

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA -**  
**CIÊNCIAS MÉDICAS**

***AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO CD14 E ECA EM***  
***PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA***  
***INTENSIVA GERAL***

**MARIA HELENA ALBARUS**

**Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira**

***Tese de Doutorado***

**2004**

**As minhas filhas Milena e Marina, meu marido, meus pais e todos os amigos, com carinho. Obrigado pela paciência, carinho e amor que sempre recebi.**

## **AGRADECIMENTOS**

Durante o desenvolvimento deste trabalho recebi a colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de prestar o meu agradecimento.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Clarice Alho que foi muito mais que uma amiga, foi uma excelente professora durante os quatro anos do curso de Doutorado, sempre se mostrando atenciosa, disponível a qualquer momento, ajudando a encontrar respostas para todos os problemas que surgiram durante este período. Tenho a certeza que sem a ajuda desta mestra não teria chegado ao fim do meu trabalho. Devo muito do meu agradecimento a esta maravilhosa pessoa.

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, que foi meu orientador, por apostar em mim e ser um grande amigo acima de tudo. Sem ele também não teria conseguido chegar ao final desta tese. Ele sempre foi muito atencioso e bastante criterioso com o nosso trabalho.

Ao Curso de pós-graduação em Medicina – Ciências Médicas da UFRGS, representado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Fuchs, pela oportunidade de aprimoramento científico dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

Ao Dr. Fernando Suparregui Dias, Chefe da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por possibilitar a coleta dos pacientes para este estudo. Além disto foi um grande incentivador deste estudo, estando sempre disposto a ajudar no que foi preciso.

Ao Dr. Luis Glock, pela ajuda importante nos cálculos estatísticos, que levaram um bom tempo para serem concluídos.

As secretárias do curso de pós-graduação em Ciências Médicas da UFRGS: Letícia, Luciano, Helena, Débora e Sandra.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Genética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Jose Luiz, Carolina, Camila e Francis por terem dado todo o suporte técnico do qual precisamos para realizar o trabalho.

Ao Luis D'Ávila pela ajuda dos resultados finais e colaboração na elaboração dos artigos.

À minha família, que com carinho deu atenção e soube entender todos os problemas pelos quais passei neste período de grande trabalho.

A todos os voluntários que doaram o material biológico para esta pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os que por um motivo ou outro permitiram que este trabalho fosse concluído.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. Caracterização dos Pacientes de UTI.....	8
2.2 Sepse.....	9
2.3. Molécula CD14.....	11
2.4. Enzima Conversora da Angiotensina (ECA).....	14
3. OBJETIVO GERAL.....	21
3.1. Objetivos Específicos.....	21
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	23
5. ARTIGOS.....	51
5.1. Artigo 1.....	51
5.2. Artigo 2.....	91
6. ANEXOS.....	142
6.1. Lista de Abreviaturas.....	142
6.2. Lista de Figuras.....	144
6.3. Lista de Tabelas.....	145

## 1.INTRODUÇÃO:

O conhecimento das bases genéticas de uma doença, isto é, de sua origem molecular, permite o melhor entendimento de como a informação herdada expressa ou modula o desenvolvimento de uma enfermidade. As diferentes variantes gênicas herdadas, poderão interferir na suscetibilidade de cada indivíduo a determinadas fragilidades biológicas e poderão predispor-lo a maiores riscos nos quadros de doenças multifatoriais (1-3). O estudo da associação entre a herança de variantes gênicas polimórficas e o estado de saúde de um paciente permitirá identificarem-se quais são as características genéticas marcadoras, que poderão ser usadas como indicadores no prognóstico, na prevenção e no tratamento das doenças (4). Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensivas (UTIs) são indivíduos em estado de saúde altamente debilitado. Quanto mais constante e completa for a monitorização deste indivíduo, melhor será realizada a intervenção, o que poderá possibilitar um desfecho mais favorável. Até o momento, dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos têm sido úteis para a definição do estado de déficit de saúde do paciente e na monitorização da sua resposta ao tratamento estabelecido na busca da sua recuperação (5). Nós sugerimos que a inclusão de dados referentes às características genéticas poderão incrementar ainda mais a boa repercussão do tratamento e do acompanhamento aos pacientes em estados patológicos graves. Assim, neste trabalho, além dos dados convencionais, nós analisamos as características genéticas de pacientes internados em UTI com o objetivo de identificar o quanto a herança genética pode interferir na resposta terapêutica e no desfecho clínico final de cada indivíduo.

O genoma humano apresenta cerca de 30 mil genes, codificadores de mais de 100 mil proteínas, nos quais já foram detectadas mais de 50 mil variações polimórficas, as quais podem provocar alterações estruturais ou regulatórias nas diversas funções metabólicas do organismo envolvendo, portanto, modificações fenotípicas (6-10). Num quadro patológico complexo, como é o caso de um paciente internado em UTI, centenas de genes estarão envolvidos na modulação fisiológica que poderá intervir diretamente na capacidade de recuperação do indivíduo. Desta forma, é fundamental conceber que, somente após estudos populacionais em larga escala, com grande número de indivíduos de diferentes populações avaliados, será possível concluir se, de fato, há associação entre a herança de certos genes ou marcadores genéticos e um fenótipo e, ainda que uma

associação significativa seja evidenciada, dever-se-á considerar as variabilidades individuais de cada paciente antes de submetê-lo a intervenções (10).

Entre todos estes genes, aqueles que interferem em múltiplos sistemas e órgãos serão, certamente, os mais decisivos. Entre todo este grupo importante de características genéticas a serem investigadas, nós selecionamos duas, por se tratarem de genes que têm tido sua dinâmica populacional estudada em diferentes grupos humanos e por codificarem para proteínas com ações na resposta inflamatória e na homeostase vascular. Assim, iniciamos o estudo genético em pacientes internados em UTI, investigando variantes polimórficas dos genes que codificam para: (I) o gene CD14, como um suposto marcador genético para ser usado como indicador no prognóstico, na prevenção e no tratamento das doenças infecciosas e (II) enzima conversora da angiotensina (ECA), a qual tem um papel chave, dado que sua expressão tem ampla repercussão sistêmica, modulando a função vascular e atuando diretamente no contexto geral da recuperação do paciente.

**REFERÊNCIAS:**

1. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al: Large scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science** 1998; 280: 1077-1082
2. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient. **JAMA** 2000; 284: 22-29
3. Sander C: Genomic medicine and the future of health care. **Science** 2000; 287: 5460, 1977-1978
4. Roses AD: Pharmacogenetics and the practice of medicine. **Nature** 2000; 15: 857-865
5. 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
6. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291: 1304-1351
7. Guttmacher AE, Collins, FS: Genomic Medicine. **N Eng J Med** 2002; 19: 1512-1520
8. Griffith LG, Grodzinsky AJ: Advances in Biomedical Engineering. **JAMA** 2001; 285: 556-561
9. Phillips JA: Genomic medicine: managing the complexity. **JAMA** 2001; 286: 1639
10. Quinzii C, Belpinati F, Pignatti PF: Predictive genetic testing - new possibilities in determination os risk of complex diseases. **Croat Med J** 2001; 42: 458-462

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Caracterização dos pacientes de UTI

O paciente internado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) é caracterizado por apresentar um quadro patológico complexo decorrente de fragilidades fisiológicas graves. Em decorrência deste quadro, a taxa de mortalidade de pacientes de UTIs fica entre 30 a 50% (1). Enquanto a mortalidade continua sendo um importante desfecho para estudos clínicos, a morbidade também tem sido levada em conta por várias razões. Primeiro, em uma população de UTI heterogênea torna-se difícil demonstrar que uma nova intervenção tem um significativo impacto na mortalidade. Segundo, uma falência orgânica pode prolongar a estada em um leito de UTI, envolvendo um aumento no uso de recursos, por isso é tão importante o entendimento das morbidades para o custo-benefício em uma análise de intervenções terapêuticas. Terceiro, a habilidade para quantificar uma situação clínica complexa usando escores e outros mecanismos podem facilitar a comunicação e apreciação dos processos envolvidos. Quarto, o melhor conhecimento da morbidade pode ajudar na identificação de diferentes padrões de disfunção ou falência orgânica e então melhorar o conhecimento dos processos destas doenças (2).

Durante os últimos 20 anos, os modelos de predições de risco em UTI mais usados são os escores *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II)*, *Multiple Organ Dysfunction Failure (MODS)* e o *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*. O *APACHE II* é um índice que visa inicialmente a predição de mortalidade e é mais comumente usado em terapia intensiva utilizando uma escala de pontuação com 12 variáveis fisiológicas associadas à idade e comorbidades do indivíduo. O escore final do *APACHE II* considera os valores mais elevados detectados nas primeiras 24 horas de internação na UTI e é utilizado na categorização do paciente dentro da relação internacional de codificação diagnóstica admissional, a qual inclui 34 diagnósticos para estimar a probabilidade de morte (3); o *MODS* e *SOFA* são índices que medem morbidade através do estado de saúde diário do paciente como instrumento formal que reflete as alterações fisiológicas independentemente da terapia. A obtenção destes dois últimos escores considera diariamente a condição de seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, cardiovascular, hematológico e neurológico) quantificado na escala de zero a quatro, utilizando-se o valor que reflita o pior estado de disfunção orgânica nas 24 horas. O valor zero representa a função normal, mortalidade na UTI < 5% e o valor 4 representa disfunção associada à



mortalidade na UTI  $\geq 50\%$  (3), além disto o índice SOFA prevê eventos hospitalares, tempo de permanência hospitalar e custos (2,3). Constantes inovações nesses instrumentos poderão ajustá-los para grupos mais específicos de pacientes tais como pacientes mais velhos ou com predisposições genéticas conhecidas, a fim de oferecer aos intensivistas maior qualidade no poder de predição.

Além destes índices citados acima, tem-se investigado, também, técnicas moleculares e celulares para serem usadas como uma ferramenta no melhor entendimento de muitas doenças graves as quais levam um paciente a entrar em uma UTI (4). Esta identificação do perfil genético poderá afetar de maneira muito particular a análise do risco individual de cada paciente dado que a herança genética pode dispô-lo a um desfecho positivo ou negativo.

O entendimento dos mecanismos moleculares e genéticos de uma disfunção orgânica pode elucidar como a mesma é expressa ou modulada pela herança genética (5,6) e como tal informação poderá ser usada em testes prognósticos (7). O genoma humano apresenta cerca de 30 mil genes, codificadores de mais de 100 mil proteínas, nos quais já foram detectadas milhões de variações polimórficas, cujas alterações estruturais ou regulatórias podem alterar diversas funções metabólicas do organismo envolvendo, portanto, modificações fenotípicas (8-12). Por esse motivo as disfunções orgânicas são acompanhadas pela expressão de centenas de genes os quais estão diretamente envolvidos na capacidade de recuperação do indivíduo (13) e tem tido um significativo desenvolvimento, validação e refinamento.

## **2.2 Sepses**

Sob o nome de toxinas bacterianas compreendem-se dois grupos de substâncias: exotoxinas e endotoxinas. As alterações hemodinâmicas que ocorrem durante o curso clínico do choque séptico se devem as endotoxinas liberadas das paredes celulares das bactérias gram-negativas e as exotoxinas produzidas pelas bactérias gram-positivas que causam dano tecidual.

Nas bactérias gram-negativas, a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) parece ser fator crucial na patogenicidade do choque séptico. São partes integrantes da parede celular microbiana e composta de uma porção lipídica (lipídio A) inserida na parede celular, um núcleo polissacarídeo evolutivamente conservado e o polissacarídeo O, altamente variável e responsável pela diversidade destas moléculas. As endotoxinas são normalmente liberadas quando as células do sistema imunológico do paciente infectado matam as bactérias, desencadeando a

casca dos mediadores inflamatórios: fator de necrose tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 10 (IL-10). Estes mediadores aumentam a permeabilidade capilar e provocam vasodilatação, resultando em distúrbios da microcirculação em muitos órgãos (14).

Na circulação, a endotoxina ativa o centro termorregulador e o processo de coagulação, atraindo leucócitos para o local da inflamação acarretando na queda do tônus esfinteriano da microcirculação e dilatação de capilares e vênulas. Ocorre, então, o aporte insuficiente de oxigênio para os tecidos acarretando o predomínio da glicólise anaeróbica nos tecidos, com o aumento do ácido láctico e dano celular. O fluxo sanguíneo deficiente nos tecidos impede a retirada normal do dióxido de carbono, que reage localmente nas células com a água, formando concentrações intracelulares muito elevadas de ácido carbônico (15).

As LPSs estimulam uma gama extraordinária de respostas do hospedeiro. Os efeitos clínicos mais importantes são febre e colapso vascular ou choque. A febre pode beneficiar o hospedeiro ou o parasita, ou ambos, e atualmente considera-se que a febre é decorrente da ação da interleucina 1 (IL 1) e do  $\text{TNF}\alpha$  no hipotálamo, ambos produzidos por macrófagos em resposta aos LPSs.

A inflamação é a reação local dos tecidos à agressão, como, por exemplo, a bacteremia, ocorrendo como resposta inespecífica que se caracteriza por uma série de alterações que tendem a minimizar ou mesmo neutralizar os efeitos da agressão. As inflamações agudas se caracterizam pelo predomínio de fenômenos exsudativos decorrentes de alterações na permeabilidade vascular permitindo o acúmulo de líquido (edema), de fibrina, de leucócitos e de hemácias na região inflamada. Nas inflamações crônicas, além destes elementos ocorre localmente a proliferação de vasos, fibroblastos, como também migração e proliferação local de monócitos e linfócitos.

A primeira alteração que se observa é uma fugaz vasoconstrição arterial local, que logo é seguida por uma dilatação ativa e intensa das arteríolas, capilares e veias circundantes. Na inflamação ocorre um aumento da permeabilidade capilar; como consequência da ação de substâncias farmacologicamente ativas que se formam no local. Em certos tipos de inflamação, os próprios agentes endotóxicos são capazes de lesar os vasos, permitindo que grandes quantidades de fluido, macromoléculas e células acumulem-se no interstício. Como consequência do aumento da permeabilidade vascular, ocorre aumento da concentração dos elementos figurados do sangue aumentando a viscosidade sanguínea. Estes eventos provocam uma progressiva queda da velocidade da circulação e a área inflamada passa a ser mal oxigenada.

O controle da intensidade da resposta inflamatória, assim como seu desencadeamento, é realizado pelos mediadores inflamatórios. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são mediados pela histamina, serotonina, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (ON) e IL-1 (15)

A sepse é uma síndrome clínica secundária à invasão da corrente sangüínea. Os fatores fisiopatológicos a ela relacionados incluem, principalmente, o local da infecção, sendo os sistemas da coagulação, fibrinolítico e inflamatório, os determinantes de sua evolução.

Os principais sinais da sepse são as alterações de temperatura, a taquicardia, a hiperventilação e as alterações no leucograma. A febre é o sinal mais característico, mas em cerca de 10% dos casos a hipotermia pode estar presente e indica um mau prognóstico. Em relação aos testes inflamatórios, nota-se que a proteína C-reativa está tão elevada durante a sepse como em outros quadros inflamatórios. Pode desenvolver-se tardiamente ou estar reduzida em casos de função hepática alterada. As taxas circulantes de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10, estão correlacionadas com a gravidade do choque séptico, mas sua contribuição ao diagnóstico individual do choque séptico não está estabelecida (16).

Os pacientes que desenvolvem quadros mais graves de sepse manifestam evidência de hipotensão, acidose láctica e alteração da função de diferentes órgãos. Os seis sistemas mais freqüentemente acometidos são: (I) cardiovascular com hipotensão, depressão miocárdica, hiperlactatemia; (II) respiratório, com hipoxemia, lesão pulmonar aguda, Síndrome da Distrição Respiratória Aguda; (III) renal com insuficiência renal aguda, oligúria; (IV) hepático com hiperbilirrubinemia; (V) coagulação com trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada e (VI) sistema nervoso central com confusão, estupor e coma (14,15).

Portanto, o diagnóstico de choque séptico pode ser orientado pela apresentação hemodinâmica de choque com débito cardíaco elevado e resistências vasculares diminuídas e apoiado pela presença simultânea de sinais de sepse (15-17)

### **2.3 Molécula CD14**

O CD14 é uma glicoproteína de 53-55 kDa ancorada a superfície de muitos tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos, e funciona como um receptor de uma ampla gama de microorganismos que atua reconhecendo diferentes estruturas de lipopolissacarídeos (LPS), peptídeoglicanos e ácido lipotéico. O CD14 é uma proteína *glycosylphosphatidylinositol* encontrada de duas

formas: mCD14, a qual está intrínseca na membrana plasmática de macrófagos, monócitos e neutrófilos, e sCD14 quando na sua forma solúvel (18). Em ambas formas, a ação do CD14 está envolvida com a sinalização imunológica inata à infecção microbiana (19,20). LPSs presentes no plasma ligam-se à receptores HDL (*high density lipoprotein*) e são reconhecidas por LBPs (*LPS binding protein*) as quais transferem as LPSs do HDL para o mCD14 bem como para sCD14 sérico. A sinalização imunológica é então promovida pelo complexo LBP-LPS-CD14. A ligação LBP-LPS ao mCD14 resulta na produção de citocinas inflamatórias tais como  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ou radicais de oxigênio, como NO e fator tecidual, bem como citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e  $TGF\beta$  por parte dos macrófagos, monócitos ou neutrófilos. A ligação LBP-LPS ao sCD14 resulta na ativação de tipos celulares que não expressam CD14 na superfície, como células endoteliais e epiteliais cujas membranas são desprovidas do CD14 intrínseco (21-23), à liberação dos mesmos mediadores (18,24). O sCD14 pode neutralizar o possível efeito tóxico da resposta imunológica desencadeada pela liberação de mediadores inibindo a ligação das LPSs ao mCD14 ou devolvendo LPSs ao HDL (18). Ainda que a completa função biológica do CD14 permaneça desconhecida, o aumento da concentração sérica do sCD14 tem sido considerado um bom marcador prognóstico de mortalidade em pacientes com sepse decorrente de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (25,26).

O gene humano que codifica para CD14 está localizado no *locus* 5q23-q31 ocupando cerca de 1500pb organizados em dois exons que codificam para uma proteína de 375 resíduos aminoacídicos [AF097942 (27); X06882 (28)]. Na seqüência promotora do gene foram identificadas quatro regiões que interagem com proteínas nucleares específicas de monócitos e três diferentes regiões nas quais se liga o fator de transcrição Sp1 (29). Mutações que alterem a seqüência de reconhecimento para Sp1 diminuem a atividade promotora do gene demonstrando um papel crítico regulador de sua expressão (29). Em um segmento de 460pb 5' flanqueante ao éxon 1 [U00699 (29,30)] foi detectado um *single nucleotide polymorphism* (SNP) de transição de uma citosina para uma timina na posição -159, a partir do sítio de início da transcrição. A mutação C<sub>-260</sub>→T encontra-se próximo a um sítio de reconhecimento para Sp1 o que permite sugerir, portanto, que tal substituição nucleotídica possa interferir na capacidade transcricional do gene. Foi observado que indivíduos portadores do alelo T apresentam níveis séricos de sCD14 aumentados em relação aos indivíduos portadores do alelo C, resultando numa possível suscetibilidade diferencial do indivíduo a desenvolver patologias associadas aos processos inflamatórios (31-33) No entanto, a associação entre a

herança genética e a pré-disposição às mesmas patologias não é verificada em todas as populações humanas estudadas (Tabela 1).

Escolhemos o gene CD14, cuja expressão tem ampla repercussão sistêmica, como um suposto marcador genético para ser usado como indicador no prognóstico, principalmente da sepse, que é uma das causas mais importantes de mortalidade encontrada em UTIs.

**Tabela 1**

**ASSOCIAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA COM MORBIDADES E O CD14**

AMOSTRA	Nº IND	CONDIÇÃO	ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPO OU ALELO	ANO	REF.
<b>Caucasóides</b>					
República Tcheca	308	Aumento da densidade CD14 IM IM	TT ( $p=0.0028$ ) Alelo T ( $p=0.0005$ ) TT ( $p=0.0049$ )	1999	31
Austrália	531	Níveis sCD14 aumentados Diminuição de níveis de IgE Resposta a IL-4 Resposta a IFN- $\gamma$	TT ( $p=0.01$ ) TT ( $p=0.004$ ) ns ns	1999	32
Alemanha	2228 841 273 76	IM CAD Risco de IM em Hp Risco de IM em Hp não fumantes Risco de IM em Hp não fumantes > 62 anos	ns ns ns TT ( $p<0.05$ ) TT ( $p<0.01$ )	1999	33
USA	774	Risco de IM	ns	2001	34
Finlândia	1151	Risco de dano renal alcoólico e cirrose	TT ( $p=0.005$ )	2001	35
Reino Unido	317	Fenótipo alérgico severo	CC ( $p=0.036$ )	2001	36
Alemanha	61	Aumento de citocinas em sobreviventes de infarto jovens	ns	2001	37
Holanda	95	Densidade mCD14 Níveis sCD14 Concentração TNF- $\alpha$	ns ns ns	2001	38
Finlândia	189	Aumento da expressão de CD14 em pacientes com psoríase	ns	2002	39
Alemanha	789	Níveis sCD14 aumentados Risco de CAD estável	TT ( $p=0.005$ ) ns	2002	40
Holanda	58	Risco de sepsis severa em pacientes com trauma	ns	2002	41
Alemanha	300	Risco de isquemia cerebral Risco de aterosclerose ou MAS	ns TT ( $p=0.05$ )	2002	42

França	212	Risco de morte em pacientes com choque séptico	TT ( $p=0.008$ )	2002	43
Finlândia	328	Níveis sCD14 aumentados	Alelo T ( $p<0.001$ )	2002	44
Alemanha	3309	CAD, IM	ns	2002	45
Alemanha	2235	Fator de risco para CAD e IM	ns	2002	46
Alemanha	800	Desenvolvimento de atopia	ns	2002	47
USA	676	Risco de infarto futuro	ns	2002	48
Itália	426	IAM	ns	2003	49
Alemanha	992	Aumento da carótida intima-média em fumantes	CC ( $p=0.002$ )	2003	50
Alemanha	2936	Níveis sCD14 aumentados Níveis IgE Prevalência de doença atópica	TT ( $p=0.03$ ) ns ns	2004	51
Holanda	759	Progressão de aterosclerose coronariana	ns	2004	52
<b>Asiáticos</b>					
Japão	211	IAM IAM Angina Pectoris Angina Pectoris	Alelo T ( $p=0.002$ ) TT ( $p=0.0004$ ) Alelo T ( $p=0.01$ ) TT ( $p=0.0009$ )	2000	53
Japão	544	Sintomático DIC	ns	2000	54
Coreia	387	Progressão de nefropatia IgA (IgG) Diminuição de IL-6 após estimulação por LPS	CC ( $p=0.03$ ) TT ( $p=0.0003$ )	2003	55
China	315	Infecção por <i>Chlamydia pneumoniae</i>	TT ( $p=0.016$ )	2003	56
Japão	1029	IM	TT ( $p=0.013$ )	2003	57
China	350	Níveis de IgE em atópicos Níveis totais de IgE em atópicos e asmáticos	CC ( $p=0.015$ ) ns	2003	58
Japão	136	Pacientes com KD Pacientes com KD com LAC	ns TT ( $p=0.05$ )	2003	59
Japão	129	Pacientes com reestenose in-stent	TT ( $p=0.01$ )	2004	60

ns: não significante

## 2.4 Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

A ECA apresenta um papel crítico no funcionamento do sistema cardiovascular. Ela é expressa nos vasos sanguíneos e no coração e sua expressão é regulada sob condições patológicas. As etapas principais da via de formação incluem a clivagem da renina, um precursor circulante, o angiotensinogênio, para liberar o decapeptídeo angiotensina I, substrato da ECA. Esta carboxidipeptidase consiste numa metalopeptidase zinco-dependente, que é responsável pela remoção de dois resíduos C-terminal (Histidina e Leucina) da angiotensina I, produzindo um octapeptídeo, a angiotensina II, potente vasoconstritor (61). O sistema renina-angiotensina regula a homeostase vascular no

organismo humano. A angiotensina II é uma das substâncias vasoconstritoras mais poderosas, sua ação é refletida sistemicamente na constrição simultânea das arteríola aumentando a resistência periférica, o que ocasiona o aumento da pressão arterial total. Os efeitos letais da vasoconstrição periférica sistêmica são o excesso de esforço cardíaco, a ocorrência de estenose vascular e hemorragias decorrentes de rompimento de vasos cerebrais ou renais (62,63).

Foi detectado no gene que codifica para a ECA, localizado no cromossomo 17q23, um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) representado pela presença ou ausência respectiva de uma seqüência repetida *Alu* de 287 bp dentro do intron 16 (64). Esta variação polimórfica do gene gera três possíveis genótipos: II, ID e DD. Especificamente tem sido demonstrado que a presença do alelo D tem correlação com níveis plasmáticos e celulares de ECA aumentados, comparados com os níveis observados dos indivíduos que carregam o alelo I, com o resultado que estes diferentes polimorfismos tem efeitos graduais na expressão fenotípica da ECA (DD>ID>II). O genótipo DD tem duas vezes mais ECA no plasma e nos tecidos que o genótipo II e indivíduos ID tem níveis intermediários. Estudos importantes, os quais incluíram a análise de populações com mais de um mil indivíduos, relacionaram a herança do alelo D ou do genótipo DD com morbidades associadas às disfunções no sistema circulatório (65-72).

A enzima ECA tem um papel muito importante no controle de dois peptídeos envolvidos na modulação do tônus vascular e na proliferação de células musculares lisas, participando do catabolismo da bradicinina e convertendo o hormônio inativo angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo com poderosa ação vasoconstritora e que também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal. O mecanismo mais provável pelo qual o alelo D ou genótipo DD pode aumentar o risco às disfunções circulatórias seria através da vasoconstrição das artérias coronárias. No entanto, outros estudos também importantes, com amostras populacionais com mais de um mil indivíduos, não evidenciaram tão claramente a associação entre a herança do polimorfismo I/D e alterações do sistema vascular (73-83) (Tabela 2 e 3)

Por se tratar de um polimorfismo intrônico, a variante da ECA em questão pode apenas tratar-se de variação silenciosa. No entanto, algumas das variantes podem estar ligadas a uma segunda mutação localizada em outra porção gênica realmente responsável pela diferenciação fenotípica observada. A associação entre a herança dos alelos I ou D e a performance vascular dependeriam, portanto, da extensão do desequilíbrio de ligação, podendo variar entre as diferentes populações (84).

**Tabela 2**  
**ASSOCIAÇÃO POSITIVA COM MORBIDADES E A ECA**

AMOSTRA	Nº IND.	VARIÁVEL	ANO	REF.
<b>Ásiáticos</b>				
China	189	Genótipo II com [ECAP] mais alto em chineses que em caucasianos.	1994	85
Japão	278	Genótipo DD associado à [ECAP] aumentados.	1994	86
Japão	318	Aumento do risco de disfunções do coração (isquemia); Genótipo DD mais frequente no grupo de disfunções cardíacas.	1995	87
Japão	202	Alelo D com frequência maior em pacientes com IM e angina.	1995	88
Japão	152	Princípio de nefropatia IgA; Alelo D associado com maior porcentagem de glomérulos com lesões segmentadas que o alelo I.	1995	89
China	272	Idade e gênero com HE; Alelo D mais frequente em idosos hipertensos; Alelo I mais frequente em normotensivos.	1996	90
Japão	332	Alelo D associado ao derrame isquêmico nos hipertensos.	1996	91
Japão	70	Alelo D com frequência maior em indivíduos com histórico familiar de hipertensão.	1996	92
Japão	60	Genótipo DD mais frequente na regressão induzida no índice de MVE e melhora no defeito no movimento diastólico.	1996	93
China	298	Genótipo DD em maior frequência em hipertensos.	1997	94
Japão	1919	Genótipo DD é um fator de risco para a HVE em mulheres hipertensas.	1997	95
Japão	57	Genótipos DD ou ID com [ECAP] maior que o genótipo II.	1997	96
Taiwan	244	Alelo I com maior frequência em brancos controle que em hipertensos e portadores do diabete mellitus.	1997	97
China	299	Genótipo DD pode ser fator de suscetibilidade genética para hipertensão.	1998	98
China	60	Alelo D e genótipo DD mais frequente em grávidas com hipertensão induzida.	1998	99
Japão	279	Fatores de risco de ataques prematuros de HE; Genótipo DD em pacientes com hipertensão, mais jovens, com índice de MVE maior.	1998	100
China	383	Alelo D associado à hipertensão.	1999	101
Japão	64	Genótipos ID e DD associados com baixo risco de resistência à insulina.	1999	102
China	189	HE e tratamento com drogas específicas; Genótipo DD em hipertensos.	2000	103
China	175	Genótipo DD é fator de risco para o desenvolvimento da arteriosclerose precoce.	2000	104
China	174	Alelo I e Genótipo II com maior frequência em hipertensos com apnea obstrutiva durante o sono.	2000	105
China	90	Alelo I e genótipo II mais frequente nos Chineses.	2000	106
Japão	236	HE; Genótipo II com maior frequência em hipertensos mais velhos.	2000	107
Japão	443	Genótipo DD com coração mais pesado que genótipos ID ou II.	2000	108
Japão	19	Genótipo DD associado à maior resistência vascular pulmonar após exercícios.	2000	109
Japão	300	Genótipos DD e ID possuem uma tendência de ser maior risco para o aparecimento de obesidade, hiperlipidemia, hipertensão e diabetes mellitus.	2000	110
China	3322	Metanálise com hipertensão arterial; Genótipo DD associado com o risco de ter hipertensão.	2001	111
China	853	PA e diabetes tipo 2; Alelo I associado à predominância da diabete tipo 2.	2001	112



China	110	Genótipo DD com alto nível sérico de angiotensina II em hipertensas.	2001	113
China	614	Alelo D menos frequente em hipertensos normoglicêmicos.	2001	114
Bangladesh	103	Hipertensão; Genótipo DD associado a valores mais altos da média de PA nas mulheres.	2002	115
China	1461	Definição da OMS sobre a Síndrome Metabólica em portadores de Diabetes tipo 2; Alelo D associado à pacientes com diabetes tipo 2.	2002	116
China	199	Genótipo DD e Alelo D associado à hipertensão em indivíduos com diabetes do tipo 2.	2002	117
Tibet	241	HE; Alelo D associado à hipertensão em mulheres.	2002	118
Japão	172	Genótipo DD como fator de risco genético para IM.	2003	119
<b>Caucasóides</b>				
Caucasiano	314	Genótipo DD aumenta o risco de morte prematura em hipertensos com familiares também hipertensos.	1994	120
França	316	Alelo D associado ao início prematuro de disfunções coronárias em diabetes do tipo 2.	1994	121
Inglaterra	656	Alelo D e genótipo DD mais frequentes em pacientes que sofreram infarto.	1994	122
Itália	174	Alelo D associado a ocorrência de DM com efeito cumulativo para desenvolvimento de hipertensão.	1994	123
Reino Unido	85	Alelo D associado ao efeito da PA no índice de MVE.	1994	124
Itália	199	Genótipo DD associado ao aumento da espessura da carótida.	1995	125
Caucasiano	130	Alelo D com frequência maior em indivíduos com estenose renal.	1996	126
Espanha	80	Genótipo DD associado ao aumento do nível de plasma da angiotensina II.	1996	127
Finlândia	600	Genótipo DD com a carótida mais espessa que os genótipos II ou ID.	1996	128
Finlândia	515	Genótipo DD em não fumantes associado à uma maior espessura do revestimento interno da carótida.	1996	128
França	439	Número de alelos D com tendência a diminuir a velocidade da pulsação.	1996	129
Itália	106	Alelo D associado à presença de retinopatia, microalbuminúria e HVE.	1996	130
USA	67	Alelo D associado ao aumento de MVE; Genótipo DD com espessura maior das artérias.	1996	131
USA	203	Genótipo DD associado à uma média aumentada do nível de atividade da ECA em crianças e adolescentes brancos.	1996	132
Áustria	122	Genótipo DD mais frequente em pacientes com nefropatia.	1997	133
Itália	140	Genótipo DD associado à HVE.	1997	134
Japoneses caucasianos	298	Genótipo DD em maior frequência em japoneses que em caucasianos.	1997	135
Reino Unido	100	Influencia a relação entre MVE e diástole anormal em hipertensos.	1997	136
Rússia	238	Genótipo DD associado a HVE.	1997	137
Alemanha	2267	Alelo D associado com risco de doença isquêmica do coração.	1998	138
Alemanha	388	Genótipo DD como fator de risco para estenose de artérias extracranianas.	1998	139
Espanha	187	Genótipo DD associado às complicações renais histopatologicamente comprovadas em hipertensos.	1998	140
Polônia	145	Alelo D associado a indivíduos normotensos com predisposição genética para hipertensão e alteração da PA.	1998	141
USA	3095	Genótipo DD associado com o aparecimento de hipertensão e diferença na PA em homens.	1998	142
Alemanha	1332	PA noturna maior em crianças diabéticas.	1999	143
Austrália	54	Genótipos II e ID associados à uma discreta elevação do [ECAp].	1999	144

