

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
MESTRADO

DIEGO D'AVILA PASKULIN

ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO -308G>A
DO GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)- α E O DESFECHO CLÍNICO DE
PACIENTES CRÍTICOS

Porto Alegre
Março 2009

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

DIEGO D'AVILA PASKULIN

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO -308G>A DO
GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)- α E O DESFECHO
CLÍNICO DE PACIENTES CRÍTICOS**

**Porto Alegre
2009**

DIEGO D'AVILA PASKULIN

**ESTUDO ASSOCIATIVO ENTRE O POLIMORFISMO -308G>A DO GENE DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)- α E O DESFECHO CLÍNICO DE
PACIENTES CRÍTICOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Clarice Sampaio Alho

**Porto Alegre
2009**

***Dedico esta dissertação aos meus pais Giorgio e Katya,
pelas lições de vida, sabedoria e incentivo.***

AGRADECIMENTOS

A Doutora Clarice Sampaio Alho, pela orientação e oportunidade de aprendizado.

Ao Doutor Fernando Suparregui Dias, pela colaboração e dedicação diária à coleta de dados para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas de pós-graduação Paulo Fallavena, Paulo Raimann, Francis Paludo Helena Thurrow e Juliane Picanço e aos colegas de laboratório Thiago Borges e Lucas Fraga pelo constante apoio e companheirismo.

A secretária Catia Bonacina pela paciência e pelo auxílio em todos os trâmites acadêmicos.

*“Os guerreiros vitoriosos vencem antes de ir à guerra,
ao passo que os derrotados vão a guerra
e só então procuram a vitória”*

SUN TZU

RESUMO

O Fator de Necrose Tumoral (TNF)-a é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, com efeitos no metabolismo de lipídeos, na coagulação sanguínea e na função endotelial. Diferentes estudos sugerem que pacientes com o genótipo -308AA, do SNP -308G>A do gene TNF-a, possuíam níveis mais elevados de TNF-a no plasma, levando o sistema imune a uma resposta inapropriada e aberrante frente a uma infecção, o que poderia aumentar o risco de sepse, choque séptico ou disfunção orgânica. O objetivo deste estudo foi comparar as condições clínicas (disfunções orgânicas) e a frequência de sepse, choque séptico e mortalidade em pacientes críticos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), quanto à pacientes com e sem o alelo -308A do TNF-a. Foram utilizados dados clínicos e demográficos (idade, gênero, tempo de internação, mortalidade durante a permanência total no hospital, escores APACHE II e SOFA), e genotipagem dos pacientes para o SNP -308G>A do TNF-a por PCR-RFLP. Um total de 437 pacientes críticos internados na UTI do Hospital São Lucas da PUCRS (Porto Alegre, Brasil) foram avaliados. As frequências genotípicas -308GG= 0.71 (n=312); -308GA=0.28 (n=120); -308AA=0.01 (n=5); e alélicas -308G=0.85 e -308A=0.15 não diferiram dos valores esperados pelo modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P=0.211$). Do total, 297 (68%) pacientes desenvolveram sepse e 212 (48%) choque séptico. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre pacientes -308GG (n=312; 71%) e -308GA+AA (n=125; 29%) quanto à suscetibilidade a sepse, choque séptico, falência orgânica ou mortalidade. Os resultados mostram que SNP -308G>A do TNF-a não tem efeito sobre as condições clínicas e na susceptibilidade à sepse e choque séptico ou na mortalidade dos pacientes em estado crítico de saúde.

Palavras Chave: TNF-a. Sepse. Disfunção Orgânica. UTI.

ABSTRACT

Tumor necrosis factor (TNF)- α is a multifunctional proinflammatory cytokine secreted predominantly by monocytes/macrophages that has effects on lipid metabolism, coagulation, insulin resistance, and endothelial function. A SNP at position -308 (relative to the transcription start site), believed to alter TNF- α gene transcription, has been associated with enhanced TNF- α production and negative outcome in some severe infections. Our aim is to investigate the frequency of the -308A allele in critical ill patients to determine whether the allele is associated with the occurrence of sepsis, septic shock and organ dysfunction. Clinical and demographic data (i.e. age, gender, length of ICU and hospital stay, mortality, SOFA and APACHE II scores) and genotyping results for the TNF- α -308G>A SNP were utilized in the analyses. Four hundred and thirty seven critically ill patients admitted to the Intensive Care Unit of the Sao Lucas Hospital – PUCRS (Porto Alegre, Brazil) were investigated. The general genotypic frequencies in our sample were -308GG=0.71 (n=312); -308AG=0.28 (n=120); -308AA=0.01 (n=5) and the allelic frequencies were -308G=0.85; -308A=0.15. The allelic and genotypic frequencies did not differ from the values expected by the Hardy-Weinberg model ($P=0.211$). We analyzed the -308G>A TNF- α SNP effect in whole patients group (n=437); in patients with sepsis (n=297; 68%); and in septic shock patients (n=212; 48%). No associations were found between -308GG patients (n=312, 71%) and -308GA+AA patients (n=125; 29%) and sepsis, septic shock, and mortality rates. We also investigate if -308G>A TNF- α genotypes could be affecting organ dysfunction or failure, but no statistical associations were found. Our results suggest that -308G>A TNF- α SNP does not play a major role in the outcome to sepsis, septic shock, higher organ dysfunction or mortality in critically ill patients.

Key Words: TNF- α . Sepsis. Organ Dysfunction. ICU.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

3'UTR: 3' Untranslated Region

5'UTR: 5' Untranslated Region

°C: Graus Celsius

A: Adenina

ACCP-SCCM: American College of Chest Physicians - Society of Critical Care Medicine

AP-1: Activator Protein 1

AP-2: Activator Protein 2

APCs: antigen-presenting cells

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

Bpm: Batimentos por minuto

C: Citosina

CD14: Cluster of Differentiation 14

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CREB: cAMP response element-binding

Da: Dalton

DCs: dendritic cells

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

EGR-1: Early Growth Response Protein 1

G: Guanina

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HSL: Hospital São Lucas

iNOS: Inductible Nitric Oxide Synthase

irpm: Impulso respiratório por minuto

k: Quilo

IL: Interleucina

LPS: Lipopolysaccharide

mmHg: Milímetros de Mercúrio

MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome

MOF: Multiple Organ Failure

mRNA: Messenger Ribonucleic Acid

PaCO₂: Pressão parcial de Dióxido de Carbono

PCR: Polymerase Chain Reaction

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

Sp1: Specificity Protein 1

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

T: Timina

TCLE: Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TLR: Toll-like Receptor

TNFR1: Tumor Necrosis Factor-alpha Receptor-1

TNFR2: Tumor Necrosis Factor-alpha Receptor-2

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

tRNA: Transfer Ribonucleic Acid

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

UTIG: Unidade de Terapia Intensiva Geral

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	11
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1.1 Infecção e Sepses.....	11
1.1.2 Imunidade Inata.....	13
1.1.3 Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva	16
1.1.4 Variantes Polimórficas e a Sepses	18
1.1.5 O gene do Fator de Necrose Tumoral (TNF)-a	20
1.2 OBJETIVOS.....	24
1.2.1 Justificativa e Hipótese	24
1.2.2 Objetivos	24
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	25
TITLE OF THE MANUSCRIPT	26
SUMMARY.....	27
INTRODUCTION.....	28
MATERIALS AND METHODS.....	28
RESULTS.....	31
DISCUSSION.....	33
ACKNOWLEDGMENTS	35
REFERENCES.....	36
TABLES	41
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	54
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	54
ANEXO B - Cartas de Aceite pelo CEP-PUCRS	57
ANEXO C - Carta de Recebimento do Periódico.....	59

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Infecção e Sepsis

O termo sepsis, primeiramente utilizado pelo poeta grego Homero, há mais de 2.700 anos, significa putrefação, decomposição da matéria orgânica por um agente agressor (bactérias, fungos, parasitas, vírus) [Geroulanos *et al.*, 2006]. Enquanto que o termo infecção está relacionado à presença de agente agressor em uma localização, (tecido, cavidade ou fluido), o termo sepsis está relacionado à consequente manifestação do hospedeiro, ou seja, à reação inflamatória desencadeada frente uma infecção [Matos *et al.*, 2003].

A sepsis é caracterizada pela ativação amplificada do sistema imune após uma infecção [Friedman *et al.*, 1998; Cohen, 2002; Hoesel *et al.*, 2004]. Apesar de esforços para o aprimoramento de ferramentas de prognóstico, como os escores APACHE II e SOFA, os médicos intensivistas continuam com dificuldades para a previsão da evolução do estado de pacientes críticos [Holmes *et al.*, 2003]. Ainda que recentes avanços terapêuticos possam auxiliar intensivistas no combate à sepsis, ao choque séptico e à disfunção de múltiplos órgãos, essas patologias continuam sendo as maiores causas de morte nas UTIs [Dombrovskiy *et al.*, 2007]. Com o aumento da expectativa de vida, a disseminação de procedimentos invasivos (cateteres intravenosos), o uso de drogas imunossupressoras para o tratamento de neoplasias, doenças auto-imunes, transplantes e aumento de casos de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a incidência de sepsis vem aumentando expressivamente nas últimas décadas, tendendo a aumentar ainda mais nos próximos anos [Boontham *et al.*, 2003].

Em contraste às infecções facilmente controladas pelo hospedeiro, as infecções fatais são caracterizadas por uma incapacidade do hospedeiro na contenção de sua resposta inflamatória própria, na qual a liberação sistêmica de citocinas na circulação ativa a resposta inflamatória, conhecida como Síndrome da Resposta

Inflamatória Sistêmica (SIRS; *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) [Matsuda et al., 2006]. Em 1991, foi realizada a Conferência de Consenso de Sepse [Bone et al., 1992], cujo objetivo foi determinar a padronização de novas definições e termos sobre sepse aumentando assim a precisão e a rapidez do diagnóstico. Desta forma, foram definidos, entre outros, conceitos como SIRS, sepse e choque séptico.

A **SIRS** é diagnosticada como uma combinação de sinais clínicos e sintomas disponíveis, onde o organismo responde a um insulto variado (trauma, pancreatite, grande queimado, infecção sistêmica), apresentando pelo menos dois dos critérios a seguir:

1. Febre, temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$; ou hipotermia, temperatura corporal $<36^{\circ}\text{C}$;
2. Taquicardia, frequência cardíaca >90 bpm;
3. Taquipnéia, frequência respiratória >20 irpm ou $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg;
4. Leucocitose, leucócitos >12.000 céls/mm³; ou leucopenia, leucócitos <4.000 céls/mm³; ou presença de $>10\%$ de leucócitos de formas jovens.

