



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

Estudo das variantes polimórficas 896A>G (Asp299Gly) e 1196C>T (Thr399Ile) do Toll like Receptor 4 (TLR4) e a suscetibilidade à sepse e às disfunções orgânicas em pacientes com condições críticas de saúde

PÓS-GRADUANDO

PAULO ROBERTO VARGAS FALLAVENA

ORIENTADOR

CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre, RS

Abril / 2007

SUMÁRIO

Assunto	Página
RESUMO	3
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1 – Paciente crítico internado em UTI	4
2 – Infecção e Sepsis	6
3 – Quadro Séptico	8
4 – Imunidade Inata	9
5 – Receptores Toll-like	14
6 – Receptor Toll-like 4 (TLR4)	15
7 – O gene humano do TLR4	16
JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	26
Title of The Paper	26
Abstract	29
Introduction	30
Subjects and Methods	32
Results	36
Discussion	39
Acknowledgement	42
References	42
Table 1	46
Table 2	47
Figure 1	48
Figure 2	49
Figure 3	50
Figure 4	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

RESUMO

Objetivo: Investigar se há associação entre as variantes polimórficas 896A>G (Asp299Gly) e 1196C>T (Thr399Ile) do gene que codifica para o *toll like receptor 4* (TLR4) e a suscetibilidade a sepse e às disfunções orgânicas em pacientes com condições críticas de saúde. **Pacientes e Métodos:** Foram selecionados para este estudo 107 pacientes com sepse secundária a infecção por bactérias Gram-negativas, internados na unidade de tratamento intensivo geral (UTI) do Hospital São Lucas da PUCRS, admitidos de março de 2002 a dezembro de 2005. O grupo controle foi constituído por 111 amostras de DNA de doadores voluntários oriundos da mesma população gaúcha. A disfunção orgânica dos pacientes sépticos foi avaliada durante a primeira semana após admissão na UTI, através do escore SOFA, e foram consideradas as ocorrências de choque séptico e óbito. Os genótipos das variantes polimórficas 896A>G e 1196C>T foram determinados por análise de fragmentos de restrição dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após, foi analisada a frequência da distribuição dos genótipos e dos alelos entre os grupos de pacientes e de indivíduos saudáveis. **Resultados:** A frequência de heterozigotos 896AG foi significativamente mais elevada entre pacientes sépticos (26%; 28/107) do que entre indivíduos saudáveis (10%; 11/111) ($P=0,002$; OR=3,22, CI_{95%}: 1,43-7,38), da mesma forma como foi mais elevada se comparados pacientes com choque séptico (24%; 18/74) e saudáveis ($P=0,008$; OR=2.92, CI_{95%}: 1,20-7,17). Correspondentemente, houve maior frequência do alelo 896G entre pacientes sépticos (13%; 28/214) que controles (5%; 11/222) ($P=0,003$; OR=2,89, CI_{95%}: 1,33-6,36), e entre pacientes com choque séptico (14%; 18/148) que indivíduos saudáveis ($P=0,011$; OR=2,66, CI_{95%}: 1,15-6,23). Pacientes 1196CT+1196TT apresentaram escores SOFA médios mais altos (8.12±3.89) que pacientes 1196CC (6.82±3.52) (Mann-Whitney test, $P=0,007$). Portadores do alelo 1196T apresentaram durante a primeira semana de internação na UTI significativamente mais casos de escores SOFA ≥ 7 (69%; 49/71) que homozigotos 1196CC (49%; 304/626) (Chi-square test, $P=0,043$; OR=1.62, CI_{95%}:0.99-2.67). Nós observamos que a herança de qualquer tipo de alelo não interfere nas taxas de mortalidade dos pacientes. **Conclusão:** As variantes polimórficas -896A>G e 1196C>T do TLR4 podem estar associadas com a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de disfunções orgânicas graves e sepse nos pacientes críticos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 – Paciente crítico internado em UTI

Os pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são caracterizados por apresentarem um quadro patológico crítico e complexo, decorrente de fragilidades fisiológicas graves e responsáveis pela elevada taxa de mortalidade que varia de 30% a 50% [Vincent JL, *et al.*, 2002]. Em um estudo recente estimou-se que nos Estados Unidos 50.000 pessoas morrem a cada ano decorrente de doenças críticas manifestadas nas UTIs como, por exemplo a sepse, com custo de até dez bilhões de dólares [Guha M, *et al.*, 2001]. Apesar dos progressos no diagnóstico e no tratamento das doenças infecciosas, a incidência de sepse tem aumentado nas últimas décadas. O aumento das infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos e o desenvolvimento de tecnologias de manutenção de vida, com o uso de procedimentos e dispositivos invasivos, podem explicar esse fato [Niederman MS, *et al.*, 1990]. Nos últimos 20 anos, vários instrumentos de medida de predição de risco têm sido aplicados aos pacientes críticos internados em UTIs na tentativa de reconhecer as melhores estratégias terapêuticas. A avaliação do quadro crítico, nos dias de hoje, é principalmente realizada através de instrumentos que analisam a disfunção de órgãos e sistemas através do monitoramento diário de seu estado fisiológico. O escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) avalia diariamente a condição de seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, hematopoiético, cardiovascular e neurológico), independentemente da terapia a qual o paciente está sendo submetida [Vincent JL, *et al.*, 1998]. Dado que pacientes de UTIs são indivíduos afetados por

múltiplas disfunções orgânicas e que, além disto, estão expostos ao ambiente hospitalar o qual é rico em diversidade de microorganismos infecciosos, o risco de que estes pacientes venham a desenvolver uma infecção é muito elevado (25-30%). Uma parcela elevada de pacientes desenvolve infecção bacteriana, sendo que cerca de 40% a 70%, acaba por desencadear quadro de sepse, choque séptico e falência de múltiplos órgãos [Russell JA, 2006]. O quadro de sepse é consequência de processos celulares em resposta a uma agressão de origem infecciosa. A manifestação clínica da sepse pode se agravar chegando a um quadro de choque, o qual é caracterizado pela presença de uma vasodilatação periférica acentuada e por uma excessiva presença de agentes pró-inflamatórios, que juntos acentuam ainda mais a disfunção e a falência de múltiplos órgãos. Observa-se o desenvolvimento de disfunção muito antes da falência de órgãos, resultado de uma reação inflamatória pela massiva liberação de citocinas. A resposta sistêmica à infecção é mediada através das citocinas derivadas de macrófagos que alvejam os receptores da extremidade-órgão em resposta a um ferimento ou infecção. A resposta inflamatória à infecção ou ao ferimento é uma reação altamente conservada e regulada do organismo. A liberação concomitante de agentes pró e antiinflamatório mantém a homeostasia do organismo. A reação antiinflamatória pode ser maior e algumas vezes mais longa que a pró-inflamatória; o objetivo disto é diminuir a produção da síntese de agentes pró-inflamatórios, assim mantendo o equilíbrio homeostático [Bone RC, *et al.*, 1997; Haddad JJ, *et al.*, 2002].

Apesar dos inúmeros progressos obtidos nas últimas décadas na tentativa de se dar suporte ao paciente crítico com foco infeccioso e sepse, a mortalidade neste grupo tem se mantido na faixa de 50% [Friedman G, *et al.*, 1998].

Sendo a sepse uma condição freqüente no âmbito da terapia intensiva, que cursa com elevada mortalidade e com tratamento com custo econômico elevado,

sua abordagem é de interesse direto do sistema de saúde. O estudo da sepse deve, no entanto, contribuir para os levantamentos epidemiológicos e pautar-se numa abordagem direcionada para o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares que desencadeiam as variações fisiopatológicas. Este conhecimento básico poderá contribuir para a modulação da seqüência de eventos que culmina nos desfechos desfavoráveis. Conhecer as bases genéticas de tais eventos é, portanto, fundamental.

2 - Infecção e Sepses

A sepse é caracterizada por uma ativação consistente do sistema imune após uma infecção bacteriana (bacteremia) que se torna amplificada e, então, desregulada [Friedman G, *et al.*, 1998]. As infecções, na maioria dos casos, são erradicadas com sucesso pelo hospedeiro por uma resposta inflamatória intensa e localizada. Em contraste, as infecções fatais são caracterizadas por uma incapacidade em conter a resposta inflamatória, na qual ocorre a liberação de potentes citocinas na circulação sistêmica, ativando a resposta inflamatória celular, em posições remotas, uma condição conhecida como Síndrome Sistêmica da Resposta Inflamatória (SIRS; *systemic inflammatory response syndrome*). Em 1991, o conceito SIRS foi postulado para definir o estado de pacientes que exibiam uma resposta sistêmica para episódios inflamatórios [Crouser ED, 2004]. Hoje, a sepse é definida como SIRS induzida por uma infecção. A SIRS é diagnosticada como uma combinação de sinais clínicos e sintomas disponíveis, apresentando pelo menos, dois dos critérios a seguir: (I) Febre, temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$ ou hipotermia, temperatura corporal $<36^{\circ}\text{C}$; (II) Taquicardia, frequência cardíaca >90 bpm; (III) Taquipnéia, frequência respiratória >20 irpm ou $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg; (IV) Leucocitose ou leucopenia, Leucócitos >12.000 cels/mm³ ou <4.000 cels/mm³, ou presença de

>10% de leucócitos de formas jovens (bastões) [Heard SO, *et al.*, 1991 ; Varon J, *et al.*, 1999; Vincent JL, *et al.*, 2002].

Considera-se sepse-grave quando a sepse está associada a manifestações de hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica, caracterizada por acidose láctica, oligúria ou alteração do nível de consciência, ou hipotensão arterial com pressão sistólica inferior a 90mmHg (sem a necessidade, porém, de agentes vasopressores). Aproximadamente 40% dos pacientes sépticos progridem para o choque séptico [Kreger BE, *et al.*, 1980]. A redução da perfusão sistêmica durante o choque combinada com uma cascata de eventos inflamatórios iniciado durante a sepse, geralmente causa o desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos, seguido de morte [Liang E, *et al.*, 2003]. As possibilidades para o desenvolvimento de sepse pela SIRS incluem a oxigenação inadequada do tecido relacionado à má distribuição do fluxo do sangue, a causa colateral dos danos nos tecidos causada pelas células imunes ativadas, e as mudanças citoplasmáticas conseqüentes às interações do receptor citocina-celula. O que quer que cause o dano celular, que afete os sistemas orgânicos, perpetua a SIRS pela ativação dos macrófagos. Este *feed-foward* é o mecanismo que explica a morte de pacientes pela chamada Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (MODS; *multiple organ dysfunction syndrome*) após dias ou semanas do início da infecção inicial e, em muitos casos, depois que a infecção original já tenha até mesmo sido erradicada. Apesar dos bilhões de dólares investidos em investigações variadas, nenhuma droga ou terapia específica foi desenvolvida para impedir efetivamente o início da SIRS ou da MODS. Por exemplo, as estratégias de imuno-modulação, tais como o anticorpo anti-TNF- α e anti-endotoxinas, parecem ser de pouco ou de nenhum benefício nos seres humanos. O esforço para aumentar a distribuição de oxigênio aos tecidos, da mesma forma, não

se mostrou benéfico além de ter sido, inclusive, prejudicial aos pacientes com sepse estabelecida [Crouser ED, 2004].

