.
- ARBOUR NC, LORENZ E, SCHUTTE BC, ZABNER J, KLINE JN, JONES M, FREES K, WATT JL, SCHWARTZ DA.. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature genetics**, New York, n.25, p.187-91,2000.
- ARNALICH F, LÓPEZ-MADERUELO D, CODOCEO R, LOPEZ J, SOLIS-GARRIDO LM, CAPISCOL C, FERNANDEZ-CAPITÁN C, MADERO R, MONTIEL C. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.127, n.2, p.331-6. Feb. 2002.
- ASSOCIAÇÃO DE MEDICINA INTENSIVA BRASILEIRA. **SEPSE**. São Paulo: Fundo AMIB. 2007
- 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. **Journal of medical genetics**, London, v. 41, n.11, p.808-13. nov. 2004.
- BARBER RC, CHANG LY, ARNOLDO BD, PURDUE GF, HUNT JL, HORTON JW, ARAGAKI CC. Innate Immunity SNPs are Associated with Risk for Severe Sepsis after Burn Injury. **Clinical medicine & research**, Marshfield, v. 4, n.4, p.250-5. Dec. 2006.
- BOCHUD PY, BONTEN M, MARCHETTI O, CALANDRA T. Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 32, n.11, p.S495-512, Nov. 2004.
- BRUEMMER-SMITH S, STÜBER F, SCHROEDER S. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70 expression in patients with severe sepsis. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 27, n. 12, p.1835-41. Dec. 2001.
- CHILD N.J.A., YANG I.A., PULLETZ M.C.K., DE COURCY-GOLDER K., ANDREWS A.-L., PAPPACHAN V.J. AND HOLLOWAY J.W. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory

-
- response syndrome. **Biochemical Society Transactions**, London; 31(Pt 3):652-3. Jun. 2003.
- CLARK MF, BAUDOIN SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. **Intensive Care Medicine**, New York., v.32, n.11, p.1706-12. Nov. 2006.
- CROW, J.F. Hardy, Weinberg and language impediments. **Genetics**, v. 152, p: 821-825, 1999.
- DA SILVA CORREIA J, SOLDAU K, CHRISTEN U, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.276, n.24, p.21129-35. Jun. 2001.
- EDWARDS-SMITH CJ, JONSSON JR, PURDIE DM, BANSAL A, SHORTHOUSE C, POWELL EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, Baltimore, v. 30, n.2, p.526-30, Aug.1999.
- EVERETT B, CAMERON B, LI H, VOLLMER-CONNA U, DAVENPORT T, HICKIE I, WAKEFIELD D, VERNON S, REEVES WC, LLOYD AR. Polymorphisms in Toll-like receptors-2 and -4 are not associated with disease manifestations in acute Q fever. **Genes and Immunity**, Hampshire, v. 8, n.8, p.699-702, Dec. 2007.
- FANG XM, SCHRODER S, HOEFT A, STUBER F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. **Critical Care Medicine**, London, v.27, n.7, p.1330-4, 1999.
- FISHMAN D, FAULDS G, JEFFERY R, MOHAMED-ALI V, YUDKIN JS, HUMPHRIES S, WOO P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 102, n.7, p.1369-76, Oct.1998.
- FUGGER L, MORLING N, RYDER LP, GEORGSSEN J, JAKOBSEN BK, SVEJGAARD A, ANDERSEN V, OXHOLM P, KARUP PEDERSEN F, FRIIS J. NcoI restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF alpha) region in four autoimmune diseases. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.34, p.17-22. 1989.
- GALLAGHER PM, LOWE G, FITZGERALD T, BELLA A, GREENE CM, MCELVANEY NG, O'NEILL SJ. Association of Il-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. **Thorax**, London, v.58, p.154-156, 2003.