A **sepse** é definida como uma SIRS induzida por um processo infeccioso comprovado, e se o quadro não for revertido pode evoluir para sepse severa, choque séptico (hipotensão refratária) e óbito por MOF (*Multiple Organ Failure*) e MODS (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*) [Karima et al., 1999].

Considera-se **sepse severa** 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).

Choque séptico refere-se a um estado de falha do sistema circulatório, caracterizado por uma forte hipotensão refratária, associada a sinais de disfunção orgânica. Se a hipotensão ou hipoperfusão induzidas pela sepse são refratárias à ressuscitação volêmica adequada e, se há a necessidade subsequente da administração de agentes vasopressores, as complicações circulatórias podem levar à MOF e à MODS [Vincent et al., 1998; Karima et al., 1999; Gullo et al., 2005]. 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 frequência à falência de órgãos vitais como os rins, o fígado, o coração e os pulmões, os quais são rapidamente comprometidos pela insuficiência da perfusão normal [O'Shea et al., 2002; Cohen, 2002; Matsuda et al., 2006].

Aproximadamente 40% dos pacientes sépticos progridem para o choque séptico [Kreger *et al.*, 1980]. A redução da perfusão sistêmica durante o choque, combinada com uma cascata de eventos inflamatórios iniciados durante a sepse, geralmente causam falência de múltiplos órgãos, seguido de morte [Liang *et al.*, 2003].

Falência de múltiplos órgãos é definida por uma alteração tão severa na função orgânica que sua homeostasia não pode ser mantida sem intervenção terapêutica artificial [Levy *et al.*, 2003]. A falência é um processo contínuo e dinâmico, que pode variar desde disfunção leve até falência total do órgão, onde parâmetros de seis sistemas-chave (pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e hematopoiético) são utilizados na avaliação do grau de disfunção apresentado [Vincent *et al.*, 1998].

1.1.2 Imunidade Inata

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos invasores e, ao contrário da imunidade adaptativa, que é específica e se molda ao agente infeccioso criando uma memória imunológica, o sistema imune inato reconhece classes genéricas de moléculas produzidas por diferentes microorganismos patogênicos [Delves *et al.*, 2000a; Delves *et al.*, 2000b]. A imunidade inata tem como função principal controlar as infecções, de maneira inespecífica (antes que a imunidade adquirida se desenvolva) desempenhando um papel fundamental nas doenças infecciosas e inflamatórias, uma vez que provoca uma resposta inflamatória generalista, na qual macrófagos, monócitos, granulócitos e células dendríticas detêm o agente invasor, impedindo que ele se dissemine pela circulação [Zweigner *et al.*, 2001].

Uma importante função da resposta imune inata é a de recrutar um maior número de células fagocitárias e moléculas efetoras para o local da infecção, através da liberação de um conjunto de citocinas denominadas proinflamatórias [Opal *et al.*, 2000]. As citocinas, cujas sínteses ocorrem 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 - *Interleukin*) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e o TNF- α . Os efeitos combinados desses mediadores contribuem para as reações locais contra a infecção na forma de resposta inflamatória [Bevilacqua, 1993; Springer, 1994; Downey, 1994; Dinarello, 1997; Dinarello, 2000].

As respostas inflamatórias são caracterizadas por induzirem dor, rubor, calor e tumor no sítio de uma infecção. A primeira dessas alterações reside num aumento do diâmetro vascular, levando a um aumento do volume sangüíneo local. A sepse é 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 [Cohen, 2002]. Dentre as funções proinflamatórias do TNF- α estão: (i) ativação de células apresentadoras de antígenos; (ii) ativação de células endoteliais (regulando receptores de adesão); (iii) estimulação da produção de outras citocinas como por exemplo as interleucinas IL-1 e IL-6; (iv) ativação da iNOS; e (v) ativação de neutrófilos, macrófagos e outras células efetoras para o local da inflamação. Contudo, se encontrado em excesso, o TNF- α pode gerar efeitos prejudiciais à resposta imune: (i) inibição a sinalização de células T; (ii) promoção de apoptose de diferentes grupos celulares; (iii) inibição de células dendríticas; e (iv) co-estimulação da produção de outras citocinas, como IL-10 e TGF- β (Figura 1) [O'Shea *et al.*, 2002].

O reconhecimento de componentes de bactérias, e a subsequente resposta imune de ativação das citocinas, são características importantes envolvidas durante o quadro séptico. Recentemente, vários polimorfismos de genes associados com esta resposta têm sido demonstrados, entre eles, variantes polimórficas no gene do TNF- α , as quais têm sido relacionadas como fator importante no curso clínico da sepse. O polimorfismo -308G>A do gene TNF- α foi identificado e associado à capacidade transcricional diferenciada do mesmo na presença do alelo A (alelo mutante, aumento de até 7x o níveis de transcrição do gene) [Kroeger *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997], podendo gerar dessa forma uma resposta imune inapropriada, acarretando assim num aumento da probabilidade de desenvolvimento de sepse, choque séptico e óbito.

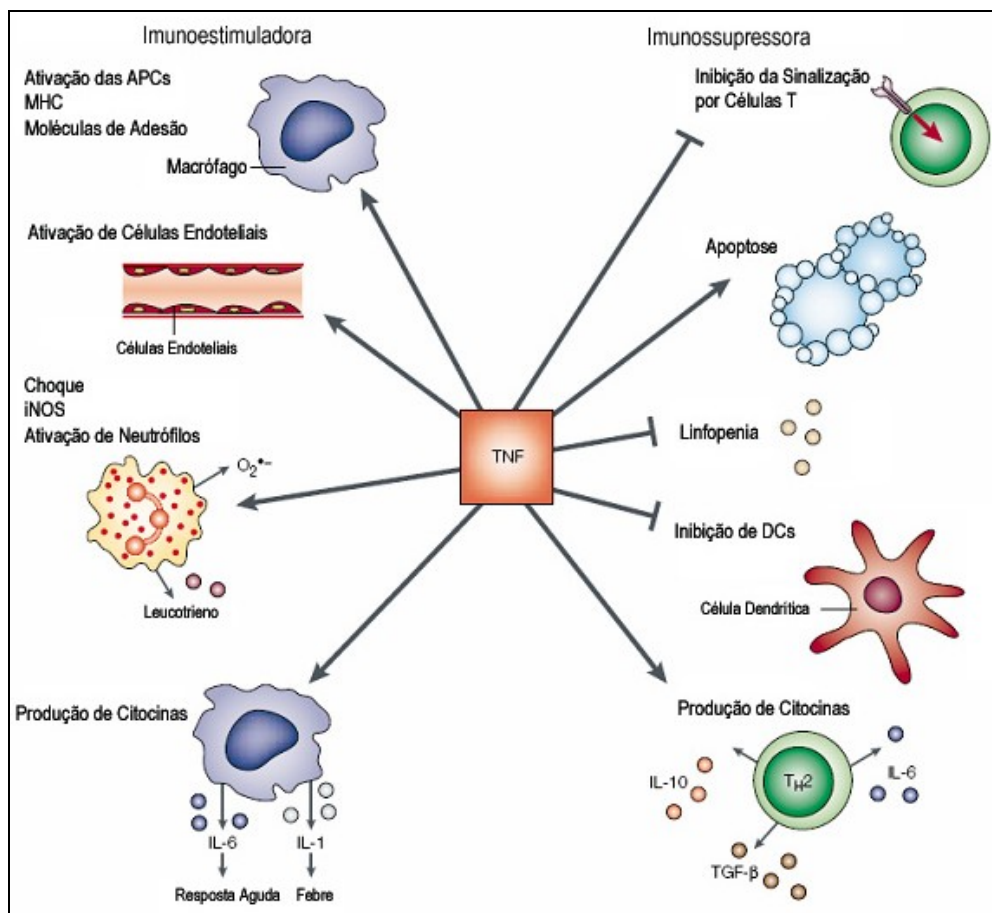


Figura 1: Resumo dos efeitos estimuladores e supressores do TNF- α . As ações proinflamatórias (imunoestimuladoras) do TNF- α são amplamente conhecidas, como ativação das APCs (*antigen-presenting cells*), de células endoteliais, de neutrófilos, estimulação da iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) e de outras citocinas proinflamatórias. TNF- α também possui ações contra a resposta imune (imunossupressoras), inibindo a sinalização por células T, promovendo apoptose de células T, inibindo DCs (*dendritic cells*), e co-estimulando outras citocinas. Modificado de O'Shea *et al.*, 2002.

Infecções devido a bactérias Gram-negativas são comumente associadas à principal causa de sepse e choque séptico. Estudos que objetivem entender como ocorre o reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS - *lipopolysaccharide*) presentes em bactérias Gram-negativas por monócitos, assim como na regulação de genes envolvidos no processo inflamatório, podem direcionar novas ferramentas terapêuticas [Holmes *et al.*, 2003]. O processo da imunidade inata (de resposta rápida para detectar e eliminar infecções causadas por agentes contagiosos) é mediado pelos receptores *Toll-Like* (TLRs - *Toll-like receptors*). Os TLRs são sensores primários de patógenos invasores, através do reconhecimento de uma variedade de moléculas derivadas de microorganismos, como o LPS presente em

bactérias Gram-negativas por exemplo [Ebong *et al.*, 2001; Glück *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2006]. A endotoxina LPS é reconhecida pelos TLRs, sinalizando o hospedeiro eucariótico sobre a presença de um invasor bacteriano [Opal *et al.*, 1998]. A presença de concentrações patológicas de endotoxina em pacientes com sepse que evoluem para sepse severa e choque séptico tem sido documentada em estudos clínicos [Danner, *et al.*, 1991; Opal *et al.*, 1999]. Huang e colaboradores demonstraram que a transcrição de muitos genes está alterada após exposição à 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 [Huang *et al.*, 2001]. A liberação concomitante de agentes pró e anti-inflamatórios mantém a homeostasia do organismo [Dinarello 1997]. A reação anti-inflamatória é geralmente maior e mais longa que a pró-inflamatória, objetivando diminuir a síntese de agentes pró-inflamatórios, mantendo assim o equilíbrio homeostático [Bone *et al.*, 1997; Haddad *et al.*, 2002]. Porém, uma resposta inflamatória sem controle pode ser a causa de disfunções orgânicas importantes [Zweigner *et al.*, 2001], pela excessiva produção e conseqüente acúmulo de citocinas pró-inflamatórias [Dinarello 1997; Dinarello 2000].