Espanha	155	Genótipo DD associado ao princípio de um estágio final de disfunção renal antes de 50 anos.	1999	145
Finlândia	3596	A variação genética da ECA pode influenciar a PA em meninos.	1999	146
França	27	Genótipo II associado ao diabetes tipo 1, resistência a mudanças glomerulares induzidas pela hiperglicemia, e com risco reduzido de nefropatia.	1999	147
Holanda	29	Alelo D associado a disfunções cardiovasculares.	1999	148
Holanda	73	Genótipo DD associado à uma maior média de microalbuminúria.	1999	149
Holanda	87	Crescimento de massa ventricular direita em indivíduos com disfunção pulmonar obstrutiva crônica.	1999	150
Itália	225	Genótipo DD com maior índice de MVE; Alelo D associado à HVE.	1999	151
Itália	160	Alelo D mais frequente em pacientes que em normotensivos.	1999	152
Itália	200	Genótipo DD associado com o aumento da MVE com um estranho aumento de HVE.	1999	153
Suécia	1256	Alelo D associado a diabetes do tipo 2 e hipertensão em pacientes com menos de 70 anos.	1999	154
USA	289	Genótipo DD associado com o aumento de MVE em homens.	1999	155
Alemanha	585	Genótipo DD associado ao transportador do gene 825T (homozigoto).	2000	156
Brasil	249	Tradicionais fatores de risco de uma disfunção coronária, polimorfismo I/D e o polimorfismo APO B podem ser prejudiciais.	2000	157
Espanha	1322	[ECAp] e hipertensão; Alelo D associado a altos [ECAp].	2000	158
Espanha	57	Genótipo DD associado ao efeito benéfico do lisinopril mais evidente na redução do índice de MVE.	2000	159
Espanha	52	Genótipos II e ID possuem maior superioridade em sensibilidade salina que os hipertensos DD.	2000	160
Espanha	136	Genótipo DD com correlação maior entre PA diastólica e inclinação de excreção urinária albumina mas não em pacientes com o alelo I.	2000	161
Finlândia	168	Genótipo II possui mais predisposição à uma melhora que indivíduos com genótipo ID ou DD.	2000	162
Holanda	257	Complicações da diabete mellitus; Alelo T (AGT -M235T) em interação com o alelo D (ECA) associado com risco elevado de excreção de albumina na urina.	2000	163
Inglaterra	557	Alelo I relacionado com o risco de aparecimento de aneurisma.	2000	164
Itália	114	Genótipo DD é um forte preditivo de grave disfunção na carótida.	2000	165
Reino Unido	40	Alelo D associado à maior presença da expressão do gene no VE, mas varia de acordo com o genótipo.	2000	166
Suécia	169	Genótipo DD com alta frequência em pacientes com hipertensão maligna.	2000	167
Alemanha	132	Genótipo DD associado à níveis aumentados de aldosterona em pacientes CHF.	2001	168
Alemanha	100	Alelo I associado à baixa atividade de circulação da ECA.	2001	169
Espanha	71	Genótipo II associado com o aumento da PA com ingestão de sal.	2001	170
Espanha	95	Indivíduos com síndrome da apneia noturna com maior [ECAp].	2001	171
Espanha	99	Genótipo DD associado à uma maior média de PA durante 24h.	2001	172
Itália	92	Alelo D associado com disfunção endotelial seletiva na artéria femoral em jovens.	2001	173
Polônia	197	Alelo I associado a grávidas hipertensas.	2001	174
Suíça	587	Genótipo DD associado à uma mais rápida progressão da disfunção renal.	2001	175
USA	35	Genótipos DD e ID com maior superioridade da sensibilidade ao sódio	2001	176

		comparado ao genótipo II.		
Chile	34	Genótipo DD associado à uma maior atividade do plasma da ECA.	2002	177
Espanha	60	Genótipo DD ou alelo D como fator de predisposição de desenvolver lesões na massa branca cerebral.	2002	178
Inglaterra	1200	Genótipo DD, após 10 semanas de exercício, maior crescimento da MVE que os indivíduos de genótipo II.	2002	179
Reino Unido	48	Alelo D associado ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças vasculares malignas.	2002	180
Itália	358	Genótipo DD associado com o risco de fibrilação atrial.	2003	181
Itália	714	Genótipo DD associado ao risco de trombolismo venoso.	2003	182
Silesia	230	Alelo D associado a pacientes CAD.	2003	183
<b>Turcos / Gregos / Israelenses</b>				
Turquia	325	Disfunções na artéria coronária; Alelo D em maior frequência em pacientes com infarto.	1998	184
Israel	197	Alelo D associado a níveis maiores de PA que o genótipo II.	1999	185
Turquia	308	HE; Genótipo DD com alto [ECAp]; Genótipo II com baixa [ECAp]	1999	186
Turquia	94	Genótipo DD é o único fator com impacto significativo na formação de cicatrizes renais.	1999	187
Grécia	104	Genótipo DD associado à maior redução da PA (na diástole/sístole).	2000	188
<b>Africanos</b>				
Negros norte americanos	133	Alelo D com maior frequência em negros que em japoneses; e os sujeitos com esse alelo eram hipertensos.	1995	189
Jamaica	500	Aumento da PA; Genótipo DD associado com alto [ECAp] em hipertensos.	1997	190
Jamaica	449	Obesos com [ECAp] alto.	1997	191
USA	399	Genótipo DD com frequência maior em indivíduos normais negros que em caucasianos.	1998	192

**Tabela 3****ASSOCIAÇÃO NEGATIVA COM MORBIDADES E A ECA**

AMOSTRA	Nº IND.	VARIÁVEL	ANO	Ref.
<b>Ásiáticos</b>				
Japão	237	Sugere que não há associação em sujeitos hipertensivos.	1993	193
Japão	104	Sensibilidade da pressão devido ao sal.	1994	194
China	255	Aumento da PA .	1996	195
China	272	HE.	1997	196
China	361	Resistência à insulina ou intolerância à glicose.	1997	197
Japão	1840	Atividade sérica com a disfunção da artéria coronária.	1997	198
Japão	281	Cardiopatía hipertrofiada ou dilatada.	1997	199
Japão	80	Índice de MVE.	1997	200
Bangladesh	103	Hipertensão.	1998	201
China	161	Infarte cerebral em indivíduos hipertensos.	1998	202
China	160	Nível de inibidor/ativador de plasminogênio no sangue.	1998	203
China	242	HE.	1999	204
Japão	1243	Hipertensão estudando mulheres e homens juntos ou separadamente	1999	205
China	410	Origem da hipertensão.	2000	206

Japão	134	Risco de infarto lacunar.	2000	207
Coréia	108	Problemas de pedra nos rins.	2000	208
China	853	PA e diabetes tipo 2; Sem associação com o aumento da PA.	2001	209
Japão	4031	Como marcador preditivo de disfunções de formação na carótida.	2001	210
Japão	1340	Hipertensão.	2001	211
Japão	299	Efeito de drogas anti-hipertensivas.	2001	212
China	136	Gene responsável pela síntese de aldosterona e HVE.	2002	213
China	207	Disfunção da artéria coronária (também em hipertensos).	2002	214
Coréia	325	Problemas vasculares em pacientes com Lupus.	2002	215
China	352	HE.	2003	216
Coréia	277	Fator de risco para osteoartrite associado à inflamação no joelho.	2003	217
<b>Caucasóides</b>				
Holanda	186	Alelo D com frequência similar em familiares com pressão alta ou baixa.	1993	218
Bélgica	228	HE.	1994	219
EUA	228	Predisposição para nefropatia diabética.	1994	220
Escócia	585	Infarto.	1995	221
Itália	240	Arteriosclerose da carótida.	1995	222
Austrália	733	Previsão de hipertensão sistólica/diastólica nos mais velhos.	1996	223
Austrália	150	Renin angiotensina.	1996	224
Inglaterra	44	Reação a qualquer droga anti-hipertensiva.	1996	225
Rússia	218	Hipertensão.	1996	226
Caucasianos	268	Hipertensão sistêmica ou disfunção nefropática.	1997	227
Alemanha	148	Fator de risco de um aumento de espessura da carótida ou hipertensos em indivíduos com diabetes tipo 1.	1998	228
Alemanha	210	Diabete tipo 2.	1998	229
Canadenses-franceses	250	Prematura disfunção na artéria coronária.	1998	230
Espanha	175	IM em pacientes jovens.	1998	231
Finlândia	856	MVE.	1998	232
Finlândia	234	Ocorrência de hipertensão.	1998	233
França	340	Espessura da parede das artérias do coração.	1998	234
França e Reino Unido	1379	Variação da PA.	1998	235
Itália	82	Gravidade em doenças renais.	1998	236
Itália	394	IM	1998	237
Itália	394	Arteriosclerose coronária.	1998	237
Itália	1032	Inibidor/ativador de plasminogênio e arteosclerose.	1998	238
República Tcheca	365	Preditivo de hipertensão.	1998	239
Alemanha	34	Volume diastólico VE em hipertensos.	1999	240
Austrália	1111	Espessura da parede da carótida.	1999	241
Caucasianos	1310	Disfunção da artéria coronária ou IM.	1999	242
Chile	117	Aumento da MVE.	1999	243
Dinamarca	51	Progressão de nefropatia em diabéticos.	1999	244
Espanha	150	HE.	1999	245
USA	1183	Risco de um derrame.	1999	246
Itália	494	O polimorfismo do gene do receptor Trp64Arg beta-3-adrenergico e a HE.	1999	247

Itália	47	Progressão de glomerulonefrite.	1999	248
Escócia	128	Sem diferença em genótipos de casos e controles.	2000	249
Espanha	1322	[ECAp] e hipertensão; Sem associação com hipertensão	2000	250
Espanha	71	HVE em casos de hipertensão.	2000	251
Espanha	148	Risco de uma tromboembolia venosa.	2000	252
Espanha	96	Risco de HVE em indivíduos hipertensos tratados por medicamentos.	2000	253
Finlândia	66	Sensibilidade ao Baroflex.	2000	254
Holanda	70	Direcionamento para falência renal em pacientes com disfunção renal policística dominante autossômica (APDKD).	2000	255
Inglaterra	188	Sem associação de indivíduos com hipercolesterol causado por diversos fatores adquirir disfunções na artéria coronária.	2000	256
Itália	1648	Estágio final em pacientes com falência renal.	2000	257
USA	1005	Inibidor/ativador de plasminogênio.	2000	258
Alemanha	83	Genótipos dos genes angiotensinogênio em separado.	2001	259
Alemanha	95	Má formações congênitas estudadas.	2001	260
Bélgica	1454	Síntese de aldosterona.	2001	261
Espanha	315	Disfunções coronárias em hipertensos.	2001	262
Itália	250	Tratamento contraceptivo oral em hipertensos.	2001	263
Itália	142	Disfunção endotelial.	2001	264
Polônia	400	HE.	2001	265
Polônia	102	Disfunções renais glomerulares.	2001	266
Alemanha	154	Alto [ECAp] sem frequência alta de restenose.	2002	267
Espanha	1851	HE.	2002	268
Finlândia	455	Pressão arterial e hipertensão em pessoas que praticam atividades físicas.	2002	269
Ilhas Canárias	619	Disfunções na coronária (coração).	2002	270
Alemanha	221	Disfunção erétil em homens.	2003	271
República Slováquia	23	Funcionamento da diástole/sístole do VE em pacientes com diabetes do tipo 2.	2003	272
<b>Turcos / Gregos / Israelenses</b>				
Grécia	182	HE .	1996	273
Israel	156	Risco de desenvolvimento de nefropatia.	1999	274
Grécia	198	Hipertensos ou indivíduos normais.	2000	275
Turquia	377	Pacientes diabéticos hipertensos, normotensivos e controles; diferença entre PA sistólica e diastólica nos genótipos.	2001	276
<b>Outros</b>				
Índios norte- americanos	305	Evidências eletrocardiográficas de disfunção na artéria coronária.	1998	277

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a relação entre os polimorfismos genéticos do CD14 e ECA e o prognóstico em pacientes de uma UTI geral.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1. Verificar se a herança genética do diferencial de variantes para o polimorfismo C-260→T do gene CD14 pode ter correlação com a expectativa de sobrevivência dos pacientes sépticos admitidos em UTI;
2. Avaliar amplamente uma população de pacientes internados em UTI através dos instrumentos que medem sua condição orgânica em relação ao desfecho;
3. Identificar quais são os melhores indicadores para a sobrevida na população estudada;
4. Verificar se a herança diferencial das variantes polimórficas do gene ECA pode conferir acurácia no poder prognóstico dos instrumentos.

#### 4- REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Vincent JL: Sepsis: The magnitude of the problem In. JL Vincent, J Carlet e Stumopal. The sepsis text 2002. Glower Academy Publisher, Norwell, U SA.
2. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, et al: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med** 1998; 26:1793-1800.
3. Gomez J, Colli ML: Prognóstico. In: Dias FS: Choque, 2002. p 387-403. Porto Alegre. EDIPUCRS.
4. Rosenberg AL: Recent innovations in intensive care unit risk-prediction models. **Curr Opin Crit Care** 2002; 8:321-330.
5. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient. **JAMA** 2000; 284: 22-29.
6. Guttmacher AE, Collins, FS: Genomic Medicine. **N Eng J Med** 2002; 19: 1512-1520.
7. Quinzii C, Belpinati F, Pignatti PF: Predictive genetic testing - new possibilities in determination of risk of complex diseases. **Croat Med J** 2001; 42: 458-462.
8. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science** 1998; 280: 1077-1082.
9. Roses AD: Pharmacogenetics and the practice of medicine. **Nature** 2000; 15: 857-865.
10. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291: 1304-1351.
11. Griffith LG, Grodzinsky AJ: Advances in Biomedical Engineering. **JAMA** 2001; 285: 556-561.
12. Phillips JA: Genomic medicine: managing the complexity. **JAMA** 2001; 286: 1639.
13. 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.
14. Nunes, F.B. "Estudos Fisiopatológicos em Ratus Norvegicus (WISTAR) Septicêmicos e a Utilização da frutose-1,6-bisfosfato como Protetor Celular". Dissertação de Mestrado 1998. PUCRS.95 pag.

15. Marín, J.& Rodríguez-Martínez, A Role of Vascular Nitric Oxide in Physiological and pathological Conditions. *Pharmacol. Ther.* 1997, 75(2): 111-134.
16. Glauser, M.P.; Zanetti, G.; Baumgartner, J.D.; Cohen, J. Septic Shock: pathogenesis. *Lancet.* 1991, 338:732-736.
17. Hibi, K.; Ishigami, T.; Tamura, K.; Mizushima, S.; Nyui, N.; Fujita, T.; Ochiai, H.; Kosuge, M.; Watanabe, Y.; Yoshii, Y.; Kihara, M.; Kimura, K.; Ishii, M.; Umemura, S. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene polymorphism and Acute Myocardial Infarction. *Hypertension.* 1998, 32:521-526.
18. Schütt C: Molecular in focus CD14. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 545-549.
19. Ulevitch RJ: Toll gates for pathogen selection. *Nature* 1999; 401: 755-756.
20. Modlin RL, Brightbill HD, Godowiski PJ. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med* 1999; 340: 1834-1835.
21. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, et al. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to region encoding growth factors and receptors. *Science* 1988; 239; 497-500.
22. Frey EA, Miller DS, Gullstein Jahr T, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992; 176: 1665-1671.
23. Landmann R, Reben AM, Sansano S, et al: Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis.* 1996; 173: 661-668.
24. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, et al. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999; March: 123-132.
25. Landmann R, Zimmerle W, Sansano S, et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram-negative septic shock. *J Infect Dis.* 1995; 171: 639-644.
26. Burgmann H, Wincler S, Locker GJ, et al. Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in Gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 307-310.
27. Long JY, Xue YN, Sun L, et al. Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* 1998; 25: 377-378.
28. Ferrero E, Goyert SM: Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res* 1998; 16: 4173.



29. Zhang DE, Hetherington CJ, Tan S, et al: Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem* 1994; 269: 11425-11434.
30. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, et al: Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989; 73: 284-289.
31. Hubacek JA, Pit'ha J, Skodová Z, et al: C(-260) → T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99:3218-3220.
32. Baldini M, Lohman C, Halonen M, et al: A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *E Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 976-983.
33. Unkelbach K, Gardemann A, Kostrzewa M, et al: A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 932-938.
34. Zee RY, Lindpaintner K, Struk B, et al: A prospective evaluation of the CD14 C9-260) T gene polymorphism and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 154: 699-702.
35. Jarcelainen HA, Orpana A, Perola M, et al: Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic disease. *Hepatology* 2001; 33: 1148-1153.
36. Koppelman GH, Reijmerink NE, Stine OC, et al: Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit care Med* 2001; 163: 965-969.
37. Grau AJ, Aulmann M, Lichy C, et al: Increased cytokine release by leucocytes in survivors of stroke at young age. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 999-1006.
38. Heesen M, Blömeke B, Schlüter B, et al: Lack of association between the -260 C → T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels. *Int Care Med* 2001; 27: 1770-1775.
39. Karhukorpi J, Ikäheimo I, Karvonen J, et al: Promoter region polymorphism of the CD14 gene (C-159T) is not associated with psoriasis vulgaris. *Eur J Immunogenetics* 2002; 29: 57-60.

40. Koenig W, Khuseyinova N, Hoffmann MM, et al: CD14 C(-260) →T polymorphism plasma levels of the soluble endotoxin receptor CD14, their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol** 2002; 40: 34-42.
41. Heesen M, Bloemeke B, Schade U, et al: The -260-C→T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. **Intensive Care Med** 2002; 2002; 28: 1161-1163.
42. Lichy C, Meiser H, Grond-Ginsbach C, et al: Lipopolysaccharide receptor CD14 polymorphism and risk of stroke in a south-german population. **J Neurol** 2002; 249: 821-823.
43. Gibot S, Cariou A, Drouet L, et al: Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. **Crit Care Med** 2002; 30: 969-973.
44. Karhukorpi J, Yan Y, Niemelä S, et al: Effect of CD14 promoter polymorphism and *H. pylori* infection and its clinical outcomes on circulating CD14. **Clin Exp Immunol** 2002; 128: 326-332.
45. Risley P, Jerrard-Dunne P, Sitzer M, et al. Promoter polymorphism in the endotoxin receptor (CD14) is associated with increased carotid atherosclerosis only in smokers. **Stroke** 2003; 34: 600-604.
46. Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, et al: C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction in the Ludwigshafen risk and cardiovascular health (LURIC) study. **Am J Cardiol** 2002; 90: 1249-1252.
47. Koch W, Kastrati A, Mehilli J, et al: CD14 gene -159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction. **Am Heart J** 2002; 143: 950-951.
48. Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, et al: Evaluation of the C-159T polymorphism in the german multicenter allergy study cohort. **Clin Exp Allergy** 2003; 33: 166-169.
49. Zee RYL, Bates D, Ridker PM: A prospective evaluation of the CD14 and CD18 gene polymorphisms and risk of stroke. **Stroke** 2002; 33: 892-895.
50. Longobardo MT, Cefalú AB, Pezzino F, et al: The C-260) >T gene polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is not associated with acute myocardial infarction. **Clin Exp Med** 2003; 3: 161-165.

51. Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, et al: A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic disease. **Allergy** 2004; 59: 520-525.
52. Agema WR, Wouter JJ, De Maat MP, et al: Pharmacogenetics of the CD14 endotoxin receptor polymorphism and progression of coronary atherosclerosis. **Thromb Haemost** 2004; 91: 986-990.
53. Shimada K, Watanabe Y, Mokuno H, et al: Common polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. **Am J Cardiol** 2000; 86: 682-684.
54. Ito D, Murata M, Tanahashi N, et al: Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. **Stroke** 2000; 31: 2661-2664.
55. Yoon HJ, Shin JH, Yang SH, et al: Association of the CD14 gene – 159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. **J Med Genet** 2003; 40: 104-108.
56. Eng HL, Chen CH, Kuo CC, et al: Association of CD14 promoter gene polymorphism and *Chlamydia pneumoniae* infection. **J Infect Dis** 2003; 188: 90-97.
57. Hohda S, Kimura A, Sasaoka T, et al: Association study of CD14 polymorphism with myocardial infarction in a Japanese population. **Jpn Heart J** 2003; 44: 613-622.
58. Leung TF, Tang NLS, Sung YM, et al: The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. **Pediatr Allergy Immunol** 2003; 14: 255-260.
59. Nishimura S, Zaitsumi M, Hara M, et al: A polymorphism in the promoter of the CD14 gene (CD14/-159) is associated with the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. **J Pediatr** 2003; 143: 357-362.
60. Shimada K, Miyauchi K, Mokuno H, et al: Promoter polymorphism in the CD14 gene and concentration of soluble CD14 in patients with in-stent restenosis after elective coronary stenting. **Int J Cardiol** 2004; 94: 87-92.
61. Bairoch A. The ENZYME database in 2000. **Nucleic Acids Res** 28:304-305.
62. Erdos EG: Angiotensin I - Converting Enzyme and the changes in our concepts through the years. **Hypertension** 1990; 16: 363-370.
63. Kem DC; Brown RD: Renin-from beginning to end. **N Engl J Med** 1990; 323: 1136-1137.

64. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al: An Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
65. Martínez E, Puras A, Escribano J, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 2000; 14:131-135.
66. Qu H, Lu Y, Lin S: Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001; 35:408-411.
67. Kimura M, Yokota M, Fujimura T, et al : Association of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with left-ventricular hypertrophy in Japanese women with essential hypertension; multicenter study of 1.919 subjects. *Cardiology* 1997; 88:309-314.
68. Gardemann A, Fink M, Stricker J, et al: ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1998; 139:153-159.
69. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, et al: Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. *J Hypertens* 1999; 17:1569-1575.
70. Montgomery H, Brull D, Humphries SE: Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital Heart J* 2002; 3:10-14.
71. Taittinen L, Uhari M, Kontula K, et al: Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens* 1999; 12:858-866.
72. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, et al: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97:1766-1772.
73. Sugiyama T, Morita H, Kato N, et al: Lack of Sex-specific effects on the association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens Res* 1999; 22: 55-59.

74. Zaman MM, Yoshiike N, Date C, et al: Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study. **J Hypertens** 2001; 19: 47-53.
75. Fujimura T, Yokota M, Kato S, et al: Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. **Am J Hypertens** 1997; 10: 1384-1390.
76. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, et al: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1999; 19: 1969-1974.
77. Poirier O, Georges JL, Ricard S, et al : New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. **J Hypertens** 1998; 16: 1443-1447.
78. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, et al: Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. **Circulation** 1999; 99: 340-343.
79. Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. **Eur Heart J** 1999; 20: 1318-1325.
80. Renner W, Pabst E, Paulweber B, et al : The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. **Atherosclerosis** 2002; 165: 175-178.
81. Poch E, La Sierra Ad A, Gonzáles-Nuñez D, et al : Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. **Med Clin (Barc)** 2002; 118: 575-579.
82. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, et al: A Meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with miocardial infarction. **Circulation** 1996; 94:708-712.
83. Agerholm-Larsen B, Noderstaggard BG, Steffensen R, et al: ACE gene polymorphism-ischemic heart disease and longevity in 10150 individuals: a case-referent and retrospective cohort study based on the Copehagen City Heart Study. **Circulation** 1997; 95: 2358-2367.
84. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) alleles in the Quechua, a high altitude South American native population. **Ann Hum Biol** 1999; 26: 375-380.

85. Lee EJ. Population genetics of the angiotensin-converting enzyme in Chinese. *Br J Clin Pharmacol.* 1994; 37:212-214.
86. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation.* 1994; 90:2199-2202.
87. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Kakai K, Syo T, Musya T, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene associates with increased risk for ischemic heart diseases in the Japanese. *Rinsho Byori.* 1995; 43:347-352.
88. Takahashi K, Nakamura H, Kubota I, Takahashi N, Tomoike H. Association of ACE gene polymorphisms with coronary artery disease in a northern area of Japan. *JPN Heart J.* 1995; 36:557-564.
89. Yorioka T, Suehiro T, Yasuoka N, Hashimoto K, Kawada M. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and clinical aspects of IgA nephropathy. *Clin Nephrol.* 1995; 44:80-85.
90. Chiang FT, Chern TH, Lai ZP, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, Tseng YZ. Age- and gender-dependent association of the angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension in a Chinese population. *J Hum Hypertens.* 1996; 10:823-826.
91. Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Matsuo T, Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation.* 1996; 93:1630-1633.
92. Maeda Y, Ikeda U, Ebata H, Hojo Y, Seino Y, Hayashi Y, Kuroki S, Shimada K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive individuals with parental history of stroke. *Stroke.* 1996; 27:1521-1523.
93. Sasaki M, Oki T, Iuchi A, Tabata T, Yamada H, Manabe K, Fukuda K, Abe M, Ito S. Relationship between the angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the effects of enalapril on left ventricular hypertrophy and impaired diastolic filling in essential hypertension: M-mode and pulsed Doppler echocardiographic studies. *J Hypertens.* 1996; 14:1403-1408.
94. Jeng JR, Harn HJ, Jeng CY, Yuek KC, Shieh SM. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in Chinese patients with hypertension. *Am J Hypertens.* 1997; 10:558-561.
95. Kimura M, Yokota M, Fujimura T, Kato S, Hirayama H, Tsunekawa A, Maeda M, Inagaki H, Ogawa S, Nakashima N, Yamada Y. Association of a

- deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with left-ventricular hypertrophy in Japanese women with essential hypertension; multicenter study of 1.919 subjects. *Cardiology*. 1997; 88:309-314.
96. Ohmichi N, Iwai N, Uchida Y, Shichiri G, Nakamura Y, Kinoshita M. Relationship between the response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. *Am J Hypertens*. 1997; 10:951-955.
97. Chuang LM, Chiu KC, Chiang FT, Lee KC, Wu HP, Lin BJ, Tai TY. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene in patients with hypertension, non-insulin-dependent diabetes mellitus, and coronary heart disease in Taiwan. *Metabolism*. 1997; 46:1211-1214.
98. Qiu C, Liu Y, Hu A, Guo Z, Song C. Deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene associated with essential hypertension in Hans Chinese population. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 1998; 20:133-137.
99. Zhu M, Xia Y, Cheng W. Study on a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1998; 33:86-95.
100. Nakano Y, Oshima T, Higara H, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M. DD genotype of the angiotensin I-converting enzyme gene is a risk factor for early onset of essential hypertension in Japanese patients. *J Lab Clin Med*. 1998; 131:502-506.
101. Liu Y, Qiu C, Zhou W, Zheng Y, Hou S, Cao J. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in essential hypertension. *Chin Med J (Eng)*. 1999; 112:115-120.
102. Takezako T, Sku K, Zhang B, Ou J, Bai H, Imai K, Jimi S, Shirai K, Arakawa K. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in patients with angina pectoris. *Am J Hypertens*. 1999; 12:291-297.
103. Liu Q, Lei H, Wang X. The relationship of angiotensin-converting enzyme gene to essential hypertension and drug treatment in Chongqing. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2000; 17:340-342.
104. Jeng JR. Carotid thickening, cardiac hypertrophy, and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 2000; 13:111-119.

105. Zhang J, Zhao B, Gesongluobu, Sun Y, Wu Y, Pey W, Ye J, Hui R, Liu L. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion (I/D) polymorphism in hypertensive patients with different degrees of obstructive sleep apnea. **Hypertens Res.** 2000; 23:407-411.
106. Wu H, Qu S, Huang Q, Deng J, Zhang Y, Li J. Polymorphism of ACE gene and its relationship with serum ACE activity in the Hans in Chengdu region. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.** 2000; 31:169-170,179.
107. Yoshida K, Ishigami T, Nakazawa I, Ohno A, Tamura K, Fukuoka M, Mizushima S, Umemura S. Association of essential hypertension in elderly Japanese with I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. **J Hum Genet.** 2000; 45:294-298.
108. Nakahara K, Matsushita S, Matsuoka H, Inamatsu T, Nishinaga M, Yonawa M, Aono T, Arai T, Ezaki Y, orimo H. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene affects heart weight. **Circulation.** 2000; 101:148-151.
109. Kanazawa H, Okamoto T, Hirata K, Yoshikawa J. Deletion polymorphisms in the angiotensin converting enzyme gene are associated with pulmonary hypertension evoked by exercise challenge in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit care Med.** 2000; 162:1235-1238.
110. Uemura K, Nakura J, Kohara K, Miki T. Association of ACE I/D polymorphism with cardiovascular risk factors. **Hum Genet.** 2000; 107:239-242.
111. Qu H, Lu Y, Lin S. Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.**2001; 35:408-411.
112. Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley JA. Renin-angiotensin system gene polymorphism, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** 2001; 24:356-361.
113. Huang Y, Liao B, Sun X. Study on the relation between the angiotensin converting enzyme gene and pregnancy induced hypertension. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.** 2001; 36:15-17.
114. Thomas GN, Critchley JÁ, Tomlinson B, Lee ZS, Young RP, Cockran CS, Chan JC. Albuminuria and the renin-angiotensin system gene



- polymorphisms in type-2-diabetic and in normoglycemic hypertensive Chinese. *Clin Nephrol.* 2001; 55:7-15.
115. Khan H, Akhteruzzaman S. Association between Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Hypertension in Selected Individuals of the Bangladeshi Population. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35:251-254.
  116. Lee YJ, Tsai JC. ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism Associated With 1998 World Health Organization Definition Metabolic Syndrome in Chinese Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care.* 2002; 25:1002-1008.
  117. Zhou L, Xue YM, Luo R, Gao F. Association of insertion/deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene with hypertensive type 2 diabetes mellitus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2002; 22:808-810.
  118. Gesang L, Liu G, Cen W, Qiu C, Zhuoma C, Zhuang L, Ren D, Pincuo Z, Chan Y. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and its association with essential hypertension in a Tibetan population. *Hypertens Res.* 2002; 25:481-485.
  119. Okura Y, Hayashi K, Shingu T, Kuga Y, Nomura S, Kajiyama G, Nakashima Y, Saku K. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype is associated with the activities of plasma coagulation factor VII and X independent of triglyceride metabolism. *Coron Artery Dis.* 2003; 14:285-291.
  120. Morris BJ, Zee RY, Schrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest.* 1994; 94:1085-1089.
  121. Ruiz J, Blanché H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, Passa P, Froguel P. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:3662-3665.
  122. Leatham E, Barley J, Redwood S, Hussein W, Carter N, Jeffery S, Bath PM, Camm A. Angiotensin-1 converting enzyme (ACE) polymorphism in patients presenting with myocardial infarction or unstable angina. *J Hum Hypertens.* 1994; 8:635-638.
  123. Pujia A, Gnasso A, Irace C, Dominijanni A, Zingone A, Perroti N, Colonna A, Mattioli PL. Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic subjects. *J Hum Hypertens.* 1994; 8:687-691.

124. Prasad N, O'Kane KP, Johnstone HÁ, Wheeldon NM, McMahon AD, Webb Dj, MacDonald TM. The relationship between blood pressure and left ventricular mass in essential hypertension is observed only in the presence of the angiotensin-converting enzyme gene deletion allele. *QJM*. 1994; 87:659-662.
125. Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hooper R, Dickerson JE, Brown MJ. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens*. 1995; 13:1602-1609.
126. Missouris CG, Barley J, Jeffery S, Carter ND, Singer DR, MacGregor GA. Genetic risk for renal artery stenosis: association with deletion polymorphism in angiotensin 1-converting enzyme gene. *Kidney Int*. 1996; 49:534-537.
127. Dieguez-Lucena JL, Aranda-Lara P, Ruiz-Galdón M, García-Villanova J, Morell-Ocaña M, Reyes-Engel A. Angiotensin I-converting enzyme genotypes and angiotensin II receptors. Response to therapy. *Hypertension*. 1996; 28:98-103.
128. Kauma H, Päivänsalo M, Savolainen MJ, Rantala AO, Kiema TR, Lilja M, Reunanen A, Kesäniemi YA. Association between angiotensin converting enzyme gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *J Hypertens*. 1996; 14:1183-1187.
129. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation*. 1996; 94:698-703.
130. Pontremoli R, Sofia A, Tirota A, Ravera M, Nicoletta C, Viazzi F, Bezante GP, Borgia L, Bobola N, Ravazzolo R, Sacchi G, Deferrari G. The deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7:2550-2558.
131. Gharavi AG, Lipkowitz MS, Diamond JÁ, Jhang JS, Phillips RA. Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is independently associated with left ventricular mass and geometric remodeling in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1996; 77:1315-1319.

132. Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension*. 1996; 27:62-66.
133. Barnas U, Schimidt A, Illievich A, Kiener HP, Rabensteiner D, Kaider A, Prager R, Abrahamian H, Irsigler K, Mayer G. Evaluation of risk factors for the development of nephropathy in patients with IDDM: insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism, hypertension and metabolic control. *Diabetologia*. 1997; 40:327-331.
134. Perticone F, Ceravolo R, Cosco C, Trapasso M, Zingone A, Malatesta P, Perroti N, Tramontano D, Mattioli PL. Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy in southern Italian patients. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29:365-369.
135. Jeng JR, Harn HJ, Jeng CY, Yueh KC, Shien SM. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in Chinese patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 1997; 10:519-524.
136. Clarckson PB, Prasad N, MacLeod C, Burchell B, MacDonald TM. Influence of the angiotensin converting enzyme I/D gene polymorphisms on left ventricular diastolic filling in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1997; 15:995-1000.
137. Moiseev VS, Demurov LM, Kobalava ZhD, Chistiakov DA, Tereshchenko SN, Kondrat'ev Ialu, Korovina EA, Nosikov VV. The polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in patients with hypertension, left ventricular hypertrophy and the development of a myocardial infarct at a young age. Preliminary report. *Ter Arkh*. 1997; 69:18-23.
138. Gardemann A, Fink M, Stricker J, Nguyen Q, Humme J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein F, Rau M, Haberbosch W. ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis*. 1998; 139:153-159.
139. Pfohl M, Fetter M, Koch M, Barth CM, Rudiger W, Haring HU. Association between angiotensin I-converting enzyme genotypes, extracranial artery stenosis, and stroke. *Atherosclerosis*. 1998; 140:161-166.
140. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, Rivera F, Revert L. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int*. 1998; 53:1743-1747.
141. Chrostowska M, Narkiewicz K, Bigda J, Winnicki M, Pawlowski R, Rossi GP, Krupa-Wojciechowska B. Ambulatory systolic blood pressure is related

- to the deletion allele of the angiotensin I converting enzyme gene in young normotensives with parental history of hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 1998; 20:283-294.
142. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998; 97:1766-1772.
143. Pavlovic M, Holl RW, Haeberle U, Schwarz K, Heinze E, Debatin KM, Lang D. Angiotensin I converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms related to 24-h blood pressure in paediatric type I diabetes mellitus. *Eur J Pediatr*. 1999; 158:18-23.
144. Stokes GS, Monaghan JC, Schrader AP, Glenn CL, Ryan M, Morris BJ. Influence of angiotensin converting enzyme (ACE) genotype on interpretation of diagnostic tests for serum ACE activity. *Aust N Z J Med*. 1999; 29:315-318.
145. Perez-oller L, Torra R, Badenas C, Mila M, Darnell A. Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 1999; 34:273-278.
146. Taittinen L, Uhari M, Kontula K, Kainulainen K, Miettinen H, Turtinen J, Nuutinen M. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens*. 1999; 12:858-866.
147. Marre M, Bouhanick B, Berrut G, Gallois Y, Le Jeune JJ, Chatellier G, Menard J, Alhenc-Gelas F. Renal changes on hyperglycemia and angiotensin-converting enzyme in type 1 diabetes. *Hypertension*. 1999; 33:775-780.
148. Danser AH, Deinum J, Osterop AP, Admiraal PJ, Schalekamp MA. Angiotensin I to angiotensin II conversion in the human forearm and leg. Effect the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *J Hypertens*. 1999; 17:1867-1872.
149. Van Dijk MA, Peters DJ, Breuning MH, Chang PC. The angiotensin-converting enzyme genotype and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:1916-1920.
150. Van Suylen RJ, Wouters EF, Pennings HJ, Cheriex EC, Van Pol PE, Ambergen AW, Vermeli AM, Daemen MJ. The DD genotype of the

- angiotensin converting enzyme gene is negatively associated with right ventricular hypertrophy in male patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159:1791-1795.
151. Celentano A, Mancini FP, Crivaro M, Palmieri V, Ferrara LA, De Stefano V, Di Minno G, de Simone G. Cardiovascular risk factors, angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism, and left ventricular mass in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1999; 83: 1196-1200.
152. Olivieri O, Trabetti E, Grazioli S, Stranieri C, Friso S, Girelli D, Russo C, Pignatti PF, Mansur G, Corrocher R. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and atheromatous renal artery stenosis. *Hypertension*. 1999; 34:1097-1100.
153. Perticone F, Maio R, Cosco C, Ceravolo R, Iacopino S, Chello M, Mastroberto P, Tramontano D, Mattioli PL. Hypertensive left ventricular remodeling and ACE-gene polymorphism. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:192-199.
154. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, Melander O, Bog-Hansen E, Ranstam J, Rastam L, Groop L. Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. *J Hypertens*. 1999; 17:1569-1575.
155. Estacio RO, Jeffers BW, Havranek EP, Krick D, Raynolds M, Schrier RW. Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene is associated with an increase in left ventricular mass in men with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens*. 1999; 12:637-642.
156. Naber CK, Husing J, Wolfhard U, Erbel R, Siffert W. Interaction of the ACE D allele and the GNB3 825T allele in myocardial infarction. *Hypertension*. 2000; 36:986-989.
157. De Padua MA, Annicchino-Bizzacchi J, Favarato D, Avakian SD, Machado César LA, Franchini Ramires JA. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2000; 85:1089-1093.
158. Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M, División JÁ, Massó J, Vidal A, Fernández JÁ . Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens*. 2000; 14:131-135.