-
- GAO L, TSAI YJ, GRIGORYEV DN, BARNES KC. Host defense genes in asthma and sepsis and the role of the environment. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v.7, n.6, p.459-67, Dec. 2007.
- GARNACHO-MONTERO J, ALDABO-PALLAS T, GARNACHO-MONTERO C, CAYUELA A, JIMENEZ R, BARROSO S, ORTIZ-LEYBA C. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. **Critical Care**, London, v. 10, n.4, p.R1111. 2006.
- GIACCONI R, CARUSO C, LIO D, MUTI E, CIPRIANO C, SABA V, BOCCOLI G, GASPARINI N, MALAVOLTA M, MOCCHEGIANI E. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients. **Mechanisms of Ageing and Development**, Lausanne, v.126, p. 866–873, 2005.
- GONG MN, ZHOU W, WILLIAMS PL, THOMPSON BT, POTHIER L, BOYCE P, CHRISTIANI DC. -308GA and TNFB polymorphisms in acute respiratory distress syndrome. **The European respiratory journal**, Lausanne, v. 26, n.3, p.382-9, Sep. 2005.
- HAMANN L, HAMPRECHT A, GOMMA A, SCHUMANN RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.285, n. 2, p.281-91. Feb. 2004.
- HAZIOT A, FERRERO E, KÖNTGEN F, HIJIYA N, YAMAMOTO S, SILVER J, STEWART CL, GOYERT SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. **Immunity**, Cambridge, v.4, p.407–414, 1996.
- HELMINEN ME, KILPINEN S, VIRTA M, HURME M. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin- 10 gene promoter polymorphism. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.184, n.6, p.777–780, Sep. 2001.
- HOLMES CL, RUSSELL JA, WALLEY KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, Chicago, v.124, n.3, p.1103-15, Sep. 2003.
- HORNER C, SCHUSTER S, PLACHKY J, HOFER S, MARTIN E, WEIGAND MA. Hemofiltration and immune response in severe sepsis. **The Journal of surgical research**, New York, v.142, n.1 , p. 59-65, Sep. 2007.
- INGALLS RR, LIEN E, GOLENBOCK DT. Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to Gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*. **J Endotoxin Res**, 6:411-415. 2000.

-
- JENKINS SC, MARCH RE, CAMPBELL RD, MILNER CM. A novel variant of the MHC-linked hsp70, hsp70-hom, is associated with rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.56, n.1, p. 38-44, Jul. 2000.
- JESSEN KM, LINDBOE SB, PETERSEN AL, EUGEN-OLSEN J, BENFIELD T. Common TNF-alpha, IL-1beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. **BMC Infectious Diseases**, London, v.7, p.108, Sep. 2007.
- KAPETANOVIC MC, LINDQVIST E, STURFELT G, SAXNE T, TRUEDSSON L, EBERHARDT K. The impact of IL-1Ra and MBL gene polymorphisms on joint damage after 5 and 10 years in patients with early rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v.34, n.4, p.894-5, Apr. 2007.
- KING JE. Sepsis in critical care. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, Philadelphia, v.19, n.1, p.77-86, Mar. 2007.
- KOVAR FM, MARIK C, CVITKO T, WAGNER OF, JILMA B, ENDLER G. The tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism does not influence inflammation and coagulation response in human endotoxemia. **Shock**, Augusta, v.27, n.3, p.238-41, Mar. 2007.
- KUMPF O, HAMANN L, SCHLAG PM, SCHUMANN RR. Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms. **Shock**, Augusta, v.25, n.2, p.123-8, Feb. 2006.
- LEAVER SK, FINNEY SJ, BURKE-GAFFNEY A, EVANS TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v.35, n.5, p.1404-10, May. 2007.
- LIN J, YAO YM, YU Y, CHAI JK, HUANG ZH, DONG N, SHENG ZY. Effects of CD14-159 C/T polymorphism on CD14 expression and the balance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in whole blood culture. **Shock**, Augusta, v.28, n.2, p.148-53, Aug. 2007.
- LIN MT, ALBERTSON TE. Genomic polymorphisms in sepsis. **Critical Care Medicine**, London, v.32, n.2, p.569-79, Feb. 2004.
- LORENZ, E., MIRA, J.P., FREES, K.L. AND SCHWARTZ, D.A. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.162, n.9, p.1028-32, May 2002.
- LOWE PR, GALLEY HF, ABDEL-FATTAH A, WEBSTER NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, London, v.31, p.34-38, 2003.