Choque séptico é uma complicação da sepse caracterizado por uma hipotensão refratária, a qual é a principal causa dos óbitos. Se a hipotensão ou hipoperfusão induzidas pela sepse são refratárias à ressuscitação volêmica adequada, e se há necessidade subsequente de administração de agentes vasopressores, as complicações circulatórias podem levar à Falência de Múltiplos Órgãos (MOF; *multiple organ failure*) ou à MODS. A falência de múltiplos órgãos é uma alteração tão severa na função orgânica que sua homeostasia não pode ser mantida sem intervenção terapêutica artificial [Levy MM, *et al.*, 2003].

3 - Quadro séptico

Observa-se no quadro séptico o aparecimento de estágios progressivos e complexos causadores de desordens no sistema imunológico desencadeados pela infecção. Diferentes fatores podem levar a SIRS, entre eles, infecção, trauma, queimaduras, isquemia, reperfusão e inflamação. A SIRS é caracterizada por um desequilíbrio no sistema imunológico de hiper-atividade ou hipo-atividade [Akira S, 2000].

3.1 - O estágio inicial da Sepse (Fase Hiperdinâmica)

Caracteriza-se pela ativação intensa de citocinas pró e antiinflamatórias. Esta fase é marcada pela produção de interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e do fator de necrose tumoral TNF- α . Também há um aumento na proteína C-reativa que se acredita ser a responsável pela ativação das espécies reativas de oxigênio e da produção de óxido nítrico (NO) [Akira S, 2000; Hoesel LM, *et al.*, 2004].

3.2 - O estágio tardio da sepse (Fase Hipodinâmica)

Esta etapa é marcada pela liberação das interleucinas IL-10 e IL-13 para conter o efeito pró-inflamatório da fase hiperdinâmica, suprimindo a ativação do fator nuclear NFκB. Há também um fenômeno conhecido como CARS (*compensatory anti response syndrome*) que consiste em uma resposta inflamatória compensatória. No final deste estágio há diminuição da fagocitose dos macrófagos, quimiotaxia, produção de citocinas e de radicais livres. Existe também uma grande diferença na capacidade de resposta das citocinas associadas a outros fatores nestes dois estágios [Titheradge MA, 1999]. Ratos cujo gene do receptor para o TNF-α, TNF-αRp55 foi inativado ou de alguma maneira bloqueado (ratos knock-out), tornaram-se resistentes ao choque endotóxico embora o TNF-α não esteja relacionado diretamente com letalidade, evento que depende de um efeito sinérgico do TNF-α, IL-β, IFN-γ e NO [Moncada S, *et al.*, 1991].

4 - Imunidade Inata

Ao contrário da imunidade adaptativa, a qual é específica e se molda ao agente infeccioso criando uma memória imunológica, o sistema imune inato reconhece classes genéricas de moléculas produzidas por vários microorganismos patogênicos. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos invasores, desempenhando um papel fundamental nas doenças infecciosas e inflamatórias, uma vez que provoca uma resposta inflamatória generalista, na qual certas células (macrófagos, monócitos, granulócitos e células dendríticas) detêm o agente invasor, impedindo que ele se espalhe [Zweigner J, *et al.*, 2001]. Uma função importante para a resposta imune inata é de recrutar mais células fagocitárias e moléculas efetoras para o local da infecção, através da liberação de uma bateria de citocinas e de outros mediadores inflamatórios que têm

profundos efeitos sobre os fatos subseqüentes. As citocinas, cuja síntese é estimulada quando os macrófagos reconhecem constituintes microbianos, são chamadas freqüentemente de monocinas, uma vez que são elaboradas principalmente por células da linhagem monócito-macrófago; as monocinas compreendem um grupo estruturalmente diferenciado de moléculas e incluem as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), todos apresentam importantes efeitos locais e sistêmicos [Bevilacqua MP, 1993; Downey GP, 1994; Springer TA, 1994]. Os efeitos combinados desses mediadores contribuem para as reações locais contra a infecção na forma de resposta inflamatória. As respostas inflamatórias operacionais são caracterizadas pela dor, rubor, calor e pelo tumor no sítio de uma infecção. A primeira dessas alterações reside num aumento do diâmetro vascular, levando a um aumento do volume sanguíneo local. Uma vez que a infecção se dissemine para a corrente circulatória, os mesmos mecanismos através dos quais o TNF- α continha a infecção local com tanta eficiência, tornam-se ineficazes. A sepse é, portanto, acompanhada pela liberação de TNF- α pelos macrófagos no fígado, no baço e em outros órgãos. A liberação sistêmica de TNF- α causa vasodilatação e perda do volume plasmático, devido a um aumento da permeabilidade vascular, conduzindo ao choque. No choque séptico, a coagulação intravascular disseminada é igualmente deflagrada pelo TNF- α , levando à formação de microtrombos e ao consumo de proteínas de coagulação, de modo que o paciente perde a capacidade de coagular o sangue de maneira apropriada. Tal condição leva com freqüência à falência de órgãos vitais tais como os rins, o fígado, o coração e os pulmões, que são rapidamente comprometidos pela insuficiência da perfusão normal [Biron CA, 1992; Sen GC, 1992; Weiss WI, *et al.*, 1992; Pfiesser K, *et al.*, 1993; Emsley J, *et al.*, 1994; Janeway CAJR, 1997; Fraser IP, *et al.*, 1998; Lamping N, *et al.*, 1998].

O reconhecimento de componentes de bactérias, e a subsequente ativação de citocinas são características importantes envolvidas durante o quadro séptico. Recentemente, vários polimorfismos de genes associados com estas respostas têm sido demonstrados: entre eles, variantes polimórficas no gene do TNF- α têm sido relacionadas como fator importante no curso clínico da sepse. O polimorfismo -308G>A do gene TNF- α foi identificado e associado a capacidade transcricional diferenciada do mesmo [Nakada TA, *et al.*, 2005]. A liberação sistêmica de TNF- α causa vasodilatação e perda de volume plasmático, devido a um aumento da permeabilidade vascular, conduzindo ao choque séptico. Um estudo com pacientes sépticos mostrou que a mortalidade foi significativamente mais elevada entre heterozigotos -308GA quando comparados com os homozigotos 308GG [Nakada TA, *et al.*, 2005].

Infecções devido a bactérias Gram-negativas são comumente associadas à principal causa de sepse e choque séptico [Holmes CL, *et al.*, 2003]. Estudos baseados no reconhecimento por monócitos de lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas e na regulação de genes envolvidos no processo inflamatório podem identificar novos instrumentos terapêuticos. O processo da imunidade inata, de resposta rápida para detectar e eliminar infecções causadas por agentes contagiosos (bactérias Gram-negativa), é iniciado pela molécula CD14 (*cluster of differentiation 14*) e mediado pelos receptores Toll-Like (*Toll-like receptors*; TLRs), os quais fazem parte de uma família de receptores conservada desde de artrópodes até mamíferos [Ebong SJ, *et al.*, 2001; Xu D, *et al.*, 2005; Glück T, *et al.*, 2001]. O CD14, um receptor de membrana que tem papel fundamental no reconhecimento de LPS por monócitos, tem sido citado frequentemente como um dos principais genes envolvidos em doenças inflamatórias. No promotor do gene CD14 foi encontrado um polimorfismo de substituição de um único nucleotídeo

(*single nucleotide polymorphism*; SNP) que parece estar associado à regulação da expressão do gene CD14 [Niederman MS, *et al.*, 1990]. A regulação do CD14 parece ser de extrema importância em vários estados de doenças inflamatórias [Le Van TD, *et al.*, 2001], e sua expressão diferenciada pode ser crucial para o curso clínico dessas patologias [Glück T, *et al.*, 2001]. LPSs de bactérias invasoras, presentes no plasma humano, ligam-se à receptores HDL (*high density lipoprotein*) e são reconhecidas por LBPs (*lipopolysaccharide binding proteins*). As LBPs, por sua vez, transferem às LPSs do HDL para o CD14 [Landmann R, *et al.*, 1996; Goyert SM, *et al.*, 1998]. A sinalização imunológica é, então, iniciada pelo complexo LBP-LPS-CD14 [Jerala R, 2007]. O CD14 é uma proteína que pode ser encontrada fixa na membrana de células do sistema imune (mCD14) ou livre no soro (sCD14). O CD14, contudo, não tem conexão com o citoplasma celular não podendo ativar a resposta imune isoladamente [Silva E, *et al.*, 2005]. A mediação do processo infeccioso inato se dá, portanto, pelos TLRs [Agnese MD, *et al.*, 2002, Jerala R, 2007].

O LPS é um composto carregado negativamente e consiste de três estruturas interconectadas que dão à molécula uma característica polar e anfipática. A estrutura básica consiste de um lipídio A (um núcleo estrutural de oligossacarídeo) e um polissacarídeo de repetição de cadeia que dá a especificidade sorotípica e características polar a toda a estrutura do LPS [Opal SM, *et al.*, 1998]. A estrutura do lipídio A geralmente consiste de uma desfosforilação β 1-6 ligado com uma glicosamina, na qual se liga um número variado (usualmente seis) de amidos assimétricos ou éster-ligantes de ácidos graxos [Opal SM, *et al.*, 1998].

Acredita-se que a porção do lipídio A seja a responsável pela ligação do LPS aos receptores de vários alvos, conferindo toxicidade ao LPS [Wong N, *et al.*, 2003]. A parede celular das bactérias Gram-negativas é assimétrica: o LPS cobre mais de 90% da superfície celular na face externa e os fosfolipídios, que têm uma

composição similar à da membrana citoplasmática, estão localizados na face interna. A parede celular serve como uma barreira fixa fornecendo proteção à bactéria em resposta a agentes anti-bacterianos. Assim, é a primeira barreira encontrada pelos peptídeos de reconhecimento do sistema imune inato dos organismos multicelulares que devem atravessá-la a fim de alcançar a membrana citoplasmática interna. Inicialmente, os peptídeos de reconhecimento interagem com a face exterior do LPS e deslocam competitivamente os cátions bivalentes que neutralizam parcialmente sua carga negativa [Rosenfeld Y, *et al.*, 2006]. A presença da endotoxina LPS alerta o hospedeiro eucariótico sobre a presença de um invasor bacteriano [Opal SM, *et al.*, 1998]. A presença de concentrações patológicas de endotoxina nos pacientes com sepsis severa e choque séptico tem sido documentada em numerosos estudos clínicos [Danner RL, *et al.*, 1991; Opal SM, *et al.*, 1998; Van Deventer, *et al.*, 1998; Opal SM, *et al.*, 1999].

Huang e colaboradores [Huang Q, *et al.*, 2001] demonstraram que a transcrição de muitos genes está alterada após exposição a endotoxina bacteriana e, dos 166 genes que foram alterados na exposição à *Escherichia coli*, cerca de 88% também foram alterados após a exposição a LPS purificado. Isto indica que o LPS é a molécula dominante que é reconhecida por células do sistema imunológico [Opal SM, *et al.*, 2003]. O reconhecimento de componentes de bactérias, tais como as LPS, pelo sistema imune inato desencadeia a resposta inflamatória com o objetivo de acabar com o agente infeccioso. Uma resposta inflamatória sem controle, no entanto, pode ser a causa de disfunções orgânicas importantes [Zweigner J, *et al.*, 2001].