159. Hernandez D, Lacalzada J, Salido E, Linares J, Barragan A, Lorenzo V, Higuera L, Martin L, Rodriguez A, Laynez I, Gonzalez-Posada JM, Torres A. Regression of left ventricular hypertrophy by lisinopril after renal transplantation role of ACE gene polymorphism. *Kidney Int.* 2000; 58:889-897.
160. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, DE la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35:512-517.
161. Redon J, Chaves FJ, Liao Y, Pascual JM, Rovira E, Armengod ME, Cooper RS. Influence of the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene on the outcome of microalbuminuria in essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35:490-495.
162. Syrjanen J, Huang XH, Mustonen J, Koivula T, Lehtimaki T, Pasternack A. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and prognosis IgA nephropathy. *Nephron.* 2000; 86:115-121.
163. Van Ittersum FJ, de Man AM, Thijssen S, de Knijff P, Slagboom E, Smulders Y, Tarnow L, Donker AJ, Bilo HJ, Stehouwer CD. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and complications of insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15:1000-1007.
164. Keramatipour M, McConnel RS, Kirkpatrick P, Tebbs S, Furlong RA, Rubinsztein DC. The ACE I allele is associated with increased risk for ruptured intracranial aneurysms. *J Med Genet.* 2000; 37:498-500.
165. Losito A, Selvi A, Jeffery S, Afzal AR, Parente B, Cao PG. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and carotid artery disease in renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2000; 13:128-33.
166. Davis GK, Millner RW, Roberts DH. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene expression in the human left ventricle: effect of ACE gene insertion/deletion polymorphism and left ventricular function. *Eur J Heart Fail.* 2000; 2:253-256.
167. Stefansson B, Ricksten A, Rymo L, Aurell M, Herlitz H. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in malignant hypertension. *Blood Press.* 2000; 9:104-109.
168. Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Cabrini G, Bonizzato A, Graziani M, Anker S, Coats A, Zardini P. Failure of Aldosterone Suppression Despite Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)

- Inhibitor Administration in Chronic Heart Failure Is Associated With ACE DD Genotype. *J Am C Card*;2001; 37:1808-1812.
169. Filler G, Yang F, Martin A, Stolpe J, Neumayer HH, Hocher B. Renin angiotensin system gene polymorphisms in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2001-5:166-173.
170. Poch E, Gonzáles D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de La Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension*. 2001; 38:1204-1209.
171. Barceló A, Elorza MA, Barbé F, Santos C, Mayoralas LR, Agusti AG. Angiotensin converting enzyme in patients with sleep apnoea syndrome: plasma activity and gene polymorphisms. *Eur Respir J*. 2001; 17:728-732.
172. Julve R, Chaves FJ, Rovira E, Pascual JM, Miralles A, Armengod ME, Redon J. Polymorphism insertion/deletion of the ACE gene and ambulatory blood pressure circadian variability in essential hypertension. *Blood Press Monit*. 2001; 6:27-32.
173. Arcaro G, Solini A, Monauni T, Cretti A, Brunato B, Lechi A, Fellin R, caputo M, Cocco C, Bonora E, Muggeo M, Bonadonna RC. ACE genotype and endothelium-dependent vasodilation of conduit arteries and forearm microcirculation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1313-1319.
174. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Chmara E, Mrozikiewicz A. Polymorphism of gene angiotensin converting enzyme in pregnancy induced hypertension. *Ginekol Pol*. 2001; 72:605-610.
175. Lovati E, Richard A, Frey BM, Frey FJ, Ferrari P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2001; 60:46-54.
176. Dengel DR, Brown MD, Ferrel RE, Supiano MA. Role of angiotensin converting enzyme genotype in sodium sensitivity in older hypertensives. *Am J Hypertens*. 2001; 14:1178-1184.
177. Jalil JE, Córdova S, Ocaranza M, Schumacher E, Braun S, Chamorro G, Fardella C, Lavandero S. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and adrenergic response to exercise in hypertensive patients. *Med Sci Monit*. 2002; 8:556-571.
178. Sierra C, Coca A, Gómez-Angelats E, Poch E, Sobrino J, de la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and cerebral white matter lesions in essential hypertension. *Hypertension*. 2002; 39:343-347.

179. Montgomery H, Brull D, Humphries SE. Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. ***Ital Heart J.*** 2002; 3:10-14.
180. Mayer NJ, Forsyth A, Kantachuvesiri S, Mullins JJ, Fleming S. Association of the D allele of the angiotensin I converting enzyme polymorphism with malignant vascular injury. ***Mol Pathol.*** 2002; 55:29-33.
181. Gensini F, Padaletti L, Fatini C, Sticchi E, Gensini GF, Michelucci A. Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with atrial fibrillation. ***Pacing Clin Electrophysiol.*** 2003;26:295-298.
182. Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Prisco D, Fedi S, Brunelli T, Marcucci R, Conti AA, Gensini GF, Abbate R. ACE DD genotype: an independent predisposition factor to venous thromboembolism. ***Eur J Clin Invest.*** 2003;33:642-647.
183. Zak I, Niemiec P, Sarecka B, Balcerzyk A, Ciemniowski Z, Rudowska E, Dylag S. Carrier-state of D allele in ACE insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C677T transition in the MTHFR gene. ***Acta Biochim Pol.*** 2003; 50(2):527-534.
184. Akar N, Aras O, Omürlü K, Cin S. Deletion polymorphism at the angiotensin-converting enzyme gene in Turkish patients with coronary artery disease. ***Scand J Clin Lab Invest.*** 1998; 58:491-495.
185. Oren I, Brook JG, Gershoni-Baruch R, Kepten I, Tamir A, Linn S, Wolfovitz E. The D allele of the angiotensin-converting enzyme gene contributes towards blood LDL-cholesterol levels and the presence of hypertension. ***Atherosclerosis.*** 1999; 145:267-271.
186. Bedir A, Arik N, Kiliç K, Gümüş T, Güner E. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. ***Am J Hypertens.*** 1999; 12:1038-43.
187. Ozen S, Alikasifoglu M, Saatci U, Bakkaloglu A, Besbas N, Kara N, Kocak H, Erbas B, Unsal I, Tuncbilek. Implications of certain genetic polymorphisms in scarring in vesicoureteric reflux: importance of ACE polymorphism. ***Am Kidney Dis.*** 1999; 34:140-145.
188. Makris TK, Stavroulakis GA, Dafni UG, Gialeraki AE, Krespi PG, Hatzizacharias NA, Tsoukal CG, Vythoulkas JS, Kyriakidis MK. ACE/DD genotype is associated with hemostasis balance disturbances reflecting



- hypercoagulability and endothelial dysfunction in patients with untreated hypertension. *Am Heart J*. 2000; 140:760-765.
189. Rutledge DR, Kubilis P, Browe CS, Ross EA. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene in essential hypertensive patients. *Biochem Mol Bio Int*. 1995; 35:661-668.
190. Forrester T, McFarlane-Anderson N, Bennet FI, Wilks R, Cooper R, Rotimi C, Morrison L, Ward R. The angiotensin converting enzyme and blood pressure in Jamaicans. *Am J Hypertens*. 1997; 10:519-524.
191. Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T. ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens*. 1997; 11:107-111.
192. Tassioulas IO, Aksentijevich I, Salmon JE, Kim Y, Yarboro CH, Vaughan EM, Davis JC, Scott DL, Austin HA, Klippel JH, Balow JE, Gourley MF, Boumpas DT. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: decreased prevalence of DD genotype in African American patients. *Clin Nephrol*. 1998; 20:283-294.
193. Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogiwara T Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 191:399-404.
194. Kojima S, Inenaga T, Matsuoka H, Kuramochi M, Omae T, Nara Y, Yamori Y. The association between salt sensitivity of blood pressure and some polymorphic factors. *J Hypertens*. 1994; 12:797-801.
195. Jian M, Cao X, Huang J, Qi J, Liu G, Wang J, Bai D, Qiao D, Zhao JF, Feng S Liu L. Polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene in the older Chinese: linked to ambulatory blood pressure levels and circadian blood pressure rhythm. *Int J Cardiol*. 1996; 55:33-40.
196. Chiang FT, Lai ZP, Chern TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, Tseng YZ. Lack of association of angiotensin converting enzyme polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens*. 1997; 10:197-201.
197. Jeng JR, Shieh SM, Harn HJ, Lee MM, Sheu WH, Jeng CY. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in patients with hypertension. *J Hypertens*. 1997; 15:963-968.

198. Fujimura T, Yokota M, Kato S, Hiravama H, Tsunekawa A, Inagaki H, Takatsu F, Nakashima N, Yamada Y. Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens*. 1997; 10:1384-1390.
199. Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Lack of association of polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and angiotensinogen genes with nonfamilial hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Am J Hypertens*. 1997; 10:921-928.
200. Nagahara T, Ishigami T, Sano T, Ikeda Y, Hibi K, Uneda S, Umemura S, Ishii M. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Jpn Heart J*. 1997; 38:821-830.
201. Chowdhury AH, Zaman MM, Haque KM, Rouf MA, Shah AT, Nakayama T, Yokoyama T, Yoshiike N, Tanaka H. Association of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism with hypertension in a Bangladeshi population. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 1998; 24:55-59.
202. Shen D, Ha D. The relationship between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and brain infarction in Chinese hypertensives. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1998; 15:136-138.
203. Jeng JR, Harn HJ, Yuek KC, Shieh SM. Plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 1998; 11:235-239.
204. Tan H, Zhang G, Huang C, Zhu K, Pan Q. Angiotensin 1-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in patients with coronary artery disease and essential hypertension and its nucleotide sequence. *Zhonghua Ye Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1999; 16:145-148.
205. Sugiyama T, Morita H, Kato N, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of Sex-specific effects on the association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens Res*. 1999; 22:55-59.
206. Thomas GN, Young RP, Tomlinson B, Woo KS, Sanderson JE, Critchley JA. Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and hypertension in Hong Kong Chinese. *Clin Exp Hypertens*. 2000; 22:87-97.
207. Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T. Gene polymorphism of the renin-

- angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am. J Hypertens*. 2000; 13:121-127.
208. Lee KB, Kim UK, Lee CC. Association of the gene polymorphism with the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Korean Med Sci*. 2000; 15:431-435.
209. Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critchley JA. Renin-angiotensin system gene polymorphism, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24:356-361.
210. Mannami T, Katsuya T, Baba S, Inamoto N, Ishikawa K, Higaki J, Ogihara T, Ogata J. Low potentiality of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism as a useful predictive marker for carotid atherogenesis in a large general population of a Japanese city: the Suita study. *Stroke*. 2001; 32:1250-1256.
211. Zaman MM, Yoshiike N, Date C, Yokoyama T, Matsumura Y, Ikemoto S, Tanaka H. Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study. *J Hypertens*. 2001; 19:47-53.
212. Katsuya T, Iwashima Y, Sugimoto K, Motone M, Asai T, Fukuda M, Fu Y, Hatanaka Y, Ohis M, Rakugi H, Higaki J, Ogihara T. Effects of antihypertensive drugs and gene variants in the renin-angiotensin system. *Hypertens Res*. 2001; 24:463-467.
213. Chen A, Zhang W, Tang X, Li Z, Lu Q, Qian X. The relationship of aldosterone synthase gene polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2002; 41:298-301.
214. Deng J, Zhou Y, Huang D, Yue J, Wang Y, Zhang X, Xie D. Relation between coronary artery disease and polymorphism of angiotensin converting enzyme gene. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2002; 19:105-107.
215. Uhm WS, Lee HS, Chung YH, Kim TH, Bae SC, Joo KB, Kim TY, Yoo DH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and vascular manifestations in Korean patients with SLE. *Lupus*. 2002; 11:227-233.
216. Wang XF, Wang SZ, Lin RY, Cheng ZH, Ding JB, Jia ML, Wen H, Wu GZ, Lu XM. Relationship of I/D polymorphism of angiotensin converting enzyme gene with hypertension in Xinjiang Kazakh isolated group. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2003;20:253-255.

217. Hong S, Yang H, Yoo M, In C, Yim S, Jin S, Choe B, Chung J. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Korean patients with primary knee osteoarthritis. *Experimental and Molecular Medicine*. 2003; 35: 189-195.
218. Schimidt S, Van Hooft IM, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens*. 1993; 11:345-348.
219. Gu XX, Spaepen M, Guo C, Fagard R, Amery A, Lijnen P, Cassiman JJ. Lack of association between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens*. 1994; 8:683-685.
220. Doria A, Warran JH, Krolewski AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of the angiotensin I-converting enzyme gene. *Diabetes*. 1994; 43:690-695.
221. Ueda S, Weir CJ, Inglis GC, Murray GD, Muir KW, Lees KR. Lack of association between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and stroke. *J Hypertens*. 1995; 13:1597-1601.
222. Dessi-Fulgheri P, Catalini R, Sarzani R, Sturbini S, Siragusa N, Guazzarotti F, Offidani M, Tamburrini P, Zingaretti O, Rappelli A . Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and carotid atherosclerosis in a low-risk population. *J Hypertens*. 1995; 13:1593-1596.
223. Johnson AG, Simons LA, Friedlander Y, Simons J, Davis DR, MaCallun J. I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene does not predict isolated systolic or systolic-diastolic hypertension in the elderly. *J Hum Hypertens*. 1996; 10:167-169.
224. Zee RY, Schrader AP, Morris BJ. Effect of angiotensin-converting enzyme genotype on renin-angiotensin components in hypertensives. *Clin Chim Acta*. 1996; 252:33-39.
225. Dudley C, Keavney B, Casadei B, Conway J, Bird R, Ratcliffe P. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. *J Hypertens*. 1996; 14:259-262.
226. Popov V, Fomicheva E, Kovalev J, Schwartz E. Absence of association between the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and

- borderline hypertension in men of St Petersburg, Russia. *J Hum Hypertens*. 1996; 10:557-559.
227. Pei Y, Scholey J, Thai K, Suzuki M, Cattran D. Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in Caucasian patients. *J Clin Invest*. 1997; 100:814-820.
228. Frost D, Pfohl M, Clemens P, Häring HU, Beischer W. Evaluation of the insertion/deletion ACE gene polymorphism as a risk for carotid artery intima-media thickening and hypertension in young type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1998; 21:836-840.
229. Pfohl M, Frost D, Koch M, Clemens P, Patzies A, Schmölling RM, Beischer W, Häring HU. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and diabetic nephropathy in IDDM patients. *Horm Metab Res*. 1998; 30:276-280.
230. Wesolowska E, Marcil M, Lussier-Cacan S, Davignon J, Latour Y, Genest J. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism in French Canadian subjects with premature coronary artery disease. *Pathol Biol (Paris)*. 1998; 46:295-300.
231. Espinosa JS, Rueda E, Muñoz E, Montiel A, Martínez S, Diéguez JL, Rius F, Reyes A, de Teresa E. Association between myocardial infarction and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in young patients. *Med Clin (Barc)*. 1998; 110:488-491.
232. Kauma H, Ikäheimo M, Savolainen MJ, Kierna TR, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesäniemi YA. Variants of renin-angiotensin system genes and echocardiographic left ventricular mass. *Eur Heart J*. 1998; 19:1109-1117.
233. Aalto-Setälä K, Palomaki H, Miettinen H, Vuorio A, Kuusi T, Raininko R, Salonen O, Kaste M, Kontula K. Genetic risk factors and ischaemic cerebrovascular disease: role of common variation of the genes encoding apolipoproteins and angiotensin-converting enzyme. *Ann Med*. 1998; 30:224-233.
234. Girerd X, Hanon O, Mourad JJ, Boutouyrie P, Laurent S, Jeunemaitre X. Lack of association between renin-angiotensin system, gene polymorphisms, and wall thickness of the radial and carotid arteries. *Hypertension*. 1998; 32:579-583.
235. Poirier O, Georges JL, Ricard S, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F, Tiret L. New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood

pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde. **J Hypertens.** 1998; 16:1443-1447.

236. Amoroso A, Danek G, Vatta S, Crovella S, Berrino M, Guarrera S, Fasano ME, Mazzola G, Amore A, Gianoglio B, Peruzzi L, Coppo R. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and severity of renal disease in Henoch-Schoenlein patients. Italian Group of Renal Immunopathology. **Nephrol Dial Transplant.** 1998; 13:3184-3188.
237. Arca M, Panniteri G, Campagna F, Candeloro A, Montali A, Cantini R, Seccareccia F, Campa PP, Marino B, Ricci G. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is not associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction in a sample of Italian patients. **Eur J Clin Invest.** 1998; 28:485-490.
238. Margaglione M, Cappucci G, d'Addetta M, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Mascolo G, Grandone E, Di Minno G. PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants. **Arterioscler Thromb Vasc Bio.** 1998; 18:562-567.
239. Vask A, Soucek M, Znojil V, Riháček I, Tschöplová S, Strelcová L, Cídl K, Blazková M, Hájek D, Hollá L, Vácha J. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. **Kidney Int.** 1998; 53:1479-1482.
240. Jacobi J, Hilgers KF, Schlaich MP, Siffert W, Schmieder RE. 825T allele of the G-protein beta3 subunit gene (GNB3) is associated with impaired left ventricular diastolic filling in essential hypertension. **J Hypertens.** 1999; 17: 1467-1462.
241. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, Thompson PL, Beilby JP. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1999; 19:1969-1974.
242. Pfohl M, Koch M, Prescod S, Haase KK, Häring HU, Karsch KR. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. **Eur Heart J.** 1999; 20:1318-1325.
243. Jalil JE, Piddo AM, Cordova S, Chamorro G, Braun S, Jalil R, Veja J, Jadue'P L, Lavandero S, Lastra P. Prevalence of the angiotensin I converting enzyme insertion/deletion polymorphism, plasma angiotensin

- converting enzyme activity, and left ventricular mass in a normotensive Chilean population. *Am J Hypertens*. 1999; 12:697-704.
244. Jacobsen P, Rossing K, Tarnow L, Rossing P, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy in normotensive type 1 diabetic patients. *Kidney Int Suppl*. 1999; 71:101-105.
245. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, de la Sierra A, Revert L, Rivera F, Darnell A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. *Med Clin (Barc)*. 1999; 112.
246. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, Hennekens CH, Lindpainter K. Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation*. 1999; 99:340-343.
247. Tonolo G, Melis MG, Secchi G, Atzeni MM, Angius MF, Carboni A, Ciccarese M, Malavasi A, Maioli M. Association of Trp64Arg beta 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J Hypertens*. 1999; 17:33-38.
248. Stratta P, Canavese C, Ciccone G, Barolo S, Dall'omo AM, Fasano ME, Mazzola G, Berutti S, Fop F, Curtioni ES, Piccoli G. Angiotensin I-converting enzyme genotype significantly affects progression of IgA glomerulonephritis in an Italian population. *Am J Kidney Dis*. 1999; 33:1071-1079.
249. Clark CJ, Davies E, Anderson NH, Farmer R, Friel EC, Fraser R, Connell JM. Alpha-adducin and angiotensin I-converting enzyme polymorphisms in essential hypertension. *Hypertension*. 2000; 36:990-994.
250. Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M, División JÁ, Massó J, Vidal A, Fernández JÁ. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens*. 2000; 14:131-135.
251. Gomez-Angelats E, de la Sierra A, Enjuto M, Sierra C, Oriola J, Francino A, Paré JC, Poch E, Coca A. Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000; 14:47-49.
252. Gonzalez Ordonez AJ, Fernandez Carreira JM, Medina Rodriguez JM, Martin Sanchez L, Alvarez Diaz R, Alvarez Martinez MV, Coto Garcia E. Risk of venous thromboembolism associated with the insertion/deletion

- polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 2000; 11:485-490.
253. Lopez\_Contreras J, Blanco\_Vaca F, Borrás X, Carreras F, Pons\_Llado G, Gallego F, Sole MJ, Cirera S, Benet MT, Negro E, Roca\_Cusachs A. Usefulness of the I/D angiotensin-converting enzyme genotype for detecting the risk of left ventricular hypertrophy in pharmacologically treated hypertensive men. **J Hum Hypertens**. 2000; 14:327-331.
254. Ylitalo A, Airaksinen KE, Hautanen A, Kupari M, Carson M, Virolainen J, Savolainen M, Kau H, Kesaniemi YA, White PC, Huikuri HV. Baroreflex sensitivity and variants of the renin angiotensin system genes. **J Am Coll Cardiol**. 2000; 35:194-200.
255. Van Dijk MA, Breuning MH, Peters DJ, Chang PC. The ACE insertion/deletion polymorphism has no influence on progression of renal function loss in autosomal dominant polycystic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**. 2000; 15:836-839.
256. Wierzbick AS, Lambert\_Hamill M, Lumb PJ, Crook MA. Renin-angiotensin system polymorphisms and coronary events in familial hypercholesterolemia. **Hypertension**. 2000; 36:808-812.
257. Aucella F, Vigilante M, Margaglione M, Grandone E, del Popolo A, Forcella M, Procaccini D, Salatino G, Passione A, Ktena M, De Min A, Stallone C. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in end-stage renal failure patients. **Nephron**. 2000; 85:54-59.
258. Pankow JS, Arnett DK, Borecki IB, Hunt SC, Eckfeldt JH, Folsom AR, Djousse L. Lack of association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 2000; 6:551-558.
259. Diet F, Graf C, Mahnke N, Wassmer G, Predel HG, Palma-Hohmann I, Rost R, Böhm M. ACE and angiotensinogen gene genotypes and left ventricular mass in athletes. **Eur J Clin Invest**. 2001; 31:836-842.
260. Hohenfellner K, Wingen AM, Nauroth O, Wühl E, Mehls O, Schaefer F. Impact of ACE I/D gene polymorphism on congenital renal malformations. **Pediatr Nephrol**. 2001; 16:356-361.
261. Wang JG, Staessen JA, Tizzoni L, Brand E, Birkenhager WH, Fagard R, Herrmann SM, Bian G. Renal function in relation to three candidate genes. **Am J Kidney Dis**. 2001; 38:1158-1168.



262. Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón F, Hernández-Perera O, Anabitarte A, Losada A, medina A, Hernández E, Fiuza D, Avalos O, Yunis C, Ferrario CM. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphism with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. Prospective Cardiac Gene. **J Am Coll Cardiol.** 2001; 37:1536-1542.
263. Mulatero P, Rabbia F, di Cella SM, Schiavone D, Plazzotta C, Pascoe L, Veglio F. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms are non-randomly distributed in oral contraceptive-induced hypertension. **J Hypertens.** 2001; 19:713-719.
264. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Albertin G, Favilla S, Sudano I, Pessina AC, Salve A . Exclusion of the ACE D/I gene polymorphism as a determinant of endothelial dysfunction. **Hypertension.** 2001; 37:293-300.
265. Dzida G, Sobstyl J, Puzniac A, Golon P, Mosiewicz J, Hanzlik J. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor type 1 genes in essential hypertension in a Polish population. **Med Sci Monit.** 2001; 7:1236-41.
266. Buraczynska M, Jozwiak L, Spasiewicz D, Nowicka T, Ksiazek A . Renin angiotensin system genes in chronic glomerulonephritis. **Pol Arch Med Wewn.** 2001; 105:455-460.
267. Ferrari M, Mudra H, Grip L, Voudris V, Schächinger V, de Jaegere P, Rieber J, Hausmann D, Rothman M, Koschyk DH, Figulla HR. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism does not influence the restenosis rate after coronary stent implantation. **Cardiology.** 2002; 97:29-36.
268. Renner W, Pabst E, Paulweber B, Malaimare L, Iglseder B, Wascher T, Pilger E. The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. **Atherosclerosis.** 2002;165:175-178.
269. Poch E, La Sierra Ad A, Gonzáles-Nuñez D, Oriola J, Redón J, Chaves FJ, Marín P, Giner V, Pamies E, Villar J, Ramírez R, Stiefel P, Rodríguez Pérez JC, Rodríguez Esparragón F, Martínez E, Carrión L, Sanchís C, División JA. Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. **Med Clin (Barc).** 2002; 118:575-579.
270. Fuentes RM, Perola M, Nissinen A, Tuomilehto J. ACE gene and physical activity, blood pressure, and hypertension: a population study in Finland. **J Appl Physiol.** 2002; 92:2508-2512.

271. Eisenhardt A, Sperling H, Hauck E, Porst H, Stief C, Rübber H, Müller N, Siffert W. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphism and response to sildenafil in men with erectile dysfunction . **Urology**. 2003; 62: 152-157.
272. Valocik G, Rosochova I, Kovacs L. Effect of ACE gene polymorphism on left ventricular function in patients with type 2 diabetes. **Vnitr Lek**. 2003 Mar;49(3):181-184.
273. Vassilikioti S, Doumas S, Petidis K, Karagiannis A, Balaska K, Vyzantiadis A, Zamboulis C. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. **Am J Hypertens**. 1996; 9:700-702.
274. Levinson O, Oren SD, Yagil C, Sapojnikov M, Wechsler A, Bloch R, Yagil Y. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in a diabetic cohort and diabetic nephropathy. **Harefuah**. 1999; 136:768-73,843.
275. Diamantopoulos EJ, Andreadis EA, Vassilopoulos CV, Tabacila-kakou MG, Sfakianakis ME, Tarassi KE, Papasteriades CA. Distribution of different HLA antigens in Greek hypertensives according to the angiotensin-converting enzyme genotype. **Am J Hypertens**. 2000; 13:438-441.
276. Araz M, Aynacioglu S, Aktaran S, Alasehirli B, Okan V. Association between polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and hypertension in Turkish type II diabetic patients. **Acta Medica (Hradec Kralove)**. 2001; 44:29-32.
277. Nagi DK, Foy CA, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Grant PJ, Knowlwe WC. Angiotensin-1-converting enzyme (ACE) gene polymorphism, plasma ACE levels, and their association with the metabolic syndrome and electrocardiographic coronary artery disease in Pima Indians. **Metabolism**. 1998; 47:622-626.

278.

## 5. ARTIGOS

### 5.1 Artigo 1

#### **Prognóstico precoce em pacientes de UTI: Uma avaliação do polimorfismo C-260 → T do gene CD14 como um marcador de prognóstico de sobrevida.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; Carolina Franco; Luiz C. D'Avila; Clarice S. Alho, PhD., Jarbas R. de Oliveira, PhD

- Maria Helena Albarus / MSc / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-CM), Porto Alegre, RS - Brazil
- Fernando Suparregui Dias / MD / Hospital São Lucas (HSL). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Carolina Rosa Franco / Bióloga / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Luiz Cláudio D'Ávila / Biólogo / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Clarice Sampaio Alho / PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Jarbas Rodrigues de Oliveira / PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil

Encaminhado para a revista Critical Care Medicine em 17 de agosto de 2004.

**Early prognosis for critically ill patients: An evaluation of the CD14 C-260→T gene polymorphism as a positive survival prognostic marker.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; Carolina Franco; Luiz C. D'Avila; Clarice S. Alho, PhD Jarbas R. de Oliveira, PhD.

**Objective:** To evaluate the polymorphism C-260T of gene CD14 as potential complementary genetic tool for outcome prognosis in infected ICU admitted patients.

**Design:** Prospective, observational study.

**Setting:** Medical intensive care unit (ICU) in a university hospital. HSL/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Patients:** Eighty-six consecutive ICU admitted patients.

**Intervention:** CD14 C-260T genotype measurement at ICU admission and 100 days survival follow-up.

**Measurements and Main Results:** At admission all patients were evaluated by APACHE II, MODS and SOFA tools, and blood was collected for C-260T genotyping. No age, gender or ethnics were used for exclusion. Those patients that don't presented infection within seven days from ICU admission were excluded. A total of 71 patients, age 14-95 (median = 58yrs), were included. The general survival was 37%. Among those that presented sepsis 32% survived and among those that became shocked the survival was 22%. Comparing the survival functions between C-260 TT and non-TT genotypes we found a statistical significant difference, favoring the survival of those patients that presented C-260 TT genotype ( $p=0.021$  for the entire group ( $n=71$ );  $p=0.025$  for middle age septic group ( $n=29$ ) and;  $p=0.009$  for middle age shocked group ( $n=21$ )).

**Conclusion:** The C-260T genotyping of ICU admitted patients seems to have some potential as a prognostic tool for infected patients. Contrary to others studies, our data suggest that infected patients owning TT genotype have better survival prognosis.

**Key Words:** infection; CD14; C-260T polymorphism; diagnostic test; genetic risk factors; intensive care unit.

Intensive Care Unit (ICU) admitted patients are weakened individuals that require sophisticated monitoring procedures that's includes frequent biochemical, physiological and clinical data collection. The very fast development of the biocellular and genomic technologies generated many recent studies that are disclosing the feasibility for the use of genetic information as a prognostic tool for the

overcome of many severe disease that lead to ICU admission. It is more and more evident that, even hundreds of different genes are involved in the resolution of a severe disease, some specific genes have a lot to say about the probability of an individual successfully manage a severe disease situation. This seems to be the case about the polymorphism C-260T of gene CD14 genotype.

CD14 is a 53-55 kDa glycoprotein anchored to the surface of many cell types, such as monocytes, macrophages and neutrophils, by a glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) tail which functions as a high affinity receptor for lipopolysaccharide (LPS) (1-4).

Accordingly to recent studies, the CD14 acts in concert with the recent discovered mammalian Toll-like receptors to discriminate microbial pathogens or their products and initiate transmembrane signaling (5, 6). As a receptor for a very wide range of microbial products including mainly lipopolysaccharide, peptidoglycans and lipoteichoic acid, the CD14 could be also found in soluble form (sCD14). This form plays a crucial role in microbial response of endothelial and epithelial cells that do not exhibit the membrane-bound CD14 (mCD14) (7), enabling that cells to produce the same kind of inflammatory cytokines in response to the LPS challenge (8, 9). In both forms, membrane anchored (mCD14) or soluble (sCD14), the CD14 receptor seems to be a major part of the innate immune system.

The lipopolysaccharide present in the serum binds to the high density lipoprotein (HDL) receptors and become recognized by LPS binding protein (LPB) which transport them to the mCD14 as well as to the sCD14. The complex (LBP+LPS+mCD14) formed then signal the immune system. Binding of LPS to membrane bound CD14 results in cellular activation that produce pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 or oxygen radicals, NO, tissue factor or others, as well as anti-inflammatory cytokines like IL-10 or TGF $\beta$ . The biological function of sCD14 is not completely clear. *In vitro*, an excess of sCD14 inhibits LPS binding to mCD14 and hence blocks cellular activation (8). In contrast sCD14-LPS complex can activate cells which do not themselves express mCD14. For example, mCD14-negative endothelial cells can be activated by LPS-sCD14 complexes to release pro-inflammatory mediators. Additionally, sCD14 may act as a shuttle molecule like LBP to transfer LPS to HDL, neutralizing in this way its toxic effects (8). It remains to be elucidated whether *in vivo* sCD14 can support LPS activation of CD14-negative cell or whether it is involved in neutralization of LPS. Even the complete biological function of the CD14 is still not well known, an increase of the serum sCD14 level is considered a good mortality prognostic marker for septic patients infected by gram-negative bacteria (10, 11).

The human gene that encodes for the CD14 is located in the locus 5q23-q31 (chromosome 5) occupying about 1500pb organized in two exons that code for a protein of 375 residues [AF097942 (12); X06882 (13)].

In the gene promoter sequence there were identified four regions that interact with specific nuclear proteins of monocytes and three areas in which the transcription factor Sp1 bind (14). Mutations that alter the recognition sequence for Sp1 decrease the promoter activity of the gene and play a critical function in the regulation of its expression (14). In a segment of 460pb 5' at the exon-1 [U00699 (14, 15)] a SNP (single nucleotide polymorphism) was detected. That SNP presented a transition from a cytosine (C) to a thymine (T) in the position -159, counted from the transcription starting site (mutation C-260→T). This mutation meets close to the recognition site for Sp1, what allows suggesting that such nucleotidic mutation can interfere in the transcriptional capacity of the gene. In fact, it was observed that individuals carriers of the T allele present increased levels of serum sCD14, in relation to the individuals carriers of the allele C, resulting in a probable differential susceptibility for the development of pathologies associated to the inflammatory processes (16), although the association of the genetic inheritance with the predisposition to these pathologies has not verified in all the studied populations (17, 18).

The objective of this study was to verify if the differential inheritance of CD14 receiver variants for the C-260→T can be correlated with the expectation for ICU patients' survival.

## **MATERIAL AND METHODS**

**Study Design.** A prospective, observational study.

### **Setting.**

Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital São Lucas PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil).

### **Patients:**

We initially enrolled in these study 86 patients (44 men and 42 women) that interned consecutively in the general Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital São Lucas (HSL) of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS -

Brazil) and that consented to participate in the study (PUCRS's Ethic Comities on Research approval on April 2002 – process nº 01/01088).

For patients with multiple ICU admission during the study period, only the data from the first entrance was considered. The age varied from 14 to 95 years (median=58). The time of the patients' internment in the ICU varied from 2 to 54 days (median=15) and in the hospital, from 5 to 224 days (median=33). As the objective of this study was to test de CD14 genotyping as a prognostic tool for the patient outcome in a real ICU environment, we don't discriminated age, sex o ethnics for the inclusion.