1.1.3 Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) apresentam quadro patológico crítico e complexo decorrente de fragilidades fisiológicas graves, que são responsáveis pela elevada taxa de mortalidade que varia de 20% a 50% [Padkin *et al.*, 2003; Dombrovskiy *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006; Esper *et al.*, 2007].

Nos últimos 20 anos, instrumentos de medida de predição de risco têm sido aplicados aos pacientes críticos internados em UTIs na tentativa de adoção das melhores estratégias terapêuticas possíveis. A avaliação do quadro clínico de pacientes internados em UTIs é realizada principalmente através de instrumentos que analisam a disfunção de órgãos e sistemas por meio do monitoramento diário de seus estados fisiológicos, porém, nenhum destes instrumentos avalia as

predisposições genéticas de pacientes. O escore APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) considera, no dia da internação, 12 variáveis fisiológicas (levando em conta os piores valores das primeiras 24 horas da admissão), a presença de doença crônica e a idade, gerando um escore que avalia a severidade do estado patológico do paciente [Knaus *et al.*, 1985]. Ao contrário do escore APACHE II – que é gerado apenas no dia da internação – o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) avalia diariamente a condição de seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, hematopoiético, cardiovascular e neurológico), independentemente de qualquer terapia a qual o paciente esteja sendo submetido [Vincent *et al.*, 1998].

Os pacientes internados em UTIs são indivíduos afetados por múltiplas disfunções orgânicas e que, além disto, estão expostos ao ambiente hospitalar, rico em diversidade de microorganismos infecciosos. Estudos epidemiológicos demonstram que aproximadamente 2% de todos os pacientes hospitalizados e 75% dos pacientes internados em UTIs acabam desenvolvendo sepse ou sepse severa, com taxa de mortalidade entre 20-50%. Esses estudos demonstram que anualmente ocorrem aproximadamente 750.000 casos de sepse severa nos EUA, com aumento estimado em 1,5% por ano. [Padkin *et al.*, 2003; Dombrovskiy *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006; Esper *et al.*, 2007]. No Brasil existe, até o momento, apenas um estudo relacionado à epidemiologia de sepse. Nesse estudo, foram analisados dados de três Hospitais do estado de São Paulo (Hospital Israelita Albert Einstein, Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo e Hospital Geral do Grajaú) e de dois Hospitais do estado de Santa Catarina (Hospital Governador Celso Ramos e Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina). Analisando 884 pacientes que permaneceram pelo menos um dia internados na UTI, a incidência e a mortalidade por sepse foram respectivamente 47% e 35%, enquanto que a incidência e a mortalidade por choque séptico foram respectivamente de 23% e 52% [Silva *et al.*, 2004].

Considerando a importância social da doença, principalmente no que concerne à taxa de morbi-mortalidade, fazem-se necessárias intervenções de natureza preventiva e curativa. Várias iniciativas têm sido propostas no sentido de prevenir infecções hospitalares, diminuindo esta parcela significativa de pacientes sépticos. Do ponto de vista terapêutico, o insucesso tem sido a rotina em dezenas de estudos clínicos que almejaram controlar a resposta inflamatória sistêmica

[Rigato *et al.*, 2001], tanto que a taxa de mortalidade não tem se alterado nos últimos anos [Friedman *et al.*,1998].

O estudo da sepse deve contribuir para levantamentos epidemiológicos, direcionados para o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares que desencadeiam as variações fisiopatológicas. Esse conhecimento básico poderá contribuir para a modulação da seqüência de eventos que culminam nos desfechos desfavoráveis da sepse como choque, Falência de Múltiplos Órgãos (MOF - *Multiple Organ Failure*) e Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (MODS - *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*) [Arcaroli *et al.*, 2005].

1.1.4 Variantes Polimórficas e a Sepse

A pesquisa em sepse tem sido focada na funcionabilidade das células imunes, na regulação do sistema imune inato e nas citocinas pró e antiinflamatórias produzidas em respostas a agentes infecciosos [Arcaroli *et al.*, 2005].

Atualmente, estudos têm sido dirigidos na identificação de variações em genes que controlam vias cruciais da resposta inflamatória. A identificação de variações genéticas em genes que codificam proteínas com funções nas vias de transdução de sinais que ativam a resposta inata, como por exemplo os TLRs [Feterowsky *et al.*, 2003] e o CD14 (*Cluster of Differentiation 14*) [D'Ávila *et al.*, 2006], tem demonstrado influência na heterogeneidade da resposta imune frente a uma infecção bacteriana. O delineamento das variações em genes e suas associações com diferentes respostas imunes podem contribuir para o aprimoramento de diagnósticos e no desenvolvimento de fármacos que irão promover a sobrevivência de pacientes críticos [Arcaroli *et al.*, 2005].

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) é o tipo mais comum de variação genética estável na população [Brooks, 1999]. Os SNPs são formas abundantes de variação no genoma, e diferem-se de mutações consideradas raras por apresentarem uma freqüência de pelo menos 1% do alelo menos abundante na população. Um SNP ocorre aproximadamente em um de cada mil pares de base, sendo que a substituição mais

comum (2/3 do total) é a de uma citosina para uma timina (C>T) [Brooks, 1999; Arcaroli *et al.*, 2005].

Um SNP pode influenciar o produto gênico de diferentes maneiras: (i) variações na região não traduzida 5' (5'UTR – 5' *Untranslated Region*) podem modificar a tradução do mRNA; (ii) variações na região não traduzida 3' (3'UTR – 3' *Untranslated Region*) podem afetar a clivagem, estabilidade e transporte do mRNA [Wjst, 2004]; (iii) SNPs na região promotora de um gene podem alterar a ligação entre fatores de transcrição ao DNA, alterando assim, o potencial de expressão gênica; (iv) mutações que modificam a fase de leitura (*frameshift mutations*) que, em geral, são inserções ou deleções e não SNPs, ou variações que resultem em um códon de terminação que durante o processo de transcrição podem levar à geração de uma proteína modificada ou não funcional; (v) mutações em sítios de clivagem, geralmente próximas à região intron/exon, podem alterar o processamento de mRNA ou a funcionabilidade da proteína; (vi) mutações sem sentido (*missense or nonsynonymous mutations*) em éxons que podem alterar a função e a atividade de uma proteína através da alteração de um aminoácido; e (vii) mutações sinônimas que gerem aminoácidos iguais, porém possuidores de tRNA diferentes, podendo influenciar a velocidade de incorporação dos aminoácidos [Wjst, 2004].

Estima-se que 10% de todos os SNPs do genoma humano sejam funcionais, apresentando potencial para alteração de processos metabólicos. Desta forma, nos últimos anos, a pesquisa em sepse tem se baseado em estudos de associação gene-enfermidade, buscando determinar o papel da variação genética na resposta inflamatória e no desenvolvimento da infecção. A maioria dos estudos é do tipo caso-controle, onde um SNP em um gene candidato é escolhido e a diferença que ocorre entre a frequência alélica dos indivíduos afetados em relação aos indivíduos controles (não relacionados aos indivíduos incluídos no estudo como casos) é estabelecida. Porém, existem limitações quanto à veracidade dos resultados estabelecidos por esta técnica quando o grupo controle não se assemelha ao grupo caso, ocorrendo estratificação da população estudada [Lin, 2004]. Além disso, associações positivas entre patologias e alelos polimórficos não demonstram, necessariamente, ser a causa da mesma, pois os alelos podem estar em desequilíbrio de ligação com algum *locus* funcional. Desequilíbrio de ligação caracteriza-se quando dois alelos, em diferentes *locus*, ocorrem em um indivíduo em uma frequência maior do que a esperada ao acaso [Cardon, 2001].

Apesar destas características de avaliação, estudos que associam SNPs à síndromes complexas, como a sepse, são de grande importância para o descobrimento de determinantes genéticas que possam influenciar essas patologias **[Risch, 2000]**. Estudos epidemiológicos demonstram que a herança genética possui papel relevante no desenvolvimento e no prognóstico de sepse, porém, alguns resultados ainda são contraditórios **[Clark et al., 2006]**. Portanto, aliados ao fato de que o genoma humano apresenta até o momento mais de 12 milhões de SNPs conhecidos e anotados **[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>]**, estudos de associação entre SNPs e sepse possuem alta relevância se conduzidos de forma correta, levando em consideração, entre outros fatores, o tamanho amostral, a metodologia aplicada, as análises estatísticas utilizadas, e a correta interpretação dos resultados **[Clark et al., 2006]**.

Devido ao fato de a sepse ser uma síndrome complexa é pouco provável que um único SNP resulte em um fenótipo específico. Porém quando uma série de polimorfismos atuarem juntos na presença de uma infecção, talvez seja possível definir a evolução de um paciente baseando-se no conjunto de informações genéticas específicas do mesmo. Além disso, a genotipagem de SNPs promete categorizar pacientes mais precisamente, permitindo que o tratamento seja cada vez mais específico e direcionado para cada via metabólica alterada em cada paciente **[Arcaroli et al., 2005]**.

1.1.5 O gene do Fator de Necrose Tumoral (TNF)-a

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, secretada predominantemente por monócitos e macrófagos, que possui efeitos no metabolismo de lipídeos, na coagulação sanguínea, na resistência à insulina e na função endotelial **[O'Shea et al., 2002]**. TNF-a foi primeiramente identificado em soro de camundongos após administração de endotoxina bacteriana, tornando-o citotóxico ou citostático para células humanas levando-as à necrose hemorrágica, e realizando, em modelos com camundongos, regressão de células cancerígenas **[Pennica et al., 1984; Shirai et al., 1985]**.

O gene que codifica o TNF- α está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3. Usualmente chamado de fator de necrose tumoral, o TNF pode também ser encontrado na literatura como TNFA, TNF- α , TNF derivado de monócitos e TNF derivado de macrófagos. TNF- α é sintetizado como uma proteína de membrana de 26kDa, que ao ser clivado por uma metaloproteinase [Black *et al.*, 1997], torna-se solúvel em sua forma ativa com 17kDa. As moléculas de TNF- α com 17kDa formam trímeros que se ligam aos dois receptores de membrana de TNF- α : o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1 – *tumor necrosis factor receptor 1*) e o receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2 – *tumor necrosis factor receptor 2*) [Vandelabeele *et al.*, 1995], sendo que a maioria dos efeitos biológicos do TNF- α está relacionada ao TNFR1. A expressão de TNF- α é regulada de diferentes formas, tanto durante a transcrição como na tradução, e através da análise da seqüência promotora do gene foi encontrada uma série de sítios de ligação de fatores de transcrição que apresentam papel importante na transcrição do gene [Xu *et al.*, 2001], como por exemplo NF- κ B, AP-1, AP-2, CREB, Egr-1, e Sp1 [Kuprash *et al.*, 1999]. A regulação do processo de transcrição do gene TNF- α é essencial para evitar os efeitos deletérios de síntese inapropriada ou excessiva de TNF- α [Abraham *et al.*, 1999]. Desta forma, variações genéticas localizadas na região promotora do gene podem afetar a transcrição e expressão do mesmo, apresentando assim, papéis importantes em doenças associadas com níveis elevados de TNF- α [Grohe *et al.*, 2006].