Estudos recentes têm se baseado na inativação do LPS por um composto sintético similar ao lipídio A, componente do LPS [Liang E, *et al.*, 2003; Wong N, *et al.*, 2003]. Esse antagonista, conhecido como E5564, mostrou ser bastante eficiente

em bloquear a ação do LPS em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, e vem sendo testado em pesquisas clínicas de fase II como um alvo terapêutico para sepse [Liang E, *et al.*, 2003; Wong N, *et al.*, 2003]. O E5564 { α -D-Glicopiranosose, 3-O-Decil-2-deoxi-6-O-[2-deoxi-3-O-[(3R)-3-metoxidecil]-6-O-metil-2-[[[(11Z)-1-oxo-11-octanodecenil) amino]-4-O-fosfono- β -D glicopiranosil] -2- [(1,3-dioxitetradecil) amino]-1- (dehidrogenio-fosfato)} é um sal tetrasódico, de segunda geração da bactéria não tóxica *Rhodobacter sphaeroides*, e mostrou-se eficiente em bloquear todos os efeitos do LPS após sua adição ao sangue *in vivo*, ainda que sua atividade seja rapidamente perdida em consequência da ligação com proteínas séricas ou plasmáticas [Wong N, *et al.*, 2003].

5 – Receptores Toll-like (TLRs)

Os TLRs são proteínas transmembrânicas que, em vertebrados, servem como estimulador da interação do sistema inato com o adquirido. São também conhecidos como Receptores de Reconhecimento Padrão (*pattern recognition receptor*, PRR). Seu domínio extracelular consiste em um número variado de repetições ricas em leucina (Leu) e regiões ricas em cisteína (Cys) precedentes ao domínio transmembrana. O domínio citoplasmático é chamado de receptor Toll-interleucina-1 (*toll interleucine receptor*, TIR) [Mushegian A, *et al.*, 2001, Matsushima N, *et al.*, 2007, Sheedy FJ, *et al.*, 2007,]. A principal função dos TLRs, associada ao controle da resposta inflamatória e resposta imune, foi bem demonstrada na sua análise em camundongos com TLRs *knockout*. O nome Toll é derivado de uma seqüência homologa da *Drosophila spp.*, o gene toll [O' Neill LA, 2005], o qual foi descoberto em 1996 e é relacionado com a formação do eixo ventral dorsal, assim como, com a resposta imune a infecção funga [O' Neill LA, 2005]. Identificação entre a similaridade do domínio citoplasmática do Toll de *Drosophila* e o receptor IL-1 de

mamíferos impeliram a busca por receptores ortólogos, subsequentemente levando a descoberta do Toll humano (nomeado como TLR4) [Pandey S, *et al.*, 2006]. Estima-se que haja aproximadamente 10 diferentes TLRs em humanos [Dunne A, *et al.*, 2003; Goldstein DR, 2004; O' Neill LA, 2005].

Um processo de defesa descontrolado do organismo contra agentes infecciosos, no entanto, causa uma série de disfunções orgânicas, entre elas coagulopatias, febre, vasodilatação e redução da pressão arterial, o que provoca necrose em tecidos e órgãos causados pelo acúmulo de citocinas [Cohen J, 2002]. A resposta do organismo em caso de falha no reconhecimento do LPS das bactérias Gram-negativas pelo TLR4 se mostra exacerbada, devido ao fato do reconhecimento do LPS ser feito pelo TLR2 que não possui a mesma afinidade ao LPS como o TLR4, o que provoca uma resposta exacerbada a infecção, podendo assim levar à falência de múltiplos órgãos e tecidos [Kopp E, *et al.*, 2003].

6 -Toll-like receptor 4 (TLR4)

O TLR4 é responsável pela mediação do reconhecimento à LPS e sinalização para liberação das citocinas. A resposta inflamatória às bactérias Gram-negativas se inicia após a interação do LPS com a proteína sérica LBP, que prende e transfere os monômeros de LPS para o CD14 [Mushegian A, *et al.*, 2001]. O receptor CD14, o qual não possui porção intracelular [Silva E, *et al.*, 2005], aciona o TLR4 através de uma molécula adaptadora MD2 [O' Neill LA, 2005]. A transdução do sinal tem início pela interação do domínio TIR do TLR4 com outro domínio TIR presente numa molécula citoplasmática denominada MyD88 (*Myeloid differentiation protein 88*) [Kopp E, *et al.*, 2001]. O MyD88 possui um caminho independente envolvendo proteínas com domínios TIR. O *death-domain* do MyD88 se prende ao *death-domain* de uma serina/treonina kinase (em geral, uma kinase IRAK-Interleukin-1-receptor-

associated kinase) e se propaga via TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*) [Kopp E, *et al.*, 2001]. TRAF6 induz a produção de um regulador mestre de inflamação, o NF- κ B [Scröder WJN, *et al.*, 2005, Costalonga M, *et al.*, 2007]. Esse regulador aciona os genes que codificam os ativadores imunes, o que inclui o TNF- α e as interleucinas IL-1, IL-8, IL-12 e IL-6 [Musheigian A, *et al.*, 2001] (Figura 1).

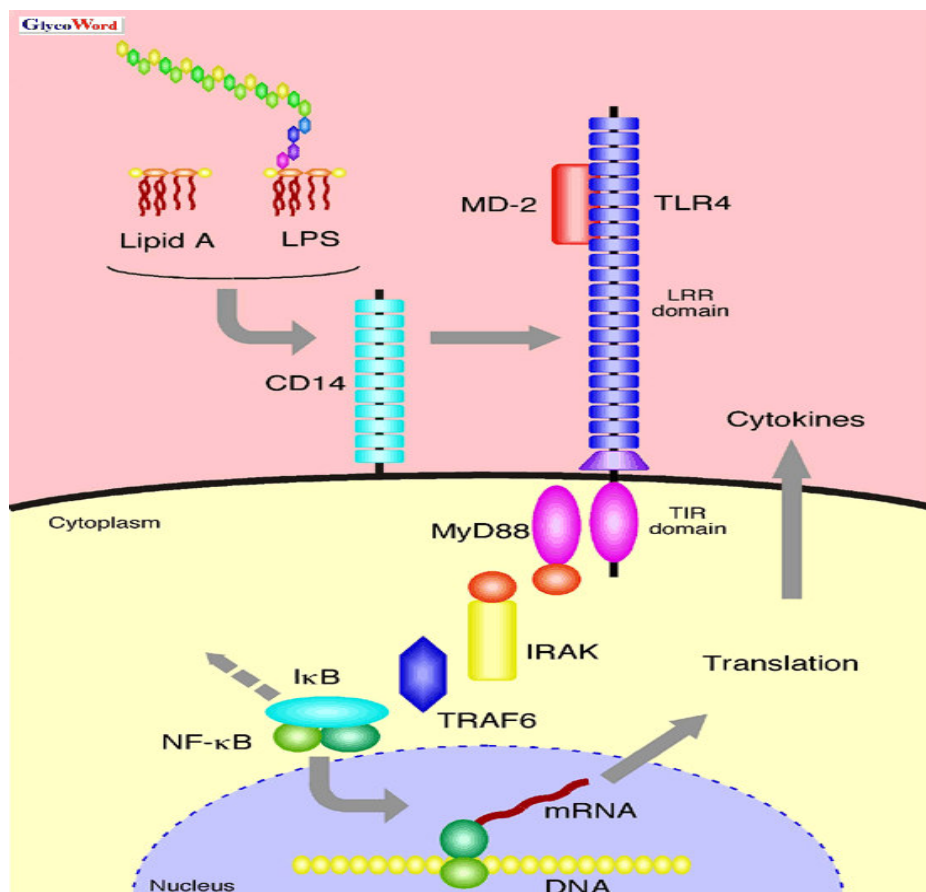


Figura 1: Mecanismo de desencadeamento do processo da resposta imune inata provocado por LPS de bactérias Gram-negativas nas seguintes ligações e ativações: LPS→LPB→CD14→MD2→TLR4→NF- κ B→citocinas. Extraído do site <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/immunity/IS-A01J.html>

7 – Gene humano TLR4

O gene que codifica para o TLR4 foi mapeado no cromossomo 9 (*locus* 9q32-q33) [Schmitt C, *et al.*, 2002; Schröder WJN, *et al.*, 2005]. Além do mapeamento, foram descritas duas alterações polimórficas do gene TLR4 que alteram a estrutura protéica do TLR4 humano: (I) uma substituição de um único nucleotídeo (SNP), dentro do éxon 4 do gene TLR4, de uma adenina (A) para uma glicina (G) na base 896 (896A>G) que leva à modificação do resíduo conservado de ácido aspártico para uma glicina no aminoácido 299 da seqüência protéica (Asp299Gly) do domínio da estrutura extracelular do TLR4 [Arbour NC, *et al.*, 2000; Schmitt C, *et al.*, 2002]; e (II) uma transição de uma citosina (C) para uma timina (T) na posição 1196 (1196C>T) que gera a substituição do aminoácido treonina por uma isoleucina no resíduo 399 (Thr399Ile) da região extracelular do TLR4 [Agnese MD, *et al.*, 2002; Schmitt C, *et al.*, 2002; Barber RC, *et al.*, 2004]. Ambas variantes mutantes são raras nas populações (frequências alélicas de 896T e 1196T variando de 6 a 10%) e parecem promover dificuldades no reconhecimento do TLR4 à LPS [Arbour NC, 2000; Agnese MD, *et al.*, 2002; Schmitt C, 2002; Barber RC, *et al.*, 2004].

As variantes polimórficas mutantes 896G e 1196T foram encontradas em proporções significativamente mais elevadas em pacientes com uma baixa resposta imune ao inalar LPS [indivíduos hiporresponsivos] (6.6%) quando comparados à população controle [Arbour NC, *et al.*, 2000; Schröder WJN, *et al.*, 2005]. Células epiteliais derivadas destes pacientes exibiram uma diminuição na resposta ao estímulo com LPS *in vitro*, em estado homocigótico (896TT e 1196TT) ou heterocigótico (896AG e 1196CT) [Kopp E, *et al.*, 2003]. Achados similares foram observados em estudos *in vitro* com macrófagos alveolares (9.6%) [Edfeldt K, *et al.*, 2004].

A obstrução das vias aéreas induzida por LPS está associada com a ativação de macrófagos alveolares, liberando citocinas pró-inflamatórias. A transfecção de células THP-1 (na qual contêm o TLR4 do tipo selvagem) com também o alelo mutante ou alelo selvagem do TLR4 demonstrou que as células transfectadas com o alelo 896AG não responde normalmente ao estímulo a LPS contudo aqueles que tiveram a transfecção do alelo 1196CT tiveram uma resposta intermediária ao LPS. Indivíduos heterozigotos para ambos os polimorfismos não tiveram resposta ao estimulados ao LPS e também menor expressão do TLR4 na superfície apical das vias aéreas. A transfecção adenoviral com o genótipo duplo selvagem (contendo alelos 896A e 1196C) promoveu a recuperação da resposta à infecção por bactérias Gram-negativas pela presença de LPS, causada anteriormente pelas variantes mutantes 896G e 1196T [Arbour NC, *et al.*, 2000; Barber RC, *et al.*, 2004]. Estes resultados reforçaram a sugestão de que as variantes mutantes 896G e 1196T diminuem a função de sinalização da imunidade inata do TLR4. O que se torna muito intrigante ao se realizar um estudo meta-analítico destas variantes polimórficas que afetam a ação do TLR4 é que, embora humanos com as variantes 896G e/ou 1196T do gene TLR4 apresentem-se mais resistentes a uma resposta inflamatória induzida (indivíduos hiporesponsivos), em algumas populações, esses indivíduos estão mais suscetíveis a uma resposta inflamatória sistêmica [Allen A, *et al.*, 2003]. Assim, foi observado que a herança das variantes 896G e/ou 1196T está relacionada à propensão a ocorrência de diabetes I e II [Kolek JM, *et al.*, 2004], de arteriosclerose [Kolek JM, *et al.*, 2004], infarto agudo do miocárdio (IAM) e doença arterial coronariana (CAD) [Edfeldt K, *et al.*, 2004]. Foi encontrada uma associação entre a baixa resposta imune (indivíduos hiporesponsivos) relacionada à herança das variantes 896G e/ou 1196T e o risco a diabetes e a IAM, mostrando prevalência de

pacientes portadores das variantes 896G e 1196T do gene TLR4 com IAM [Edfeldt K, *et al.*, 2004].