The mortality rate during the time of internment in the hospital was 59.3% (n=51). The death event was considered independently of the internment period in ICU or in the hospital. As inclusion criteria, we considered for this study only those patients that presented some infection during the first week in the ICU. Of those 86 patients, 71 presented infection and were included in the statistical tests. Of those patients 61.6% presented sepsis (n=53) and, among those septic patients, 69.8% (n=37) became shocked. The APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) and SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) scores obtained in the day of the admission in ICU varied from 4 to 41 (mean=21.6; SD=8.13) and from 0 to 15 (mean=6.83; SD=3.57), respectively. At the end of the first week of internment in the ICU, the SOFA scores varied from 0 to 18 (mean=6.50; SD=4.20).

As a criterion for death risk evaluation we divide those patients accordingly the SOFA score at admission (SOFA1) and at day 7 (SOFA7). The risk was classified as “low” or “high” for  $SOFA1 < 7$  or  $SOFA1 > 6$  and  $SOFA7 < SOFA1$  or  $SOFA7 \geq SOFA1$ , respectively. **Patients.** Eighty seven consecutive ICU (44male and 43 female), admitted patients that consented to be part of this study. From those 87, only seventy-one patients that presented some kind o infection were included.

#### **DNA isolation and CD14 C-260T genotyping:**

The genomic DNA was extracted from leucocytes obtained from 5ml of blood samples collected, in sterile system with EDTA, from each patient at ICU admission and maintained refrigerated at 4°C or frozen at -20°C (19). The genotyping visualization was made through electrophoresis system, in agarose gel (2%)/ethidium bromide/TBE, of the digested amplified and digested segments.

The genetic determination was accomplished using the amplification technology of Polymerase Chain Reaction (PCR) in a thermocycler PTC-100 (Peltier-Effect Cycling MJ Research Inc.) using primers to the polymorphism of interest. The polymorphism was analyzed as previously described (20): a segment

that includes the CD14 promoter was amplified with forward primer (24nt): 5'-TTG GTG CCA ACA GAT GAG GTT CAC-3' and reverse primer (23nt): 5'-TTC TTT CCT ACA CAG CGG CAC CC-3', in the initial denaturizing condition at 94°C for 10 minutes, followed by 35 cycles consisting of 94°C denaturation for 1 minute, hybridization at 65°C for 35 seconds and extension at 72°C for 1 minute, and an final extension of 10 minutes at 72°C. The amplified product of 560bp was incubated at 37°C for 3 hours with 10U of the restriction endonuclease *HaeIII* (Life Technologies - Gibco BRL®) which recognizes and digests DNA in the 5'-GG↓CC-3' region.

Each individual's genotype was determined by the electrophoresis analysis of the digested fragments (560bp) of DNA after the incubation. The genotyping was based on the following information (fig. 1): (I) all the individuals present a restriction site for *HaeIII* in the position -417 to -414 (considering the beginning of the translation) and all the amplified segments are digested at this restriction site; (II) individuals CC homozygous presents in both chromosomes the nucleotide C in the gene promoter position -260, where the restriction site GGCC is located. After digestion three fragments can be identified, 204bp, 201bp and 155bp, respectively; (III) individuals TT homozygous presents in both chromosomes the nucleotide base substitution C→T at CD14 promoter's position -260, which eliminate one recognition site for *HaeIII* showing, as a result of the digestion, two DNA fragments of 359bp and 201bp, respectively; (IV) individuals heterozygous (TC) shows four fragments of DNA, respectively with 359bp, 204bp, 201bp and 155bp.

### **Statistical Analysis.**

The main analysis was on survival rate. For that we used the Kaplan-Meier procedures. To test for equality of survival distributions we got the Log\_Rank statistic, for what  $p < 0.05$  was considered significant. Descriptive results of continuous variables were expressed as a mean (SD) and count and percentages for categorical data.

Analyses were completed on a computer running SPSS 11.5 software (SPSS Inc. USA).

## **RESULTS**

Figure 2 shows a flow chart scheme of the patient's segregation. As we can see, 71 patients that presented some kind of infection were included. From those



patients, 53 presented sepsis (75%) and 37 became shocked (51%). The overall survival, amongst those 71 patients included in this study, was 26 (37%) ( and no statistical difference was found for gender ( $p=0.90$ ) (see Fig. 3)

For age related survival evaluation, we grouped all patients into three groups based on quartiles strata: Group 1 included age 14 to 43 yrs (first quartile;  $n=18$ ); Group 2 included age 44 to 69 yrs (second and third quartiles;  $n=36$ ) and; Group 3 included age 70 to 95 yrs (forth quartile;  $n=17$ ). These age strata discrimination revealed a statistical survival difference ( $p=0.05$ ) favoring young (61%) against elderly (24%) (see Fig. 4). Middle age patients performed in middle (33%).

To evaluate the C-260T genotyping power as a prognostic tool for infected ICU patients, we performed survival function analysis using Kaplan-Meier procedures. The results showed a statistical significant difference in favor of the TT genotype (62% survival) against non TT genotype (26% survival;  $p=0.02$ ) (see Fig 5).

As we found that age is a relevant parameter for ICU admitted patient survival (see Fig. 4), we tested the performance of the TT genotype against age strata. The results revealed that the middle age TT patients perform better than non-TT genotyped patients ( $p=0.05$ ) (see Fig.6). The results showed more than that. The C-260T genotypes seems to have no power to forecast the outcome for the young group (age 14-43;  $p=0.43$ ), nor for the elderly group (age 70-95;  $p=0.77$ ).The same test was performed for the septic patients and shocked patients. We verified the same pattern, septic middle age TT patients (group 2) survived better ( $p=0.02$ ) and the group 1 and group 3 did not present statistical relevant differences (group 1,  $p=0.68$ ; group 3,  $p=0.63$ ).

To go further, we tested de survival for both genotypes against the SOFA scores. To do so, we divided the patients into 3 groups, accordingly the evolution of the SOFA scores along the first week of ICU stay. Thirty four patients (10 TT and 24. non TT) reduced SOFA score at day 7 ( $SOFA_7 < SOFA_1$ ), 9 patients (2 TT and 7 non TT) didn't alter de SOFA score ( $SOFA_7 = SOFA_1$ ) and 28 patients increased SOFA score at day 7 ( $SOFA_7 > SOFA_1$ ). For the first two groups, the survival for both genotypes didn't reach statistical significant difference ( $SOFA_7 < SOFA_1$ ,  $p=0.21$ ;  $SOFA_7 = SOFA_1$ ,  $p=0.68$ ). The last group ( $SOFA_7 > SOFA_1$ ) presented a very significant difference in favor of the TT genotype (TT survival = 56%; non TT survival = 0%;  $p=0,017$ ) (see Fig. 7).

## DISCUSSION

Single nucleotide polymorphisms (SNP's) are alterations in an only base in identical areas of the genome present in, at least, 1% of the individuals. Many SNP's has been used to map genes associated with human diseases. There are 48,196 SNP's detected by statistical analyses in *human expressed sequence tags* (EST's), which are areas associated with gene coding segments (20). Such SNP's demonstrated to be an efficient tool in the detection of gene areas associated with diseases. The study of SNP's in the human health can be useful to do recommendations in the sense of addressing initiatives of performance to the focuses that need larger attention and investment in research.

Our study comes to confirm that the CD14 gene can be considered as a candidate to answer some questions that related to the variable physiological states that involve infections. The current studies with SNP's are concentrated mainly on genes that one hopes to influence directly the response to a certain drug or disease (21). We proposed a prospective study, including patients with different focuses and degrees of infection to evaluate the differential allele's action of an only constituent gene. Our analysis was characterized as "strategy based on sequences" (21). The CD14 SNP's that was studied is potentially functional once it can interfere quantitatively in the transcriptional capacity of the gene.

The conclusions about the differential effect of the alleles of this specific CD14 polymorphism on the phenotype, however, didn't consider the variation of other genes involved in the response process to the infections. The responses to the infections are influenced by a great number of genetic products and, certainly, the importance of this gene polymorphism can depend on the polymorphism of other genes.

In all ways, our research facilitates the obtaining of positive and negative prognostic estimates that can be associated to the clinic through the identification of causal variants that correlates phenotype-genotype. Besides, our results can be useful to address the study of the real functional interference of the mutation on the expression of the gene. Such a functional evaluation can be exploited for the clinical pharmacological application.

When well established, the knowledge of genetic variants that offer significant prognostics values on as patients will respond to the treatments will benefit patient that can count with a specific procedure adapted to its genotype and

they will also benefit to the health structures as a whole. In such a way, we can already foreseen improvements in the effectiveness of patient's treatment.

The studies of *linkage disequilibrium* (LD) looks for to identify genetic variants that could increase the susceptibility for a specific disease or phenotype of interest when being in larger frequency among the affected individuals than they controls (22). However, the specific study of each population is important, once the pattern of LD measured in humans and the use of SNP's varies a lot (22).

It is always important to consider that the prognostic values found in our study can address but not be applied directly to other populations, due to the great ethnic-biological particularities.

Our study included south of Brazil resident individuals, a population mainly of European origin. Another population can present different LD patterns between the alleles of the CD14 and other genomic segments and, consequently, offer different prognostic values. The variations of SNP's and the degree of LD within other genes are specific in each population and we don't still have the knowledge on the allele's frequency and LD patterns among each ethnic population (23).

In this study, we found evidences of correlation between CD14 C-260T polymorphism and the survival of infected ICU admitted patients. The CD14 TT genotype carrier patients group presented less mortality when compared to non-TT genotype. Even when we discriminated septic from non-septic or shocked versus non-shocked the pattern remained the same, especially for the middle age group. These findings are, in same way, intriguing and in conflict with recently published study (24).

We believe that there are several possible explanations for this discrepancy. Firstly, we did not filter or segregate for age, sex or ethnics as others authors did. Secondly, patients with a wider range of pathological severity, from mild infection spot to severe shock, were included. We think that our used strategy is more accordingly to the real ICU environment and practices and better represents the day to day reality of and university hospital.

To explain why the middle age group performed better for the CD14 TT genotype, we suggest the hypothesis that the elderly group (age 70-95) has the immune system so debilitated in many aspects that can't get benefit from the TT genotype. In contrast, the young group (age 14-43) probably has so many other powerful capabilities to balance the pro-anti-inflammatory reactions, and doing so overcome the infection challenge, that the help of the TT genotype don't represent any significant improvement to the immune system. As Bone (25) stated, infections

pathologies in general and sepsis in particular are multifactorial events that produce organic reactions that alternates dynamically between pro and anti-inflammatory responses. The overcome of a severe infection depends mainly of the body capacity to adequately modulate the equilibrium among those opposite forces. We propose that the middle age patients have more flexibility in controlling the availability of the sCD14 during the evolution of the illness. Doing so, their can better modulate the dynamic of the events. In our opinion, as do happens for soluble receptor TNF $\alpha$  (26) to have augmented sCD14 serum concentration (a TT genotype characteristic) could be a protective factor that helps the immune system to better balance the pro-anti-inflammatory actions. To confirm this hypothesis it's necessary to monitor the sCD14 levels along time line and compare the data between TT and non-TT patients, a job that we didn't do.

In the light of our findings, despite the limitation of this study, we can conclude that there are evidences to suspect that be a CD14 TT carrier could offer a positive survival prognosis in case of an infection that leads to ICU admission, especially if one age between 44 and 69 years old. We also conclude that using CD14 genotyping, complementarily to others evaluation tools like APACHE and SOFA, could increase the percentage of correct outcome prognosis.

## REFERENCES

1. Goyert SM, Ferrero E, Retting WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM: The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. **Science** 1988; 239:497-500
2. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM: The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. **J Immunol** 1988; 141:547-52
3. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science** 1990; 249:1431-3
4. Haziot A, Tsuberi B, Goyert SM: Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of TNF $\alpha$  in response to LPS. **J Immunol** 1993; 150:5556-65
5. Ulevitch RJ: Toll gates for pathogen selection. *Nature* 1999; 401:755-756
6. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ: The toll of innate immunity on microbial pathogens. **N Engl J Med** 1999; 340:1834-1835
7. Landmann R, Reben AM, Sansano S, et al: Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. **J Infect Dis** 1996; 173:661-668
8. Schütt C: Molecules in focus: CD14. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31 545-549
9. Karina R, Matsumoto S, Higashi H, et al: The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today** 1999; March: 123-132
10. Landmann R, Zimmerle W, Sansano S, et al: Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram-negative septic shock. **J Infect Dis** 1995; 171:639-644
11. Burgmann H, Wincler S, Locker GJ, et al: Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in Gram-positive sepsis. **Clin Immunol Immunopathol** 1996; 80: 307-310
12. Long JY, Xue YN, Sun L, et al: Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene. **Shenh Wu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan** 1998; 25: 377-378
13. Ferrero E, Goyert SM: Nucleotide sequence of gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. **Nucleic Acid Res** 1998; 16: 4173
14. Zhang DE, Hetherington CJ, Tan S, et al. Sp1 is critical factor for the monocyte specific expression of human CD14. **J Biol Chem** 1994; 269: 11425-11434

15. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, et al. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989; 73: 284-289
16. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin SO, et al. Association of a Promoter Polymorphism of the CD14 gene and Atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 965-69
17. Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, et al. C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Ludwigshafen Risk and cardiovascular health (LURIC) Study. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1249-52
18. Koch W, Kastrati A, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. CD14 gene - 159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction. *Am Heart J* 2002; 143: 971-76
19. Gomez J, Colli ML: Prognóstico. In: Dias FS: Choque, 2002. p 387-403. Porto Alegre. EDIPUCRS
20. Irizarry K, Kustanovich V, Li C, Brown N, et al. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphism in human expressed sequences. *Nature Reviews Genetics* 2000; 26: 233-236
21. David BG, Sarah KT, Sanjay MS. Pharmacogenetics goes genomic. *Nature Reviews Genetics* 2003; 12: 937-947
22. Jeffrey DW, Jonathan KP. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetic* 2003; 4: 587-597
23. Cristopher S, Carlson MA, Eberle MJ, et al. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nature Reviews Genetic* 2003; 33: 518-521
24. Gibot S, Alain C, et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 2002; 30 (5): 969-973
25. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24 (7): 1125-28
26. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, et al: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998; 26:1793-1800

## LEGENDS

**Figure 1.** Agarose/Ethidium Bromide/TBE electrophoresis visualization of the DNA fragments obtained from our patients (one representative sample). (MW) banding pattern of the 123bp ladder (GIBCO-BRL). Fragment sizes indicated at left; (PCR) Amplified 560bp product; Expected banding pattern for heterozygous TC (TC), homozygous TT (TT) and homozygous CC (CC). Fragments sizes indicated at right.

**Figure 2.** Study flow chart according to patients' initial diagnoses. One patient was initially excluded because CD14 genotype data was lost. Fifteen more patients were excluded because no infection spot was detected during ICU stay

**Figure 3.** Survival functions by gender (n=71; Female survival, 33%; Male survival, 39%; Overall, 37%). There is no significant difference (p=0.90).

**Figure 4.** Survival functions by age strata. Young group (n=18) survive better and the elderly group (n=17) presented the worst survival index (p=0.05)

**Figure 5.** Survival functions for TT (n=21) *versus* non TT (n=50) genotypes (p=0.02).

**Figure 6.** Survival functions for patients from middle age group 2 (age 44-69, n=37; TT genotype *versus* non TT, p=0.05).

**Figure 7.** Survival functions for patients that got increased SOFA scores at end of one week of ICU stay. TT genotype perform better (p=0.017) than non-TT

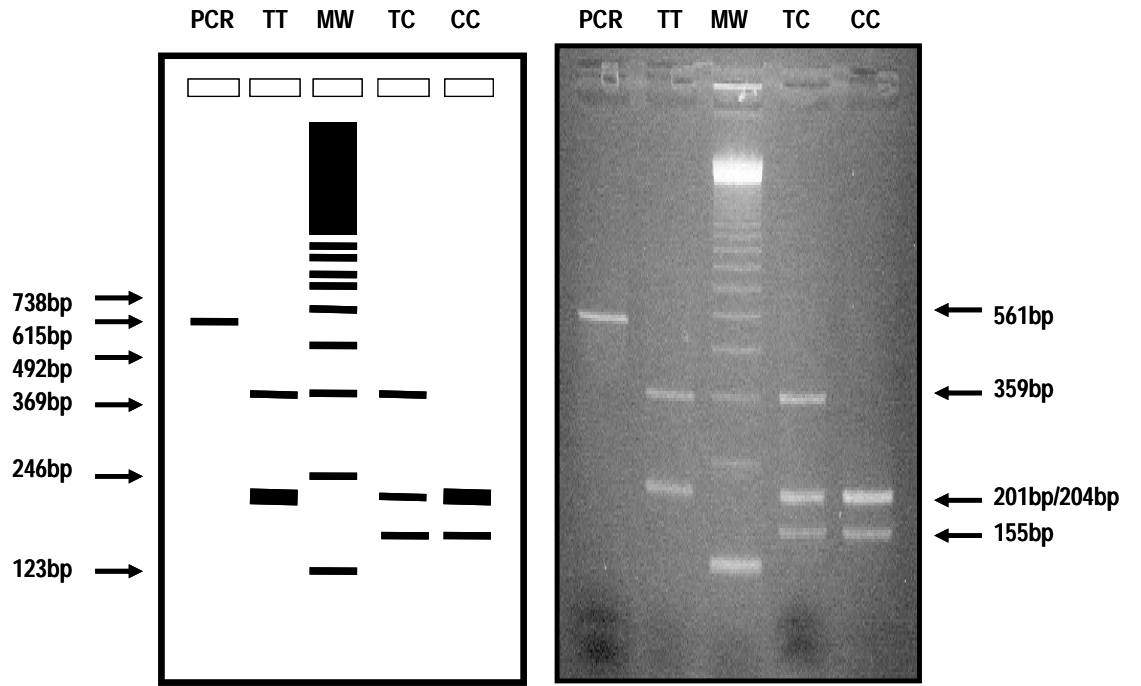


FIGURE 1



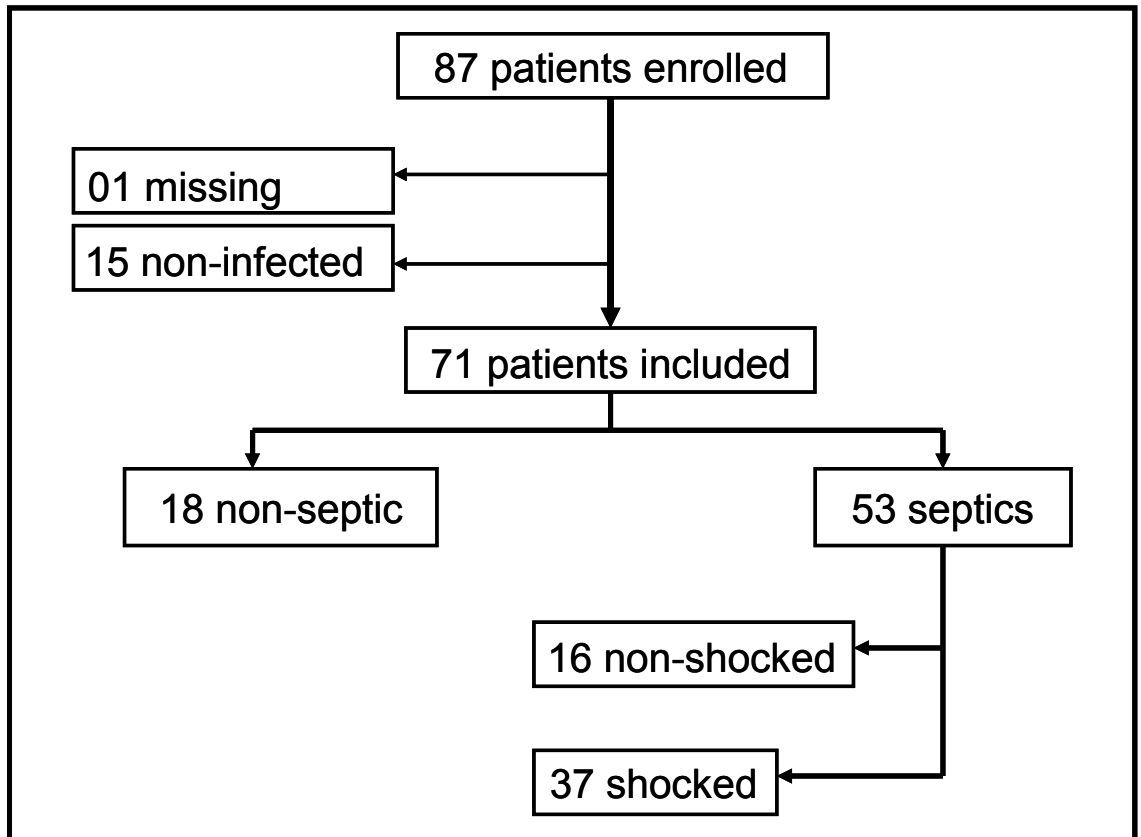


FIGURE 2

### SURVIVAL FUNCTIONS

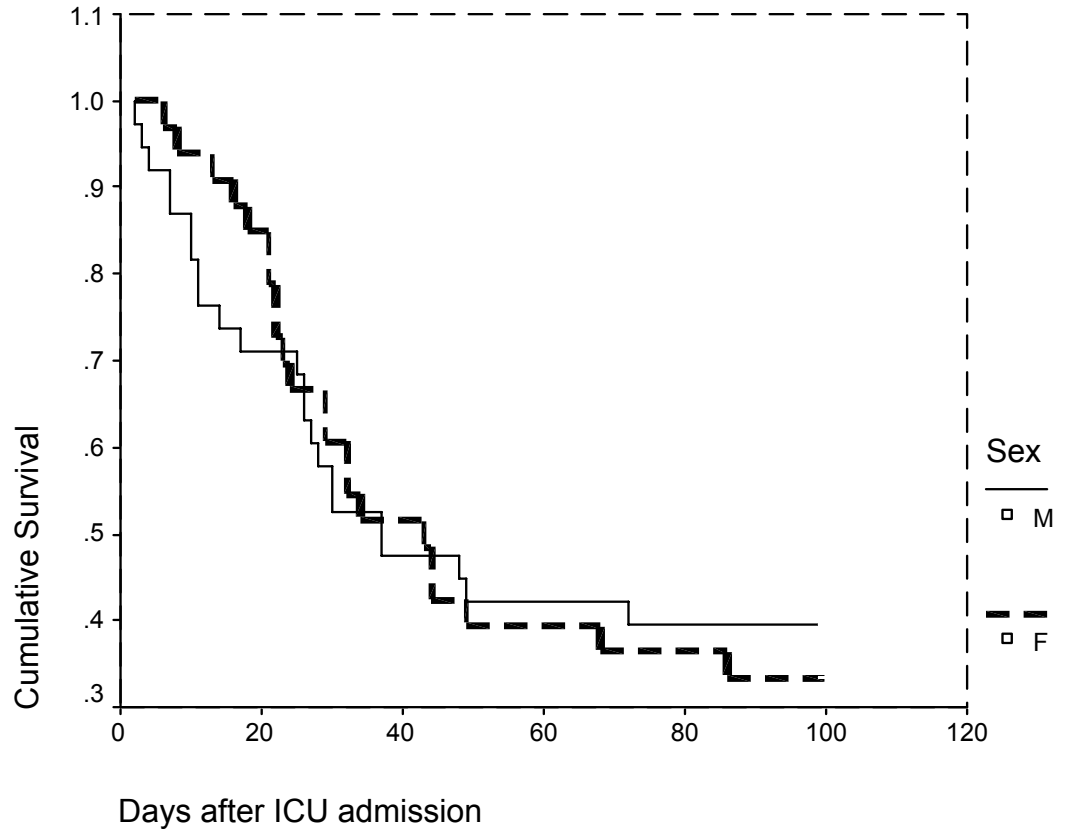


FIGURE 3

### SURVIVAL FUNCTIONS

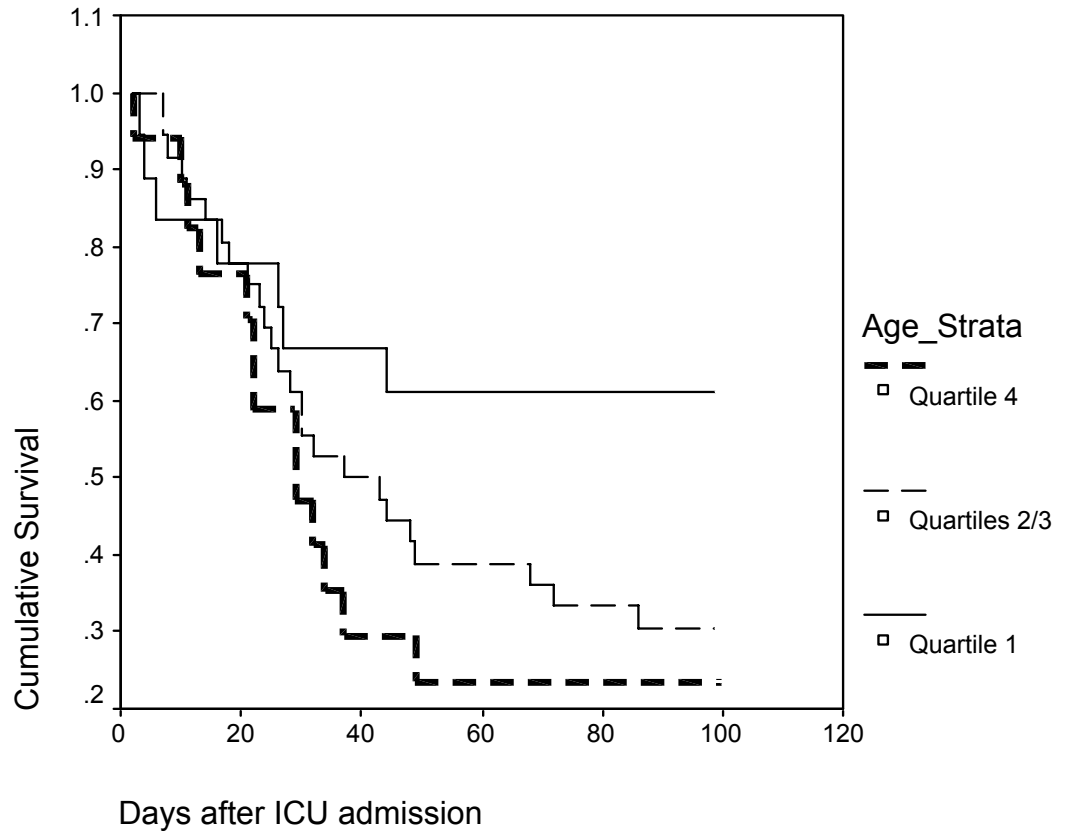


FIGURE 4

### SURVIVAL FUNCTIONS

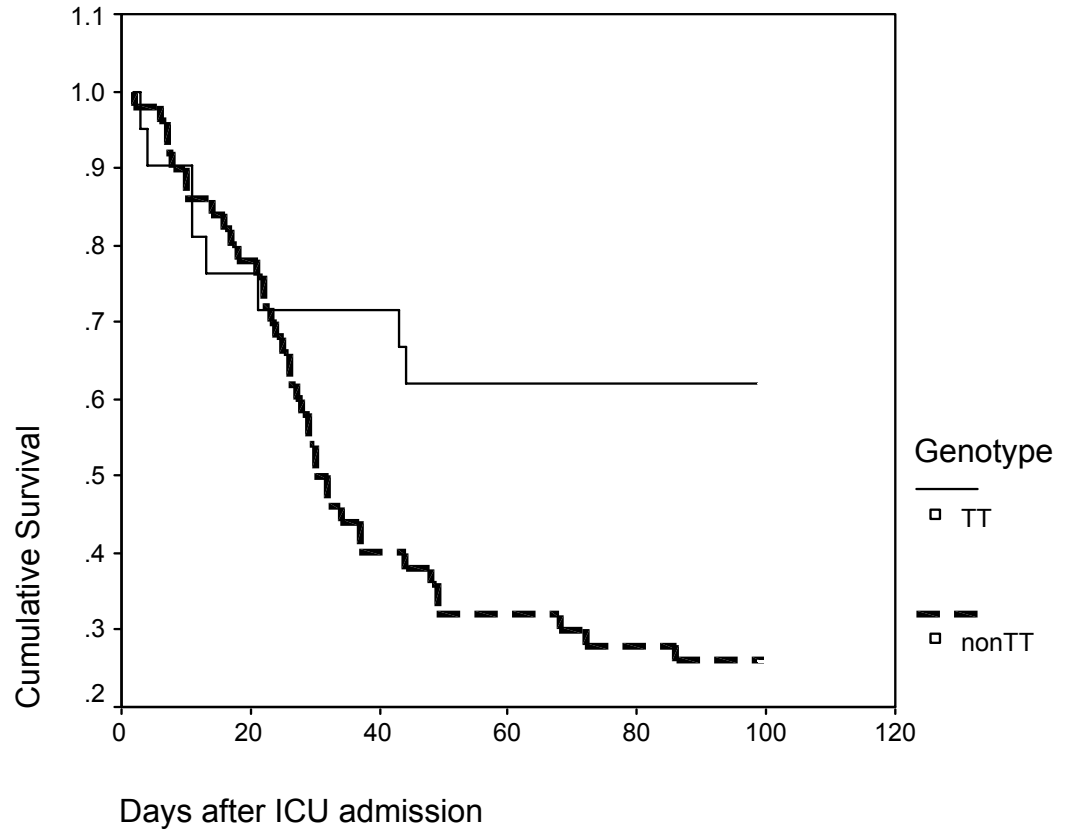
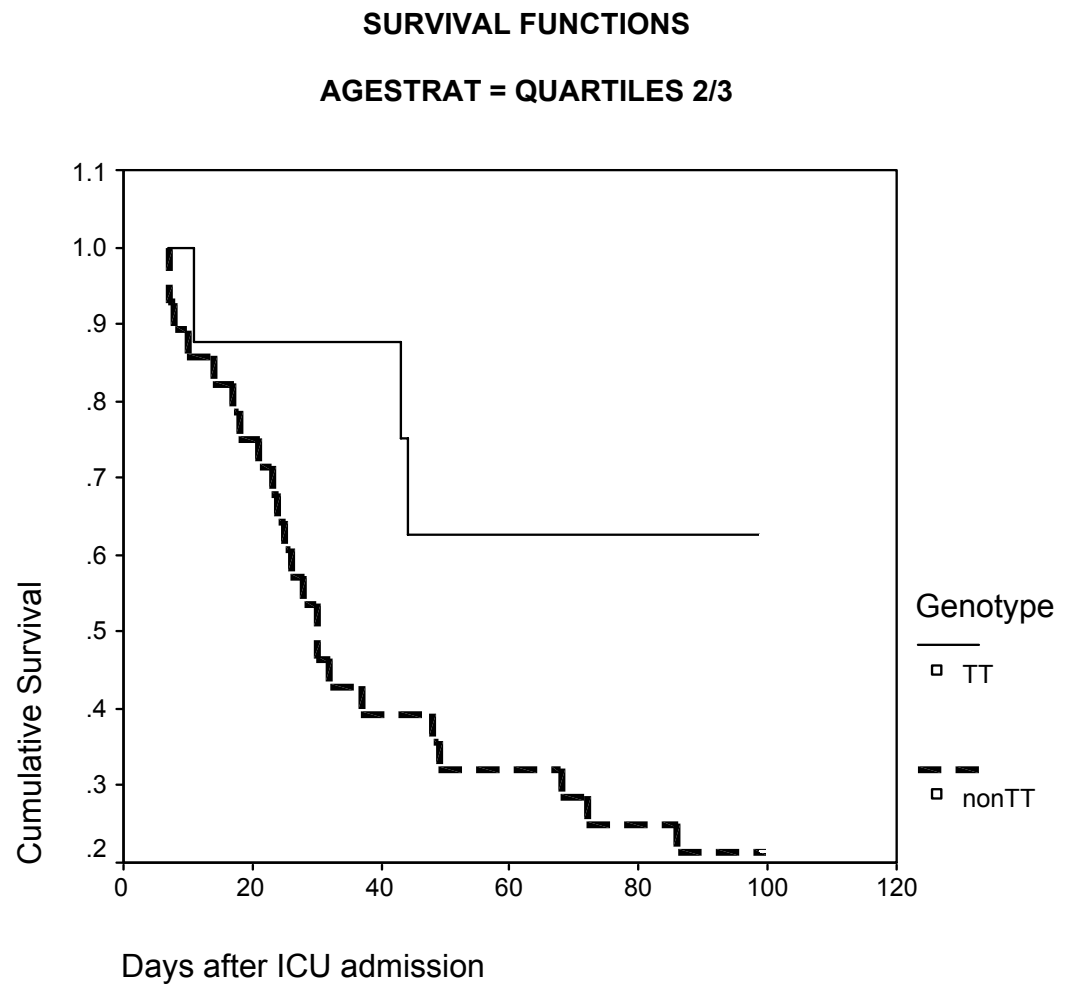
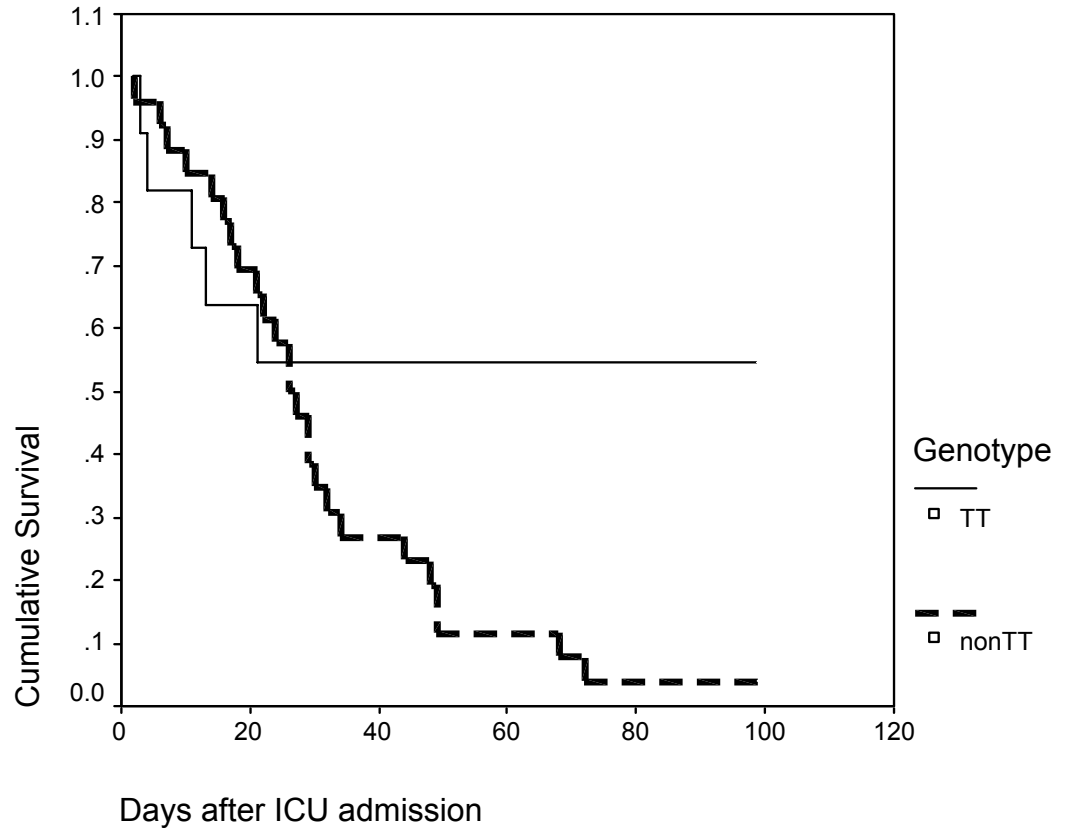


FIGURE 5

**FIGURE 6**

**SURVIVAL FUNCTIONS**

**SOFA 7 > SOFA 1**



**FIGURE 7**

**Prognóstico precoce em pacientes de UTI: Uma avaliação do polimorfismo C-260 → T do gene CD14 como um marcador de prognóstico de sobrevida.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; Carolina Franco; Luiz C. D'Avila; Clarice S. Alho, PhD; Jarbas R. de Oliveira, PhD .