O gene do TNF- α é altamente polimórfico e é comumente relacionado a doenças infecciosas [Wunderink *et al.*, 2003]. Uma série de polimorfismos já foi identificada na região promotora do gene, incluindo um SNP na posição -308 em relação sítio do início da transcrição, onde a presença de uma guanina (G) define o alelo comum, chamado de TNF1, e a presença de uma adenina (A) define o alelo mutante, chamado de TNF2 [Lin *et al.*, 2004; Appoloni *et al.*, 2004]. Wilson e colaboradores demonstraram que o alelo mutante é um potente ativador transcricional em relação ao alelo selvagem, pois a presença do alelo “A” aumentou de seis a sete vezes o poder de transcrição de TNF- α [Wilson *et al.*, 1997]. Kroeger e colaboradores também demonstraram que o SNP na posição -308 afeta o processo de transcrição [Kroeger *et al.*, 1997]. A região localizada entre os nucleotídeos -323 e -285 (incluindo o SNP -308G>A) na presença do alelo “G” liga-se a quatro complexos protéicos promotores da transcrição (B, C, D, e DI). Já na presença do alelo “A”, ocorre a ligação de um quinto complexo proteico, denominado

complexo E, que possui efeito na capacidade de ligação dos complexos proteicos comuns (B, C, D, e DI), aumentando a atividade transcricional do gene **[Kroeger et al., 1996]**. Wu e colaboradores também demonstraram que o SNP -308G>A afeta a ligação de fatores de transcrição na região -347 a -269 do gene do TNF-a, aumentando de três a sete vezes a produção de TNF-a **[Wu et al., 1997]**.

A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias não apenas aumenta o poder da resposta imune frente a um organismo invasor, como também pode apresentar efeitos deletérios que modificam a regulação hemodinâmica e o controle metabólico **[Lin et al., 2005]**. Embora um processo infeccioso seja complexo, a influência da herança genética do TNF-a (citocina pró-inflamatória produzida em altos níveis durante esse processo) tem sido examinada em relação à sepse, ao choque séptico e à mortalidade **[Panacek, 1999; Abraham et al., 1999; Mira et al., 1999; Appoloni et al., 2001; Monick et al., 2003; Majetschak et al., 2002; Gordon et al., 2004; Nakada et al., 2005; Sipahi et al., 2006]**. Mira e colaboradores observaram que ser portador do alelo "A" pode estar associado a um risco maior de desenvolvimento de choque e mortalidade (n=89), a qual foi de 52% em comparação a 24% no grupo controle formado por indivíduos saudáveis ($P=0,008$) **[Mira et al., 1999]**. Na sepse severa, os não sobreviventes apresentam uma prevalência significativa do alelo "A". Os homocigotos para o alelo "A" apresentam uma taxa de mortalidade elevada em relação aos heterocigotos ($P=0,0022$), além de concentrações mais elevadas de TNF-a e de um grau maior de disfunções orgânicas **[Stüber et al., 1996]**. Estes achados foram corroborados em pacientes com trauma e submetidos à cirurgia **[Wunderink et al., 2003]**, mas não em pacientes com pneumonia (n=280) **[Waterer et al., 2001]**.

Um estudo realizado em Taiwan, não mostrou diferença na frequência alélica entre sobreviventes e não sobreviventes em relação à herança da variação polimórfica -308G>A em pacientes com choque séptico **[Tang et al., 2000]**. No subgrupo de pacientes com choque séptico (n=42), os autores encontraram que uma proporção significativamente maior de não sobreviventes possuía pelo menos uma cópia da variante alélica "A" em comparação com os sobreviventes. A mortalidade nos pacientes com pelo menos uma variante alélica "A" foi de 92% em comparação com 62% ($p<0,05$) nos pacientes homocigotos GG. Os autores também relataram níveis de TNF-a mais elevados nos pacientes com choque séptico que não sobreviveram, em comparação com os sobreviventes ($p<0,05$) **[Tang et al., 2000]**.

O desfecho no choque séptico associou-se com o SNP -308G>A em pelo

menos dois estudos [**Stüber et al., 1996; Tang et al., 2000**]. Em relação a estes resultados, Stüber não considera que a genotipagem deste SNP em pacientes com sepse severa contribua para a determinação do risco. Em pacientes com sepse abdominal, os níveis de TNF-a não foram influenciados por este SNP [**Stüber, 2002**].

O TNF-a possui grande influência no processo infeccioso, coordenando a resposta inflamatória e ativando cascatas de produção de citocinas. Desta forma, acreditamos que o estudo do SNP -308G>A do gene TNF-a possa ser de interesse clínico para o diagnóstico e predição do estado de pacientes internados em UTIs.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Justificativa e Hipótese

A condição crítica de um paciente, a gravidade de suas disfunções orgânicas, a evolução para sepse, choque séptico ou para o óbito são características complexas determinadas pela interferência simultânea de inúmeros fatores externos e de fatores herdados. O estudo do SNP -308G>A do gene que codifica para o TNF- α pode ser útil no processo de identificação dos efeitos que as variantes genéticas podem ter no momento de uma doença crítica. Os resultados de diferentes estudos sugerem que pacientes com o genótipo AA, do SNP -308G>A do gene do TNF- α possuam níveis mais elevados de TNF- α no plasma, levando o sistema imune a uma resposta inapropriada e aberrante frente a uma infecção, aumentando assim o risco de desenvolvimento de sepse, choque, MOF, MODS e óbito. Nossa hipótese é que pacientes críticos portadores do alelo A apresentariam maiores freqüências de sepse, choque, MOF, MODS e óbito.

1.2.2 Objetivos

Nosso objetivo no presente estudo foi avaliar uma possível relação entre a transmissão do SNP -308G>A do gene do TNF- α e a ocorrência de sepse, choque, MOF, MODS e óbito em pacientes com estado crítico de saúde.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

TNF -308A ALLELE WAS NOT AN INDEPENDENT RISK FACTOR IN 437
CRITICALLY ILL PATIENTS FROM SOUTHERN BRAZIL

Periódico submetido para *International Journal of Immunogenetics*.

TITLE OF THE MANUSCRIPT

TNF -308A ALLELE WAS NOT AN INDEPENDENT RISK FACTOR IN 437 CRITICALLY ILL PATIENTS FROM SOUTHERN BRAZIL

Running Head

TNF -308G>A SNP IN 437 CRITICALLY ILL PATIENTS

Keywords

TNF-a, -308G>A SNP, sepsis, critical illness

First name, middle initial and last name of each author

Diego D Paskulin*, Paulo RV Fallavena*, Francis JO Paludo*, Thiago J Borges*, Fernando S Dias†, Clarice S Alho*

* Laboratory of Human and Molecular Genetics, Biosciences Faculty, Catholic Pontifical University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

† São Lucas Hospital, Catholic Pontifical University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Address for proofs and reprints

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

SUMMARY

We assessed the relationship of the genotype distribution of -308G>A TNF- α polymorphism with regard to the development of sepsis, septic shock, higher organ dysfunction or mortality in critically ill patients. Observational, hospital-based cohort study of 437 critically ill Caucasian patients from southern Brazil admitted to the general ICU of the São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil. We monitored the patients daily from the ICU admission day to the discharge of the hospital, or death, measuring SOFA score, sepsis and septic shock occurrences. We analyzed the -308G>A TNF- α SNP effect in the entire patient group (n=437); in patients with sepsis (n=297); and in septic shock patients (n=212). The genotypic frequencies were -308GG=0.71 (n=312); -308GA=0.28 (n=120); -308AA=0.01 (n=5) and the allelic frequencies were -308G=0.85; -308A=0.15. No associations were found in sepsis, septic shock, organ dysfunction, and/or mortality rates among the -308G>A TNF- α genotypes. Our results suggest that the -308G>A TNF- α SNP alone does not play a major role in the outcome from the critical illness. The presence of the -308A TNF- α allele was not sufficiently strong to lead critically ill patients to sepsis, septic shock, higher organ dysfunction or mortality in a population from southern Brazil.

INTRODUCTION

The susceptibility to adverse outcome from critical illness (occurrence of sepsis, septic shock, failure and organ dysfunction, and mortality) varies dramatically due to different degrees of inflammatory response to infections. TNF- α is a pleiotropic cytokine mainly produced by activated monocytes and macrophages, which plays a key role in the inflammatory response (O'Shea *et al.*, 2002). Inappropriate expression or overexpression of TNF- α can lead to the progression of inflammatory and autoimmune diseases (Lockley *et al.*, 2001; Schottelius *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006). The TNF- α gene is located in the major histocompatibility complex (MHC) region, and a large number of polymorphisms of its promoter have been described (Wilson *et al.*, 2002; Wunderink *et al.*, 2003; Grohe *et al.*, 2006). A single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the TNF- α gene at nucleotide 308 (-308G>A, relative to the transcription start site) may be important in determining the host's TNF- α response. The SNP -308G>A has been associated with inducible levels of TNF- α in vitro, where the change of a guanine (common -308G allele) to an adenosine (uncommon -308A allele) results in differential binding of nuclear factors, leading to six to sevenfold increase in the inducible level of TNF- α gene transcription (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997). Systemic administration of TNF- α produces most of the symptoms and signs of sepsis (Beutler, 1986), and although a number of studies have found associations of the -308A allele with a predisposition to septic shock and/or outcome from sepsis, findings have been inconsistent (Stuber *et al.*, 1996; Mira *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000; Appoloni *et al.*, 2001; Waterer *et al.*, 2001; O'Keefe *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2004; Jessen *et al.*, 2007).

In order to resolve the potential role of the -308A allele we tested in 437 patients whether the presence of this allele influences the outcome from critical illness leading patients to sepsis, septic shock, higher organ dysfunction, or mortality.

MATERIALS AND METHODS

Study design and approval

This study was an observational, hospital-based cohort study of patients admitted to the medical and surgical Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital São

Lucas (HSL), of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil, between January 1st, 2004, and December 31st, 2006. Patients were not eligible if they were diagnosed with HIV-infection, taking immunosuppressive drugs, pregnant or lactating, or of non-Caucasian ancestry. The Research Ethics Committee of the institution (protocols #03-01732, and #05-02357; REC Tel.: 55 51 3320 3345) approved this study.