Foi observado uma associação entre a herança do alelo 896G e níveis reduzidos de proteína C reativa (CRP), a qual é um marcador de resposta às inflamações. No entanto, neste estudo, investigando pacientes sem IAM que passaram por uma angiografia, os autores observaram que portadores do alelo 896G tinham reduzida prevalência de CAD e diabetes I e II. Este achado sugeriu que uma menor resposta a regulação do sistema imune pode ser benéfica, modificando o risco de CAD e da diabete [Kolek JM, *et al.*, 2004].

Um estudo realizado com pacientes com traumas de queimaduras mostrou uma forte relação do SNP 896A>G com o aumento dos riscos para desencadear sepse severa (OR= 2.46, CI 0.88 a 6.90) [Barber RC, *et al.*, 2004]: pacientes portadores do alelo 896G (genótipos 896AG ou 896GG) apresentaram grande redução à resposta às LPS (hipo-responsivos), mas, por outro lado, estes pacientes apresentaram um aumento do risco de desenvolverem choque séptico e uma infecção sistêmica por bactérias gram-negativa [Barber RC, *et al.*, 2004].

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A condição crítica de um paciente, a gravidade de suas disfunções orgânicas, a evolução para sepse, para o choque séptico ou para o óbito são características complexas determinadas pela influência simultânea de centenas de fatores externos e de fatores herdados. O estudo das variantes polimórficas do gene que codifica para a proteína transmembrana *toll-like receptor 4* (TLR4) pode ser útil na busca em desvendar parte do efeito que a herança genética pode ter no momento da doença crítica, dado que esse receptor faz parte da imunidade inata. Nosso objetivo neste trabalho foi, portanto, responder à pergunta que questiona se as variantes polimórficas 896A>G (Asp299Gly) e 1196C>T (Thr399Ile) do gene que codifica para o TLR4 podem influenciar a susceptibilidade à sepse e às disfunções orgânicas em pacientes em condições críticas de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular Immunology. Saunders. Elsevier Science **2003**.
2. Agnese MD, Calvano JE, Hahm SJ, *et al*. Human toll-like receptor 4 Mutation but not CD14 Polymorphisms are associated with an increase Risk of Gram-negative infections. J Infect Dis **2002**; 186: 1522-5.
3. Akira S. Toll like receptors: lessons from knockout mice. Biochem Soc Trans **2000**; 28(5): 551-6.
4. Allen A, Obaro S, Bojang K, *et al*. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group a meningococcal meningitis in Gambian children. Pediatr Infect Dis J **2003**; 22(11): 1018-9.
5. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet. **2000**; 25: 187-91.
6. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chaves FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF- α polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following Burn injury. J Med Gen **2004**; 48: 808-13.
7. Bevilacqua MP. Endothelial leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol **1993**; (11): 767-804.
8. Biron CA. Role of early cytokines, including α and β interferons in innate and adaptive immune responses to viral infection. Semin Immunol **1998**; (10): 383-90.
9. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. Chest **1997**; 112: 235-43.
10. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature **2002**; 420: 885-91.
11. Costalonga M, Zell T. Lipopolysaccharide enhances in vivo interleukin-2 production and proliferation by naïve antigen-specific CD4 T cells via a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. Immunol **2007**:1-7.
12. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. Mitochondrion **2004**; (4): 729-41.
13. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. Chest **1991**; 99:169-75.
14. Downey GP. Mechanism of leukocyte motility and chemotaxis. Curr Opin Immunol **1994**; (6): 113-24.

15. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor super family: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. **2003**; 1-17.
16. Ebong SJ, Goyert SM, Nemzek JA, Kim J, Bolgos GL, Remick DG. Critical role of CD14 for production of proinflammatory Cytokines and cytokine inhibitors during sepsis with failure to alter morbidity or mortality. *Infect Immun* **2001**; 69(4):2099-106.
17. Edfeldt K, Bennet A M, Eriksson P, *et al*. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* **2004**; 25: 1447-53.
18. Emsley J, White HE, O'Hara BP, *et al*. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature* **1994**: 338-67.
19. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RAB. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **1998**; (10): 363-372.
20. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* **1998**; 26: 2078-86.
21. Glück T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble Cd14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* **2001**;(6):351-8.
22. Glück T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* **2001**;(6): 351-8.
23. Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Curr Opin Immunol* **2004**; 16(5): 538-44.
24. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to region encoding growth factors and receptors. *Science* **1998**; 239(4839): 497-500.
25. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* **2001**; (13): 85-94.
26. Haddad JJ, Fahlman CS. Nuclear Factor- κ B- Independent Regulation of Lipopolysaccharide- Mediated Interleukin-6 Biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1045-51.
27. Heard SO, Fink MP. Multiple organ failure syndrome – Part I: Epidemiology, prognosis, and pathophysiology. *Int Care Med* **1991**; 6: 279-94.
28. Hoesel LM, Ward PA. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discovery Today* **2004**; 3(1): 345 -50.

29. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* **2003**; (124): 1103-15.
30. Huang Q, Liu D, Majewski P, *et al.* The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* **2001**; 294: 870-5.
31. Janeway CAJR, Travers P. *Imunobiologia - O sistema imunológico na saúde e na doença.* Art Med **1997**.
32. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* **2007**: 1-11.
33. Kolek JM, Carlquist FJ, Muhlestein BJ, *et al.* Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* **2004**; 148 (6): 1034-40.
34. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **2003**; 15: 396-401.
35. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram-negative bacteriemia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatments in 612 patients. *AM J Med* **1980**; (250): 3324-7.
36. Lamping N, Dettermmer R, Schroder NW, *et al.* LPs-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or Gram- Negative bacteria. *J Clin Invest* **1998**; (101): 2065-71.
37. Landmann R, Reben AM, Sansano S, Zimmerli W. Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis* **1996**; 173: 661-8.
38. Le Van TD, Bloom JW, Bailey TJ. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* **2001**; 167(10): 5838-44.
39. Levy MM, Marshal JC, Abraham E Angus, *et al.* International Sepsis Definitions Conference. *Int Care Med* **2003**; 29(4): 530-8.
40. Liang E, Wong N, Allen I, *et al.* Pharmacokinetics of E5564, a Lipopolysaccharide Antagonist, in patients with impaired Hepatic function. *J Clin Pharmacol* **2003**; (43): 1361-9.
41. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbaya P, *et al.* Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* **2007**; 8(1):124
42. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **1991**; (43): 109-42.

43. Mushegian A, Medzhitov R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J Cell Bio* **2001**; 155: 705-10.
44. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, *et al.* Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* **2005**; (129): 322-8.
45. Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clin Chest Med* **1990**; 11(4): 633-6.
46. O' Neill LA. Estopim Imunológico. *Scientific American Brasil* **2005**; 68-75.
47. Opal SM, Glück T. Endotoxin as drug target. *Crit Care Med* **2003**; 31: 57-64.
48. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, *et al.* Relationship between plasma levels of lipopolusaccharide (LPS) and LPS-Binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* **1999**; 80:1584-9.
49. Opal SM, Yu RLJ. Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. New approaches and future directions. *Drugs* **1998**; 55: 497-508.
50. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends. *Immunol Cell Biol* **2006**; (84): 333-41.
51. Pfeiffer K, Matsuyama T, Kudig TM, *et al.* Mice deficient for 55Kd tumor necrosis factor receptor are resintant to endotoxic shock, yetvsucumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **1993**; (73): 457-67.
52. Rosenfeld Y, Shai Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim Biophys Acta* **2006**; 1-9.
53. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med* **2006**; (355): 1699-713.
54. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphism of TLR4: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles. *Clin Chem* **2002**; 48(10): 1661-7.
55. Scröder WJN, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor and susceptibility in infectious disease. *Lancet Infect Dis* **2005**; (5): 156-64.
56. Sen GC, Lengyel P. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Bio Chem* **1992**; (267): 5017-20.
57. Sheedy FJ, O'Neill LA. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* **2007**; (82): 1-8.
58. Silva E, Othero J, Sogayar ACB. Consenso Brasileiro de sepse- disfunção de múltiplos órgãos. <http://www.einstein.br/sepse/pdf/2.pdf> (28/08/2005).

59. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi- step paradigm. *Cell* **1994**; (76): 301-04.
60. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* **1999**; (1411): 437-55.
61. Van Deventer SJM, Buller HR, ten Cate JW, Sturk A, Pauw W. Endotoxemia as an early predictor of septicemia in febrile patients. *Lancet* **1998**; 1:605-8.
62. Varon J, Marik PE, Irwin RS, Cerra FB, Rippe JM. Multiple organ dysfunction syndrome. In *Intensive Care Medicine*. Lippincott-Raven Philadelphia **1999**; 2044-8.
63. Vincent JL, Carlet J, Opal SM. Sepsis: The magnitude of the problem. *The Sepsis Text* **2002**; Kluwer Academy Publisher.
64. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* **1998**; 26:1793-1800.
65. Vincent JL, Ferreira FL, Evans TW. Multiple organ failure: Clinical syndrome. In *Mechanisms of organ dysfunction in critical illness*. Int Care Med Springer **2002**; 394-403.
66. Weiss WI, Drickmer K, Hendrickson WA. Structure of a C-type mannose binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **1992**; (360): 127-34.
67. Wong N, Rossignol D, Rose JR, Kao R, Carter A, Lynn M. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of E5564, a lipid A antagonist, during an ascending single-dose clinical study. *J Clin Pharmacol* **2003**; (43); 735-42.
68. Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* **2005**; 233(2):85-9.
69. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood J* **2001**; (98): 3800-8.

MANUSCRITO COM RESULTADOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL

TITLE OF THE MANUSCRIPT

Single nucleotide polymorphisms of the toll-like receptor 4 (TLR4) and susceptibility to organ dysfunction and sepsis.

First name, middle initial and last name of each author / highest academic degree, and institutional affiliation for each author:

- Paulo Roberto Vargas Fallavena / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS – Brazil.
- Diego D'Avila Paskulin
- Luis Glock/ PhD
- Fernando Suparregui Dias / MD
- Clarice Sampaio Alho / PhD

Name of the institution(s) where the work was performed:

Faculdade de Biociências (FaBio) and Hospital São Lucas (HSL) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Address for reprints:

Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 P12 - 2º andar. 90619-900 - Porto Alegre, RS - Brazil; Telephone number: (55) (51) 33203568; E-mail address: csalho@pucrs.br

Financial support used for the study, including any institutional departmental funds:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Faculdade de Biociências (FaBio), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Index words:

TLR4 polymorphism; 896A>G SNP; 1194C>T SNP; genetic risk factors; sepsis; organ dysfunction.