**Objetivo:** Avaliar o polimorfismo C-260T do gene CD14 como uma ferramenta genética complementar no prognóstico de pacientes de uma UTI.

**Local/Ambiente:** Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em um hospital universitário. HSL/PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Pacientes:** Oitenta e seis pacientes internados na UTI.

**Intervenção:** Análise do genótipo C-260T de pacientes de UTI internados em um período de 100 dias.

**Medidas e Principais Resultados:** Todos os pacientes foram avaliados na internação usando os escores APACHE II, MODS e SOFA, e foi coletado sangue para a genotipagem do polimorfismo do promotor CD14 C-260T. Não foi usado como critério de exclusão a idade, o sexo ou a raça. Os pacientes que não apresentaram infecção dentro de sete dias de internação na UTI foram excluídos. Um total de 71 pacientes, com idades entre 14-95 (média = 58 anos), foram incluídos. A sobrevida, de uma maneira geral, foi de 37%. Entre os que apresentaram infecção, 32% sobreviveram e, entre os que sofreram choque, a sobrevivência foi de 22%. Comparando as curvas de sobrevivência entre os genótipos C-260 TT e não-TT, encontramos uma diferença estatisticamente significativa, favorecendo a sobrevida daqueles pacientes que apresentaram o genótipo C-260 TT ( $p=0.021$  para o grupo inteiro ( $n=71$ );  $p=0.025$  para o grupo séptico de meia idade ( $n=29$ ) e;  $p=0.009$  para o grupo de meia idade que sofreu choque ( $n=21$ ))

**Conclusão:** A análise dos genótipos do polimorfismo do promotor CD14 C-260T dos pacientes internados da UTI, parece ter algum poder como prognóstico em pacientes infectados. Ao contrário de outros estudos, os nossos dados sugerem que pacientes infectados que possuem o genótipo C-260T têm melhor prognóstico de sobrevida.

**Palavras Chaves:** infecção; CD14; C-260T; polimorfismo; teste diagnóstico; fatores de risco genéticos; unidade de tratamento intensivo.

Os pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTIs), são indivíduos com estado de saúde altamente debilitados e amplamente monitorados através de análises bioquímicas, fisiológicos e clínicos. O rápido avanço da tecnologia biocelular e genômica geraram vários estudos recentes, que têm revelado a viabilidade do uso da informação genética como poder prognóstico para muitas doenças graves que levam à internação na UTI. Fica cada vez mais evidente que, mesmo que centenas de genes diferentes estejam envolvidos na resolução de uma doença grave, alguns genes específicos têm muito a ajudar na probabilidade de um indivíduo conseguir manejar de forma bem sucedida uma situação de doença grave. Este parece ser o caso do polimorfismo do promotor C.<sub>260</sub>→T.

CD14 é uma glicoproteína de 53-55 kDa ancorada na superfície de muitos tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos, por uma tríade de glycosil-phosphatadyl-inositol (GPI), que funciona como um receptor de alta afinidade para o lipopolissacarídeo (LPS). (1-4)

De acordo com estudos recentes, o CD14 age juntamente com os receptores de mamíferos do tipo Toll, recentemente descobertos, para discriminar entre patógenos ou seus produtos e iniciar uma sinalização transmembrana (5, 6). Sendo um receptor de uma ampla gama de produtos microbiais, incluindo principalmente lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e ácido lipoteico, o CD14 pode também ser encontrado na forma solúvel (sCD14). Esta forma exerce um importante papel na resposta microbiana das células endoteliais e epiteliais que não exibem o receptor CD14 ligado à membrana celular (mCD14) (7), permitindo que as células produzam o mesmo tipo de citocinas inflamatórias em resposta ao LPS (8, 9). Em ambas as formas, membranosa (mCD14) ou solúvel (sCD14), o receptor CD14 parece ser a parte principal do sistema imune inato.

O lipopolissacarídeo presente no líquido sérico (plasma) liga-se aos receptores de lipoproteína de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*) e torna-se reconhecido pela proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP - LPS binding protein), que transporta-os à mCD14, assim como ao sCD14. O complexo (LBP + LPS + mCD14) formado então, sinaliza ao sistema imune. A ligação do LPS à membrana superficial (membrane-bound) CD14 resulta em uma ativação celular que produz citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ou radicais de oxigênio, ON, fator de tecido ou outros, bem como citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 ou TGF $\beta$ . A função biológica do sCD14 não está completamente clara. *In vitro*, um excesso de sCD14 inibe a ligação do LPS ao



mCD14 e bloqueia a ativação celular (8). Em contraste, o complexo sCD14-LPS pode ativar células que não expressam mCD14. Por exemplo, as células endoteliais com mCD14 negativo podem ser ativadas pelo complexo LPS-sCD14 para liberar mediadores pró-inflamatórios. Além disso, o sCD14 pode agir como uma molécula, como o LBP, que transfere o LPS para o HDL, neutralizando desta forma seus efeitos tóxicos (8). Precisa ser esclarecido se o sCD14 *in vivo* pode neutralizar a ativação do LPS de células CD14 negativa ou se está envolvido na neutralização do LPS. Mesmo que a função biológica completa do CD14 não esteja ainda bem conhecida, um aumento do nível sérico do sCD14 é considerado um bom marcador prognóstico de mortalidade em pacientes sépticos infectados por bactérias gram-negativa e gram-positiva (10, 11).

O gene humano que codifica o CD14 está localizado no loco 5q23q31 (cromossomo 5), ocupando aproximadamente 1500pb, organizado em dois exons que codificam uma proteína de 375 nucleotídeos [AF097942 (12); X06882 (13)].

Na sequência promotora do gene foram identificadas quatro regiões que interagem com proteínas nucleares específicas de monócitos e três áreas nas quais se liga o fator de transcrição Sp1 (14). Mutações que alteram a seqüência de reconhecimento para Sp1 diminuem a atividade promotora do gene e exercem uma função crítica na regulação da sua expressão (14). Foi detectado um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP-single nucleotide polymorphism) em um segmento de 460pb 5' flanqueante ao éxon 1 [U00699 (14, 15)]. Este SNP apresenta uma transição de uma citosina ( C ) para a timina ( T ) na posição – 159, contada do ponto inicial da transcrição (mutação C-260→T). Esta mutação encontra-se perto do ponto de reconhecimento do Sp1, o que permite sugerir que tal mutação nucleotídica possa interferir na capacidade de transcrição do gene. Aliás, foi observado que os indivíduos que carregam o alelo T apresentam níveis de sCD14 aumentados, em relação aos indivíduos que carregam o alelo C, resultando em uma provável suscetibilidade diferencial para o desenvolvimento de patologias associadas à processos inflamatórios (16), embora a associação da herança genética com a predisposição para estas patologias não tenha sido verificada em todas as populações estudadas (17,18).

O objetivo deste estudo foi verificar se a herança genética do polimorfismo do promotor C-<sub>260</sub>→T pode ter associação com a expectativa de vida dos pacientes sépticos de UTI.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Desenho:** Estudo observacional e prospectivo.

**Local/Ambiente:**

Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital São Lucas (HSL), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), RS, Brasil.

**Pacientes:**

Foram incluídos no presente estudo 86 pacientes (44 homens e 42 mulheres) que internaram consecutivamente na Unidade de Terapia Intensiva Geral (UTIG) do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e que consentiram participar do estudo (Aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da PUCRS, em abril de 2002 sob o n° 01/01088).

Foi considerada apenas a primeira entrada na UTIG/HSL/PUCRS dos pacientes que eram recorrentes. A idade variou de 14 a 95 anos (mediana=58). O tempo de internação dos pacientes na UTIG/HSL/PUCRS variou de 2 a 54 dias (mediana=15) e no hospital, de 5 a 224 dias (mediana=33). Como o objetivo deste estudo foi testar a genotipagem do CD14 como uma ferramenta no prognóstico de melhora para os pacientes internados na UTI nós não discriminamos idade, sexo ou raça na inclusão.

A taxa de mortalidade durante o tempo de internação no hospital foi de 59.3% (n=51). O evento morte foi considerado independentemente do período de internação na UTI ou no hospital. Como critério de inclusão nós consideramos para este estudo somente aqueles pacientes que apresentaram algum tipo de infecção durante a primeira semana de internação na UTI. Dos 86 pacientes 71 apresentaram infecção e foram incluídos nos testes estatísticos. A porcentagem de pacientes que apresentaram sepse foi de 61.6% (n=53) e, destes pacientes sépticos, 69.8% (n=37) apresentaram choque séptico. Os escores APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) e SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), obtidos no dia da admissão na UTI, variaram de 4 a 41 (média 21.6; DP=8.13) e de 0 a 15 (média 6.83; DP=3.57), respectivamente. Após a primeira semana de internação na UTI, o escore SOFA-dia7 variou de 0 a 18 (média 6.50; DP=4.20).

Como um critério para o risco de morte, nós dividimos os pacientes de acordo com o escore SOFA, na admissão (SOFA 1), e no dia 7 (SOFA 7). O risco

foi classificado como “baixo” ou “alto” para  $SOFA1 < 7$  ou  $SOFA1 > 6$  e  $SOFA7 < SOFA1$  ou  $SOFA7 \geq SOFA1$ , respectivamente.

### **Genotipagem do polimorfismo C-260T do gene CD14:**

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos provenientes de amostras de 5ml de sangue coletado em sistema estéril com EDTA e mantido refrigerado a 4°C, ou congelado a -20°C (19).

A determinação genética foi realizada usando a tecnologia de amplificação em reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador PTC-100 (Peltier-Effect Cycling MJ Research Inc.) usando *primers* flanqueantes ao polimorfismo de interesse. O polimorfismo C-260T do gene CD14 foi analisado como inicialmente descrito (20) e devidamente estabelecido para a rotina do Laboratório de Genética e Biologia Molecular - PUCRS, como segue: amplifica-se um segmento de DNA genômico da porção promotora do gene CD14 com *primer forward* (24 nt): 5'- TTG GTG CCA ACA GAT GAG GTT CAC - 3' e *reverse* (23 nt): 5'- TTC TTT CCT ACA CAG CGG CAC CC - 3', nas condições de desnaturação inicial à 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridização à 65°C por 35 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto, e extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado de 560pb é incubado à 37°C por 3 horas com 10U da endonuclease de restrição *HaeIII* (*Life Technologies - Gibco BRL®*) a qual reconhece e digere o DNA no sítio 5'-GG↓CC-3'.

O genótipo de cada indivíduo foi determinado pela análise eletroforética dos fragmentos digeridos do DNA amplificado por PCR (560pb), após a incubação. A genotipagem foi baseada nas seguintes informações (figura 1): (I) todos os indivíduos apresentam um sítio de restrição para *HaeIII* (GGCC) na posição -417 a -414 (considerando o início da tradução), assim todos os segmentos amplificados são digeridos neste sítio de restrição; (II) indivíduos homocigotos CC apresentam em ambos cromossomos o nucleotídeo C na posição -260 do promotor do gene CD14, na qual encontra-se um sítio de reconhecimento para *HaeIII* (GGCC). Após a digestão com *HaeIII*, foram detectados, portanto, três fragmentos de DNA resultantes (204pb, 201pb e 155pb); (III) indivíduos homocigotos TT apresentam em ambos cromossomos a substituição de base nucleotídica C→T na posição -260 do promotor do gene CD14. Assim, o sítio de restrição para *HaeIII* é perdido, e no gel de agarose são observados apenas dois fragmentos de DNA (359pb e 201pb); (IV) indivíduos heterocigotos TC apresentam 4 fragmentos de DNA após a digestão (359pb, 204pb, 201pb e 155pb).

**Análises estatísticas:**

A análise principal foi em cima de curva de sobrevivência. Para tal usamos os procedimentos do Kaplan-meier. Para testar a igualdade das distribuições de sobrevivência usamos a estatística Log-Rank para o qual foi considerado  $p \leq 0.05$ , como significativo. Os resultados descritivos de variáveis contínuas foram demonstrados usando desvio padrão e contagem e porcentagem para dados categóricos.

As análises foram feitas em um programa de computador SPSS 11.5 software (SPSS Inc. USA).

**RESULTADOS**

A figura 2 mostra um quadro de distribuição dos pacientes. Como nós podemos ver, 71 pacientes que apresentaram algum tipo de infecção foram incluídos. Destes pacientes, 53 apresentaram sepse (75%) e 37 entraram em choque (51%). A sobrevivência entre os 71 pacientes incluídos neste estudo, foi de 26 (37%) e nenhuma diferença estatística foi encontrada para o sexo ( $p=0.90$ ) (ver Fig 3).

Para a avaliação da sobrevivência em relação a idade, agrupamos todos os pacientes em três grupos, baseados na estratificação por quartis : Grupo 1 incluiu idades entre 14 a 43 anos (primeiro quartil;  $n=18$ ); Grupo 2 incluiu idades entre 44 a 69 anos (segundo e terceiro quartis;  $n=36$ ) e; Grupo 3, idades de 70 e 95 anos (quarto quartil;  $n=17$ ). Esta estratificação da idade revelou uma diferença estatística significativa na sobrevivência ( $p=0.05$ ), favorecendo os jovens (61%) contra os mais velhos (24%). Pacientes de meia-idade ficaram em um padrão intermediário (33%)(ver Fig. 4)

Para avaliar o poder do polimorfismo C-260T como prognóstico em pacientes infectados da UTI, nós realizamos uma análise de curva de sobrevivência, utilizando os procedimentos de Kaplan-Meier. Os resultados mostraram uma diferença estatística significativa a favor do genótipo TT (62% sobreviventes) contra genótipo não-TT (26% sobreviventes;  $p=0.02$ ) (ver Fig. 5).

Como foi encontrado que idade é um parâmetro relevante na sobrevivência de pacientes internados na UTI (ver Fig. 4), nós testamos a performance do genótipo TT contra a estratificação da idade. Os resultados revelaram que entre os pacientes com meia-idade, aqueles com o genótipo TT desempenham-se melhor do que os pacientes com o genótipo não-TT ( $p=0.05$ ) (ver Fig. 6). Os resultados mostraram

também que os genótipos do polimorfismo C<sub>-260</sub>→T parecem não ter poder de prever o prognóstico no caso do grupo de jovens (idades entre 14-43; p=0.43), e tampouco no grupo dos mais velhos (idades entre 70-95; p=0.77).

O mesmo teste foi feito com pacientes sépticos e pacientes em choque. Nós verificamos o mesmo padrão, onde pacientes TT sépticos e de meia-idade (grupo 2) sobrevivem melhor (p=0.02) e o grupo 1 e 3 não apresentam diferenças estatísticas significantes (grupo 1, p=0.68; grupo 3, p=0.63).

Além disto, nós testamos a sobrevivência de ambos genótipos contra os escores do SOFA. Para isto, nós dividimos os pacientes em 3 grupos de acordo com a evolução do SOFA ao longo da primeira semana de internação na UTI. 34 pacientes (10 TT e 24 não-TT) tiveram escores do SOFA reduzidos no dia 7 (SOFA7<SOFA1), 9 pacientes (2 TT e 7 não-TT) não alteraram o escore do SOFA (SOFA7=SOFA1) e 28 pacientes aumentaram o escore do SOFA no dia 7 (SOFA7>SOFA1). Para os primeiros dois grupos, a sobrevivência para ambos genótipos não alcançou diferença estatística significativa (SOFA7<SOFA1, p=0.21; SOFA7=SOFA1, p=0.68). O último grupo (SOFA7>SOFA1) apresentou uma diferença muito significativa a favor do genótipo TT (Sobrevida TT = 56%; sobrevida não-TT = 0%; p=0.017)(ver Fig. 7).

## DISCUSSÃO

Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) são alterações em uma única base em regiões idênticas do genoma presentes em, pelo menos, 1% dos indivíduos. Muitos SNPs têm sido utilizados para mapear genes associados com doenças humanas. Foram relatados 48196 SNPs detectados por análises estatísticas em *human expressed sequence tags* (ESTs), as quais são regiões associados com segmentos codificantes de genes (20). Tais SNPs demonstraram ser uma ferramenta eficiente na detecção de regiões associadas com doenças. O estudo de SNPs na saúde humana pode ser útil para fazer recomendações no sentido de direcionar iniciativas de atuação aos focos que necessitam maior atenção e investimento em pesquisa.

Nosso estudo vem afirmar que o CD14 pode ser considerado como um gene candidato para respostas variáveis estados fisiológicos que envolvem infecções. Os atuais estudos com SNPs são concentrados principalmente em genes que se espera influenciar diretamente a resposta a uma determinada droga ou doença

(21). Nós propusemos um estudo abrangente, com pacientes com diferentes focos ou graus de infecção respondendo a ação diferencial de alelos de um único gene constitutivo. Nossa análise é caracterizada como “Sequenced Based” ou estratégia baseada em seqüências (21), o SNP do CD14 que foi estudado é potencialmente funcional uma vez que pode estar interferindo quantitativamente na capacidade transcricional do gene.

As conclusões sobre o efeito diferencial dos alelos deste polimorfismo específico do CD14 sob o fenótipo, no entanto, não consideraram a variação de outros genes envolvidos no processo de resposta às infecções. As respostas às infecções são influenciadas por um grande número de produtos gênicos e, certamente, a importância do polimorfismo no gene em questão pode depender de polimorfismos em outros genes.

De todas formas, nossa pesquisa possibilita a obtenção de estimativas de valores preditivos positivos e negativos, característicos de estudos prospectivos, uma vez que podem ser associados à clínica através da identificação de variantes causais que correlacionam fenótipo-genótipo. Além disto, nossos resultados podem ser úteis para direcionar o estudo sobre a real interferência funcional da mutação sobre a expressão do gene. Tal avaliação funcional pode ser explorada para a aplicação clínica e farmacológica.

Quando bem estabelecido, o conhecimento de variantes genéticas que ofereçam significantes valores prognósticos sobre como pacientes responderão aos tratamentos, beneficiarão pacientes que poderão contar com um procedimento específico apropriado ao seu genótipo e beneficiarão também às estruturas de saúde, já se prevê melhorias na eficácia no tratamento do paciente.

Os estudos de desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* – LD) buscam identificar variantes genéticas que poderiam aumentar a suscetibilidade para uma doença ou fenótipo de interesse, estando em maior freqüência entre os indivíduos afetados do que entre os controles (22). Contudo, o estudo particular de cada população é importante, uma vez que o padrão de LD medido nos dados humanos e a utilização dos SNP's variam muito (22).

É sempre importante considerar que os valores prognósticos encontrados em nosso estudo podem direcionar, mas não, ser diretamente aplicados a outras populações em decorrência das grandes particularidades étnico-biológicas.

Nosso estudo incluiu indivíduos residentes no sul do Brasil, uma população de origem eminentemente européia. Uma outra população poderá apresentar padrões diferentes de LD entre os alelos do CD14 e outros segmentos genômicos

e, conseqüentemente, valores prognósticos diferentes. As variações de SNP's e o grau de LD com outros genes são específicos em cada população e não dispomos ainda do conhecimento sobre a freqüência de alelos e padrões de LD entre os SNP's em cada população étnica (23).

Neste estudo, nós encontramos uma evidência de associação entre o polimorfismo C<sub>-260</sub>→T e a sobrevivência dos pacientes com infecção internados na UTI. Os pacientes com o genótipo TT apresentaram uma menor taxa de mortalidade quando comparados aos com o genótipo não-TT. Mesmo quando discriminamos os pacientes sépticos dos não-sépticos, ou com choque *versus* os sem choque, o padrão permaneceu o mesmo, especialmente no grupo de meia-idade. Estes achados estão, de alguma forma, em conflito com um estudo recentemente publicado (24).

Acreditamos que existam várias explicações possíveis para estas discrepâncias. Primeiramente, nós não filtramos ou segregamos por idade, sexo ou raça, como outros autores já fizeram. Em segundo lugar, pacientes com vários graus de severidade patológica, desde uma leve infecção à um choque severo, foram incluídos. Achamos que a estratégia que usamos está mais de acordo com a melhora real e prática da UTI, e que melhor representa a realidade da rotina diária de um hospital universitário.

Para explicar porque o grupo de meia-idade teve uma melhor performance com o genótipo TT, sugerimos a hipótese de que o grupo dos mais velhos (70-95 anos) tem o sistema imune tão debilitado que não conseguem se beneficiar do genótipo TT. Por outro lado, o grupo de jovens (14-43 anos) provavelmente apresentam melhor capacidade de equilibrar as reações pro-antiinflamatórias e, assim, superar a infecção, por isso o genótipo TT não representa qualquer melhora significativa no sistema imune. Segundo Bone (25) já colocou, as patologias infecciosas em geral e as sepse em particular são eventos multifatoriais que produzem reações orgânicas que alternam dinamicamente entre respostas pro e anti-inflamatórias. A superação de uma infecção severa depende principalmente da capacidade do corpo de modular o equilíbrio entre as forças opostas. Nós propomos que os pacientes de idade intermediária tenham mais flexibilidade em controlar a disponibilidade do sCD14 durante a evolução da doença. Sendo assim, eles podem modular melhor a dinâmica dos eventos. Na nossa opinião, como acontece com os receptores solúveis de TNF $\alpha$  (26), o aumento da concentração sérica do sCD14 (uma característica do genótipo TT) pode ser um fator de proteção que auxilia o sistema imune a equilibrar melhor as ações pró-anti-inflamatórias.

Para confirmar esta hipótese é necessário monitorar os níveis de sCD14 ao longo do tempo e comparar os dados entre os pacientes TT e os não-TT.

Na luz dos nossos achados, apesar da limitação deste estudo, podemos concluir que existem evidências para suspeitar que um portador do genótipo TT poderia representar um prognóstico positivo de sobrevivência no caso de uma infecção que leva à internação na UTI, especialmente em uma idade entre 44 e 69 anos.



## REFERÊNCIAS

1. Goyert SM, Ferrero E, Retting WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM: The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. **Science** 1988; 239:497-500
2. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM: The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. **J Immunol** 1988; 141:547-52
3. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science** 1990; 249:1431-3
4. Haziot A, Tsuberi B, Goyert SM: Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of TNF $\alpha$  in response to LPS. **J Immunol** 1993; 150:5556-65
5. Ulevitch RJ: Toll gates for pathogen selection. **Nature** 1999; 401:755-756
6. Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ: The toll of innate immunity on microbial pathogens. **N Engl J Med** 1999; 340:1834-1835
7. Landmann R, Reben AM, Sansano S, et al: Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. **J Infect Dis** 1996; 173:661-668
8. Schütt C: Molecules in focus: CD14. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31 545-549
9. Karina R, Matsumoto S, Higashi H, et al: The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today** 1999; March: 123-132
10. Landmann R, Zimmerle W, Sansano S, et al: Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram-negative septic shock. **J Infect Dis** 1995; 171:639-644
11. Burgmann H, Wincler S, Locker GJ, et al: Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in Gram-positive sepsis. **Clin Immunol Immunopathol** 1996; 80: 307-310
12. Long JY, Xue YN, Sun L, et al: Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene. **Shenh Wu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan** 1998; 25: 377-378
13. Ferrero E, Goyert SM: Nucleotide sequence of gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. **Nucleic Acid Res** 1998; 16: 4173
14. Zhang DE, Hetherington CJ, Tan S, et al. Sp1 is critical factor for the monocyte specific expression of human CD14. **J Biol Chem** 1994; 269: 11425-11434

15. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, et al. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989; 73: 284-289
16. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin SO, et al. Association of a Promoter Polymorphism of the CD14 gene and Atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 965-69
17. Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, et al. C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and miocardial infarction in Ludwigshafen Risk and cardiovascular health (LURIC) Study. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1249-52
18. Koch W, Kastrati A, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. CD14 gene - 159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction. *Am Heart J* 2002; 143: 971-76
19. Gomez J, Colli ML: Prognóstico. In: Dias FS: Choque, 2002. p 387-403. Porto Alegre. EDIPUCRS
20. Irizarry K, Kustanovich V, Li C, Brown N, et al. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphism in human expressed sequences. *Nature Reviews Genetics* 2000; 26: 233-236
21. David BG, Sarah KT, Sanjay MS. Pharmacogenetics goes genomic. *Nature Reviews Genetics* 2003; 12: 937-947
22. Jeffrey DW, Jonathan KP. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetic* 2003; 4: 587-597
23. Cristopher S, Carlson MA, Eberle MJ, et al. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nature Reviews Genetic* 2003; 33: 518-521
24. Gibot S, Alain C, et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 2002; 30 (5): 969-973
25. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24 (7): 1125-28
26. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, et al: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998; 26:1793-1800

## LEGENDAS

**Figura 1.** Visualização dos fragmentos de DNA em eletroforese com Agarose/Brometo de Etídio/TBE, dos pacientes (uma amostra representativa). (MW) padrão de banda de peso molecular de 123bp (GIBCO-BRL). Tamanho de fragmentos indicado a esquerda; produto de (PCR) amplificado de 560bp; padrão de banda esperado para heterozigoto TC (TC), homozigoto TT (TT) e homozigoto CC (CC). Tamanho de fragmentos indicados a direita.

**Figura 2.** Fluxograma de inclusão de pacientes. Um paciente foi inicialmente excluído porque a informação sobre o genótipo CD14 foi perdida. Outros 15 pacientes foram excluídos porque não foram encontrados focos de infecção durante a internação na UTI.

**Figura 3.** Curva de sobrevivência em relação ao sexo (n=71; sobreviventes femininos, 33%; masculinos, 39%; total, 37%). Não há diferença significativa (p=0.09).

**Figura 4.** Curva de sobrevivência por idade. Grupo 1(quartil 1) sobrevive melhor (n=18) e o grupo 3 (quartil 4) apresentou o pior índice de sobrevivência (n= 17) (p=0.05).

**Figura 5.** Curva de sobrevivência por genótipos genótipos TT (n=21) versus não-TT (n=50) (p=0.02).

**Figura 6.** Curva de sobrevivência em pacientes do grupo 2 (quartil 2 e 3) (idade 44-69 anos, n=37; genótipo TT *versus* não-TT, p=0.05)

**Figura 7.** Curva de sobrevivência em pacientes que tiveram um aumento no escore SOFA ao final de uma semana de internação na UTI. O genótipo TT apresentou sobrevida maior do que os não-TT (p=0.017) .