Study Subjects

A total of 437 critically ill adult patients from southern Brazil (236 males and 201 females) admitted to the ICU at HSL-PUCRS were included in this study.

Clinical Data

The organ dysfunction and failure were evaluated using the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (Vincent *et al.*, 1996) score obtained during the first seven days from the ICU admission and from days 15 and 29. The patients follow-up was extended up to the total time they stayed in the hospital from the ICU admission to a maximum of 242 days. We monitored the patients daily during their entire ICU and post-ICU (hospital) stay, measuring sepsis and septic shock occurrences until the discharge of the hospital or death. For diagnosis of sepsis and septic shock we used the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Criteria (ACCP/SCCM *et al.*, 1992). For illness severity evaluation we used the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE-II) score obtained on the ICU admission day (Knaus *et al.*, 1985). Clinical endpoints of the study were discharge from the hospital (survivors) or death (non-survivors). 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

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 and maintained at -20°C (Lahiri & Nurnberger, 1991). To genotype TNF- α -308G>A SNP (rs1800629), DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with forward primer TNF- α -F 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' and reverse primer TNF- α -R 5'-ACA CTC

CCC ATC CTC CCT GCT-3' (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil) in which the underlined nucleotide represents the deliberated primer mismatch designed to introduce an artificial *Nco*I restriction site when the G allele is present at position -308A. 116 bp PCR product was obtained from a 25µl reaction mix containing 10-50 ng DNA, 1 µM each primer, 0.4 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U Taq polymerase in Taq 1x Buffer (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil). The reaction was carried in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) as follows: 95°C for 2 minutes; 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 15 s and 74°C for 15 s; and 74°C for 10 minutes for final extension. The PCR amplified product (12µl) was cleaved in an appropriate buffer with 10U of the *Nco*I (5`-C/CATGG-3`); GibcoBRL®-Life Technologies™, Rockville, MD, USA) in a total volume of 15µl at 37°C for 16 hours and digested and undigested samples were visualized by electrophoresis in 3% agarose gel with Gel Red staining against a 100-bp ladder. A single band at 116 bp identified -308AA homozygotes, two bands at 96 and 20 bp identified -308GG homozygotes, and three bands at 116, 96 and 20 bp indicated heterozygotes at the TNF-α -308 locus. Each patient found to have -308AA or -308GA genotypes were subjected to a second, independent PCR restriction fragment length-polymorphism analysis in order to confirm their genotypes.

In order to confirm that the 116bp PCR amplified product really represented the targeted product, we performed a sequence analysis in MegaBase 1000 capillary DNA sequencer (Amersham Biosciences UK Ltd, Chalfont St Giles, Bucks, UK), also using the designed primers (forward and reverse). The sequence obtained was submitted to a nucleotide-nucleotide BLAST online alignment (*blast*, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) with the databases, and we found consensus with the *Homo sapiens* tumor necrosis factor-α gene, promoter region (GenBank accession X02910) and the sequence exported from chromatogram file. The alignment view was performed in ClustalX program (version 1.8, as described in Thompson *et al.*, 2002) in multiple alignment mode, with sequences loaded in FASTA format. All the personnel involved in patient care were blind to the selection process and genotyping results. Based on the information that -308A allele leads to six to sevenfold increase in the TNF-α transcription level (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997), we use dominant model to -308A allele to perform our analysis. We believe that the co-dominant or recessive models are not applicable in this case since there is a quantitative transcriptional effect of one allele.

Statistical analysis

Statistical calculations were performed using the statistical package SPSS 13 (SPSS 13.0 for Windows, Chicago, Illinois, USA). Unless otherwise stated, continuous variable results are expressed as a mean \pm standard deviation (SD), and the categorical variables as frequencies and percents. Means were compared using one-way analysis of variance, and non-normally distributed scalar variables were analyzed as non-parametric using Mann–Whitney test. For the categorical data we used Pearson chi-square test, also used to test for Hardy-Weinberg equilibrium. To evaluate the influence of individual genotype on the patient outcome, excluding other risk factors that could influence the outcome, we used binary logistic regression analysis, incorporating patients with and without -308A allele and two main clinical predictors, age and SOFA-1 score. All reported *P* values are two-tailed and considered statistically significant when 0.05 or less.

RESULTS

Clinical Data

Table 1 shows critically ill patients' clinical and demographic data. Four hundred and thirty seven patients were investigated; data about age, gender, APACHE-II and SOFA scores, length of stay in ICU and ICU plus hospital, sepsis and septic shock occurrences, and mortality rates are shown. Patient mortality was positively associated with older age, higher APACHE-II and SOFA-1 scores, longer ICU stay, sepsis and septic shock (all $P < 0.01$; data not shown).

The main causes of admission to ICU were Medical Sepsis (34.8%), followed by Medical Respiratory (23.8%) and Surgical Abdominal (11.2%). In ICU, 297 (68%) patients had severe sepsis, and 212 (71%) of them evolved to shock. Blood samples of patients with severe sepsis ($n=297$) were as follows: 47.8% (140/297) no focus identified, 26% (77/297) with only Gram-negative bacteria; 5.3% (7/297) with only Gram-positive bacteria; 14% (42/297) with both Gram-negative and positive bacteria; 2% (6/297) with fungal; and 4.7% (14/297) with fungal and bacterial infection. The anatomical distribution of the primary site of infection in septic patients was as follows: 196 (66%) pulmonary; 71 (23.9%) abdominal; 10 (3.4) urinary; 4 (1.3) central nervous system; 3 (1.0) skin; and 13 (4.4) another site.

Genotypic and Allelic Data

The general genotypic frequencies in our sample were -308GG=0.71 (n=312); -308GA=0.28 (n=120); -308AA=0.01 (n=5) and the allelic frequencies were -308G=0.85; -308A=0.15. The allelic and genotypic frequencies did not differ from the values expected by the Hardy-Weinberg model ($P=0.211$; Pearson Chi-square test).

Relations between clinical findings and genotypic data

With dominant model to -308A allele (pooling -308GA and -308AA genotypes for statistical testing) we performed our analysis of susceptibility to sepsis, septic shock and mortality in critically ill patients. In order to confirm that other important variables, such as age, gender and diagnosis, were otherwise equal between the two groups, a comparison between patients with and without -308A allele is shown in table 1. A statistical association between -308A allele and longer ICU and hospital stay was found in our cohort, but as the presence of the allele was not statistically associated with adverse outcome, this finding was not found to be relevant, and was discharged from our analysis.

The patients' clinical data into with -308A (n=125; 28.6%) or without -308A (n=312; 71.4%) groups are in Table 2. We analyzed the -308G>A TNF-a SNP effect in whole patients group (n=437); in patients with sepsis (n=297); and in septic shock patients (n=212). No associations were found in sepsis, septic shock, and mortality rates between the -308G>A TNF-a genotype groups. Nevertheless, interestingly, all -308AA patients (n=5) presented sepsis and septic shock.

We also investigated if -308G>A TNF-a genotype groups could be affecting organ dysfunction or failure, measured by SOFA scores (days 1 to 7, 15, and 29), in critically ill patients, septic or septic shock patients. Our results show that there were no statistical associations among -308G>A TNF-a genotype groups and SOFA scores in any patient sets (critically ill patients, septic or septic shock patients), as SOFA score medians obtained during ICU stay (measured in days 1 to 7, 15, and 29; with a total of 2889 data) were similar among -308G>A TNF-a genotypes (Table 3). Finally, to control for confounding variables, we analyzed the impact of the possible covariates age and SOFA-1 scores on the outcome of critical illness in binary logistic regression model, but none of them were found to be relevant.

DISCUSSION

Our study of 437 ICU patients revealed no association between TNF- α -308G>A genotypes and adverse outcome (sepsis, septic shock, higher organ dysfunction or mortality) from critical illness. Our results demonstrated that the -308A allele frequency was 15%, confirming the trend documented in Danish (22%) (Jessen *et al.*, 2007), English (20%) (Gordon *et al.*, 2004), French (18%) (Mira *et al.*, 1999) and Spanish subjects (9%) by Garnacho-Montero *et al.* 2006). The -308A allele has higher level of inducible and constitutional TNF- α (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997), but its phenotypical effects in sepsis, septic shock, organ dysfunction, and mortality have been contradictory (Clark *et al.*, 2006); while it was perceived in some genetic association studies (Stuber *et al.*, 1996; Mira *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1997); in other it does not exist (Reid *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2004; Jessen *et al.*, 2007).

Specifically, in contrast with our study (n=437, southern Brazilian population), positive associations between -308A allele and sepsis, septic shock, higher organ dysfunction, and/or mortality were found when Mira *et al.* (n=89, France), Tang *et al.* (n=112, China), O'keefe *et al.* (n=152, USA), and Watanabe *et al.* (n=113, Japan) studied the -308G>A SNP in their populations. How can these differences among studies be explained? Some factors may contribute to these findings: First, the TNF- α gene is in the highly polymorphic 6p21 locus, within the class III region for major histocompatibility complex (MHC), between lymphotxin α (TNF- β) and lymphotxin β genes (Hajeer *et al.*, 2001). Strong linkage disequilibrium among the alleles creates established haplotypes that affect differently TNF- α expression and activity, and that can have diverse effects within each studied population. So, the independent -308G>A SNP analysis can cause conflicting results. Second, the immune response involves several molecules (CD14, TLR4, TLR2, MyD88, IRAK, NF- κ B, and others) codified by other genes that can interfere in the inflammatory arena causing misleading conclusions. Third, the TNF- α gene product can be changed at different stages (gene transcription, post-transcription, mRNA stability, cleavage to soluble form, and/or receptor structure or levels), and it can modify circulating TNF- α activity during critical illness affecting patient's outcome. Finally, our larger sample size (n=437) comparing with previous studies may have produced the contrasting result, although we recognize that Gordon *et al.* suggested that at least 2000 patients would be necessary to achieve 90% power to obtain a *P*-value of 0.01 in studies involving the -308A allele and septic shock (Gordon *et al.*, 2004).

For negative results, assessment of power to detect modest effects is crucial, and along with that, careful assessment of the likelihood of a false-positive finding in an apparent significant genetic association should also be made. So when can we declare success in a genetic association study (Newton-Cheh *et al.*, 2005)? A meta-analysis suggested that most reported findings of association are not correct, and that these false-positives studies are probably responsible for the vastness of failures to replication associations between common variants and complex outcomes (Lohmueller *et al.*, 2003). The reasons for this lack of reproducibility have been well discussed (Cardon *et al.*, 2001; Ioannidis, 2003; Todd, 2006), especially between large versus small studies (Ioannidis *et al.*, 2003).