Periodic chosen for submission:

Journal of Infectious Disease

Abbreviations:

A - Adenine

AN - ANOVA test

APACHE-II - Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

Asp – Aspartate

C – Cytosine

CD14 – Cluster of differentiation 14

DNA - Deoxyribonucleic acid

eNOS – endothelial nitric oxide synthase

G - Guanine

Glu – Glutamate

Hosp – hospital

HSL - Hospital São Lucas

ICU - Intensive Care Unit

IFN- γ – interferon- γ

IL-1 - interleukin-1

LOS - length of stay

LPS - lipopolysaccharide
mRNA – Messenger ribonucleic acid
MW - mann-whitney *U*-test
nNOS – neuronal nitric oxide synthase
NO – nitric oxide
NOS – nitric oxide synthase
PCR - Polymerase chain reaction
PMNs – Polymorphonuclear neutrophils
PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
SD - standard deviation
SNP – Single nucleotide polymorphism
SNPs - Single nucleotide polymorphisms
SOFA - Sequential Organ Failure Assessment
SOFA1 - SOFA score at day 1, ICU admission
SOFA2 - SOFA score at day 2
SOFA3 - SOFA score at day 3
SOFA4 - SOFA score at day 4
SOFA5 - SOFA score at day 5
SOFA6 - SOFA score at day 6
SOFA7 - SOFA score at day 7
T - Timine
TLR - Toll-like receptor
TNF- α - tumor necrosis factor-alpha
 χ^2 - Pearson Chi-squared test

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate the association between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of toll-like receptor 4 (TLR4) and susceptibility to organ dysfunction and sepsis.

PATIENTS AND METHODS: One hundred and seven patients with sepsis secondary to major Gram-negative bacteria infection admitted to the intensive care unit (ICU) from March 2002 to December 2005 were enrolled for this study. A further 111 non-septic volunteer DNA donors from a gaúcha population were chosen to serve as the normal control group. The organ dysfunction of septic patients was evaluated during the first week after ICU admission, sepsis, septic shock, and mortality in ICU and hospital were considered. Genotypes of 896A>G (Asp299Gly protein alteration) and 1196C>T (Thr399Ile) SNPs were determined in septic patients and non-septic controls by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. Distributional differences of genotypes and alleles between patients and non-septic subjects were analyzed.

RESULTS: The overall presence of 896AG heterozygotes was significantly higher in septic patients (26%; 28/107) than in non-septic individuals (10%; 11/111) ($P=0.002$, OR=3.22, CI_{95%}: 1.43-7.38), as well as in septic shock patients (24%; 18/74) than in non-septic individuals ($P=0.008$, OR=2.92, CI_{95%}: 1.20-7.17). Correspondingly, there was more 896G allele among septic patients (13%; 28/214) than in non-septic subjects (5%; 11/222) ($P=0.003$, OR=2.89, CI_{95%}: 1.33-6.36), as well as in septic shock patients (14%; 18/148) than in non-septic individuals ($P=0.011$, OR=2.66, CI_{95%}: 1.15-6.23). 1196CT+1196TT patients present higher mean SOFA scores (8.12 ± 3.89) when compared to 1196CC (6.82 ± 3.52) (Mann-Whitney test, $P=0.007$). During the first ICU week, the 1196T allele carriers present significantly more SOFA scores equal to or above 7 (69%; 49/71) than 1196CC homozygotes (49%; 304/626) (Chi-square test, $P=0.043$, OR=1.62, CI_{95%}: 0.99-2.67). We also observed that the inheritance of any of these alleles did not affect mortality.

CONCLUSION: The 896A>G and 1196C>T TLR4 SNPs may be associated with a higher risk of susceptibility to the development of more severe organ failure and sepsis.

INTRODUCTION

All Gram-negative bacteria have the lipopolysaccharide (LPS) with a lipid-A invariant portion (called pathogen-associated molecular pattern, PAMP) that is recognized by the animal innate immune system and stimulates a powerful immune response. When PAMPs are recognized by the pattern-recognition receptors (PRR) of the animal innate immune system, pro-inflammatory effect begins [1].

In animal immune systems, toll-like receptors (TLR) are PRRs that have the unique and essential function of being signal-transducing receptors for LPS [2]. TLRs comprise a family of type I transmembrane receptors, which are characterized by an extracellular leucine-rich repeat (LRR) domain and an intracellular Toll/IL-1 receptor (TIR) domain [3]. The human TLR4 was the first mammalian Toll to be characterized [4] and it is expressed in a variety of cell types, predominantly in cells of the immune system, including macrophages and dendritic cells (DCs) [3]. Recognition of LPS by TLR4 is complex and requires several accessory molecules, among them CD14 and MD-2.

After exposure to LPS, the effective TLR4 induces the inflammatory response by prompting macrophages and DC to release the cytokine tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1 (IL-1), which can cause fever and even lead to sepsis, and septic shock [4,5].

Inactive versions of TLR4 [knock-out mice (resultant from TLR4 gene mutations)] render the animal innate immune system hypo- or in-sensitive to LPS. Normal mice die of sepsis within an hour of being injected with LPS (an acute infection induced artificially), but mutant mice with a defective version of TLR4 fail to respond to LPS and survive in the same period [6]. However, a reduced TLR4

function would not efficiently induce the innate inflammatory response and, consequently, an individual could be more prone to systemic infections than would be the case with a normal TLR4 function.

In human genome, two cosegregating single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the TLR4 gene (9q32-q33 *locus*) coding region have been described: 896A>G (Asp299Gly protein alteration) and 1196C>T (Thr399Ile) [7-10]. These SNPs modify the amino acid sequence of the TLR4 extra cellular domain structure, but it is not yet known if both are functional mutations. Growing amounts of data suggest that the ability of certain individuals to respond properly to TLR ligands may be impaired by these SNPs within the TLR4 gene, resulting in an altered susceptibility to, or course of, infectious or inflammatory disease [7].

The mutant variants 896G (Gly) and 1196T (Ile) have been found in significantly higher proportions in patients with a low immune response to LPS (hypo-responsive individuals) when compared to a control population [7, 9]. Epithelial cells derived from hypo-responsive patients have shown a reduction in response to stimulation with LPS *in vitro*, in homozygosis (896GG; 1196TT) as well as in heterozygosis (896AG; 1196CT) [11]. Similar findings have been observed in studies with alveolar macrophages [12]. The adenoviral transfection with the 896A and 896G alleles promoted the recovery of the response to the infection by Gram-negative bacteria caused by the mutant variants 896G and 1196T [9, 10]. People with reduced TLR4 activity would not efficiently induce the innate inflammatory response and, consequently, could be more prone to have systemic infections than those with a normal TLR4. Indeed, the mutations in TLR4 appear to influence the susceptibility to cardiovascular and respiratory diseases which are associated with systemic inflammatory reactions. Compared with wild-type carriers, men with the 896G and the 1196T alleles had an increased risk of myocardial infarction [12]. The 896G allele

carriers were linked to an increased prevalence of asthma in Swedish children [13], but another study investigating asthma found no association of TLR4 variants with the incidence of this disease; however, the 896G allele carriers were found to be significantly correlated with disease severity [14].

Patients with meningococcal disease show a highly significant excess of TLR4 mutant coding variation when compared with ethnically matched controls [15]. 896G allele carriers were associated with reduced levels of C reactive protein (CRP), which is a marker of response to inflammation [16], and were significantly associated with an increased risk of severe sepsis following burn trauma [17]. Similarly, other recent studies have also suggested that altered TLR4 signaling plays a role in the development of sepsis and septic shock [8, 10, 18].

These data have strengthened the suggestion that the mutant variants 896G and 1196T reduce the function of signaling of the innate immunity of the TLR4 which could be potentially involved in the pathogenesis of severe systemic infections and organ dysfunction. For this reason, TLR4 is a good candidate gene for genetic susceptibility studies. In our work, we analyze the evidence for a genetic susceptibility in the course of organ dysfunction, the development of septic shock, and in death from sepsis in septic patients. For this purpose, we used genetic evaluations in order to understand the role of 896A>G and 1196C>T TLR4 SNPs during human systemic infection. We also compared the alternative genotype and allele frequencies between septic patients and non-septic subjects from a southern Brazilian population.

PATIENTS AND METHODS

We studied 107 critically ill patients (61 men and 46 women) admitted to the General Intensive Care Unit (ICU) of the São Lucas Hospital (HSL), Brazil, between May 2002 and December 2005, and 111 non-septic, DNA donor, subjects that served as the normal control group. The enrolled controls were allegedly healthy at the time of the donation of biological material. All patients and controls were from the southern Brazilian population. All patients or their legal representatives gave written, informed consent. Approval for human study protocols was obtained from the Research Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (Protocol # 06/03140).

Patient Data.

We monitored the patients on a daily basis during their entire ICU and post-ICU (hospital) stay, which resulted in measurements from the ICU admission day to a maximum of 165 days. All patients had sepsis secondary from, at least, one Gram-negative bacterium infection focus during their ICU stay. Some critically ill adult patients were previously described partially by D'Avila et al. (2006) [19]. Patients were not eligible if they were under 18 years old or diagnosed with HIV-infection, pregnant, or lactating or taking immunosuppressive drugs.

For diagnosis of sepsis and septic shock we used the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference criteria [20, 21]: at least two of the following criteria: Fever or hypothermia (temperature in the core of the body $> 38^{\circ}\text{C}$ or $< 36^{\circ}\text{C}$); Tachycardia (ventricular rate > 90 bpm); Tachypnea or Hyperventilation (> 20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg); Leucocytosis or Leucopenia.

For illness severity evaluation we used the APACHE-II (Acute Physiology and Chronic Healthy Evaluation II) [20, 22] score obtained on ICU admission day. The organ dysfunction and failure was evaluated using the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score obtained on ICU admission day (SOFA-1) and during the first seven days following the ICU admission [20, 22]. Six different systems are evaluated regarding their clinical conditions in order to determine each SOFA score: cardiovascular function (systolic and diastolic blood pressure, use of vasopressors), liver function (serum bilirubin levels), respiratory (PaO₂, FiO₂), neurological function (Glasgow coma score), coagulation function (platelet count), and renal function (serum creatinine levels, urine output). For each system, we considered without organ dysfunction SOFA scores equal to zero, organ dysfunction scores 1 and 2, and organ failure scores 3 and 4. Total diary SOFA corresponds to the sum of six systems SOFA scores.

Clinical endpoints of the study were discharge from the hospital or death. Mortality was measured in days until death. For those patients with multiple ICU admission during the study period, only data from the first entrance was considered.

Genotyping of 896A>G and 1196C>T TLR4 SNPs:

A 5ml blood sample was collected in a sterile system with EDTA and maintained refrigerated at 4°C or frozen at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA were isolated from leucocytes by standard procedures [23] and maintained at -20°C. Genotyping protocols for 896A>G (Asp299Gly) and 1196C>T (Thr399Ile) polymorphisms were previously described by Arbour et.al [8]. Both DNA sequences were amplified in a 25 µL reaction containing 10-100 ng of DNA, 0.2 mmol/L of each dNTP, 2 mmol/L of MgCl₂ and 1.25 U Taq DNA Polymerase in Taq Buffer (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). The 896A>G SNP was amplified using 10

pmol of each sense 5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG 3'; and antisense 5' GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC 3' primers (synthesized by Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil) in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). The 1196C>T SNP was similarly amplified using sense 5' GGTGAGTGTGACTATTGAAAGGGTAAAAG 3' and antisense 5' GAAGCTCAGATCTAAATACTTTAGGCCG 3' primers (synthesized by Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil) in the same thermocycler. Cycling conditions for both polymorphisms were 95°C for 5 min, followed by 36 cycles at 95°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 30s; and, finally, a 5 min extension at 72°C.