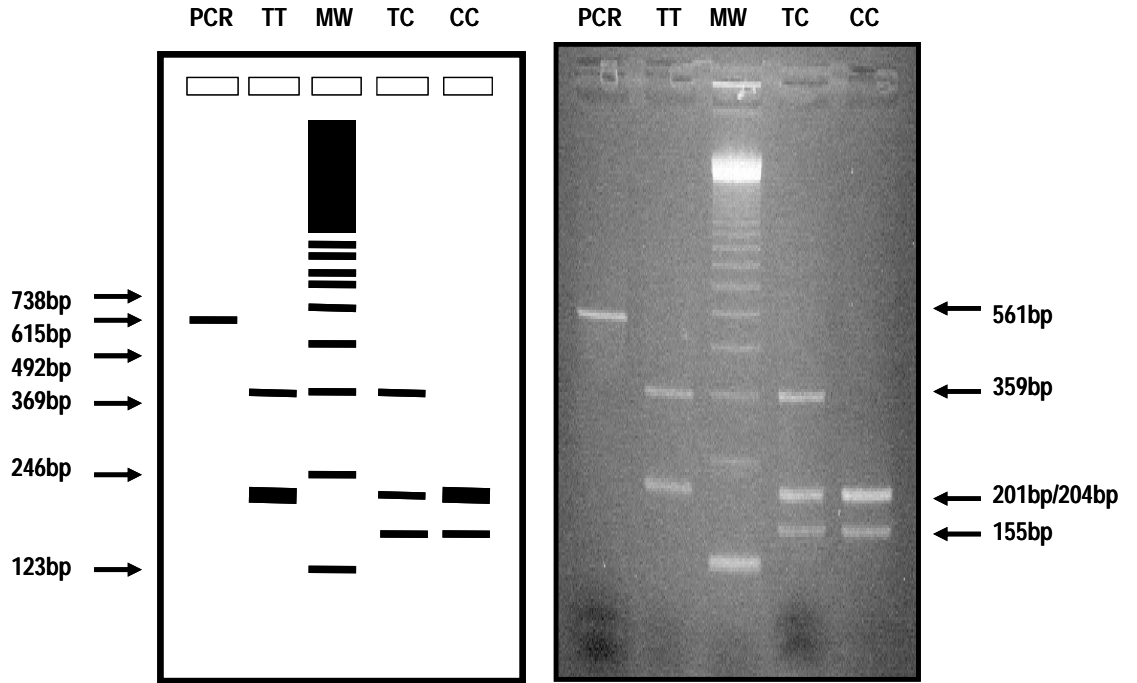


FIGURA 1

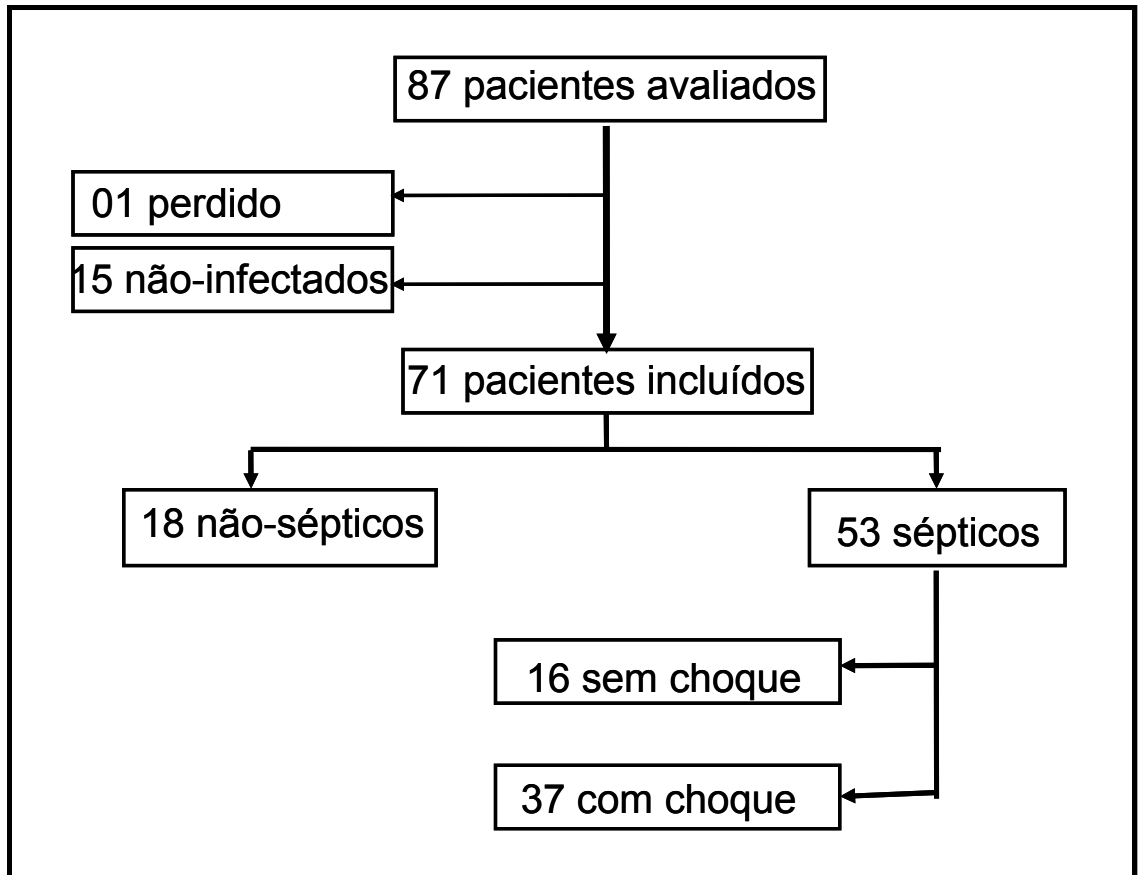
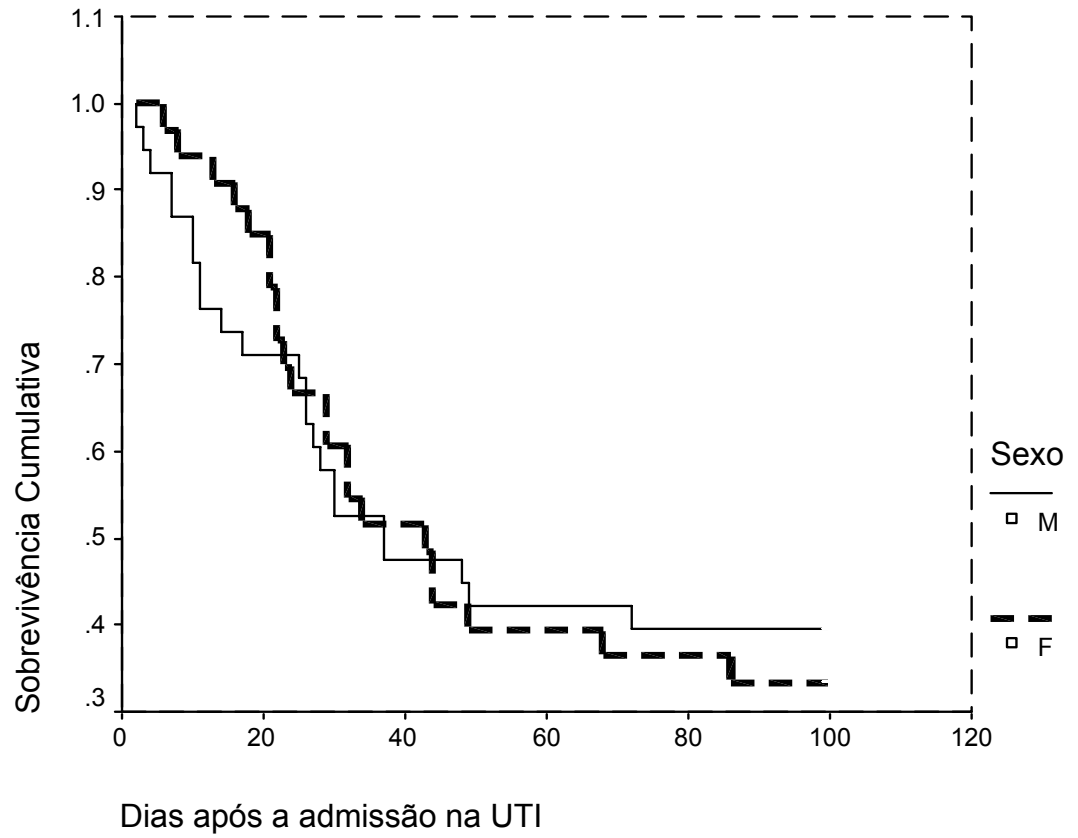
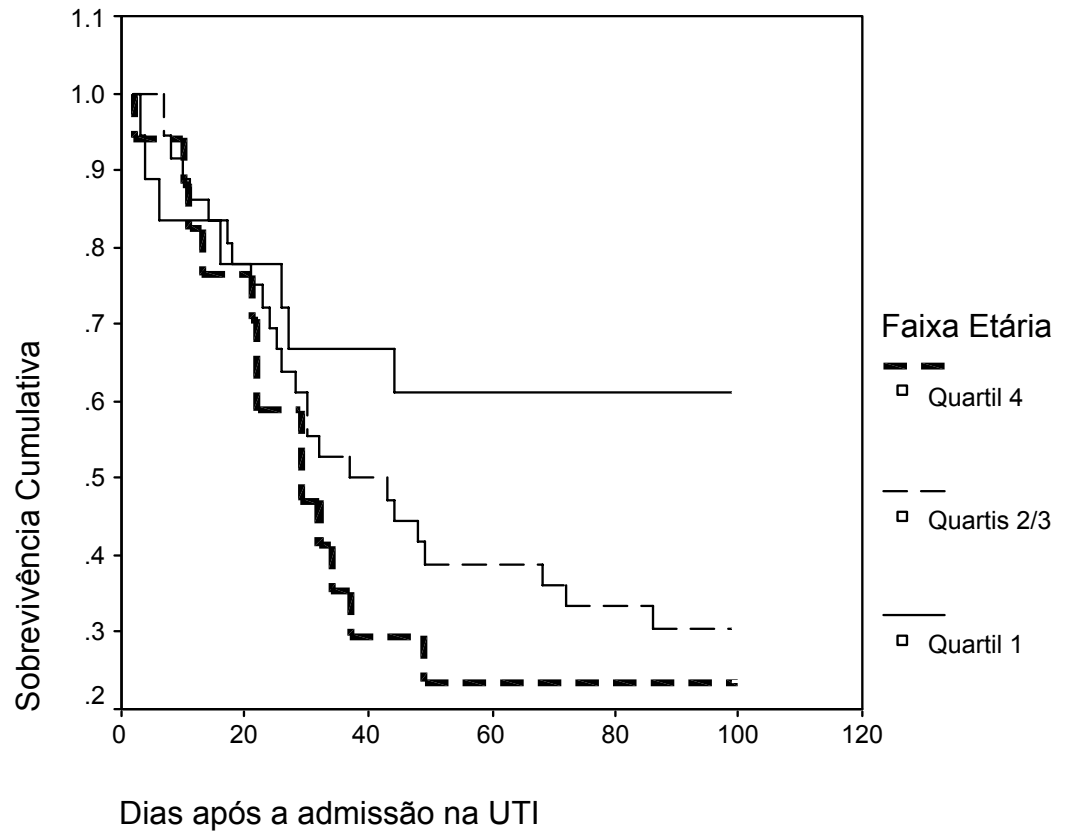
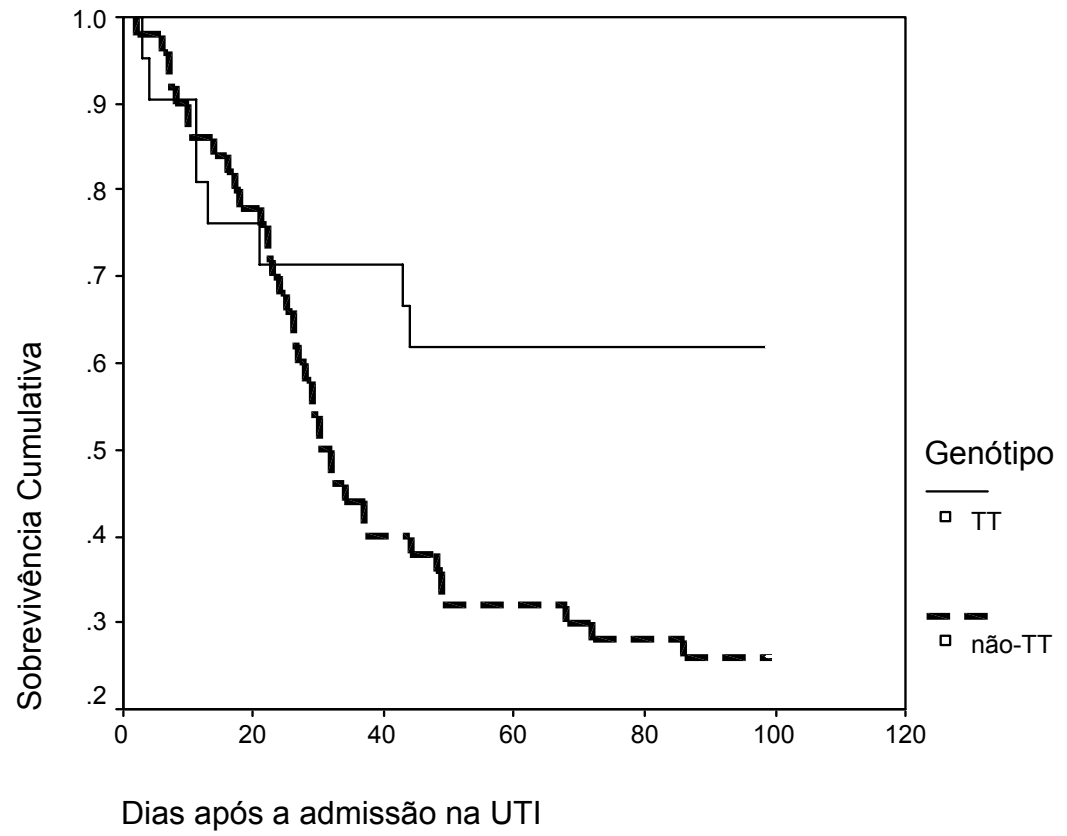


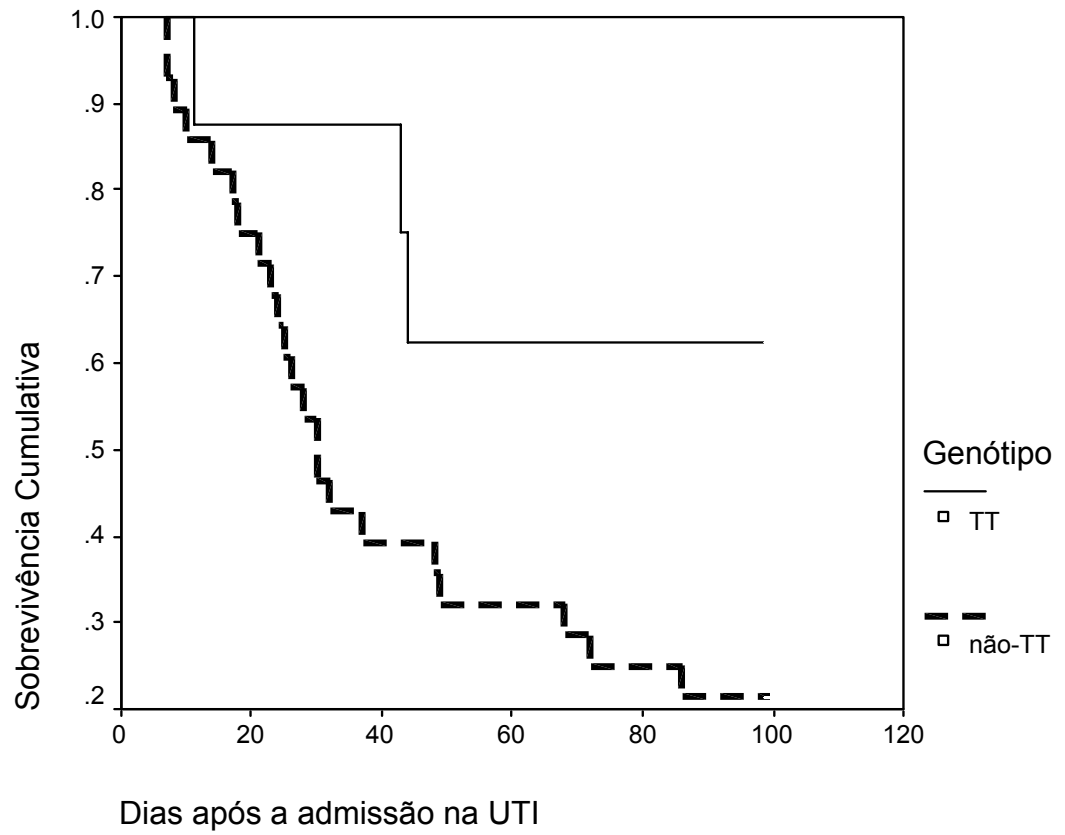
FIGURA 2

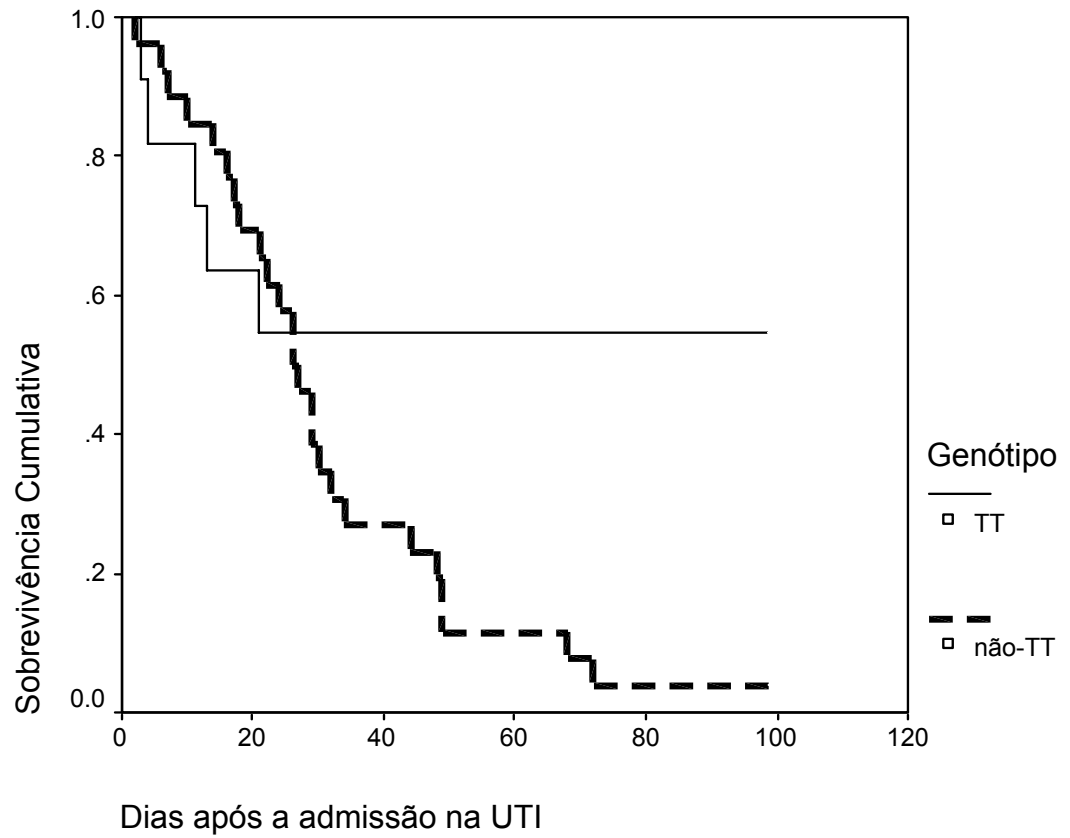
**CURVA DE SOBREVIVÊNCIA****FIGURA 3**

**CURVA DE SOBREVIVÊNCIA****FIGURA 4**

**CURVA DE SOBREVIVÊNCIA****FIGURA 5**



**CURVA DE SOBREVIVÊNCIA****QUARTILS 2 E 3****FIGURA 6**

**CURVA DE SOBREVIVÊNCIA****SOFA 7 > SOFA 1****FIGURA 7**

## 5.2. ARTIGO 2

### **O polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora da angiotensina como um indicador para a suscetibilidade e melhora em pacientes de UTI.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; José L. S. Ferraro; Carolina Franco; Luiz Glock, PhD; Luiz C. D'Ávila; Clarice S. Alho, PhD; Jarbas R. de Oliveira, PhD.

- Maria Helena Albarus / MSc / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-CM), Porto Alegre, RS - Brazil
- Fernando Suparregui Dias / MD / Hospital São Lucas (HSL). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- José Luis S. Ferraro/ Biólogo/ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Carolina Rosa Franco / Bióloga / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Luiz Glock/ PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Cláudio D'Ávila / Biólogo / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Clarice Sampaio Alho / PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil
- Jarbas Rodrigues de Oliveira / PhD / Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, RS - Brazil

O artigo será enviado para a revista Critical Care Medicine.

**The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism as an indicator for outcome in critical care patients.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; José L. S. Ferraro; Carolina Franco; Luiz Glock, PhD; Luiz C. D'Avila; Clarice S. Alho, PhD; Jarbas R. de Oliveira, PhD.

**Objective:** Evaluate thoroughly a population of patients admitted in the ICU using scores which measure organ condition concerning their outcome; (II) identify which indicators are better for determining survival of the population studied; and (III) verify if the differential inheritance of the polymorphic variants of the ACE gene can confer accuracy in the prognostic power of the scores.

**Design:** Prospective, observational study.

**Setting:** Medical Intensive Care Unit (ICU) in a University Hospital (HSL/PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil).

**Patients:** Eighty six consecutive ICU admitted patients.

**Intervention:** ACE gene polymorphism analysis of patients admitted in the ICU and their respective APACHE II, MODS, and SOFA scores.

**Measurements and Main Results:** Eighty six patients were analyzed and evaluated during admittance using APACHE II, MODS, and SOFA scores. Blood was collected for ACE gene polymorphism genotyping. A significant association was found among age, SOFA day-1, and SOFA day-1 *minus* SOFA day-7 value, independently, and survival ( $p=0.002$ ;  $p=0.002$ ; and  $p<0.001$ ). No statistically significant differences were found among gender, length of hospital stay, or age ( $p=0.29$ ;  $p=0.63$ ;  $p=0.41$ ) concerning I/D polymorphism genotypes. Likewise, no difference was found concerning the degree of organ dysfunction obtained on admission day of the patients among the scores evaluated (APACHE II, MODS, and SOFA) and their corresponding genotypes ( $p=0.69$ ;  $p=0.49$ ; and  $p=0.72$ ). No significant difference was either found among sepsis and shock concerning genotypes ( $p=0.264$  and  $p=0.931$ ).

**Conclusion:** The analysis of the ACE polymorphism genotypes and the organ dysfunction scores of the patients admitted in the ICU showed that the patients that survived presented lower values for age and admittance day scores, and had a significant reduction of the values obtained by SOFA during the first week of ICU stay. However, the influence of the genetic inheritance of the I/D polymorphism was not detected in the clinical outcome.

**Key Words:** APACHE II, MODS, SOFA; ECA, I/D polymorphism; diagnosis test; genetic risk factors; Intensive Care Unit.

Patients admitted to an Intensive Care Unit (ICU) are characterized by presenting a complex physiopathological state due to multiple serious derangements, in which the mortality rate ranges from 30 to 50% (1). During the past 20 years, ICU risk-prediction models have undergone significant development, validation, and refinement. Among the general ICU severity of illnesses scoring systems, the Acute Physiology and Chronic Health Evolution II (APACHE II) has become one of the most accepted and used (2). To risk-adjust patients with longer, more severe illnesses, several models of organ dysfunction or failure have become available, including the Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) (3), and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (4). Constant innovations in these instruments can adjust them to a more specific group of patients, such as the elderly or patients with known genetic predisposition, in order to offer the ICU patients a heightened quality in prediction.

The identification of the genetic profile can allow in a very particular manner the analysis of the individual risk of patients, given that the genetic inheritance can predispose them to a positive or negative outcome. The understanding of the molecular mechanisms of an organ dysfunction can elucidate how it is expressed or modulated by genetic inheritance, (3-5) and how such information can be used in prognostic scores (6).

The human genome presents around 30 thousand genes, codifying more than 100 thousand proteins, where millions of polymorphic variations have already been detected. These structural or regulatory modifications can alter diverse metabolic functions of the involved organism, such as phenotypical alterations (7-11). In consequence to this, the organ dysfunctions are accompanied by the expression of hundreds of genes that will be directly involved in the recovery capacity of the individual (12).

Amongst all of these genes, we considered the one that codifies for the angiotensin-converting-enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1) which has a key role in the vascular function. ACE interferes indirectly towards the recovery of the patient, given that its expression has a broad systemic repercussion (13, 14).

Factors that modify the performance of the vascular function can lead to cardiovascular complications in those individuals that already present some type of physiological derangement (14). In a healthy organism, a fine regulatory circuit that maintains the corporal homeostasis does the regulation of the eletrolityc balance

and energetic metabolism. Protein products of genes that can express themselves differently depending on their polymorphic form modulate such regulation.

The renin-angiotensin system regulates the vascular homeostasis in the human being. The angiotensin II is one of the most powerful vasoconstrictor substances. Its action is systemically reflected on the simultaneous constriction of arterioles, increasing peripheral resistance, which causes an elevation in blood pressure. Excess in cardiac effort, incidence of vascular stenosis, and hemorrhage due to the disruption of cerebral or renal vessels are lethal effects of the systemic peripheral vasoconstriction. The production and metabolism of angiotensin II consists in three main steps, which include an enzymatic cleavage of the angiotensinogen into angiotensin I by rennin; the degradation of angiotensin I by a few peptides; and the conversion of angiotensin I in angiotensin II by ACE (15, 16).

The gene that codifies for ACE is located on chromosome 17q23, where an insertion/deletion polymorphism was detected, represented by a respective presence or absence of a repeated Alu sequence of 287bp inside intron 16 (17). This polymorphic variation of the gene generates three possible genotypes (II, ID, and DD), which have been associated to a differential activity of circulating ACE, reflecting on the risk development of diseases due to high blood pressure (17-23). In these studies, a cumulative inheritance of the D allele would be a genetic risk factor for cardiovascular disease. However, not all of the populations studied show agreement to this conclusion. Meta-analysis and studies with an elevated number of subjects have shown flaws in the direct association among the inheritance of the D allele and cardiovascular risk (24, 25).

Due to the fact that it is an intronic polymorphism, this variable in question can merely be a silent variation. However, some of the variables can be found linked to another mutation found in another genomic portion, which is the main responsible for the phenotypical variation observed. The association among the inheritance of the I or D allele and vascular performance would depend, therefore, on the extension of the disequilibrium linkage which could vary among different populations (26).

In this study, we determined the allelic frequencies of the I/D polymorphic variant of the ACE gene in individuals admitted in the ICU, and compared the genetic inheritance to the organ dysfunction through scores designed to reflect the physiological dysfunctions of patients (27, 28), and the clinical outcome. Our purposes were to: (I) evaluate thoroughly a population of patients admitted in the ICU using instruments that measure their organ condition related to outcome; (II) identify which indicators are better to determine survival in the population studied;

and (III) verify if the differential inheritance of the polymorphic variants of the ACE gene can confer accuracy in the prognostic power of the scores. With this, we hope to provide information about the genetic analysis that can be used for innovative purposes and refinement of these prognostic scores in the ICUs.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients:**

In this analysis were included 86 patients (44 male and 42 female) admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of São Lucas Hospital of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

The age of the patients varied from 14 to 95 years old (mean age  $56.1 \pm 18.9$  yrs). Only the first admittance in the ICU was considered of those patients that were admitted more than once. The admission diagnosis was done according to the APACHE II score. The patients were then distributed as follows: one with heart failure; four with metabolic/renal illness; nine with cardio respiratory arrest; one with digestive hemorrhage; one with cardiovascular disease; three with respiratory problems; five with neurological problems; one with rhythm disturbances; one with gastrointestinal disease; 18 with infections; 31 with sepsis; one with coronary artery disease; one after renal transplantation surgery; one after gastrointestinal tract neoplasm surgery; one with hemorrhagic shock; two with hemorrhage; two with perforation/obstruction of the gastrointestinal tract; two with trauma; and one with chronic obstructive pulmonary disease.

Organ dysfunction was evaluated by SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score during the first week of ICU stay. Patient survival was considered independently from the length of ICU or hospital stay. This research was approved by the Scientific Committee of the institution and by PUCRS Research Ethics Committee, approval on April 2002 – process nº 01/01088, having complied with the International Research Regulations on human beings. All of the patients signed a Free Will Consent Form.

### **Measurements of the patients' health state:**

The monitoring was done using the following evaluations: (I) APACHE II score (28); (II) SOFA: describes the degree of the daily organic dysfunction of the patient considering six organic systems, quantifying their dysfunction on a scale from zero to four, similar to the MODS score. In addition to the MODS score, the SOFA score foresees hospital events, length of hospital stay and costs (28, 29).

SOFA-day: the sum of all the inferred values for each of the six systems evaluated on the indicated day. SOFA-day1: a score of the organic dysfunction on admission day of the patient.

The evolution of the organic condition of the patients was monitored and registered by the MODS-day and SOFA-day scores during the seven days of the first week of stay in the ICU. The degree of organic dysfunction of the patients at the end of the first week of stay was obtained by the difference of the MODS-day7 and SOFA-day7 (referring to the seventh day of stay) minus the score on admission day (MODS-day1 and SOFA-day1).

### **Genomic DNA Isolation**

The genomic DNA was extracted from leukocytes of each patient. These cells were obtained from 5ml samples of peripheral blood that was collected in a sterile system with EDTA and kept refrigerated at 4°C, or frozen at -20°C (30).

### **Genotyping of the I/D Polymorphism of the ACE gene**

The I/D polymorphism of ACE was analyzed as initially described (31): a segment of intron 16 of the ACE gene was amplified with forward: 5' - CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - 3' and reverse primers: 5' - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - 3', in the conditions of initial denaturing at 94°C for 10 minutes; followed by 35 cycles composed by denaturing at 94°C for 1 minute, hybridization at 60°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute; and final extension at 72°C for 5 minutes. The genotype of each individual was determined by the electrophoresis analysis (2% agarose gels / ethidium bromide / TBE) of the amplified DNA segments.

The genotyping was based on the following informations: (I) homozygote II individuals present in both chromosomes an insertion of an Alu sequence inside intron 16 which generates a single amplified segment of 490bp; (II) homozygote DD individuals present in both chromosomes the absence of this Alu sequence inside intron 16 which generates a single amplified segment of only 190bp; (III) Heterozygote ID individuals present in the agarose gel both fragments of DNA (490bp and 190bp).

### **Statistical analysis:**

To analyze the data, descriptive and inferencial statistics were done. Amongst the descriptive techniques, the frequency tables, mean standard deviation, and proportion were utilized. The inferencial techniques are those associated to the



assumption tests, which were utilized such as parametric (t-Student test, ANOVA, and multiple Tukey comparisons) or as non-parametric tests (chi-square, and exact Fisher test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis, and logistic regression). The data was analyzed in the statistical package SPSS for Windows version 11.5. The distribution of the patients' allelic and genotypical frequencies was compared by the chi-square test with the anticipated values by the equilibrium model of Hardy-Weinberg. For the survival analysis Kaplan-Meier statistical procedures were used, being that the Log Rang test was used for the significant difference evaluation. The level of significance was 5%.

## RESULTS

### **Characterization of the patients on admission day in the ITU related to survival during hospital stay**

Regarding the outcome of the survival in the hospital, patients were divided into two groups: (I) survivors (n=35): individuals that survived during their stay in the hospital, and (II) nonsurvivors (n=51): individuals that did not survive during their stay in the hospital. No significant difference was observed between the patient gender associated to survival (Pearson chi-square test;  $p=0.69$ ), or amongst length of ICU stay in the two groups (Mann-Whitney;  $p=0.21$ ). However, a highly significant association was observed between the age and survival, being that the mean age of the survivors ( $48.4\pm 18.6$ ) is significantly lower than that of the nonsurvivors ( $61.3\pm 17.4$ ) (t-Student;  $p=0.002$ ).

Scores were obtained regarding the organic dysfunction of the 86 patients on admission day in the ICU through the APACHE II, MODS, and SOFA instruments, independently. The organic dysfunction scores obtained by the three instruments, for each patient, presented a highly significant correlation (Spearman test;  $p<0.001$ ). A highly significant correlation was observed between the admission day scores in the ICU for any one of the instruments, and survival, and that all of the survivors' individual scores (APACHE II =  $18.1\pm 7.8$ ; MODS-day1 =  $3.7\pm 2.3$ ; SOFA-day1 =  $5.1\pm 3.2$ ) are significantly lower than those of the nonsurvivors (APACHE II =  $23.6\pm 8.0$ ; MODS-day1 =  $5.5\pm 3.0$ ; SOFA-day1 =  $7.9\pm 3.5$ ) (t-Student;  $p=0.002$  for APACHE II and MODS, and  $p<0.001$  for SOFA )(Table 1).

### **Characterization of the patients during their first weeks' stay in the ICU related to survival during hospital stay**

Daily scores were obtained during the first week of stay in the ICU, of the 86 patients regarding the dysfunction of six organic systems through the MODS and SOFA instruments. The analysis of the organic dysfunction measured by the two instruments during the week, showed highly significant correlation between both of them (Spearman test;  $p < 0.001$ ). By means of this motive, for posterior analysis only the values obtained by the SOFA score were considered.

In the survival group of patients the significant difference was observed between the date of admission scores (mean SOFA-day1 =  $5.11 \pm 3.22$ ) and the seventh day scores (mean SOFA-day7 =  $3.80 \pm 2.61$ ) (t-Student;  $p = 0.012$ ). On the contrary, the group of patients that did not survive during the length of stay in the hospital, there was no significant difference between the date of admission scores (SOFA-day1 =  $7.85 \pm 3.45$ ) and the seventh day scores (SOFA-day7 =  $8.15 \pm 4.16$ ) (t-Student;  $p = 0.44$ ), and that in this group of patients, the scores of the last days are higher (Figure 1)

### **Identification of prognostic indicators for survival**

The analysis of the logistic regression showed the isolated influences of age, SOFA-day1 scores, and SOFA-day7 *minus* SOFA-day1 values concerning survival ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ , and  $p = 0.012$ , respectively), and that the chance of survival increased the lower the values for each one of the three indicators. The logistic regression analysis showed the SOFA-day1 and age together could influence survival ( $p < 0.001$ ). Thus, the age, the SOFA-day1 score, and the organic dysfunction evolution during the first week of stay in the ICU were considered as independent prognostic indicators for survival.

Concerning age, the patients were grouped into two categories: (I) with age up to 50 years ( $n = 33$ ) and (II) with age over 50 years old ( $n = 53$ ). The chance of survival between the individuals with age up to 50 years old was 2.93 times in association to those with more than 50 years of age (IC=[1.20; 7.17]; Pearson chi-square test;  $p = 0.20$ ).

Concerning the SOFA-day1 score, the patients were grouped into two categories: (I) with SOFA-day1 below six ( $n = 42$ ) and (II) with SOFA-day1 above six ( $n = 44$ ). The chance of survival between the individuals with SOFA-day1 below six was 4.72 times in association to those with SOFA-day1 above six (IC=[1.86; 11.96]; Pearson chi-square test;  $p < 0.001$ ).

Concerning the evolution of the organic dysfunction during the first week of stay in the ICU, the patients that remained during a week in the ICU (n=66), after their admission were grouped into two categories: (I) with improvement, that is, with SOFA-day7 values lower than SOFA-day1 (n=37) and (II) without improvement, that is, with SOFA-day7 values higher or the same as SOFA-day1 (n=29). The chance of survival between the individuals that presented improvement by the end of the first week of their stay in the ICU was 3.83 in association to those that did not present improvement (IC=[1.34; 10.93]; Pearson chi-square test; p=0.01).

### **Effect of the inheritance of the polymorphic variants of the ACE gene.**

The 86 patients were genotyped for the I/D polymorphism of the ACE gene. The total frequencies of the genotypes (II=0.16; ID=0.43; and DD=0.41) and alleles (I=0.38; D=0.62) showed that the population is in Hardy-Weinberg equilibrium (Pearson chi-square test, p=0.71).

No statistically significant differences were observed for gender, length of hospital stay, or age of the patient in the three genotype groups (Chi-Square; p=0.29, Kruskal-Wallis; p=0.63 and ANOVA; p=0.41, respectively) (Table 2). Likewise, no significant differences were observed between the degree of organic dysfunction acquired on admission day of the patient in the ICU, for any one of the three instruments (APACHE II, MODS and SOFA) related to the genotypes (ANOVA; p=0.69, p=0.49 and p=0.72, respectively) (Table 2).

The patients were then divided into two categories, according to their genotype: (I) II+ID (n=51): homozygote individuals for the I allele (n=14) plus the heterozygote individuals (n=37) and (II) DD (n=35): homozygote individuals for the D allele. Likewise as presented in table 2, no significant difference was observed regarding gender (Pearson chi-square test; p=0.02), length of hospital stay (Mann-Whitney; p=0.46), age (t-Student; p=0.34) or SOFA-day1 score (t-Student; p=0.55) when the two groups were compared.

The figure 2 shows the daily mean values of the SOFA score acquired during the first week of stay in the ICU of the patients grouped by genotype. No significant difference was observed between the daily mean SOFA score during the seven days of the first week of the stay in the ICU and the genotype (t-Student; p=0.51).

The logistic regression analysis between age, SOFA-day1 score, SOFA-day7 *minus* SOFA-day1 value, and ACE genotype about survival show that the genetic data does not influence the prognostic power in survival, likewise as the

data of the I/D genotype of the ACE gene observed separately did not demonstrate to influence survival ( $p=0,913$ ).

The data of the I/D genotype of the ACE gene did not demonstrate to be associated to dysfunction in any of the six systems evaluated (respiratory, renal, hepatic, cardiovascular, coagulation and neurologic) when observed separately or altogether (ANOVA). Likewise, no statistically significant difference was observed between the incidence of sepsis and/or shock in the three genotype groups (Chi-Square;  $p=0.264$  and  $p=0.931$ , respectively).

Complementing the former analysis, using Kaplan-Meier statistical procedures, an analysis on survival was done, where the distribution of the decrease events was compared between the II+ID genotypes and DD genotypes during the period following 100 days after admission of the patient in the ICU (figure3). In this analysis no statistically significant differences were found ( $p=0.92$ ). The patients were then stratified according to three age groups (14-43 years old; 44-69 years old; and 70-95 years old), not being detected performance differences for survival between the group of patients with II+ID or DD genotypes in the three age groups ( $p=0.96$ ;  $p=0.57$ ; and  $p=0.30$ , respectively).

Finally, the distribution of the events for the stratified groups according to the APACHE II and SOFA indicators were analyzed, resulting in the absence of significant difference (APACHE II  $>21$ ,  $p=0.40$ ; APACHE II  $\leq 21$ ,  $p=0.25$ ) (SOFA-day7 $>$ SOFA-day1,  $p=0.72$ ; SOFA-day7=SOFA-day1,  $p=0.92$ ; and SOFA-day7 $<$ SOFA-day1,  $p=0.68$ ). This analysis confirms the absence of a relationship between the inheritance of the ACE alleles and the survival of the patients included in this study.

## DISCUSSION

The use of genetic information can serve as a prognosis in the medical practice (9, 32-34). Genetic data can be useful in the identification of susceptibility of an individual and can be included as another risk factor in the medical instruments designed to detect the physiological profile of the patient aiming towards a prognosis and treatment (3-5, 8, 35).

Currently, important instruments have been used in the medical field as risk indicators or for the outcome of the organic conditions of the patient, whereas the APACHE II, the MODS, and the SOFA score are among them. The scores resulting

from the application of these instruments, which have a prognostic purpose, reflect the health state of the patient with a purpose of practical utility. The inclusion of genetic predictive values to the referred instruments would be some form of increasing their accuracy. However, before the inclusion of the scores that reflect the risk due to the inherited characteristics, broadened population studies should be accomplished to indicate which polymorphic variations indicate morbidity markers.

Different inherited genetic variables can interfere in the susceptibility of each individual to determined biological weaknesses, predisposing him to different degrees of organic dysfunction. The study of the association between the inheritance of polymorphic genetic variables and the health state of a patient permits the genetic marker characteristics to be identified, which can be used as indicators in prognosis, prevention, and treatment of complex diseases. Patients admitted in the Intensive Care Units (ICUs) are individuals with highly debilitated health states. The complete and constant monitoring of this individual will help improve the interventions that are performed, enabling a more favorable outcome. Up to this moment, biochemical, physiological, and clinical data have been useful to define the deficit health state of the patient, and the monitoring of his response to the established treatment in search of his recovery.

We suggested that the inclusion of (the data referring to the) genetic characteristics can increase even more a heightened repercussion of the treatment and the accompaniment to the patients in an altered physiological state. Thus, in this study, besides the conventional data, we analyzed the genetic characteristics of the patients admitted in the ICU with the purpose to identify how substantial the genetic inheritance interferes in the therapy response and the final clinical outcome of each individual.

The analysis showed isolated influences concerning survival in age, SOFA-day1 scores, and SOFA-day7 minus SOFA-day1 values. This data was considered as an independent prognostic indicator for survival. The data of the I/D genotype of the ACE gene observed isolated or wholly did not show influence in survival, or in any other pathological phenotypic variation. That is, the I/D polymorphism of the ACE gene did not enable a refinement in the prognostic authority of the instruments concerning the outcome of the patient admitted in an ICU.

Important studies containing population analysis with more than one thousand individuals associated the inheritance of the D allele or the DD genotype to morbidity linked to dysfunction in the circulatory system (36-43). The ACE enzyme has an important role controlling two peptides involved in the vascular tonus modulation and the proliferation of the smooth muscle cells. This enzyme

participates in the bradycinin catabolism and conversion of the inactive Angiotensin I hormone into Angiotensin II, an octapeptide with a powerful vasoconstriction action that also stimulates the secretions of Aldosterone through the adrenal cortex. The most probable mechanism by which the D allele or DD genotype can increase the risk of the circulatory dysfunction would be through the vasoconstriction of the coronary arteries. Nevertheless, other, also important studies that had population samples containing more than one thousand individuals did not clearly evidence the association among the inheritance of the I/D polymorphism and alterations in the vascular system (44-52).