-
- MA P, CHEN D, PAN J, DU B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. **Critical Care Medicine**, London, v.30, n.5, p.1046-50, May 2002.
- MALLEO G, MAZZON E, SIRIWARDENA AK, CUZZOCREA S. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence. **Shock**, Augusta, v.28, n.2, p.130-40, Aug. 2007.
- MANOCHA S, RUSSELL JA, SUTHERLAND AM, WATTANATHUM A, WALLEY KR. Fibrinogen-beta gene haplotype is associated with mortality in sepsis. **The Journal of Infection**, London, v. 54, n.6, p.572-7, Jun. 2007.
- MICHALEK J, SVETLIKOVA P, FEDORA M, KLIMOVIC M, KLAPACOVA L, BARTOSOVA D, HRSTKOVA H, HUBACEK JA. Interleukin-6 gene variants and the risk of sepsis development in children. **Human Immunology**, New York, v.68, n.9, p.756-60. Sep. 2007.
- MICHEL O, LEVAN TD, STERN D, DENTENER M, THORN J, GNAT D, BEIJER ML, COCHAUX P, HOLT PG, MARTINEZ FD, RYLANDER R. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.112, n.5, p.923-9, Nov. 2003.
- MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.16, n.3, p.1215, Feb. 1988.
- MINNICH DJ, MOLDAWER LL. Anti-cytokine and anti-inflammatory therapies for the treatment of severe sepsis: progress and pitfalls. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.63, n.3, p. 437-41, 2004.
- MIRA JP, CARIOU A, GRALL F, DELCLAUX C, LOSSER MR, HESHMATI F, CHEVAL C, MONCHI M, TEBOUL JL, RICHE F, LELEU G, ARBIBE L, MIGNON A, DELPECH M, DHAINAUT JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.282, n.6, p. 561-8, Aug. 1999.
- MORTON NE, ZHANG W, TAILLON-MILLER P, ENNIS S, KWOK PY, COLLINS A. The optimal measure of allelic association. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p:5217-21, 001.
- MOORCHUNG N, SRIVASTAVA AN, GUPTA NK, GHOSHAL UC, ACHYUT BR, MITTAL B. Cytokine gene polymorphisms and the pathology of chronic

-
- gastritis. **Singapore Medicine Journal**, Singapore, v.48, n.5, p. 447-54, May 2007.
- MULLER-STEINHARDT M, EBEL B, HARTEL C. The impact of interleukin-6 promoter -597/-572/-174 genotype on interleukin-6 production after lipopolysaccharide stimulation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.147, n.2, p.339-45, Feb. 2007.
- NIETERS A, BECKMANN L, DEEG E, BECKER N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. **Genes and Immunity**, Hampshire, v. 7, n.6, p. 615-24, Sep. 2006.
- PARHAM P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre : Ed. Artmed, 2001. 372 p.
- RAUCHSCHWALBE SK, MASEIZIK 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. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v. 56, n.4, p.815-22, Apr. 2004.
- RIVERS EP, KRUSE JA, JACOBSEN G, SHAH K, LOOMBA M, OTERO R, CHILDS EW. The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, London, v. 35, n. 9, p. 2016-24, Sep. 2007.
- RYLANDER R., MICHEL O. Organic Dust Induced Inflammation – Role of Atopy and TLR4 and CD14 Gene Polymorphisms. **American Journal of Industrial Medicine**, New York, v.48, p.302-307, 2005.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Biotechnology**, Stoneham, v.24, p. 104-8, 1992
- SATURNINO SF, ANDRADE MV. Toll-Like Receptors, New Horizons in Sepsis. **Current Molecular Medicine**, v.7, n.5, p. 522-531, 2007.
- SCHLICHTING D, MCCOLLAM JS. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat. **South Medicine Journal**, Cebu City, v.100, n.6, p. 594-600, Jun. 2007.
- SCHMITT C, HUMENY A, BECKER CM, BRUNE K, PAHL A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. **Clinical chemistry**, Baltimore, v. 48, n. 10, p.1661-7, Oct. 2002.
- SCHROEDER S, RECK M, HOEFT A, STUBER F. Analysis of two human leukocyte antigen-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with

-
- severe sepsis. **Critical Care Medicine**, London, v. 27, n. 7, p. 1265-70, Jul. 1999.
- SCHUELLER AC, HEEP A, KATTNER E, KROLL M, WISBAUER M, SANDER J, BARTMANN P, STUBER F. Prevalence of two tumor necrosis factor gene polymorphisms in premature infants with early onset sepsis. **Biology of the Neonate**, New York, v. 90, n. 4, p. 229-32, 2006.
- SHANKS RM, SARGENT JL, MARTINEZ RM, GRABER ML, O'TOOLE GA. Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, Oxford, v.21, n.8. p. 2247-55, Aug. 2006.
- SHU Q, FANG X, CHEN Q, STUBER F. IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis. **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 116, n. 11, p. 1756-9, Nov. 2003.
- SILVA, E. **Manual sepse**. Rio de Janeiro: ATHENEU RIO, 2006. 122 p.
- SILVA, FP; VELASCO, IT. **SEPSE**. Barueri: Manole, 2007. 512 p.
- SRISKANDAN S, ALTMANN DM. The immunology of sepsis. **Journal of Pathology**, v. 214, p: 211-223, 2008.
- STUBER 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. **Critical Care Medicine**, London, v. 34, n.3, p.381-4, 1996b.
- STUBER F, UDALOVA IA, BOOK M, DRUTSKAYA LN, KUPRASH DV, TURETSKAYA RL, SCHADE FU, NEDOSPASOV SA. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. **Journal of Inflammation**, London, v. 46, n. 1, p.42-50, 1995-96a.
- SUFFREDINI AF, CHANOCK SJ. Genetic variation and the assessment of risk in septic patients. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 32, n. 11, p.1679-80, Nov. 2006.
- SUTHERLAND AM, WALLEY KR, MANOCHA S, RUSSELL JA. The association of interleukin 6 haplotype clades with mortality in critically ill adults. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 165, n. 1, p. 75-82, Jan. 2005a.
- 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. **Critical Care Medicine**, London, v. 33, n. 3, p. 638-44, Mar. 2005b.