The amplified PCR products (20 µL) were cleaved, in an appropriate buffer, with 5U of the NcoI (5'C/CATGG3'; New England Biolabs™, USA) for the 896A>G SNP; and 5U of MspI (5'C/CGG3'; New England Biolabs™, USA) for 1196C>T SNP in a total volume of 25µL, at 37°C for 4 hours. The restriction digests were visualized on a 2% agar gel, stained with ethidium bromide, and visualized over a UV light to determine the genotypes 896AA (249bp fragment); 896AG (249bp, 222bp, and 27bp); 896GG (222bp and 27bp) and 1196TT (280bp fragment); 1196CT (280bp, 256bp and 24bp); 1196CC (256bp and 26bp). The *Homo sapien* toll-like receptor transcript variant sequence is registered in the EMBL data base as GI: 88758616 (GenBank accession number: NM138554.2). Genotyping was performed in a blinded fashion, i.e., investigators were unaware of patient data.

Statistical analysis:

Statistical calculations were carried out using the SPSS 11.5 statistical package (SPSS, Chicago, USA). Continuous variable results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and the categorical variables as frequencies and percents. Non-normally distributed scalar variables were analyzed as non-parametric using the

Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. For categorical data, we used the Pearson Chi-squared test. To test Hardy–Weinberg equilibrium, the Chi-squared test was used. All reported P values are two-tailed, with 0.05 or less taken as significant.

RESULTS

One hundred and seven patients with secondary sepsis to major Gram-negative bacteria infection were included in the study, 74 of them developed septic shock (69.2%, 74/107). Table 1 illustrates a complete description of the 107 septic patients presented in two groups; all septic patients (n=107), and patients with septic shock (n=74). As the table results show, all patients had sepsis secondary to, at least, one major Gram-negative bacteria focus. We found 14 different varieties of Gram-negative bacteria. *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. were the most frequent cause of infections [42.1% (45/107) and 40.2% (43/107), respectively], and the pulmonary system was the most affected (62.6%, 67/107). All patients presented more than one bacterial variety and more than one focus of infection. Data on age, gender, APACHE II and SOFA-1 scores, organ dysfunction and failure, length of stay in ICU and hospital, together with mortality rates can be seen in Table 1.

We evaluated the influence of 896A>G and 1196C>T SNPs in the two patient groups mentioned above, in an additional 111 non-septic subjects, genetic susceptibility to sepsis and septic shock was analyzed (Figure 1). Figure 1-A shows that there were significant differences among rates of 896A>G genotypes (896AA and 896AG) when we compared all septic patients and non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.002$), and only patients with septic shock and non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.008$). The overall presence of 896AG heterozygotes was significantly higher in septic patients (26%; 28/107) than in non-septic individuals

(10%; 11/111) ($P=0.002$, $OR=3.22$, $CI_{95\%}$: 1.43-7.38), as well as in septic shock patients (24%; 18/74) than in non-septic individuals ($P=0.008$, $OR=2.92$, $CI_{95\%}$: 1.20-7.17). Figure 1-B confirms statistical associations among rates of 896A>G alleles; correspondingly there was more 896G allele among septic patients (13%; 28/214) than in non-septic subjects (5%; 11/222) ($P=0.003$, $OR=2.89$, $CI_{95\%}$: 1.33-6.36), as well as in septic shock patients (14%; 18/148) than in non-septic individuals ($P=0.011$, $OR=2.66$, $CI_{95\%}$: 1.15-6.23).

Figure 1-C illustrates that there were no significant differences among rates of 1196C>T genotypes (1196CC and 1196CT+1196TT) when we contrasted all septic patients and the non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.368$), or septic shock patients and non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.495$). Figure 1-D specifies no differences among rates of 1196C>T alleles when we compared all septic patients and the non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.305$), or only septic shock patients and non-septic subjects (Chi-square test, $P=0.572$). For the entire evaluation presented in Figure 1 all statistical differences with $P<0.05$ was showed.

Finally, we analyzed the isolated effect of variants 896G and 1196T in septic and septic shock patients, compared with the non-septic group (Figure 2). Because the frequency of mutant alleles is low and only one patient was mutant homozygote (1196TT), in this evaluation we segregated subjects in two classes of double genotypes: 896AA/1196CC *versus* 896AG/1196CT (in this last cluster there is only one mutant allele for each SNP). Figure 2 shows that there were no significant differences among rates of two double genotype classes when we compared septic patients and the non-septic subjects (Chi-square test, $P<0.353$), or between the septic shock patients and the non-septic subjects (Chi-square test, $P<0.829$). When observed simultaneously, the overall presence of one mutant allele for each SNP

(896AG/1196CT) was similar in septic (4.8%; 5/104), shock septic (5.6%; 4/71) patients, and in non-septic individuals (7%; 7/100) (Figure 2).

We found that total genotype and allele frequencies (patients and non-septic subjects) to both SNPs were at Hardy-Weinberg equilibrium (896AA=0.83, 896AG=0.17, 896GG=0 and 896A=0.92, 896G=0.08; Pearson Chi-square test $P=0.702$; 1196CC=0.85, 1196CT=0.14, 1196TT=0.01 and 1196C=0.92, 1196T=0.08; Pearson Chi-square test $P=0.995$). Also, the isolated frequencies from samples obtained from patients or non-septic volunteers did not differ from the values expected by the Hardy-Weinberg model (patients: 896AA=0.74, 896AG=0.26, 896GG=0 and 896A=0.87, 896G=0.13; Pearson Chi-square test $P=0.753$; 1196CC=0.88, 1196CT=0.11, 1196TT=0.01 and 1196C=0.93, 1196T=0.07; Pearson Chi-square test $P=0.836$; non-septic subjects: (896AA=0.89, 896AG=0.11, 896TT=0 and 896A=0.95, 896G=0.05; Pearson Chi-square test $P=0.817$; 1196CC=0.82, 1196CT=0.17, 1196TT=0.01 and 1196C=0.91, 1196T=0.09; Pearson Chi-square test $P=0.852$).

The effect of 896A>G and 1196C>T SNPs was estimated during the first ICU week in order to analyze the genetic susceptibility in the course of a critical clinical condition based on organ dysfunction measured by SOFA scores (Figure 3). Figure 3-A demonstrates that among 896A>G genotypes there was no significant difference in SOFA scores during the first ICU week (Mann-Whitney test, $P=0.674$). Nevertheless, Figure 3-B shows that among 1196C>T genotypes there was a significant difference in SOFA scores throughout the first ICU week; 1196CT+1196TT patients presented higher mean SOFA scores (8.12 ± 3.89) when compared to 1196CC (6.82 ± 3.52) (Mann-Whitney test, $P=0.007$). As a prognostic score, the total SOFA score consensually can predict mortality [24]; lower frequency of deaths are observed in the group with scores under 7 and worst prognosis when the total SOFA

score is equal or above 7. In our analysis, during the first ICU week, 1196T allele carriers (1196CT+1196TT genotypes) presented significantly more total SOFA scores equal or above 7 (69%; 49/71) than 1196CC homozygotes (49%; 304/626) (Chi-square test, $P=0.043$, OR=1.62, CI_{95%}:0.99-2.67).

The frequencies of 896A>G and 1196C>T genotypes were determined considering the mortality rates. Figure 4 demonstrates that there were no significant differences among 896A>G (Figure 4-A) and 1196C>T (Figure 4-B) genotypes in the mortality rates of patients monitored daily during their entire ICU and post-ICU (hospital) stay from the ICU admission to a maximum of 165 days. Hospital deaths of septic patients showed similar results; 896AA (57%, 46/81) and 896AG (54%, 14/26) (Chi-square test, $P=0.792$), and 1196CC (55%, 50/91) and 1196CT+TT (62%, 8/13) (Chi-square test, $P=0.654$). Other P values are shown in the figure legend.

DISCUSSION

In 2000, Arbour and colleagues originally reported the two cosegregating TLR4 SNPs that were found at a substantially higher proportion among people hyporesponsive to inhaled lipopolysaccharide (LPS), compared with a control population [8]. Arbour and colleagues' report was followed by a series of studies investigating the potential impact of these SNPs on the incidence and course of infectious diseases, which can be better examined in Schröder and Schumann's review [7]. In 2002, Lorenz and colleagues identified an association of the 896G, but not the 1196T allele, with the incidence of septic shock during infections with Gram-negative bacteria in 91 patients [18]. In the same year, Agnese and colleagues detected that both SNPs were associated with an increased risk of Gram-negative infections in 77 a ten-fold increase in pregnant women carrying 1196T allele [25]. In

contrast, more recently, two studies failed to detect a significant correlation between these SNPs and the incidence of sepsis [26] or severity of SIRS (severe inflammatory response syndrome) [27].

The nonsynonymous adenine to thymine mutation at nucleotide +896 of the human TLR4 gene (896A>G) causes an asparagine to glycine replacement at 299 amino acid in protein (Asp299Gly). The 1196 cytosine to thymine transition (1196C>T) originates a threonine to isoleucine (Thr399Ile) substitution at 399 residue. The area containing the residues 299 and 399 belongs to the cellular extra domain (ectodomain) of connection to LPS. Thus, because these SNPs are situated within the extracellular domain coding area, the impact is most likely caused by a decreased recognition of ligands. Overexpression studies indicated that the Asp299Gly substitution might have a greater functional impact compared with Thr399Ile [8]. Indeed, comparative analysis shows that the sequence of TLR4 is highly conserved in vertebrates, and the preservation of the cellular extra domain is the assurance of effectiveness in the recognition of LPS. Hence, considering the structural and chemical characteristics of the amino acids, the change Asp (acid residue) to Gly (neutral) may be a more significant alteration than Thr to Ile (both neutral). It may also be a cumulative effect of two SNPs, and one or the two SNPs to be in linkage disequilibrium with other rare functional variants within TLR4 gene or with other gene.

Our results showed that there was a three-fold increase in the presence of the 896G allele in patients with sepsis secondary to Gram-negative bacteria infection when compared to non-septic individuals. When we studied the course of organ dysfunction during ICU stay, we detected that those patients with significant higher dysfunction SOFA scores were 1196T, but not 896G, carriers. We also observed that the inheritance of any of these alleles did not affect mortality. Looking for a single

interpretation of inheritance of two polymorphic variants in our sample, we can consider that if the proposition that 896G and 1196T alleles interfere in the TLR4 recognized function is correct, it would explain our data which suggests that patients with 896G and 1196T alleles have greater susceptibility to unregulated inflammatory response.

Even with the possible controversy regarding the genetic association data, our results emphasize the idea that the mutant alleles at the 896A>G and 1196C>T SNPs can have some impact in the phenotype, and carriers of these alleles could have increased susceptibility to Gram-negative sepsis or severe organ dysfunction. A reduced signal in response to LPS by a TLR4 mutant molecule does not induce an inflammatory response that is strong enough to clear the bacteria colonization, which spreads and becomes systemic. Systemic infection is what triggers an unregulated inflammatory response which is the basis of sepsis, shock, and organ failure. A reduced signal in response to LPS by a TLR4 was experimentally observed by novel amphipathic compounds E5531 and E5564 that have been developed as direct antagonists of LPS at the TLR4 LPS receptor [28-30]. E5564 is a synthetic second generation analog of the lipid-A component of LPS that blocks TLR4 and has been proven to be a powerful inhibitor of the release of cytokines and other cell mediators [31, 32]. Patients treated with E5564 were seen to become hypo-responsive [32, 33].