Our study was designed to achieve the set of guidelines proposed by Bogardus *et al.* (Bogardus *et al.*, 1999) recently reviewed by Clark and Baudouin (Clark *et al.*, 2006) to examine associations among genetic variants and risk for and outcome from complex diseases. In addition to that, we considered the guidelines put forth for replication of genotype studies by the NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies (NCI-NHGRI, 2007).

Even that -308G>A SNP seems to have a central role in the TNF- α expression, the overall relevance of association studies can be widely questioned (Colhoun *et al.*, 2003). Considering the main points expressed by critical analysis of association studies (Peters *et al.*, 2003; Vitali *et al.*, 2005; Trikalinos *et al.*, 2006), our study possesses some strengths; 1- the SNP has biological reasonability, i.e., there is a plausible effect of the gene product in infection and sepsis; 2- we used a quality control system to ensure genotyping accuracy (sequencing verification of the DNA amplified fragment, black controls, and repetitions) in our lab routine; 3- the lab technicians were blinded to phenotype and clinical investigators blinded to genotype; 4- genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium (Trikalinos *et al.*, 2006); 5- the patients were recruited from an unique Caucasian population with similar genetic background, mainly of Portuguese ancestry, but descendants from Italians, Spanish and Germans have also contributed to this gene pool (Salzano *et al.*, 1970; Parra *et al.*, 2003); 6- we use precise and universal definitions to sepsis and septic shock, worldwide scores to organ dysfunction, and days instead categories to mortality determinations.

We acknowledged some limitations of our study. First, patients from a single center were included in a long enrollment period (two years). Second, the lack of association of a single SNP does not rule out the relationship of genetic variation in

the TNF gene with sepsis outcome, to be exact, only one SNP of one anti-inflammatory mediator was evaluated, i.e., no haplotyped-based approaches were performed. Third, despite we had enrolled 437 critically ill patients, we could not reach the 80% power necessary to run out of the type II error. Finally, we did not evaluate serum TNF levels, although several studies have shown correlation of TNF- α -308A genotype with serum TNF levels (Gordon *et al.* 2004; Louis *et al.*, 1998). Any meaningful interpretation of serum TNF levels taken at varying time points after the onset of illness and beginning of antibiotics is difficult (Waterer *et al.*, 2001). Even in the setting of acute septic shock, an increased serum TNF is not detectable in all patients (Cohen *et al.*, 1996; Abraham *et al.*, 1998), because TNF has a short half-life, and is known to be released in pulses (Gordon *et al.* 2004), so genotype associations that correlate with an overall phenotypic response may be more useful than correlation with single point cytokine measurements.

There have been several other -308G>A studies published in the critically ill with contradictory results. Studies involving genetic polymorphisms and clinical conditions in ICU should be explicitly encouraged, but only well-powered, and large studies will provide definitive answers to this situation. It is important to emphasize that because sepsis is a dynamic and complex process, it is likely that varying and distinct combination of SNPs, as opposed to any SNP alone, interface to impact the outcome of critically ill patients, and we are currently working with this approach.

In conclusion, our work was performed in a single ICU with 437 critically ill patients and we suggest that -308G>A TNF- α SNP alone does not play a major role in the outcome from the critical illness. The presence of the -308A TNF- α allele was not sufficiently strong to lead critically ill patients to sepsis, septic shock, higher organ dysfunction or mortality in a population from southern Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank AJG Bos, CAS Ferreira, CL Dornelles, and FB Nunes for their suggestions and P Graebin, LR Fraga, and HS Thurow for technical assistance. This study was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (process #505536/2002-8), the Programa de Bolsa Pesquisa para Alunos da Graduação – Edital BPA PUCRS 2007-2008, and Faculdade de Biociências, PUCRS. The study is part of the Masters' Degree dissertation of the first

author who had a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brazil.

REFERENCES

Abraham E, Anzueto A, Guttierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in the treatment of septic shock. The NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998 Mar 28;**351**(9107):929-33.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992 Jun;**20**(6):864-74.

Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M, Andriens M, Duchateau J; Vincent JL. Association of Tumor Necrosis Factor-2 Allele with Plasma Tumor Necrosis Factor-alpha Levels and Mortality from Septic Shock. *Am J Med* 2001 Apr 15;**110**(6):486-8.

Beutler B. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986 Oct 24;**234**(4775):470-4.

Bogardus ST Jr, Concato J, Feinstein AR. Clinical epidemiological quality in molecular genetic research: The need for methodological standards. *JAMA* 1999 May 26;**281**(20):1919-26.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001 Feb;**2**(2):91-9.

Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Int Care Med* 2006 Nov;**32**(11):1706-12.

Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: An international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis: International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med* 1996;**24**:1431-1440.

Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 2003 Mar 8;**361**(9360): 865-72.

Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jiménez R, Barroso S, et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Crit Care* 2006;**10**(4):R111.

Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, et al. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun* 2004 Dec;**5**(8):631-40.

Grohe SS, Stuber F, Book M. TNF- α Promoter Polymorphism in Relation to TNF- α Production and Clinical Status in Cystic Fibrosis. *Lung* 2006;**184**:99–104.

Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol* 2001 Nov;**62**(11):1191-9.

Ioannidis JPA, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 2003 Feb 15;**361**(9357):567-71.

Ioannidis JPA. Genetic associations: false or true? *Trends Mol Med* 2003 Apr;**9**(4):135-8.

Jessen KM, Lindboe SB, Petersen AL, Eugen-Olsen J, Benfield T. Common TNF- α , IL-1 β , PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis* 2007 Sep 18;**7**:108.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985 Oct;**13**(10):818-29.

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

Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acids Res* 1991 Oct 11;**19**(19):5444.

Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;**104**:487–501.

Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;**33**:177-182.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998 Sep;**113**(3):401-6.

Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNFalpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999 Aug 11;**282**(6):561-8.

NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007 Jun 7;**447**(7145):655-60.

Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits design and analysis issues. *Mutation Research* 2005 Jun 3;**573**(1-2):54-69.

O'Keefe GE, Hybki DL, Munford RS. The G-A single nucleotide polymorphism at the -308 position in the tumor necrosis factor-alpha promoter increases the risk for severe sepsis after trauma. *J Trauma* 2002 May;**52**(5):817-25; discussion 825-6.

O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and Autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**:37-45.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jan 7;**100**(1):177-82.

Peters DL, Barber RC, Flood EM, Garner HR, O'Keefe GE. Methodologic quality and genotyping reproducibility in studies of tumor necrosis factor -308 G-A single nucleotide polymorphism and bacterial sepsis: implications for studies of complex traits. *Crit Care Med* 2003 Jun;**31**(6):1691-6.

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

Salzano FM and Freire-Maia N, Editors, Problems in human biology. A study of Brazilian populations, Wayne State University Press, Detroit (1970).

Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK. Biology of tumor necrosis factor-alpha – implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 2004;**13**:193–222.

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

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

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997 Dec 15;**25**(24):4876-82.

Todd JA. Statistical false positive or true disease pathway? *Nat Genet* 2006 Jul;**38**(7):731-3.

Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol* 2006 Feb 15;**163**(4):300-9.

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H 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. *Int Care Med* 1996;**22**(7):707-710.

Vitali SH, Randolph AG. Assessing the quality of case-control association studies on the genetic basis of sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005;**6**:S74-77.

Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Resp Crit Care Med* 2001 Jun;**163**(7):1599-604.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992 Aug;**1**(5):353.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor- α promoter on transcriptional activation. *Immunol* 1997;**94**:3195–99.

Wood LJ, Nail LM, Gilster A, Winters KA. Cancer chemotherapy-related symptoms: Evidence to suggest a role for proinflammatory cytokines. *Oncol Nurs Forum* 2006 May 3;**33**(3):535-42.

Wunderink RG, Waterer GW. Genetics of sepsis and pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2003;**9**(5):384-389.

TABLES**Table 1:** Clinical and demographic data of critically ill patients

Variables	All Patients	With -308A	Without -308A	P*
Frequency [†]	437 (100)	125 (28.6)	321 (71.4)	0.211 ^{HW}
Age (years) [‡]	57 (38-71)	55 (39-71)	57 (38-71)	0.608 ^{MW}
Male [†]	236 (54)	65 (27.6)	171 (72.4)	0.597 ^{X2}
Medical Admission	366 (83.2)	102 (27.9)	264 (72.1)	0.440 ^{X2}
Surgical Admission	71 (16.2)	23 (32.4)	48 (67.4)	
APACHE II Score [§]	19.1 (7.7)	19.3 (8.2)	19.0 (7.4)	0.629 ST
SOFA-1 Score [‡]	6 (4-9)	6 (4-9)	6 (4-9)	0.709 ^{MW}
SOFA-7 Score [‡]	5 (3-8)	5 (3-8)	5 (3-8)	0.610 ^{MW}
SOFA-15 Score [‡]	5 (3-8)	5 (3-8)	5 (3-8)	0.789 ^{MW}
SOFA-29 Score [‡]	4 (3-7)	5 (3-9)	3 (3-7)	0.115 ^{MW}
Sepsis [†]	297 (68)	89 (71.2)	208 (66.7)	0.359 ^{X2}
Septic Shock [†]	212 (48.5)	58 (46.4)	154 (49.3)	0.576 ^{X2}
ICU mortality [†]	138 (31.6)	40 (32.0)	98 (31.4)	0.905 ^{X2}
ICU+H mortality [†]	190 (43.5)	56 (44.8)	134 (42.9)	0.724 ^{X2}
ICU LOS (days) [‡]	13 (8-23)	15 (9-27)	13 (7-21)	0.024 ^{MW}
ICU+H LOS (days) [‡]	37 (22-59)	42 (28-65)	34 (20-56)	0.019 ^{MW}

Without -308A: -308GG homozygotes to -308G>A TNF-a SNP; With -308A: -308GA heterozygotes and -308AA homozygotes to -308G>A TNF-a SNP; APACHE-II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; ICU: Intensive Care Unit; ICU+H: ICU plus hospital; LOS: Length of stay; n: number; SD: Standard Deviation of the mean; IQR: Interquartile Range; ST: Student's *t*-test; MW: Mann-Whitney *U*-test; X2: Pearson Chi-Square test; *: *P* value describes a comparison between With -308A allele and Without -308A allele groups; †: n (%); ‡: median (IQR); §: mean (SD); HW: Pearson Chi-Square test for Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 2: Patients' clinical data according to -308G>A Tumor Necrosis Factor- α single nucleotide polymorphism groups