The analysis of the genetic results obtained in the present study should consider, at least, two main focal points: 1 – that the organic dysfunctions presented by the patients admitted in ICUs are multifactorial, which means, caused by the entire result of the expression capacity of these millions of genes that control the six organic systems. The expression capacity of these millions of genes is a reflection of the interferences of the many different genes in the human genome that are modulated by outside factors. 2 – the I/D (insertion/deletion) polymorphism is an allelic variation with a respective presence or absence of a repeated Alu sequence of 287bp inside the intron 16 of the ACE gene. Just as the insertions of the Alu family propagated during evolution (53, 54), inside the human genome, other hundreds of millions of mutations also altered the genome in diverse regions, and had the most diverse phenotypic repercussions. Due to the fact that we are dealing with an intronic polymorphism, the I/D variable of the ACE gene interferes directly in the synthesis of the Angiotensin-Converting-Enzyme or may be linked to some other mutation that could interfere in the synthesis (55). It was verified that the variations in the levels of ACE-mRNA were not related to the I/D polymorphism (56, 57). However, the serum levels of the ACE activity are associated to the D allele or the DD genotype in many populations (58). It is probable that the regulation of the ACE expression might be occurring at the post-transcription level, and that the I/D polymorphism might be a silent mutation linked to a second mutation that is the actual one responsible for the modulation of the vasoconstriction activity of ACE. This second mutation could be found inside the same ACE gene (in an exon or the 5' or 3' non translating region, for example) (58), or in another gene that regulates ACE activity. In such case, the incidence of a positive association between the D allele and the increase in the ACE activity, or a positive association between the DD genotype and the susceptibility to cardiovascular morbidity would depend on the extension of the linkage disequilibrium between the two polymorphic mutations.

These two focal points could explain, at least in part, the vast variation of the genetic effect on the phenotype. That is, the genotype – phenotype relationship could be disguised by influences and/or genomic and environmental interferences concerning the gene at study.

In the approximately 30 thousand genes in the human genome, codifying more than 100 thousand proteins, thousands of polymorphic variables that can cause structural or regulatory alterations in the diverse metabolic functions of the organism have already been detected (7). Thus, it is fundamental to conceive that, only after large scale population studies, with a vast number of individuals from different populations evaluated, would it be possible to conclude, in fact, that there is an association between the inheritance of certain genes or genetic markers and phenotype (3, 4, 8).

Our results were capable of indicating that the patients that survived presented lower values regarding age and scores on admission day, and significantly lower values acquired by SOFA during the first week of stay in the ICU. However, the differential inheritance of the I/D polymorphism was not capable of influencing the clinical outcome. Assuring that there was no bias of selection in the population analyzed, that is, it finds itself in Hardy-Weinberg equilibrium, and that on admission day in the ICU the three genotypes were equally distributed between all of the characteristics, we can infer that the analysis of the I/D polymorphism of the ACE was not a capable indicator for predicting susceptibilities or as a mortality risk for the patients in the ICU included in this study.

Nevertheless, more than six billions of human beings reside on the planet currently, distributed in genetically distinguishable subgroups with particular physiological fragilities. The results of our study can motivate and lead to new investigations, encouraging the use of genomic science and its applications in medical practices', in search for genetic markers that can be included as risk factors in medical instruments that have prognostic means.

**REFERENCES**

1. Vincent JL: Sepsis: The magnitude of the problem In. JL Vincent, J Carlet e Stum SM opal. The sepsis text 2002. Glower Academy Publisher, Norwell, U SA.
2. Rosenberg AL: Recent innovations in intensive care unit risk-prediction models. **Curr Opin Crit Care** 2002; 8:321-330
3. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient. **JAMA** 2000; 284: 22-29
4. Sander C: Genomic medicine and the future of health care. **Science** 2000; 287:1977-1978
5. Guttmacher AE, Collins, FS: Genomic Medicine. **N Eng J Med** 2002; 19: 1512-1520
6. Quinzii C, Belpinati F, Pignatti PF: Predictive genetic testing - new possibilities in determination of risk of complex diseases. **Croat Med J** 2001; 42: 458-462
7. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science** 1998; 280: 1077-1082
8. Roses AD: Pharmacogenetics and the practice of medicine. **Nature** 2000; 15: 857-865
9. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291: 1304-1351
10. Griffith LG, Grodzinsky AJ: Advances in Biomedical Engineering. **JAMA** 2001; 285: 556-561
11. Phillips JA: Genomic medicine: managing the complexity. **JAMA** 2001; 286: 1639
12. 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
13. Bauer PR: Microvascular responses to sepsis: Clinical significance. **Pathophysiol** 2002; 8: 141-148.
14. Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, et al: Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. **Int J Cardiol** 2001; 80: 161-172
15. Erdos EG: Angiotensin I - Converting Enzyme and the changes in our concepts through the years. **Hypertension** 1990; 16: 363-370



16. Kem D C; Brown RD: Renin-from beginning to end. **N Engl J Med** 1990; 323: 1136-1137
17. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al: An Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest** 1990; 86: 1343-1346
18. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature** 1992; 359: 641-644
19. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, et al: Angiotensin-I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J** 1993; 290: 33-40
20. Griendling KK, Murphy TJ, Wayne AR: Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation** 1993; 87: 1816-1828
21. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, et al: Angiotensin converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation** 1995; 92: 1387-1388
22. Beohar N, Prather A, Yu QT, et al: Angiotensin converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. **J Invest Med** 1995; 43: 275-280
23. Dakik HA, Mahmarian JJ, Verani MS, et al: Association of angiotensin-1-converting enzyme gene polymorphism with myocardial ischemia and potency of infarct related artery in patients with myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 1997; 29: 1468-1473
24. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, et al: A Meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. **Circulation** 1996; 94:708-712
25. Agerholm-Larsen B, Noderstaggard BG, Steffensen R, et al: ACE gene polymorphism-ischemic heart disease and longevity in 10150 individuals: a case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study. **Circulation** 1997; 95: 2358-2367
26. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) alleles in the Quechua, a high altitude South American native population. **Ann Hum Biol** 1999; 26: 375-380
27. Marshall JC: Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas. In: Dias FS: Choque, 2002. p 375-386. Porto Alegre. EDIPUCRS.
28. Gomez J, Colli ML: Prognóstico. In: Dias FS: Choque, 2002. p 387-403. Porto Alegre. EDIPUCRS

29. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, et al: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med** 1998; 26:1793-1800
30. 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; 19:5444
31. Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al: PCR detection of the Insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1) **Nucl Acids Res** 1992; 20:1433
32. Strachan T, Read AP: Human molecular genetics. *Bios Scientific Publishers Ltd. London* 1999
33. Fischer EP, Klose S: The Human Genome – The Diagnostic Challenge. *Boehringer Mannheim GmbH. R. Piper GmbH & Co. KG. München* 1996
34. Guttmacher AE, Jenkins J, Uhlmann WR: Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. **Am J Med Genet** 2001; 106: 216-222
35. Collins FS, McKusick VA: Implications of the Human Genome Project for medical science. **JAMA** 2001; 285: 540-544
36. Martínez E, Puras A, Escribano J, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. **J Hum Hypertens** 2000; 14:131-135
37. Qu H, Lu Y, Lin S: Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi** 2001; 35:408-411
38. Kimura M, Yokota M, Fujimura T, et al : Association of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with left-ventricular hypertrophy in Japanese women with essential hypertension; multicenter study of 1.919 subjects. **Cardiology** 1997; 88:309-314
39. Gardemann A, Fink M, Stricker J, et al: ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. **Atherosclerosis** 1998; 139:153-159
40. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, et al: Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. **J Hypertens** 1999; 17:1569-1575
41. Montgomery H, Brull D, Humphries SE: Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting

- enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital Heart J* 2002; 3:10-14
42. Taittinen L, Uhari M, Kontula K, et al: Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens* 1999; 12:858-866
  43. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, et al: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97:1766-1772
  44. Sugiyama T, Morita H, Kato N, et al: Lack of Sex-specific effects on the association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens Res* 1999; 22: 55-59
  45. Zaman MM, Yoshiike N, Date C, et al: Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study. *J Hypertens* 2001; 19: 47-53
  46. Fujimura T, Yokota M, Kato S, et al: Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1384-1390
  47. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, et al: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1969-1974
  48. Poirier O, Georges JL, Ricard S, et al : New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. *J Hypertens* 1998; 16: 1443-1447
  49. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, et al: Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 1999; 99: 340-343
  50. Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J* 1999; 20: 1318-1325
  51. Renner W, Pabst E, Paulweber B, et al: The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 2002; 165: 175-178

52. Poch E, La Sierra Ad A, González-Nuñez D, et al: Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 575-579
53. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T: LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature Genet* 2003; 35: 41-48
54. Batzer MA, Deininger PL: Alu Repeats and Human Genomic Diversity. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3: 370-380
55. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, et al: Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290: 33-40
56. Tamaki S, Iwai N, Ohmichi N, et al: Effect of genotype on the angiotensin-converting enzyme mRNA level in human atria. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 5: 305-308
57. Spruth E, Zurbrugg HR, Warnecke C, Erdmann J, et al: Expression of ACE mRNA in the human atrial myocardium is not dependent on left ventricular function, ACE inhibitor therapy, or the ACE I/D genotype. *J Mol Med* 1999; 11: 804-810
58. Kammerer CM, Gouin N, Samallow PB, et al: Two quantitative trait loci affect ACE activities in Mexican-Americans. *Hypertension* 2004; 43: 466-470

**LEGENDS****Table**

**Table 1.** Profile of the patients associated to survival in the hospital related to gender, length of stay in the hospital, age, and organic dysfunction score on the admission day in the ICU measured by APACHE II, MODS, and SOFA instruments. The significances on the right column are associated to the comparison among survivor and nonsurvivor groups.

**Table 2.** Profile of the patients regarding the genotype associated to gender, length of hospital stay, age, and organic dysfunction on the date of admission in the ICU, measured by the APACHE II, MODS and SOFA instruments. The significance on the right column is associated to the comparison between the patients grouped by genotypes.

## LEGENDS

### Figure

**Figure 1:** The bars identify mean and standard deviation values of the Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) for seven days of intensive care unit stay in survivor (striped bars, n=35) and nonsurvivor (solid bars, n=51) patient groups. The difference between the mean scores from the two groups was significant (Pearson chi-square test;  $p < 0.01$ ). The dotted line shows a progressive decrease in the total number of patients during the length of stay (from 86 on the 1<sup>st</sup> day to 66 on the 7<sup>th</sup> day). The dashed line shows a decrease in the percentage of patients that survived during the days of the week (from 100% survival on the 1<sup>st</sup> day to 54% survival on the 7<sup>th</sup> day).

**Figure 2:** The bars identify mean and standard deviations values of the Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) for seven days of intensive care unit stay in II+ID (solid bars, n=51), and DD (striped bars, n=35) genotype groups. The dashed line shows a progressive decrease in the total number of patients during the length of stay: black circle = II+ID (from 51 on the 1<sup>st</sup> day to 45 on the 7<sup>th</sup> day); white circle = DD (from 35 on the 1<sup>st</sup> day to 31 on the 7<sup>th</sup> day). The difference between the mean scores from the two groups was not significant (Pearson chi-square test;  $p = 0.89$ ).

**Figure 3:** Progressive decrease in the total number of patients (%) related to time during the 100 days after admission of the patient in the ICU [from 86 on the 1<sup>st</sup> day (100%) to 35 on the 100<sup>th</sup> day (41%)] in II+ID (continuous line) and DD (dotted line) genotype groups. There was no significant difference between the two groups of genotypes related to survival (Kaplan-Meier; Log Rank;  $p = 0.92$ ).

**TABLE 1:**

	Survivors	Nonsurvivors	Total	<i>p</i> Value*
Number of patients	35	51	86	0.69 <sup>a</sup>
Male	19	25	44	
Female	16	26	42	
Hospital stay (days) (mean value)	36.6	42.9	40.4	0.21 <sup>b</sup>
Age (mean value)	48.4	61.3	56.1	0.002 <sup>c</sup>
APACHE II (mean value)	18.1	23.6	21.6	0.002 <sup>c</sup>
MODS-day1 (mean value)	3.7	5.5	4.8	0.002 <sup>c</sup>
SOFA-day1 (mean value)	5.1	7.9	6.8	<0.001 <sup>c</sup>

\* relative significance to the comparison between the survivor and nonsurvivor groups; <sup>a</sup>Chi-square test; <sup>b</sup>Mann-Whitney; <sup>c</sup>t-Student;

**TABLE 2:**

	II	ID	DD	Total	<i>p</i> Value
Genotype frequency	0.16	0.43	0.41		
Number of patients	14	37	35	86	
Male	5	22	17	44	
Female	9	15	18	42	0.29 <sup>a</sup>
Hospital stay (days) (mean value)	35.6	38.0	45.1	40.4	0.63 <sup>b</sup>
Age (mean value)	61.8	56.1	53.7	56.1	0.41 <sup>c</sup>
APACHE II (mean value)	21.0	22.5	21.0	21.6	0.69 <sup>c</sup>
MODS-day1 (mean value)	4.3	5.2	4.6	4.8	0.49 <sup>c</sup>
SOFA-day1 (mean value)	6.6	7.2	6.5	6.8	0.72 <sup>c</sup>

\* relative significance to the comparison between the patients grouped by genotype;

<sup>a</sup>Chi-square test; <sup>b</sup>Kruskall-Wallis; <sup>c</sup>ANOVA



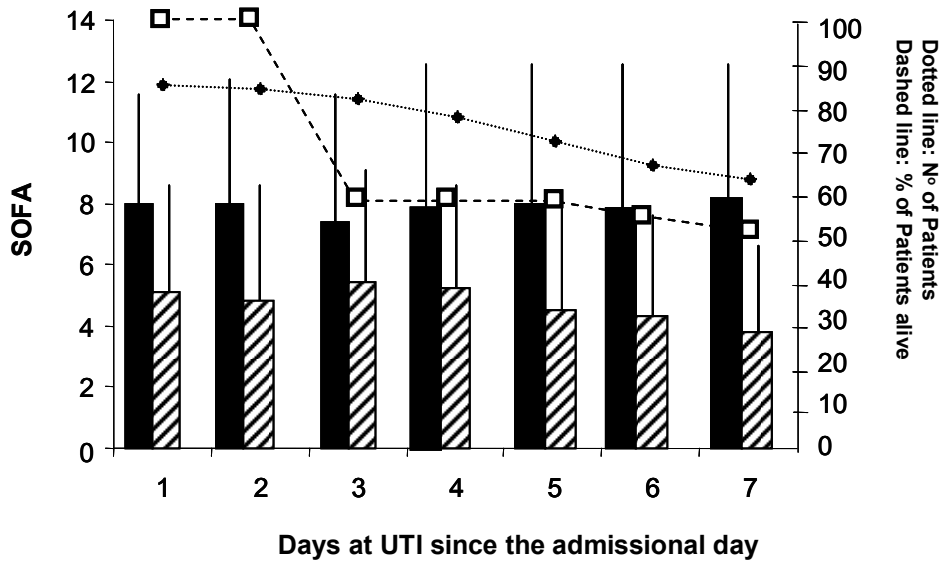
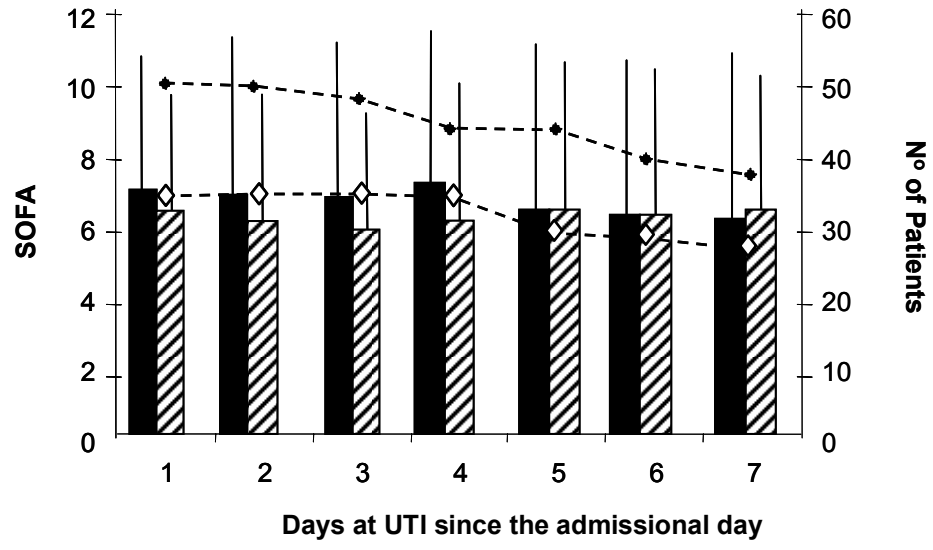


Figure 1



**Figure 2**

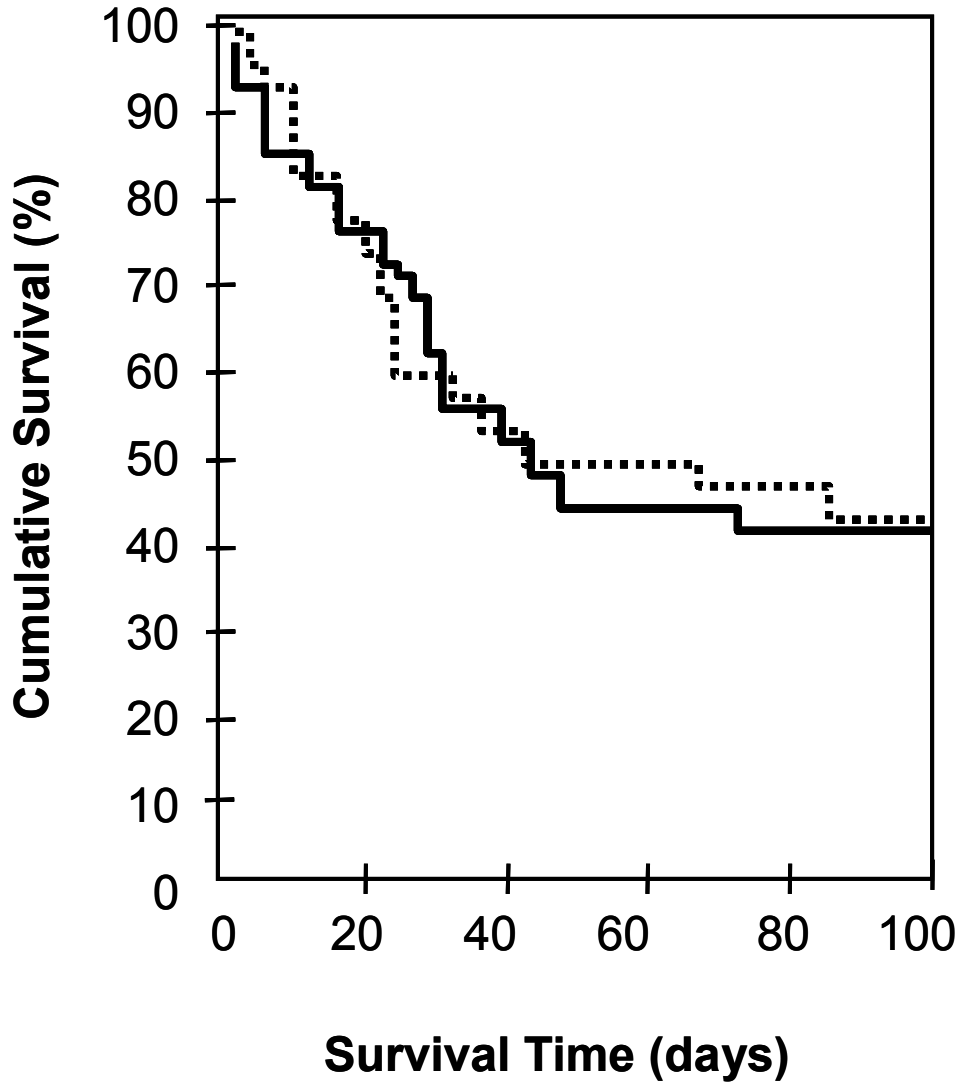


Figure 3

**O polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora da angiotensina como um indicador para a suscetibilidade e melhora em pacientes de UTI.**

Maria H. Albarus, MSc; Fernando Dias, MD; José L. S. Ferraro; Carolina Franco; Luiz Glock, PhD; Luiz C. D'Avila; Clarice S. Alho, PhD; Jarbas R.de Oliveira, PhD.

**Objetivos:** Avaliar amplamente uma população de pacientes internados em UTI através dos instrumentos que medem sua condição orgânica em relação ao defecho; identificar quais são os melhores indicadores para a sobrevida na população estudada e verificar se a herança das variantes polimórficas do gene da ECA pode conferir acurácia no poder prognóstico dos instrumentos (SOFA).

**Desenho:** Estudo observacional, prospectivo

**Local/Ambiente:** Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em um hospital universitário. HSL/PUC-RS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Pacientes:** Oitenta e seis pacientes internados na UTI

**Intervenção:** Análise do polimorfismo do gene ECA nos pacientes internados na UTI e seus respectivos escores APACHE II, MODS e SOFA.

**Medidas e Principais Resultados:** Todos os pacientes foram avaliados na internação usando os escores APACHE II, MODS e SOFA, e foi coletado sangue para a genotipagem do polimorfismo do gene da ECA. Foram analisados 86 pacientes. Encontramos associação significativa entre a idade, SOFA dia-1 e a diferença entre o SOFA dia-1 – SOFA dia-7, independentemente e a sobrevida ( $p=0.002$ ;  $p=0.002$  e  $p<0.001$ ). Quanto aos genótipos do polimorfismo I/D, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre o sexo, tempo de internação hospitalar ou idade ( $p=0.29$ ;  $p=0.63$ ;  $p=0.41$ ), da mesma maneira também não foi encontrada diferença quanto ao grau de disfunção orgânica obtido no dia da admissão do paciente em relação aos instrumentos (APACHE II, MODS e SOFA) e os respectivos genótipos ( $p=0.69$ ;  $p=0.49$  e  $p=0.72$ ). Também não foi observada diferença significativa entre sepse e choque em relação aos genótipos ( $p=0.264$  e  $p=0.931$ )

**Conclusão:** A análise dos genótipos do polimorfismo do gene da ECA e dos instrumentos de disfunção orgânica dos pacientes internados da UTI, mostraram que os pacientes que sobrevivem apresentam valores inferiores para idade e escores do dia da internação, e redução significativa dos valores obtidos pelo SOFA durante a primeira semana de internação na UTI. No entanto não foram capazes de detectar a influência da herança genética do polimorfismo I/D no defecho clínico.

**Palavras Chaves:** APACHE II, MODS, SOFA ; ECA, polimorfismo I/D; teste diagnóstico; fatores de risco genéticos; unidade de tratamento intensivo

O paciente internado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) é caracterizado por apresentar um quadro patológico complexo decorrente de fragilidades fisiológicas graves. Em decorrência deste quadro, a taxa de mortalidade de pacientes de UTIs é de 30 a 50% (1). Durante os últimos 20 anos, os modelos de predição de risco de UTI tem tido significativo desenvolvimento, validação e refinamento. Entre as diversas severidades gerais de uma UTI, tem-se usado sistemas de escores tais como: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) sendo um dos mais aceitos e usados (2). Para se melhor ajustar o risco e severidade da doença em relação a disfunção orgânica ou falência usa-se os escores Multiple Organ Dysfunction Failure Score(MODS), and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (2). Constantes inovações nesses instrumentos poderão ajustá-los para grupos mais específicos de pacientes tais como pacientes mais velhos ou pacientes com predisposições genéticas conhecidas, a fim de oferecer aos intensivistas maior qualidade no poder predição.

A identificação do perfil genético poderá afetar de maneira muito particular a análise do risco individual de cada paciente dado que a herança genética pode predispor-lo a um desfecho positivo ou negativo. O entendimento dos mecanismos moleculares de uma disfunção orgânica pode elucidar como a mesma é expressa ou modulada pela herança genética (3-5) e como tal informação poderá ser usada em testes prognósticos (6).

O genoma humano apresenta cerca de 30 mil genes, codificadores de mais de 100 mil proteínas, nos quais já foram detectadas milhões de variações polimórficas, cujas alterações estruturais ou regulatórias podem alterar diversas funções metabólicas do organismo envolvendo, portanto, modificações fenotípicas (7-11). Por esse motivo, as disfunções orgânicas são acompanhadas pela expressão de centenas de genes os quais estarão diretamente envolvidos na capacidade de recuperação do indivíduo (12).

Entre todos estes genes, consideramos o que codifica a enzima conversora da angiotensina (ECA) tem um papel chave dado que sua expressão tem ampla repercussão sistêmica, uma vez que modula a função vascular, a qual interfere no contexto geral da recuperação do paciente (13, 14),

Fatores que alterem o perfeito desempenho da função vascular podem desencadear complicações cardiovasculares naqueles indivíduos que já

apresentem alguma fragilidade fisiológica (14). Em um organismo saudável, a regulação do balanço eletrolítico e do metabolismo energético é realizada por um circuito regulatório fino que mantém a homeostasia corporal. Tal regulação é modulada por produtos protéicos de genes que podem se expressar diferentemente dependendo da sua forma polimórfica.

O sistema renina-angiotensina regula a homeostase vascular no organismo humano. A angiotensina II é uma das substâncias vasoconstritoras mais poderosas, sua ação é refletida sistemicamente na constrição simultânea das arteríolas, aumentando a resistência periférica, o que ocasiona o aumento da pressão arterial total. Os efeitos letais da vasoconstrição periférica sistêmica, são o excesso de esforço cardíaco, a ocorrência de estenose vascular e hemorragias decorrentes de rompimento de vasos cerebrais ou renais. As etapas principais da via de formação e metabolização da angiotensina II incluem a clivagem enzimática da angiotensina I a partir do angiotensinogênio pela renina, a degradação da angiotensina II por alguns peptídeos e a conversão de angiotensina I em angiotensina II pela ECA (EC 3.4.15.1) (15,16).

Foi detectado no gene que codifica para a ECA, localizado no cromossomo 17q23, um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) representado pela presença ou ausência respectiva de uma seqüência repetida *Alu* de 287 bp dentro do íntron 16 (17). Esta variação polimórfica do gene gera três possíveis genótipos II, ID e DD os quais têm sido associados com a atividade diferencial da ECA circulante refletida no risco de desenvolvimento de doenças decorrentes de pressão arterial elevada (17-23). Nestes estudos, a herança cumulativa do alelo D seria um fator de risco genético à doença cardiovascular. Contudo, nem todas as populações estudadas têm sido concordantes nesta conclusão. Meta-análises e estudos com elevado número de sujeitos, têm mostrado falhas na associação direta entre a herança do alelo D e o risco cardiovascular (24, 25).

Por se tratar de um polimorfismo intrônico, a variante da ECA em questão pode apenas tratar-se de variação silenciosa. No entanto, alguma das variantes pode estar ligada a uma segunda mutação localizada em outra porção genômica realmente responsável pela diferenciação fenotípica observada. A associação entre a herança dos alelos I ou D e a performance vascular dependeriam, portanto, da extensão do desequilíbrio de ligação, podendo variar entre as diferentes populações (26).

Neste estudo, nós determinamos as freqüências alélicas da variante polimórfica I/D do gene ECA em indivíduos internados em UTI, e comparamos a herança genética com o estado de disfunção orgânica através de instrumentos

designados para refletir as disfunções fisiológicas do paciente (27, 28) e com o desfecho clínico. Nossos objetivos foram: (I) avaliar amplamente uma população de pacientes internados em UTI através dos instrumentos que medem sua condição orgânica em relação ao desfecho, (II) identificar quais são os melhores indicadores para a sobrevida na população estudada e (III) verificar se a herança diferencial das variantes polimórficas do gene ECA pode conferir acurácia no poder prognóstico dos instrumentos. Com isso, pretendemos fornecer informações sobre essa análise genética que possam ser usadas nas propostas de inovações e de refinamento dos instrumentos de prognósticos usados nas UTIs.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Pacientes:**

Foram incluídos no presente estudo 86 pacientes (44 homens e 42 mulheres) da Unidade de Terapia Intensiva Geral (UTIG) do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), que estiveram internados no hospital durante  $40.4 \pm 31.1$  dias.

A idade dos pacientes variou de 14 a 95 anos ( $56.1 \pm 18.9$  anos). Foi considerada apenas a primeira entrada na UTIG/HSL/PUCRS dos pacientes que eram recorrentes. O diagnóstico de inclusão foi feito de acordo com critérios do APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*), tendo sido assim distribuídos: um com insuficiência cardíaca; quatro com doença metabólica/renal; nove com parada cárdio-respiratória; um com hemorragia digestiva; um com doença cardiovascular; três com problemas respiratórios; cinco com problemas neurológicos; um com distúrbios do ritmo; um com doença gastrointestinal; 18 com infecção; 31 com sepse; um com coronariopatia; um pós cirurgia de transplante renal; um pós- cirurgia por neoplasia do trato gastrointestinal; um com choque hemorrágico/hipovolemia; dois com hemorragia; dois com perfusão/obstrução do trato gastrointestinal; dois com politrauma e um com disfunção bronquiopulmonar crônica obstrutiva.

O acompanhamento do estado de saúde do paciente foi obtido através dos índices MODS (*Multiple Organ Dysfunction Score*) e SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) durante a primeira semana de internação. O desfecho de sobrevida foi considerado independentemente do período de internação na UTI ou no hospital. Este trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do HSL e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, em abril de 2002 sob o n° 01/01088,

tendo sido cumpridas as Normas Internacionais de Pesquisa em seres humanos. Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

### **Avaliação diária do estado de saúde dos pacientes:**

A monitorização dos pacientes foi realizada utilizando as seguintes avaliações: (I) APACHE II: (28); (II) SOFA: descreve o grau de disfunção orgânica diário do paciente considerando seis sistemas orgânicos, quantificando a disfunção dos mesmos numa escala de zero a quatro à semelhança do índice MODS. Em acréscimo ao índice MODS, o índice SOFA prevê eventos hospitalares, tempo de permanência hospitalar e custos (28, 29). SOFA-dia: somatório dos valores inferidos para cada um dos seis sistemas avaliados no dia indicado. SOFA-dia1: escore da disfunção orgânica no dia da admissão do paciente.

A evolução da condição orgânica dos pacientes foi monitorada e registrada pelos escores MODS-dia e SOFA-dia durante os sete dias da primeira semana de internação. O grau de disfunção orgânica dos pacientes ao final da primeira semana de internação foi obtido pela diferença dos escores MODS-dia7 e SOFA-dia7 (referentes ao sétimo dia de internação) menos o do dia da admissão (MODS-dia1 e SOFA-dia1).

### **Obtenção do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos proveniente de amostras de 5ml de sangue coletado em sistema estéril com EDTA e mantido refrigerado a 4°C, ou congelado a -20°C (30).

### **Genotipagem do polimorfismo I/D do gene ECA**

O polimorfismo I/D da ECA foi analisado como inicialmente descrito (31): amplificou-se um segmento de DNA genômico do intron 16 do gene ECA com primer forward: 5' - CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - 3' e reverse: 5' - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - 3', nas condições de desnaturação inicial à 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridização à 60°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto, e extensão final de 72°C por 5 minutos. O genótipo de cada indivíduo foi determinado pela análise eletroforética (2% gel de agarose / brometo de etídio / TBE) dos segmentos de DNA amplificados.

A genotipagem foi baseada nas seguintes informações: (I) indivíduos homocigotos II apresentam em ambos cromossomos uma inserção de uma seqüência *Alu* dentro do intron 16 a qual gera um único segmento amplificado de



490 pb; (II) indivíduos homozigotos DD apresentam em ambos cromossomos a ausência desta seqüência *Alu* dentro do íntron 16 gerando um único segmento amplificado de apenas 190 pb; (III) indivíduos heterozigotos ID os quais apresentam no gel de agarose ambos fragmentos de DNA.

### **Análises estatísticas:**

Para analisar os dados foram feitas estatísticas descritivas e inferenciais. Dentre as técnicas descritivas, foram utilizadas as tabelas de freqüência, média desvio padrão e proporção. As técnicas inferenciais são aquelas associadas aos testes de hipóteses, que foram utilizadas tanto as paramétricas como não paramétrica, como o qui-quadrado e teste exato de Fisher, juntamente com os resíduos ajustados padronizados, teste t-Student, teste de Mann-Whitney, ANOVA, Kruskal-Wallis com as comparações múltiplas de Tukey, e regressão logística. Os dados foram analisados no pacote estatístico SPSS for Windows, versão 11.5. A distribuição das freqüências gênicas e genotípicas nos pacientes foram comparadas pelo teste do qui-quadrado com os valores previstos pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para a análise de sobrevivência foram usados procedimentos estatísticos Kaplan-Meier, sendo o teste Log Rang utilizado para a significância das diferenças. O nível de significância utilizado foi de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização dos pacientes no dia da admissão na UTI em relação à sobrevida durante a internação hospitalar (Tabela 1):**

Em relação ao desfecho da sobrevida no hospital, os pacientes foram divididos em dois grupos: (I) sobreviventes (n=35): os que sobreviveram durante o período de internação no hospital e (II) não sobreviventes (n=51): os que não sobreviveram durante período de internação no hospital. Não se observou diferença significativa entre sexo do paciente em relação à sobrevida (Pearson chi-square test;  $p=0.69$ ), ou entre o tempo de internação hospitalar nos dois grupos (Mann-Whitney;  $p=0.21$ ). No entanto, observou-se associação altamente significativa entre a idade e a sobrevida, sendo que a idade média dos sobreviventes ( $48.4 \pm 18.6$ ) é significativamente mais baixa que a dos não sobreviventes ( $61.3 \pm 17.4$ ) (t-Student;  $p=0.002$ ).

Foram obtidos escores quanto à disfunção orgânica no dia da admissão na UTI dos 86 pacientes através dos instrumentos APACHE II, MODS e SOFA, independentemente. Os escores da disfunção orgânica obtidos pelos três

instrumentos, por paciente, apresentaram correlação altamente significativa (Spearman test;  $p < 0.001$ ). Observou-se correlação altamente significativa entre os escores no dia da admissão na UTI, para qualquer um dos instrumentos, e a sobrevida, sendo que os escores dos indivíduos sobreviventes (APACHE II =  $18.1 \pm 7.8$ ; MODS-dia1 =  $3.7 \pm 2.3$ ; SOFA-dia1 =  $5.1 \pm 3.2$ ) são significativamente mais baixos que os dos não sobreviventes (APACHE II =  $23.6 \pm 8.0$ ; MODS-dia1 =  $5.5 \pm 3.0$ ; SOFA-dia1 =  $7.9 \pm 3.5$ ) (t-Student;  $p = 0.002$  para APACHE II e MODS, e  $p < 0.001$  para SOFA) (Tabela 1).