Because 896A>G and 1196C>T SNPs seem to interfere in the TLR4 function, consequently affecting innate immunity, these genetic variants may be independent and significant risk factors of septic and severe critical clinical conditions. In summary, based on present and previous observations, we propose that 896A>G and 1196C>T TLR4 SNPs can be considered potential prognostic genetic markers for sepsis, septic shock, and organ dysfunction.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Process # 505536/2004-8). The study is part of the Master's Degree dissertation of the first author.

REFERENCES

1. Janeway CAJR. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **1992**; (13): 11–6.
2. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* **1999**; 162(7): 3749-52.
3. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997**; 388(6640): 394-7.
4. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med* **1999**; 340: 1834-5.
5. Ulevitch RJ. Toll gates for pathogen selection. *Nature* **1999**; 401(6755): 755-6
6. Beutler B. Inferences, Questions and Possibilities in Toll-like Receptor Signaling. *Nature* **2004**; 430(6996): 257-63.
7. Schröder WJN, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor and susceptibility in infectious disease. *The Lancet* **2005**; 5: 156-64.
8. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* **2000**; 25(2): 187–91.
9. Schmitt C, Humeny A, Becker CM. Polymorphism of TLR4: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles. *Clin Chem* **2002**; 48(10): 1661-7.
10. Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, *et al.* Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* **2002**; 186(10): 1522–5.
11. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **2003**; 15: 396-401.
12. Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, Frostegard J. Association of hyporesponsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* **2004**; 25: 1447-53.

13. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* **2004**; 114(3): 561-7.
14. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* **2004**; 5: 41-5.
15. Smirnova I, Mann N, Dols A, et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci* **2003**; 100(10): 6075-80.
16. Kolek JM, Carlquist FJ, Muhlestein BJ, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* **2004**; 148 (6): 1034-40.
17. 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**; 41(11): 808-13.
18. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* **2002**; 162(9): 1028-32.
19. D'Avila LC, Albarus MH, Franco CR, et al. Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunol Cell Biol* **2006**; 84(3): 342-8.
20. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* **1985**; 13(10): 818-29.
21. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* **2003**; 31(4): 1250-6.
22. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* **1996**; 22(7): 707-10.
23. Lahiri DK, Nurnberger JIJR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **1991**; 19 (19): 5444.
24. Ceriani R, Mazzoni M, Bortone F, et al: Application of the Sequential Organ failure Assesment Score to cardiac surgery patients. *Chest* 2003; 123(4): 1229-39.

25. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2004**; 116(2): 152-6.
26. Child NJA, Yang IA, Pulletz MCK, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans* **2003**; 31(Pt 3): 652-3.
27. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, et al. Effects of functional Toll-like Receptor-4 on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunol* **2003**; 109(3): 426-31.
28. Wasan M, Sivak O, Cote AR, MacInnes AI, et al. Association of the Endotoxin Antagonist E5564 with High-Density Lipoproteins In Vitro: Dependence on Low-Density and Triglyceride-Rich Lipoprotein Concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47(9): 2796-2803.
29. Lynn MY, Wong YN, L.Wheeler J, Kao RJ, et al. Extended in Vivo Pharmacodynamic Activity of E5564 in Normal Volunteers with Experimental Endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**; (308): 175-81.
30. Liang E, Wong YN, Allen I, Kao R, Marino M, DiLea C. Pharmacokinetics of E5564, a Lipopolysaccharide Antagonist, in Patients with Impaired Hepatic Function. *J Clin Pharmacol* **2003**; 43(12): 1361-9.
31. Rossignol DP, Christ WJ, Hawkins LD, et al. Synthetic endotoxin antagonists, in *Endotoxin in Health and Disease* (Brade H, Opal SM, Vogel SN, and Morrison DC eds) Marcel Dekker Inc **1999**; 699-717.
32. Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, et al. Inhibition of endotoxin response by E5564, a novel toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**; 304:1093-102.
33. Rossignol DP and Lynn M. Antagonism of in vivo and ex vivo response to endotoxin by E5564, a novel synthetic lipid A antagonist. *J. Endotoxin Res* **2003**; 8: 483-8.
34. Newport MJ, Allen A, Awomoyi AA, et al. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia. *Tuberculosis* **2004**; 84(6): 347-52.
35. Allen A, Obaro S, Bojang K, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group a meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J* **2003**; 22(11): 1018-9.
36. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* **2005** 11(5): 681-5.

37. Hang J, Zhou W, Zhang H, Sun B, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population. *J Endotoxin Res* **2004**; 10(4): 238-40.
38. van Rijn BB, Roest M, Franx A, et al. Single step high-throughput determination of Toll-like receptor 4 polymorphisms. *J Immunol Methods* **2004**; 289(1-2): 81-7.
39. Reismann P, Lichy C, Rudofsky G, et al. Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J Neurol* **2004**; 251(7): 853-8.
40. Rittersma SZ, Kremer Hovinga JA, Koch KT, et al. Relationship between in vitro lipopolysaccharide-induced cytokine response in whole blood, angiographic in-stent restenosis, and toll-like receptor 4 gene polymorphisms. *Clin Chem* **2005**; 51(3): 516-21.
41. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* **2003**; 197(12): 1787-91.
42. Hawn TR, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Aderem A. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**; 102(7): 2487-9.
43. Imahara SD, Jelacic S, Junker CE, O'Keefe GE. The TLR4 +896 polymorphism is not associated with lipopolysaccharide hypo-responsiveness in leukocytes. *Genes Immun* **2005**; 6(1): 37-43.
44. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* **2005**; 11(10): 1489-95.

Table 1: Septic patient characterization.

Characteristics	All septic patients	Only septic shock
N (%)	107 (100)	74 (69.2)
Age [years; mean (SD)]	56.05 (18.88)	57.47 (18.57)
Age Range [median (min/max)]	59.00 (13 / 93)	61.00 (13 / 93)
Gender [male (%) / female (%)]	61 (57) / 46 (43)	44 (59) / 30 (41)
Bacterial variety [N (%)]		
<i>Acinetobacter sp</i>	43 (40.18)	23 (31.08)
<i>Alcaligenes sp.</i>	1 (0.90)	0
<i>Burkholderia sp</i>	3 (2.80)	2 (2.70)
<i>Enterobacter</i>	10 (9.34)	7 (6.54)
<i>Enterococcus</i>	10 (9.34)	5 (6.76)
<i>Escherichia coli</i>	8 (7.47)	3 (4.05)
<i>Haemophilus</i>	1 (0.90)	0
<i>Klebsiella</i>	28 (26.16)	24 (32.43)
<i>Bacilo gram-negativa</i>	1 (0.90)	1 (1.35)
<i>Proteus</i>	7 (6.54)	4 (5.40)
<i>Pseudomonas</i>	45 (42.05)	36 (48.65)
<i>Serratia</i>	1 (0.90)	1 (1.35)
<i>Stenophomonas</i>	1 (0.90)	1 (1.35)
<i>Streptococcus</i>	6 (5.60)	6 (8.11)
Infection focus [n (%)]		
Pulmonary system	67 (62.61)	56 (75.67)
Urinary system	13 (12.14)	7 (9.46)
Abdominal	34 (31.77)	18 (24.32)
Catheter	1 (0.90)	0
Neural system	6 (5.60)	3 (4.05)
Skin	8 (7.47)	5 (6.76)
Other	5 (4.67)	3 (4.05)
APACHE II score [mean (SD)]	20.65 (7.28)	21.00 (7.25)
SOFA-1 [mean (SD)]	7.23 (3.131)	8.11 (2.850)
With only organ dysfunction [N (%)]	1 (0.93)	0
With organ failure [N (%)]	106 (99.07)	74 (100)
ICU LOS [days; median (min/max)]	24.50 (1/128)	27 (1/118)
ICU+H LOS [days; median (min/max)]	44 (8/165)	50 (8/165)
ICU mortality [N (%)]	52 (48.59)	46 (62.16)
ICU+H mortality [N (%)]	60 (56.07)	51 (68.91)

One hundred and seven critically ill patients included in the study presented in two groups: all septic patients (n=107), and patients with septic shock of them (n=74). N, number of patients; SD, Standard deviation of the mean; ICU: Intensive care unit; APACHE II: Acute Physiology And Chronic Healthy Evaluation II score obtained on ICU admission day; SOFA-1: Sequential Organ Failure Assessment score obtained daily during the first week from the ICU admission (day 1); Organ dysfunction: when six systems SOFA scores were only 1 or 2 during a first ICU week; Organ failure: when six systems SOFA scores were, at least once, 3 or 4 during a first ICU week. ICU LOS: Length of stay in intensive care unit, measured by number of days; ICU+H LOS: Total length of stay in ICU and post-ICU (hospital), measured by number of days; Mortality: outcome of septic patients in total length of stay in ICU and ICU+H.

Table 2: Characteristics of studies reporting 896A>G and 1196C>T allele frequencies in different populations.

Author	N	896A Allele	896G Allele	1196C Allele	1196T Allele	Location
Hawn <i>et al.</i> , 2005	616	0.64	0.36	0.64	0.36	USA
Gazouli <i>et al.</i> , 2005	305	0.85	0.14	0.97	0.02	Greece
Edfeldt <i>et al.</i> , 2004	2774	0.87	0.13	0.87	0.13	Sweden
Rittersma <i>et al.</i> , 2005	236	0.87	0.13	0.88	0.12	Netherlands
Barber <i>et al.</i> , 2004	159	0.88	0.11	-	-	USA
Newport <i>et al.</i> , 2004	245	0.88	0.11	-	-	Gambia
Allen <i>et al.</i> , 2003	524	0.88	0.11	-	-	Gambia
Erridge <i>et al.</i> , 2003	80	0.90	0.10	0.90	0.10	Scotland
Imahara <i>et al.</i> , 2005	80	0.90	0.10	-	-	USA
Lakatos <i>et al.</i> , 2005	727	0.90	0.10	-	-	Hungary
Genc <i>et al.</i> , 2004	238	0.90	0.10	-	-	USA
Reismann <i>et al.</i> , 2004	1411	0.91	0.08	0.91	0.08	Germany
Kolek <i>et al.</i> , 2004	1894	0.91	0.09	-	-	USA
Van Rijn <i>et al.</i> , 2004	345	0.93	0.07	0.93	0.07	Netherlands
Hang <i>et al.</i> , 2004	491	1.00	0	1.00	0	China

N: total number of studied subjects (cases + controls); USA: United States of America.