	Total	With -308A	Without -308A	P^(X²)
Total of ICU patients	437 (100)	125 (28.6)	312 (71.4)	0.211 ^{HW}
With sepsis	297 (68.0)	89 (71.2)	208 (66.7)	0.359
With septic shock	212 (48.5)	58 (46.4)	154 (49.3)	0.576
ICU+H mortality	190 (43.5)	56 (44.8)	134 (42.9)	0.724
ICU mortality	138 (31.5)	40 (32.0)	98 (31.4)	0.905
Septic patients	297 (68.0)	89 (71.2)	208 (66.7)	0.295 ^{HW}
With septic shock	212 (71.4)	58 (65.2)	154 (74.0)	0.121
ICU+H mortality	159 (53.5)	47 (52.8)	112 (53.8)	0.870
ICU mortality	125 (42.1)	36 (40.4)	89 (42.8)	0.083
Septic Shock patients	212 (48.5)	58 (46.4)	154 (49.3)	0.319 ^{HW}
ICU+H mortality	130 (61.3)	34 (58.6)	96 (62.3)	0.620
ICU mortality	107 (50.5)	30 (51.7)	77 (50.0)	0.783

Variables are expressed as number (%). Without -308A: -308GG homozygotes to -308G>A TNF- α SNP; With -308A: -308GA heterozygotes and -308AA homozygotes to -308G>A TNF- α SNP; ICU: Intensive Care Unit; ICU+H: Intensive Care Unit and Hospital; Mortality: mortality at ICU and ICU plus post-ICU (hospital), measured by number of days; n: number of patients; ^{HW}: Pearson Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium; X²: Pearson Chi-square test. *P* value describes a comparison between patients with and without the data specified at each line and the presence of the -308A allele.

Table 3: Sequential Organ Failure Assessment scores by -308G>A TNF-a groups in critically ill patients.

-308G>A TNF-a	n	With -308A	Without -308A	<i>P</i>^{MW}
Critically ill Patients	437	125	312	
SOFA 1-7,15,29	6 (3-8)	6 (3-8)	6 (3-8)	0.932
SOFA 1-7	6 (3-8)	6 (3-8)	6 (3-8)	0.988
Septic Patients	297	91	265	
SOFA 1-7,15,29	6 (4-9)	7 (4-9)	6 (4-9)	0.924
SOFA 1-7	7 (4-9)	7 (4-9)	7 (4-9)	0.839
Septic Shock Patients	212	56	197	
SOFA 1-7,15,29	7 (5-10)	8 (5-10)	7 (5-10)	0.520
SOFA 1-7	7 (5-10)	8 (5-10)	7 (5-10)	0.385

Without -308A: -308GG homozygotes to -308G>A TNF-a SNP; With -308A: -308GA heterozygotes and -308AA homozygotes to -308G>A TNF-a SNP; n: number of patients; IQR: Interquartile Range; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score obtained daily during the first week from the ICU admission (days 1 to 7), and in the days 15 and 29 described as median (IQR); ^{MW}: Mann-Whitney *U*-test. *P* value describes a comparison between SOFA scores and the presence of the -308A allele.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 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 fator externo e cada gene herdado, exercem isoladamente um pequeno efeito, mas que cumulativamente, definem 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 ao legado genético que o indivíduo herdou.

Ainda que centenas de genes estejam envolvidos na modulação fisiológica final de um indivíduo com um quadro patológico complexo, aqueles genes que interferem em múltiplos sistemas e órgãos são sempre muito decisivos. Trabalhar com um SNP na região promotora do gene que codifica o Fator de Necrose Tumoral -a foi um esforço na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética pode ter no momento da doença crítica.

Embora alguns trabalhos de associação gene-patologia e de estudos de caso-controle envolvendo polimorfismos genéticos identifiquem associações e eventuais predisposições a determinados quadros patológicos, muitos vieses de publicação são encontrados quando se associa polimorfismos a doenças complexas como a sepse: estudos com reduzido tamanho amostral são aceitos para publicação apenas quando um resultado significativo é encontrado; estudos com elevado tamanho amostral são muito raros. Nosso objetivo foi responder à pergunta que questiona se um SNP no gene que codifica para o TNF-a poderia influenciar a susceptibilidade à sepse, ao choque séptico, às disfunções orgânicas e a mortalidade em pacientes críticos. Ao contrário de estudos envolvendo o SNP -308G>A e sepse, nosso estudo possui como ponto forte o tamanho amostral (n=437). Após a análise dos resultados, verificamos que a presença do alelo -308A à *upstream* do gene TNF-a não foi forte o suficiente para interferir nas condições clínicas e na susceptibilidade à sepse e choque séptico ou na mortalidade dos pacientes em estado crítico de saúde.

Finalizamos concordando que trabalhos envolvendo associação entre polimorfismos genéticos e desfechos de pacientes críticos devam ser conduzidos

com um grande tamanho amostral (com cerca de 2000, como já foi mencionado), com uma variante polimórfica com plausibilidade biológica, com homogeneidade da população de estudo (etnia, idade, sexo, tipo de infecção, sítio de infecção) e utilizando-se de fenótipos bem definidos. E, tão definitivo como os itens acima referidos, com análises estatísticas que alcancem um forte poder de predição. Nosso grupo está na busca para alcançar tais tópicos.

REFERÊNCIAS

Abraham LJ, Kroeger KM. **Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease.** J Leu Biol. 1999;66:562-566.

Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M, Andriens M, Duchateau J; Vincent JL. **Association of Tumor Necrosis Factor-2 Allele with Plasma Tumor Necrosis Factor-alpha Levels and Mortality from Septic Shock.** Am J Med. 2001;110:586-588.

Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M, Andriens M, Duchateau J; Vincent JL. **Association Between the TNF-2 Allele and a Better Survival in Cardiogenic Shock.** Chest. 2004;125;2232-2237.

Arcaroli J, Fessler B, Abraham E. **Genetic polymorphisms and sepsis.** Shock. 2005;24(4):300–312.

Bevilacqua MP. **Endothelial leukocyte adhesion molecules.** Annu Rev Immunol. 1993;(11):767-804.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, *et al.* **A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor- α from cells.** Nature. 1997;385(20):729-733.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA *et al.* **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.** Chest. 1992;101;1644-1655.

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. **Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process.** Chest. 1997;112:235-43.

Boontham PP, Chandran B, Eremin RO. **Surgical Sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications.** Surg J R Coll Surg Edinb Irel. 2003;1:187-206.

Brooks AJ. **The essence of SNPs.** Gene. 1999;234:177–186.

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

Clark MF, Baudouin SV. **A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis.** Intensive Care Med. (2006)32:1706-1712.

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

D'Ávila LC, Albarus MH, Franco CR, Aguiar BA, Oliveiras JR, Dias FS, *et al.* **Effects of CD14 -260C>T polymorphisms on the mortality of critically ill patients.** Immunol Cell Biol. 2006;84(4):342-8.

Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. **Endotoxemia in human septic shock.** Chest. 1991;99:169-75.

Delves PJ, Roitt IM. **The Immune System – First of Two Parts.** Advances in Immunology. 2000a;343(1)37-49.

Delves PJ, Roitt IM. **The Immune System – Second of Two Parts.** Advances in Immunology. 2000b;343(2)108-117.

Dinarello CA. **Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock.** Chest. 1997;112:321S-329S.

Dinarello CA. **Proinflammatory Cytokines.** Chest. 2000;118:503–508.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. **Facing the challenge: Decreasing case fatality rates in severe sepsis despite increasing hospitalizations.** Crit Care Med. 2005;33:2555–2562.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J. **Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003.** Crit Care Med. 2007;35:1244–1250.

Downey GP. **Mechanism of leukocyte motility and chemotaxis.** Curr Opin Immunol. 1994;(6):113-24.

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.

Esper A, Martin GS. **Is severe sepsis increasing in incidence and severity?** Crit Care Med. 2007; 35(5):1414-1415.

Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, *et al.* **Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis.** Immunol. 2003;109:426-431.

Friedman G, Silva E, Vincent JL. **Has the mortality of septic shock changed with time?** Crit Care Med. 1998;26:2078-2086.

Geroulanos S, Douka ET. **Historical perspective of the word “sepsis”.** Intensive Care Med. 2006;32:2077.

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.

Gordon AC, Lagan AL, Aganna E. **TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study.** Genes Immun. 2004;5:631–640.

Grohe SS, Stuber F, Book M. **TNF- α Promoter Polymorphism in Relation to TNF- α Production and Clinical Status in Cystic Fibrosis.** Lung. 2006;184:99–104.

Gullo A, Iscra F, Di Capua G, Berlot G, Lucangelo U, Chierago ML, *et al.* **Sepsis and organ dysfunction: an ongoing challenge.** Minerva Anesthesiol. 2005;71(11):671-99.

Haddad JJ, Fahlman CS. **Nuclear Factor- κ B- Independent Regulation of Lipopolyssaccharide- Mediated Interleukin-6 Biosynthesis.** Biochem Biophys Res Commun. 2002;291:1045-51.

Hoesel LM, Ward PA. **Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis.** Drug Discovery Today. 2004;3(1):345-50.

Holmes CL, Russell JA, Walley KR. **Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock: Role in Prognosis and Potential for therapy.** Chest. 2003;124;1103-1115.

Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, *et al.* **The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components.** Science. 2001;294:870-5.

Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. **The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure.** Mol Med Today .1999 Mar;5(3):123-32.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. **APACHE II: a severity of disease classification system.** Crit Care Med. 1985 Oct;13(10):818-29.

Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. **Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatments in 612 patients.** AM J Med. 1980;(250):3324-7.

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

Kroeger, KM, Abraham LJ. **Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF- α gene.** Biochem Mol Biol Int. 1996;40:43-51.

Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL. **Similarities and Differences Between Human and Murine TNF Promoters in Their Response to Lipopolysaccharide.** J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):4045-52.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, *et al.* **International Sepsis Definitions Conference.** Intensive Care Med. 2003;29(4): 530-8.

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):1361-9.

Lin MT, Albertson TE. **Genomic polymorphisms in sepsis.** Crit Care Med. 2004;32:569-79.

Lin WJ, Yeh WC. **Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor - α signaling in septic shock.** Shock. 2005;24(3):206-209.

Majetschak M, Obertack U, Schade FU. **Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms, Leukocyte Function, and Sepsis Susceptibility in Blunt Trauma Patients.** Clin Diagn Lab Immunol. 2002;1205-1211.