-
- TAKEUCHI F, NAKANO K, NABETA H, HONG GH, KAWASUGI K, MORI M, OKUDAIRA H, KUWATA S, TANIMOTO K. Genetic contribution of the tumour necrosis factor (TNF) B + 252*2/2 genotype, but not the TNFa,b microsatellite alleles, to systemic lupus erythematosus in Japanese patients. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 32, n. 3, p.173-8, 2005.
- 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. **Critical Care Medicine**, London, v. 28, n. 8, p.2733-6, 2000.
- TEMPLE SE, CHEONG KY, ARDLIE KG, SAYER D, WATERER GW. The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. **Intensive Care Medicine**, New York, v.30, n.9, p..1761-7, Sep. 2004.
- TEXEREAU J, CHICHE JD, TAYLOR W, CHOUKROUN G, COMBA B, MIRA JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 7, p. S408-15, Nov. 2005.
- TISCHENDORF JJ, YAGMUR E, SCHOLTEN D, VIDACEK D, KOCH A, WINOGRAD R, GRESSNER AM, TRAUTWEIN C, WASMUTH HE, LAMMERT F. The interleukin-6 (IL6)-174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the ex vivo secretion of IL6. **International Journal of immunogenetics**, Oxford, v.6, n. 34, p.413-8. Dec. 2007.
- VARGAS-ALARCÓN G, LONDOÑO JD, HERNÁNDEZ-PACHECO G, GAMBOA R, CASTILLO E, PACHECO-TENA C, CARDIEL MH, GRANADOS J, BURGOS-VARGAS R. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 61, p. 48–51, 2002.
- VENET F, CHUNG CS, MONNERET G, HUANG X, HORNER B, GARBER M, AYALA A. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, Oct. 2007.
- VERSTAK B, HERTZOG P, MANSELL A. Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. **Inflammation Research**, Basel, v. 56, n.1, p.1-10, Jan. 2007.
- VILLAR J, MACA-MEYER N, PEREZ-MENDEZ L, FLORES C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. **Critical Care**, London, v. 8, n.3, p. 180-9, Jun. 2004.
- WATANABE E, HIRASAWA H, ODA S, MATSUDA K, HATANO M, TOKUHISA T. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are

associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. **Critical Care Medicine**, London, v. 33, n.1, p. 89-97, 2005.

WATERER GW, ELBAHLAWAN L, QUASNEY MW, ZHANG Q, KESSLER LA, WUNDERINK RG. Heat shock protein 70-2_1267 AA homozygotes have an increased risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia. **Critical Care Medicine**, London, v.31, n.5, p.1367-1372, 2003.

WATERER GW, QUASNEY MW, CANTOR RM, WUNDERINK RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 163, n.7, p.1599-604, Jun. 2001.

WATTANATHUM A, MANOCHA S, GROSHAUS H, RUSSELL JA, WALLEY KR. Interleukin-10 haplotype associated with increased mortality in critically ill patients with sepsis from pneumonia but not in patients with extrapulmonary sepsis. **Chest**, Chicago, v.128, n. 3, p. 1690-8, Sep. 2005.

WILKENING S, HEMMINKI K, RUDNAI P, GURZAU E, KOPPOVA K, KUMAR R, FÖRSTI A. Case-control study in basal cell carcinoma of the skin: single nucleotide polymorphisms in three interleukin promoters pre-analysed in pooled DNA. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 155, n. 6, p.1139-44, Dec. 2006.

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 Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 28, p. 4409-13, Jul. 2005.