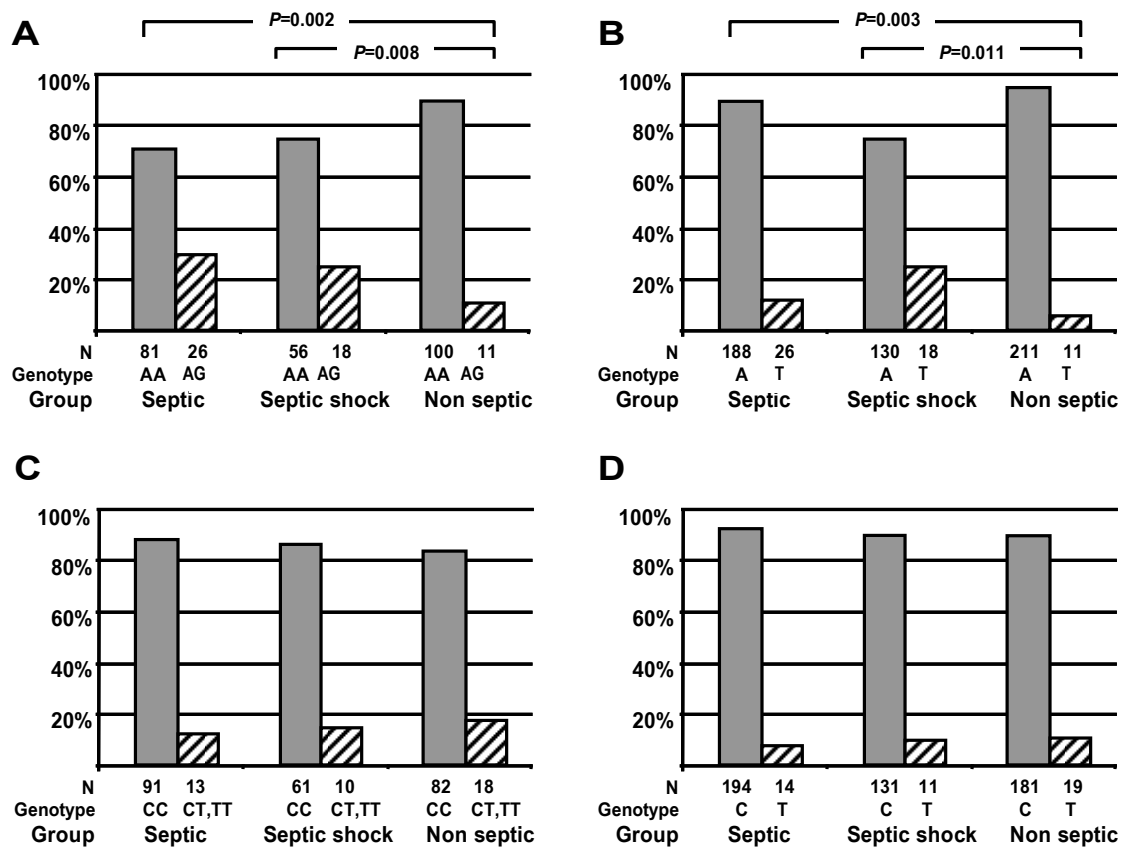


Figure 1. 896A>G and 1196C>T SNPs frequencies in the two patient groups and in non-septic subjects. A and B: Percentiles of 896A>T genotypes and alleles, respectively, of septic patients (n=107), patients with septic shock (n=74), and in non-septic subjects (n=111). C and D: Percentiles of 1196A>T genotypes and alleles, respectively, of septic patients (n=104), patients with septic shock (n=71), and in non-septic subjects (n=100). Genotypic and allele frequencies are indicated as percents and numbers (N). Genotype and allele classes are indicated below the colored bars. Statistical associations were calculated by Chi-square test. Only the significant differences are shown ($P<0.05$).

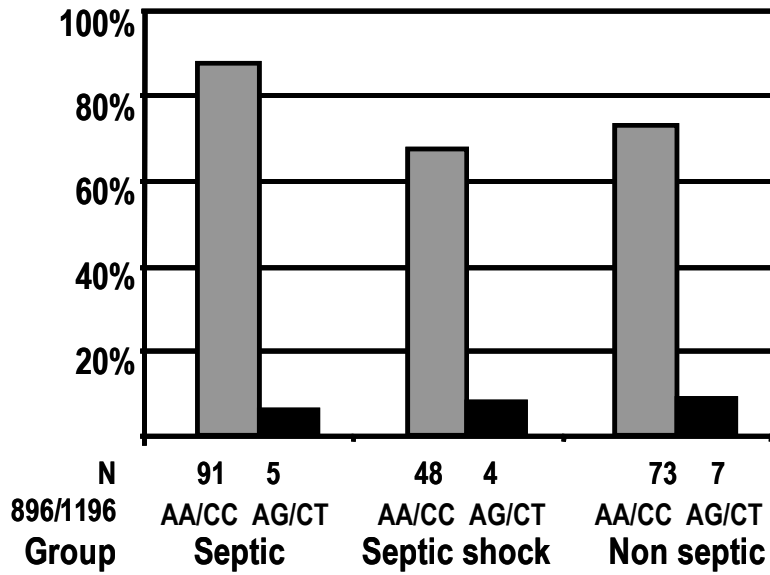


Figure 2. Percentiles of double genotype classes in the two patient categories and in non-septic subjects. The two classes of double genotypes are colored as: 896AA/1196CC: gray and 896AT/1196CT: black. All septic patients (N=104), only patients with septic shock (N=71), non-septic subjects (N=100). Frequencies are indicated as percents and numbers (N). Statistical associations were calculated by Chi-square test. Comparison found no significant differences.

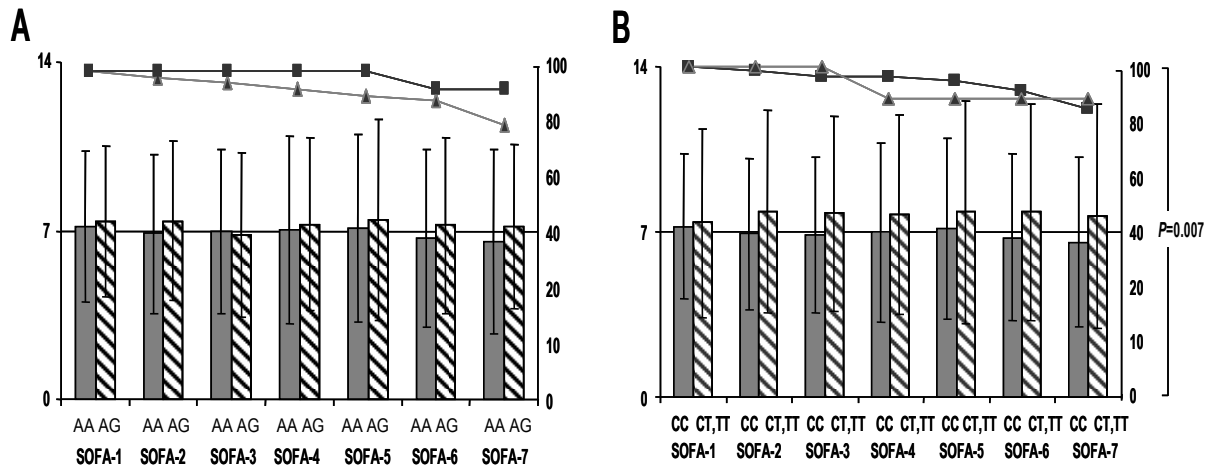


Figure 3. Means of total SOFA scores by 896A>T and 1196C>T genotypes during the first ICU week. A: Mean and standard deviation of daily SOFA score in 896AA (solid bars) and 896AT (striped bars) genotypes. Scale of the SOFA values is on the left. The lines above represent the percents of surviving patients by 896AA (square) and 896AT (triangle) genotypes, with scale on the right. B: Mean and standard deviation of daily SOFA score in 1196CC (solid bars) homozygote and 1196T carriers (striped bars). The lines above represent the percents of 1196CC (square) and 1196CT+TT (triangle) surviving patients. Statistical associations were calculated in A and B by Mann-Whitney test. Genotype classes and SOFA-days are indicated below the colored bars. Only the significant differences are shown ($P > 0.05$).

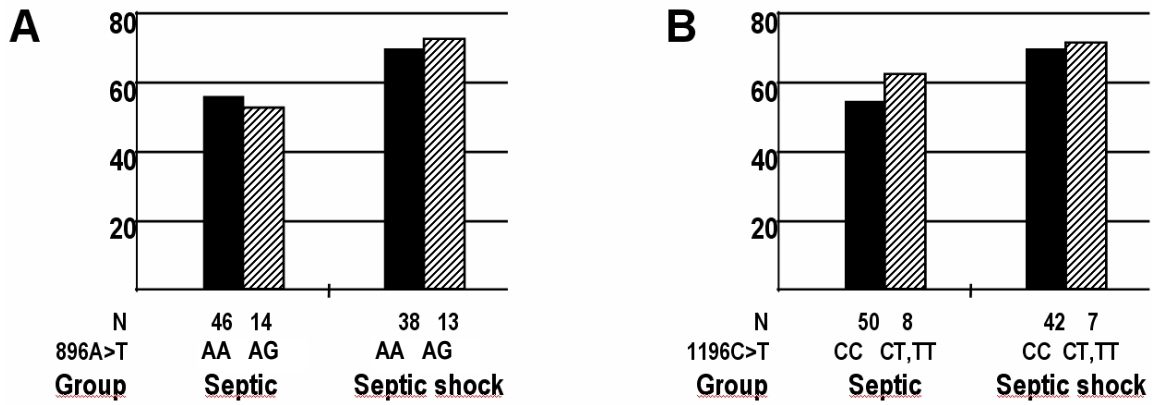


Figure 4. Mortality rates by 896A>T and 1196C>T TLR4 SNPs genotypes. A: Percentiles of deceased by 896A>T genotypes of all septic patients (n=107; $P=0.792$), only patients with septic shock (n=74; $P=0.188$). B: Percentiles of deceased by 1196C>T genotypes of all septic patients (n=104; $P=0.654$), only patients with septic shock (n=71; $P=0.767$). Genotypic and allele frequencies are indicated as percents and numbers (N). Genotype classes are indicated below the colored bars. Statistical associations were calculated by Chi-square test.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sepse e a falência orgânica são características complexas determinadas pela interferência de múltiplos fatores. Centenas ou milhares de fatores externos e de fatores intrínsecos determinarão simultaneamente a susceptibilidade para e o desfecho de uma condição clínica patológica crítica. Cada efeito externo e cada um dos genes herdados exercerá isoladamente um pequeno efeito, mas que cumulativamente, no somatório com os demais, definirá a evolução do quadro clínico. O estado de saúde, o prognóstico e o desfecho de pacientes em condições críticas de saúde estão, portanto, também relacionados a herança genética que indivíduo recebeu.

Ainda que centenas de genes estejam envolvidos na modulação fisiológica final de um indivíduo com um quadro patológico complexo, aqueles genes que interferem sistemicamente são sempre muito decisivos. Trabalhar com as variantes polimórficas do gene que codifica para a proteína trans-membrana *toll-like receptor 4* (TLR4) foi um esforço na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética pode ter no momento da doença crítica e a sepse.

Como apresentado ao longo deste trabalho, nosso objetivo foi responder à pergunta que questiona se variantes polimórficas do gene que codifica para o TLR4 poderiam influenciar a susceptibilidade à sepse e às disfunções orgânicas em pacientes críticos. Nós verificamos que, pelo menos em parte, a susceptibilidade à sepse ao choque séptico e à gravidade das disfunções orgânicas pode ser decorrente da herança das variantes polimórficas do TLR4.

Baseado em registros prévios, pode-se considerar que as variantes polimórficas 896A>G e 1196C>T estão ligadas ou interferem diretamente na função diferencial do TLR4 e isso afeta, conseqüentemente, a resposta imune inata. Sendo

assim, nossos resultados mostram que a herança diferencial de alelos destes SNPs (*single nucleotide polymorphism*) pode ser, de fato, um fator de risco independente e significativo de susceptibilidade para a gravidade da condição clínica crítica e para a evolução da sepse.

Em conclusão, baseado em observações prévias e no presente estudo, nós propomos que as variantes polimórficas 896A>G e 1196C>T do gene que codifica para o TLR4 podem ser considerados potenciais marcadores genéticos para a sepse e para gravidade das disfunções orgânicas em pacientes em estado crítico de saúde.