Matos GFJ, Victorino JA. **Consenso Brasileiro de Sepse – Critérios para o Diagnóstico de Sepse, Sepse severa e Choque Séptico. 2003.** <http://www.einstein.br/sepse/pdf/2.pdf> (18/06/2007).

Matsuda N, Hattori Y. Systemic **Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy.** J Pharmacol Sci. 2006;101:189–198.

Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, *et al.* **Association of TNF2, a TNF- α Promoter Polymorphism, With Septic Shock Susceptibility and Mortality.** JAMA. 1999;282:561-68.

Monick MM, Hunninghake GW. **Second Messenger Pathways in Pulmonary Host Defense.** Annu Rev Physiol. 2003;65:643-67.

Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, *et al.* **Influence of Toll-Like Receptor, CD14, Tumor Necrosis Factor, and Interleukine-10 Gene Polymorphisms on Clinical Outcome in Japanese Critically Ill patients.** J Surg Research. 2005;129:322-328.

O’Shea JJ, Ma A, Lipsky P. **Cytokines and Autoimmunity.** Nat Rev Immunol. 2002;2:37-45.

Opal SM, DePalo VA. **Anti-Inflammatory Cytokines.** Chest. 2000;117;1162-1172.

Opal SM, Glück T. **Endotoxin as drug target.** Crit Care Med. 2003; 31: 57-64.

Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, *et al.* **Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock.** J Infect Dis. 1999; 80:1584-9.

Opal SM, Yu RLJ. **Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. New approaches and future directions.** Drugs. 1998;55:497-508.

Padkin A, Goldfrad C, Brady AR. **Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland.** Crit Care Med. 2003;31:2332–2338.

Panacek EA, Kaul M. **IL-6 as a Marker of Excessive TNF- α Activity in Sepsis.** Sepsis. 1999;3:65–73.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, *et al.* **Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.** Nature. 1984;312(5996):724-9.

Rigato O, Silva E, Kallas EG, Brunialti MK, Martins PS, Salomao R. **Pathogenetic Aspects of Sepsis and Possible Targets for Adjunctive Therapy.** Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2001;1:13-30.

Risch NJ. **Searching for genetic determinants in the new millennium.** Nature. 2000;405:847-856.

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H. **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor.** Nature. 1985;313(6005):803-6.

Sipahi T, Pocan H, Akar N. **Effect of Various Genetic Polymorphisms on the Incidence and Outcome of Severe Sepsis.** Clin Appl Thromb Hemost. 2006;12(1):47–54.

Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, *et al.* **Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study).** Critical Care. 2004;8:R251-R260.

Springer TA. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi- step paradigm.** Cell. 1994;(76):301-04.

Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. **A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis.** Crit Care Med. 1996;24:381-84.

Stüber F. **Genetic Predisposition.** In Vincent JL, Carlet J, Opal SM. The Sepsis Text. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002.

Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, *et al.* **Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection.** Crit Care Med. 2000;28:2733-36.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. **Two tumor necrosis factor receptors: structure and function.** Trends in Cell Biol. 1995;5:392-399.

Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, *et al.* **Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicentric, prospective study.** Crit Care Med. 1998;26:1793-1800.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL. **Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study.** Crit Care Med. 2006;34:344-353.

Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. **Septic Shock and Respiratory Failure in Community-acquired Pneumonia Have Different TNF Polymorphism Associations.** Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:1599-1604.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor- α promoter on transcriptional activation.** Immunol. 1997;94:3195-3199.

Wjst M. **Target SNP selection in complex disease association studies.** BMC Bioinformatics. 2004;5(92):1-6.

Wu WS, McClain KL. **DNA polymorphisms and mutations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LHC).** J Interferon Cytokine Res. 1997;17:631-635.

Wunderink RG, Waterer GW. **Genetics of sepsis and pneumonia.** Curr Opin Crit Care. 2003;9:384-89.

Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. **Expression and function of Toll-like receptor on T cells.** Cell Immunol. 2005;233(2):85-9.

Xu Z, Dziarski R, Wang Q, Swartz K, Sakamoto KM, Gupta D. **Bacterial Peptidoglycan-Induced TNF- α Transcription Is Mediated Through the Transcription Factors Egr-1, Elk-1, and NF- κ B.** Am Assoc Immunol. 2001; 6975-6982.

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.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título da pesquisa:

Efeitos da Herança de Variantes Gênicas Polimórficas em Pacientes com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo estudar as características genéticas de pessoas internadas em unidades de terapia intensiva (UTIs) para identificar quais são as suas predisposições a desenvolver complicações durante a internação. Algumas pessoas internadas em UTIs podem apresentar uma complicação respiratória grave chamada Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (abreviada por SARA) que pode causar alterações importantes no funcionamento dos outros órgãos do corpo humano. Cada pessoa tem particularidades próprias em relação às suas características genéticas. Assim, algumas pessoas internadas em uma UTI podem ter maior ou menor predisposição à desenvolver uma complicação como a SARA. O objetivo principal desta pesquisa é estudar pessoas internadas em UTIs que desenvolveram SARA para entender se há alguma associação entre suas características genéticas e a ocorrência da SARA, e se há associação com as outras complicações decorrentes da SARA. Para isso, nós analisaremos o material genético (DNA) dos pacientes que estiverem internados na Unidade de Tratamento Intensivo Geral do Hospital São Lucas - UTIG / HSL / PUCRS. O material genético (DNA) será obtido através de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS. Serão estudados seis segmentos do DNA de cada paciente, isto é, serão estudados seis genes, através dos quais será possível se ter um perfil genético de cada pessoa. Os nomes dos genes que serão estudados são os seguintes: 1- gene CD14; 2 - gene eNOS; 3 - gene ECA; 4 - gene SOD2; 5 - gene TNF- α e gene: IL-1Ra. Após a análise genética, serão comparados os resultados provenientes do estudo do DNA com os dados que refletem o estado geral de saúde do paciente. Com este estudo esperamos compreender melhor: (I) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente de UTI; (II) o quanto as características genéticas influenciam no sucesso da recuperação de um paciente com SARA; e (III) o quanto as características genéticas influenciam na suscetibilidade das pessoas às diferentes fragilidades biológicas. Quando isto for desvendado, a medicina poderá contar com mais um indicador biológico que auxiliará no diagnóstico, na prevenção e no tratamento de diferentes doenças complexas.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este trabalho, vamos usar parte de uma amostra do sangue que é coletado durante os procedimentos de rotina do paciente internado na UTIG / HSL / PUCRS. Também serão consultados os dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos presentes no prontuário de cada paciente.

Os desconfortos ou riscos esperados:

O paciente não estará exposto a nenhum desconforto em decorrência da participação neste estudo, pois serão utilizadas amostras de material biológico e dados coletados na rotina da UTIG / HSL / PUCRS.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

O paciente (ou responsável) deve sentir-se à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

Os benefícios que se pode obter:

Neste momento, o paciente não receberá nenhum benefício direto em decorrência deste estudo. Ainda não são bem conhecidos os efeitos que a herança genética tem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados do paciente estarão contribuindo na descoberta de indicadores genéticos que auxiliarão futuramente o diagnóstico, a prevenção e o tratamento das doenças complexas.

No futuro, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência desta pesquisa, os pesquisadores buscarão o paciente (ou familiares) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso o paciente (ou o responsável) tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que se ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente o paciente (ou o responsável) deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo;

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam do mesmo. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos pacientes (ou responsáveis), sempre que solicitados.

Garantia de acompanhamento adequado;

A equipe de profissionais de saúde que atende no UTIG / HSL / PUCRS tem uma rotina estabelecida no acompanhamento dos pacientes da UTI. Esta rotina de atendimento ao paciente não será alterada em nada por ocasião deste estudo. Assim, garantimos que a concordância ou não na participação deste estudo não implicará em qualquer modificação na rotina do tratamento já estabelecido para os pacientes. Os resultados destes exames não terão efeito algum sobre o paciente.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a privacidade do paciente, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Os dados dos pacientes estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos pacientes. A identidade do paciente será, portanto, totalmente desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA. Para isso, o paciente (ou responsável) poderá permitir que sua amostra de DNA seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

Eu, _____ (*preencher com nome do responsável*) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe do Dr. Fernando S. Dias certificou-me de que todos os dados referentes ao paciente desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como responsável pelo paciente _____ (*preencher com nome do paciente*), dou consentimento para que ele participe da pesquisa.

Paralelamente,

() permito que a amostra de material genético seja usada em pesquisas futuras, sem a necessidade de nova consulta, desde que os novos estudos sejam devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade do mesmo Pesquisador Coordenador. Fui informado que, também nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar ao paciente (ou ao responsável) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

() não permito que o material genético seja usado em novos estudos.

Caso tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar ao Dr. Fernando S. Dias nos telefones (51) 99743803 ou (51) 3320 3000 ramal 3037. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também à Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 9113 6334 ou (51) 3320 3568 e os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3000 ramal 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

_____	_____	____/____/20____
Assinatura do Paciente (ou responsável)	Nome do Paciente (ou responsável)	Data

_____	_____	____/____/20____
Assinatura do Pesquisador	Nome do Paciente	Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com nome do paciente ou do responsável*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

_____	_____	____/____/20____
Assinatura da Testemunha	Nome da Testemunha	Data

ANEXO B - Cartas de Aceite pelo CEP-PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 838/03-CEP

Porto Alegre, 11 de dezembro de 2003.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Efeitos da herança de variantes gênicas polimórficas em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA)".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Fernando Suparregui Dias
N/Universidade



Ofício 357/08-CEP

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Porto Alegre, 10 de abril de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04145, intitulado: **“Associação entre o SNP - 308G> A do gene do fator de necrose tumoral (TNF)-a e o desfecho clínico em pacientes críticos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim
 COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
 Profa Clarice Sampaio Alho
 N/Universidade

PUCRS

Campus Central
 Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
 Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
 E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C - Carta de Recebimento do Periódico

International Journal of Immunogenetics - Manuscript ID IJIG-Oct-08-0137
28-Oct-2008

Dear Dr Alho:

Your manuscript entitled "TNF -308A ALLELE WAS NOT AN INDEPENDENT RISK FACTOR IN 437 CRITICALLY ILL PATIENTS FROM SOUTHERN BRAZIL" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the International Journal of Immunogenetics.

Your manuscript ID is IJIG-Oct-08-0137.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijig> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ijig>.

If you have not already done so, please complete and sign the attached Exclusive Licence Form and return either by fax or by post to the contact details below.

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Immunogenetics.

Sincerely,

International Journal of Immunogenetics Editorial Office

Blackwell Publishing

9600 Garsington Road

Oxford, OX4 2DQ, UK

Fax: 0044 (0) 1865 471326