### **Caracterização dos pacientes durante a primeira semana de internação na UTI em relação à sobrevida durante a internação hospitalar**

Foram obtidos escores diários, ao longo da primeira semana de internação na UTI, dos 86 pacientes quanto à disfunção de seis sistemas orgânicos através dos instrumentos MODS e SOFA. A análise da disfunção orgânica medida pelos dois instrumentos ao longo da semana mostrou correlação altamente significativa entre ambos (Spearman test;  $p < 0.001$ ). Por esse motivo, para as análises posteriores, foram considerados apenas os valores obtidos pelo score SOFA.

No grupo de pacientes sobreviventes observou-se diferença significativa entre os escores do dia da admissão (SOFA-dia1 médio =  $5,11 \pm 3,22$ ) e os escores do sétimo dia (SOFA-dia7 médio =  $3,80 \pm 2,61$ ) (t-Student;  $p = 0.012$ ). Ao contrário, no grupo de pacientes que não sobreviveu durante o período de internação no hospital, não houve diferença significativa entre os escores do dia da admissão (SOFA-dia1 =  $7,85 \pm 3,45$ ) e o do sétimo dia (SOFA-dia7 =  $8,15 \pm 4,16$ ) (t-Student;  $p = 0.44$ ), sendo que nesse grupo de pacientes, os escores do último dia são mais altos (Figura 1).

### **Identificação de indicadores prognósticos para a sobrevida**

A análise de regressão logística mostrou as influências isoladas da idade, do escore SOFA-dia1 e do valor SOFA-dia7 - SOFA-dia1 sobre a sobrevida ( $p = 0,002$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,012$ , respectivamente), sendo que a chance de sobrevida aumenta quanto mais baixos forem os valores para qualquer um dos três indicadores. A análise de regressão logística mostrou o SOFA-dia1 e idade influenciando conjuntamente a sobrevida ( $p < 0,001$ ). Assim, a idade, o escore SOFA-dia1 e evolução da disfunção orgânica ao longo da primeira semana de internação na UTI foram considerados como indicadores independentes prognósticos para sobrevida.

Em relação à idade, os pacientes foram agrupados em duas categorias: (I) com idade até 50 anos (n=33) e (II) com idade superior a 50 anos (n=53). A chance de sobrevida entre os indivíduos com idade até 50 anos foi de 2.93 vezes em relação aqueles com mais de 50 anos (IC=[1.20;7.17]; Pearson chi-square test; p=0.02).

Em relação ao escore SOFA-dia1, os pacientes foram agrupados em duas categorias: (I) com SOFA-dia1 até seis (n=42) e (II) com SOFA-dia1 superior a seis (n=44). A chance de sobrevida entre os indivíduos com SOFA-dia1 foi de 4.72 vezes em relação aqueles com SOFA-dia1 acima de seis (IC=[1.86;11.96]; Pearson chi-square test; p<0.001).

Em relação à evolução da disfunção orgânica ao longo da primeira semana de internação na UTI, os pacientes que permaneceram durante uma semana na UTI (n=66), após a internação, foram agrupados em duas categorias: (I) com melhora, isto é, com valores de SOFA-dia7 inferiores ao SOFA-dia1 (n=37) e (II) sem melhora, isto é, com valores de SOFA-dia7 superiores ou iguais ao SOFA-dia1 (n=29). A chance de sobrevida entre os indivíduos que apresentaram melhora ao final da primeira semana de internação na UTI foi de 3.83 em relação aqueles que não apresentaram melhora (IC=[1.34;10.93]; Pearson chi-square test; p=0.01).

### **Efeito da herança das variantes polimórficas do gene ECA.**

Os 86 pacientes foram genotipados quando ao polimorfismo I/D do gene ECA. As freqüências totais de genótipos (II=0.16; ID=0.43; DD=0.41) e alelos (I=0.38; D=0.62) mostraram que a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Pearson chi-square test, p=0.71).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o sexo, tempo de internação hospitalar ou idade do paciente nos três grupos de genótipos (Qui-Quadrado; p=0.29, Kruskal-Wallis; p=0.63 e ANOVA; p=0.41, respectivamente) (Tabela 2). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre o grau de disfunção orgânica obtido no dia da admissão do paciente na UTI, para qualquer um dos três instrumentos (APACHE II, MODS e SOFA) em relação aos genótipos (ANOVA; p=0.69, p=0.49 e p=0.72, respectivamente) (Tabela 2).

Os pacientes foram, então, divididos em duas categorias, segundo o genótipo: (I) II+ID (n=51): indivíduos homozigotos para o alelo I (n=14) mais indivíduos heterozigotos (n=37) e (II) DD (n=35): indivíduos homozigotos para o alelo D. Da mesma forma como apresentado na tabela 2, não se observou diferença significativa quanto ao sexo (Pearson chi-square test; p=0.02), tempo de

internação hospitalar (Mann-Whitney;  $p=0.46$ ), idade (t-Student;  $p=0.34$ ) ou escore SOFA-dia1 (t-Student;  $p=0.55$ ) quando se comparou os dois grupos.

A figura 2 mostra as médias diárias do escore SOFA obtidas durante a primeira semana de internação na UTI dos pacientes agrupados por genótipo. Não foram observadas diferenças significativas entre o escore médio diário do SOFA durante os sete dias da primeira semana de internação na UTI e o genótipo (t-Student;  $p=0.51$ ).

As análises de regressão logística conjunta entre idade, escore SOFA-dia1, valor SOFA-dia7 - SOFA-dia1 e genótipo ECA sobre a sobrevida mostraram que o dado genético não influencia no poder prognóstico para a sobrevida, da mesma forma como os dados do genótipo I/D do gene ECA observado isoladamente não mostrou influenciar na sobrevida ( $p=0,913$ ).

Os dados do genótipo I/D do gene ECA não mostraram estar associados a disfunções em nenhum dos seis sistemas avaliados (respiratório, renal, hepático, cardiovascular, hematológico e neurológico) quando observados isolado ou conjuntamente (ANOVA). Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a ocorrência de sepse e/ou choque nos três grupos de genótipos (Qui-Quadrado;  $p=0.264$  e  $p=0.931$ , respectivamente).

Em complemento às análises anteriores, utilizando procedimentos estatísticos Kaplan-Meier foi realizada uma análise de sobrevivência onde se comparou a distribuição dos eventos de óbito para os genótipos II+ID com a do genótipo DD durante o período de 100 dias após a admissão do paciente na UTI (Figura 3). Nessa análise não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0.92$ ). Os pacientes foram, então estratificados segundo três faixas etárias (14-43 anos; 44-69 anos; 70-95 anos), não sendo detectadas diferenças de performance para a sobrevivência entre os grupos de pacientes com genótipos II+ID ou DD nas três faixas etárias ( $p=0.96$ ;  $p=0.57$ ;  $p=0.30$ , respectivamente).

Finalmente, foram analisadas a distribuição dos eventos para grupos estratificados segundo os indicadores APACHE II e SOFA, não tendo sido encontrado diferenças significativas (APACHE II  $>21$ ,  $p=0.40$ ; APACHE II  $\leq 21$ ,  $p=0.25$ ) (SOFA-dia7 $>$ SOFA-dia1,  $p=0.72$ ; SOFA-dia7=SOFA-dia1,  $p=0.92$ ; SOFA-dia7 $<$ SOFA-dia1,  $p=0.68$ ). Tais análises confirmam a ausência de relação entre a herança dos alelos da ECA e a sobrevivência dos pacientes incluídos neste estudo.

## DISCUSSÃO

Cada vez mais, sustenta-se que o uso da informação genética poderá servir como prognóstico na prática médica (9,32-34). Dados genéticos poderão ser úteis na identificação das suscetibilidades individuais e poderão ser um fator de risco a mais a ser incluído nos instrumentos da medicina designados a detectar o perfil fisiológico do paciente com vistas ao tratamento e ao prognóstico (3-5,8,35).

Atualmente, importantes instrumentos têm sido utilizados na avaliação médica como indicadores de risco ou de desfecho das condições orgânicas do paciente, entre eles, o APACHE II, o MODS e o SOFA. Os índices resultantes da aplicação desses instrumentos, os quais têm o propósito do prognóstico, refletem o estado de saúde do paciente com o propósito da utilidade prática. A inclusão de valores preditivos genéticos aos referidos instrumentos seria uma forma de aumentar a acurácia dos mesmos. No entanto, antes da inclusão de escores que reflitam o risco decorrente das características herdadas, devem ser realizados amplos estudos populacionais que indiquem quais são as variações polimórficas marcadoras de morbidades.

Diferentes variantes gênicas herdadas poderão interferir na suscetibilidade de cada indivíduo a determinadas fragilidades biológicas as quais poderão predispor-lo a diferentes graus de disfunções orgânicas. O estudo da associação entre a herança de variantes gênicas polimórficas e o estado de saúde de um paciente permitirá que sejam identificados quais são as características genéticas marcadoras, as quais poderão ser usadas como indicadores no prognóstico, na prevenção e no tratamento das doenças complexas. Pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) são indivíduos em estado de saúde altamente debilitado. Quanto mais constante e completa for a monitorização deste indivíduo, melhor será realizada a intervenção, o que possibilitará um desfecho mais favorável. Até o momento, dados bioquímicos, fisiológicos e clínicos têm sido úteis para a definição do estado de déficit de saúde do paciente, e na monitorização da sua resposta ao tratamento estabelecido na busca da sua recuperação.

Nós sugerimos que a inclusão de dados referentes às características genéticas poderão incrementar ainda mais a boa repercussão do tratamento e do acompanhamento aos pacientes em estados fisiológicos alterados. Assim, neste trabalho, além dos dados convencionais, nós analisamos as características genéticas de pacientes internados em UTI com o objetivo de identificar o quanto a

herança genética interfere na resposta terapêutica e no desfecho clínico final de cada indivíduo.

A análise mostrou influências isoladas apenas da idade, do escore SOFA-dia1 e do valor SOFA-dia7 - SOFA-dia1 sobre a sobrevivência. Esses dados foram considerados como indicadores independentes prognósticos para sobrevivência. Os dados do genótipo I/D do gene ECA observado isolado ou conjuntamente não mostraram influenciar na sobrevivência, ou em qualquer outra variação fenotípica patológica. Assim, os dados do genótipo I/D do gene ECA não possibilitaram refinar o poder prognóstico dos instrumentos quanto ao desfecho do paciente internado em uma UTI.

Estudos importantes, os quais incluíram análises de populações com mais de um mil indivíduos, relacionaram a herança do alelo D ou do genótipo DD com morbidades associadas às disfunções no sistema circulatório (36-43). A enzima ECA tem um papel muito importante no controle de dois peptídeos envolvidos na modulação do tônus vascular e na proliferação de células musculares lisas, participando do catabolismo da bradicinina e convertendo o hormônio inativo angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo com poderosa ação vasoconstritora e que também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal. O mecanismo mais provável pelo qual o alelo D ou genótipo DD pode aumentar o risco às disfunções circulatórias seria através da vasoconstrição das artérias coronárias. No entanto, outros estudos também importantes, com amostras populacionais com mais de um mil indivíduos, não evidenciaram tão claramente a associação entre a herança do polimorfismo I/D e alterações do sistema vascular (44-52)

A análise dos resultados genéticos obtidos no presente estudo deve considerar, pelo menos, dois grandes enfoques: 1 – as disfunções orgânicas apresentadas por pacientes internados em UTIs são multifatoriais, ou seja, causadas pelo resultado conjunto da capacidade de expressão de milhares de genes que controlam os seis sistemas orgânicos. A capacidade de expressão desses milhares de genes é um reflexo das interferências entre os diferentes genes do genoma humano, modulados pelos fatores vindos do meio externo; 2 - o polimorfismo I/D (inserção/deleção) é uma variação alélica de presença ou ausência respectiva de uma seqüência repetida *Alu* de 287 bp dentro do intron 16 do gene ECA. Da mesma forma como as inserções da família *Alu* se propagaram, ao longo da evolução (53,54), dentro do genoma humano, outras centenas de milhares de mutações também alteraram o genoma nos mais variados locais, e com as mais diversas repercussões fenotípicas. Por se tratar de um polimorfismo

intrônico, a variante I/D do gene ECA poderia interferir diretamente na síntese do mRNA-ECA ou estar ligada a alguma mutação que o fizesse (55). No entanto, foi verificado que as variações encontradas o nível de mRNA-ECA não se relacionam com o polimorfismo I/D (56, 57). De todas as formas, os níveis séricos da atividade ECA são associados ao alelo D, ou ao genótipo DD, em muitas populações (58). É provável, assim, que a regulação da expressão da ECA esteja ocorrendo no nível pós-transcricional e o polimorfismo I/D, seja uma mutação silenciosa ligada a uma segunda mutação a qual seria a real responsável pela modulação da atividade vasoconstritora da ECA. Esta segunda mutação poderia estar dentro do próprio gene ECA (num exon ou nas regiões 5' ou 3' não traduzida, por exemplo) (58), ou num outro gene regulador da ECA. Sendo assim, a ocorrência de associação positiva verificada entre o alelo D e o aumento da atividade ECA, ou de associação positiva verificada entre o genótipo DD e a suscetibilidade a morbididades cardiovasculares, dependeria da extensão do desequilíbrio de ligação entre as duas mutações polimórficas.

Esses dois enfoques poderiam explicar, pelo menos em parte, a ampla variação do efeito genético no fenótipo. Isto é, a relação genótipo-fenótipo pode estar sendo mascarada por influências e/ou interferências genômicas e ambientais sob o gene em estudo.

Nos cerca de 30 mil genes do genoma humano, codificadores de mais de 100 mil proteínas, já foram detectadas milhares de variantes polimórficas as quais podem provocar alterações estruturais ou regulatórias nas diversas funções metabólicas do organismo envolvendo, portanto, modificações fenotípicas (7). Desta forma, é fundamental conceber que, somente após estudos populacionais em larga escala, com grande número de indivíduos de diferentes populações avaliados, será possível concluir se, de fato, há associação entre a herança de certos genes ou marcadores genéticos e um fenótipo (3,4,8).

Nossos resultados foram capazes de apontar que os pacientes que sobrevivem apresentam valores inferiores para idade e escores do dia da internação, e redução significativa dos valores obtidos pelo SOFA durante a primeira semana de internação na UTI. No entanto, não foram capazes de detectar a influência da herança diferencial para o polimorfismo I/D no desfecho clínico. Assegurando que não tenha havido nenhum viés de seleção na amostra analisada, dado que a mesma encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e que, no dia da admissão na UTI, os três genótipos estavam igualmente distribuídos entre todas características, podemos inferir que a análise do polimorfismo I/D da ECA não foi

um indicador capaz de prever susceptibilidades ou risco de mortalidade para os pacientes de UTI incluídos neste estudo.

Contudo, mais de seis bilhões de seres humanos habitam hoje o planeta, distribuídos em subgrupos geneticamente distinguíveis e com particulares fragilidades fisiológicas. O resultado de nosso estudo pode direcionar e motivar novas investigações incentivando o uso da ciência genômica e suas aplicações à prática médica e na busca de marcadores genéticos que possam ser um fator de risco a mais a ser incluído nos instrumentos da medicina com fins prognósticos.



**REFERÊNCIAS**

1. Vincent JL: Sepsis: The magnitude of the problem In. JL Vincent, J Carlet e Stum SM opal. The sepsis text 2002. Glower Academy Publisher, Norwell, USA.
2. Rosenberg AL: Recent innovations in intensive care unit risk-prediction models. **Curr Opin Crit Care** 2002; 8:321-330
3. DeAngelis CD, Rosenberg RN, Smith JM: Genomic medicine and the individual patient. **JAMA** 2000; 284: 22-29
4. Sander C: Genomic medicine and the future of health care. **Science** 2000; 287:1977-1978
5. Guttmacher AE, Collins, FS: Genomic Medicine. **N Eng J Med** 2002; 19: 1512-1520
6. Quinzii C, Belpinati F, Pignatti PF: Predictive genetic testing - new possibilities in determination of risk of complex diseases. **Croat Med J** 2001; 42: 458-462
7. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science** 1998; 280: 1077-1082
8. Roses AD: Pharmacogenetics and the practice of medicine. **Nature** 2000; 15: 857-865
9. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291: 1304-1351
10. Griffith LG, Grodzinsky AJ: Advances in Biomedical Engineering. **JAMA** 2001; 285: 556-561
11. Phillips JA: Genomic medicine: managing the complexity. **JAMA** 2001; 286: 1639
12. 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
13. Bauer PR: Microvascular responses to sepsis: Clinical significance. **Pathophysiol** 2002; 8: 141-148.
14. Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, et al: Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. **Int J Cardiol** 2001; 80: 161-172
15. Erdos EG: Angiotensin I - Converting Enzyme and the changes in our concepts through the years. **Hypertension** 1990; 16: 363-370

16. Kem D C; Brown RD: Renin-from beginning to end. **N Engl J Med** 1990; 323: 1136-1137
17. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al: An Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest** 1990; 86: 1343-1346
18. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature** 1992; 359: 641-644
19. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, et al: Angiotensin-I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J** 1993; 290: 33-40
20. Griendling KK, Murphy TJ, Wayne AR: Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation** 1993; 87: 1816-1828
21. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, et al: Angiotensin converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation** 1995; 92: 1387-1388
22. Beohar N, Prather A, Yu QT, et al: Angiotensin converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. **J Invest Med** 1995; 43: 275-280
23. Dakik HA, Mahmarian JJ, Verani MS, et al: Association of angiotensin-1-converting enzyme gene polymorphism with myocardial ischemia and potency of infarct related artery in patients with myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 1997; 29: 1468-1473
24. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, et al: A Meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. **Circulation** 1996; 94:708-712
25. Agerholm-Larsen B, Noderstaggard BG, Steffensen R, et al: ACE gene polymorphism-ischemic heart disease and longevity in 10150 individuals: a case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study. **Circulation** 1997; 95: 2358-2367
26. Rupert JL, Devine DV, Monsalve MV, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) alleles in the Quechua, a high altitude South American native population. **Ann Hum Biol** 1999; 26: 375-380
27. Marshall JC: Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas. In: Dias FS: Choque, 2002. p 375-386. Porto Alegre. EDIPUCRS.

28. Gomez J, Colli ML: Prognóstico. In: Dias FS: Choque, 2002. p 387-403. Porto Alegre. EDIPUCRS
29. Vincent JL, Mendonça A, Cantraine F, et al: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med** 1998; 26:1793-1800
30. 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; 19:5444
31. Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al: PCR detection of the Insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1) **Nucl Acids Res** 1992; 20:1433
32. Strachan T, Read AP: Human molecular genetics. *Bios Scientific Publishers Ltd. London* 1999
33. Fischer EP, Klose S: The Human Genome – The Diagnostic Challenge. *Boehringer Mannheim GmbH. R. Piper GmbH & Co. KG. München* 1996
34. Gutmacher AE, Jenkins J, Uhlmann WR: Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. **Am j Med Genet** 2001; 106: 216-222
35. Collins FS, McKusick VA: Implications of the Human Genome Project for medical science. **JAMA** 2001; 285: 540-544
36. Martínez E, Puras A, Escribano J, et al: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. **J Hum Hypertens** 2000; 14:131-135
37. Qu H, Lu Y, Lin S: Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi** 2001; 35:408-411
38. Kimura M, Yokota M, Fujimura T, et al : Association of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with left-ventricular hypertrophy in Japanese women with essential hypertension; multicenter study of 1.919 subjects. **Cardiology** 1997; 88:309-314
39. Gardemann A, Fink M, Stricker J, et al: ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. **Atherosclerosis** 1998; 139:153-159
40. Bengtsson K, Orho-Melander M, Lindblad U, et al: Polymorphism in the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. **J Hypertens** 1999; 17:1569-1575

41. Montgomery H, Brull D, Humphries SE: Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Ital Heart J* 2002; 3:10-14
42. Taittinen L, Uhari M, Kontula K, et al: Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *Am J Hypertens* 1999; 12:858-866
43. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, et al: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 97:1766-1772
44. Sugiyama T, Morita H, Kato N, et al: Lack of Sex-specific effects on the association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Hypertens Res* 1999; 22: 55-59
45. Zaman MM, Yoshiike N, Date C, et al: Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study. *J Hypertens* 2001; 19: 47-53
46. Fujimura T, Yokota M, Kato S, et al: Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1384-1390
47. Hung J, McQuillan BM, Nidorf M, et al: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid wall thickening in a community population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1969-1974
48. Poirier O, Georges JL, Ricard S, et al : New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. *J Hypertens* 1998; 16: 1443-1447
49. Zee RY, Ridker PM, Stampfer MJ, et al: Prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of stroke. *Circulation* 1999; 99: 340-343
50. Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J* 1999; 20: 1318-1325

51. Renner W, Pabst E, Paulweber B, et al: The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for peripheral arterial disease. ***Atherosclerosis*** 2002; 165: 175-178
52. Poch E, La Sierra Ad A, Gonzáles-Nuñez D, et al: Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. ***Med Clin (Barc)*** 2002; 118: 575-579
53. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T: LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. ***Nature Genet*** 2003; 35: 41-48
54. Batzer MA, Deininger PL: Alu Repeats and Human Genomic Diversity. ***Nature Reviews Genetics*** 2002; 3: 370-380
55. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, et al: Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. ***Biochem J*** 1993; 290: 33-40
56. Tamaki S, Iwai N, Ohmichi N, et al: Effect of genotype on the angiotensin-converting enzyme mRNA level in human atria. ***Clin Exp Pharmacol Physiol*** 1997; 5: 305-308
57. Spruth E, Zurbrugg HR, Warnecke C, Erdmann J, et al: Expression of ACE mRNA in the human atrial myocardium is not dependent on left ventricular function, ACE inhibitor therapy, or the ACE I/D genotype. ***J Mol Med*** 1999; 11: 804-810
58. Kammerer CM, Gouin N, Samallow PB, et al: Two quantitative trait loci affect ACE activities in Mexican-Americans. ***Hypertension*** 2004; 43: 466-470

## LEGENDAS

### Tabelas

**Tabela 1.** Perfil dos pacientes quanto à sobrevivência no hospital em relação ao sexo, tempo de internação no hospital, idade e escore de disfunção orgânica no dia da admissão na UTI medida pelos instrumentos APACHE II, MODS e SOFA. As significâncias na coluna da direita são relativas à comparação entre os grupos sobreviventes e não sobreviventes.

**Tabela 2.** Perfil dos pacientes quanto ao genótipo em relação ao sexo, tempo de internação no hospital, idade e disfunção orgânica no dia da admissão na UTI, medida pelos índices APACHE II, MODS e SOFA. As significâncias na coluna da direita são relativas à comparação entre os pacientes agrupados por genótipos.

## LEGENDAS

### Figuras

**Figura 1** As barras identificam os valores das médias e desvios padrões do Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) para os sete dias internados na unidade de terapia intensiva em sobreviventes (barras listradas, n=35) e não sobreviventes (barras sólidas, n=51). A diferença entre os scores médios dos dois grupos foi significativa (Pearson chi-square test;  $p < 0.01$ ). A linha pontilhada mostra o decréscimo progressivo no número total de pacientes com o tempo (de 86 no primeiro dia a 66 no sétimo dia). A linha tracejada mostra o decréscimo da porcentagem de pacientes vivos durante os dias da semana (de 100% vivos no primeiro dia a 54% vivos no sétimo dia).

**Figura 2.** As barras identificam os valores das médias e desvios padrões para o Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) para sete dias de internação na unidade de terapia intensiva em grupos de genótipos : II+ID (barras sólidas, n=51) e DD (barras listradas, n=35). A linha pontilhada mostra decréscimo progressivo no número total de pacientes com o tempo: círculo preto = II+ID (de 51 no primeiro dia até 45 no sétimo dia); círculo branco = DD (de 35 no primeiro dia até 31 no sétimo dia). A diferença entre os scores médios dos dois grupos não foi significativa (Pearson chi-square test;  $p = 0.89$ ).

**Figura 3.** Decréscimo progressivo do número total de pacientes (%) em função do tempo ao longo de 100 dias após a admissão do paciente na UTI de 86 no primeiro dia (100%) até 35 no centésimo dia (41%)] no grupo de genótipos : II+ID (linha contínua) e DD (linha pontilhada). Não houve diferença significativa entre os dois grupos de genótipos em relação à sobrevivência (Kaplan-Meier; Log Rank;  $p = 0.92$ ).

**TABELA 1:**

	Sobreviventes	Não sobreviventes	Total	<i>p</i> Valor*
Nº pacientes	35	51	86	0.69 <sup>a</sup>
Homens	19	25	44	
Mulheres	16	26	42	
Internação no hospital (dias)				
(média)	36.6	42.9	40.4	0.21 <sup>b</sup>
Idade (média)	48.4	61.3	56.1	0.002 <sup>c</sup>
APACHE II (média)	18.1	23.6	21.6	0.002 <sup>c</sup>
MODS-dia1 (média)	3.7	5.5	4.8	0.002 <sup>c</sup>
SOFA-dia1 (média)	5.1	7.9	6.8	<0.001 <sup>c</sup>

\*significância relativa à comparação entre os grupos de sobreviventes e não sobreviventes; <sup>a</sup>Chi-square test; <sup>b</sup>Mann-Whitney; <sup>c</sup>t-Student;



**TABELA 2:**

	II	ID	DD	Total	$\rho$ Valor
Frequência genotípica	0.16	0.43	0.41		
Número de pacientes	14	37	35	86	
Homens	5	22	17	44	
Mulheres	9	15	18	42	0.29 <sup>a</sup>
Internação hospitalar (dias) (média)	35.6	38.0	45.1	40.4	0.63 <sup>b</sup>
Média Idade (média)	61.8	56.1	53.7	56.1	0.41 <sup>c</sup>
Média APACHE II (média)	21.0	22.5	21.0	21.6	0.69 <sup>c</sup>
Média MODS-dia1 (média)	4.3	5.2	4.6	4.8	0.49 <sup>c</sup>
Média SOFA-dia1 (média)	6.6	7.2	6.5	6.8	0.72 <sup>c</sup>

\*significância relativa à comparação entre os pacientes agrupados por genótipos;

<sup>a</sup>Chi-square test; <sup>b</sup>Kruskall-Wallis; <sup>c</sup>ANOVA

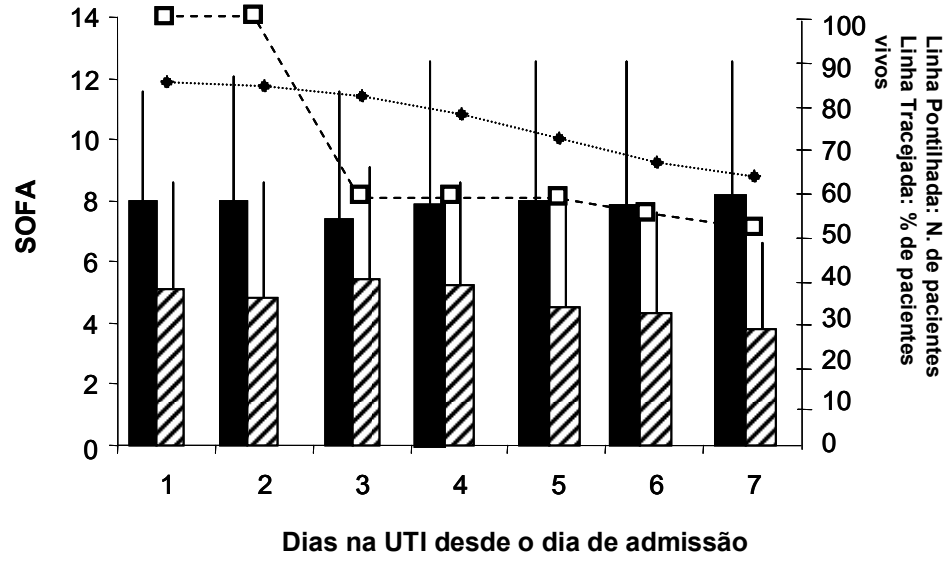
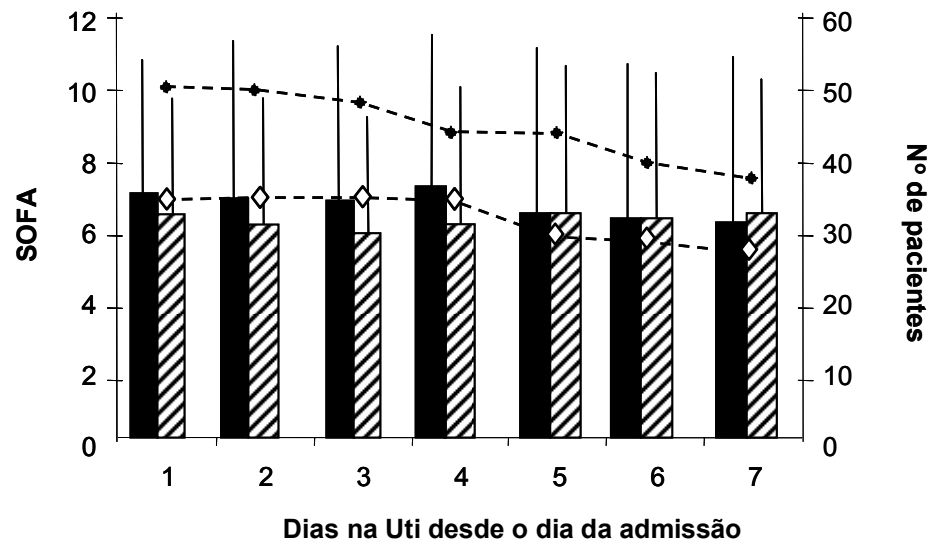
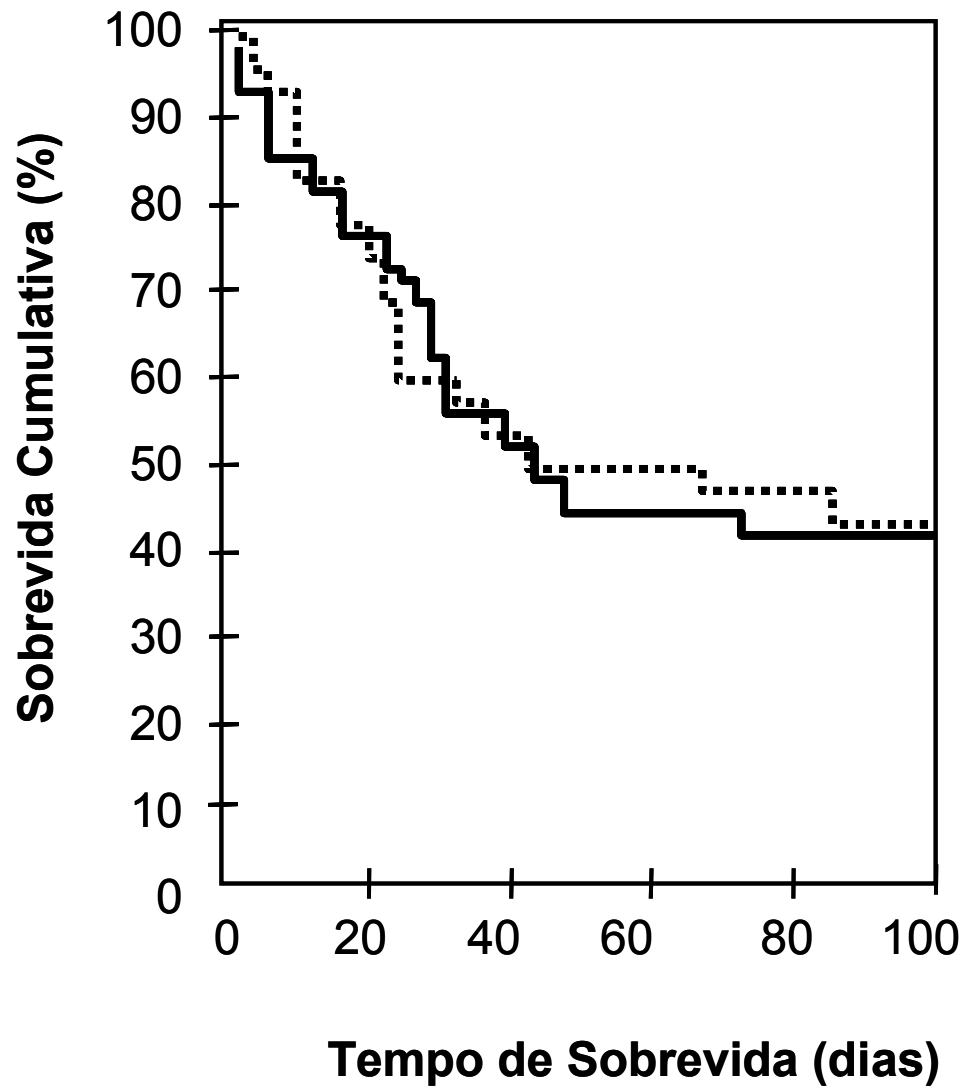


Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**

## **6.ANEXOS**

### **6.1 Lista de Abreviaturas**

**APACHE II** – Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

**APDKD** – Disfunção renal policística dominante autossômica

**CAD** – Doença arterocoronariana

**CHF** - Falência crônica do coração

**DIC**– Doença isquêmica cerebrovascular

**DM** – Diabete melitus

**ECA** – Enzima conversora da angiotensina

**ECAp** – Níveis plasmáticos de ECA

**ESTs**- Human expressed sequence tags

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**HE** - Hipertensão essencial

**Hp** - Hipertensão

**HVE** - Hipertrofia ventricular esquerda

**IAM** – Infarto agudo do miocárdio

**IFN-γ** – Interferon gama

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgAN** – Nefropatia de imunoglobulina A

**IgE** – Imunoglobulina E

**IL-1** – Interleucina 1

**IL-4** – Interleucina 4

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-8** – Interleucina 8

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-12** – Interleucina 12

**IM** – Infarto do miocárdio

**KD** – Doença de Kawasaki

**LAC** – Lesão aterocoronariana

**LBPs** – Proteína de ligação de LPS

**LD**- Linkage disequilibrium

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MAS** – Infarto microangiopático

**mCD14** – Receptor de membrana da endotoxina CD14

**MODS** – Multiple Organ Dysfunction Failure

**MVE** - Massa ventricular esquerda

**ON** – Óxido nítrico

**PA:** Pressão arterial

**sCD14** –Receptor solúvel da endotoxina CD14

**SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo simples

**SOFA** – Sequential Organ Failure Assessment

**TGF $\beta$**  – Fator  $\beta$  de crescimento de transformação

**TNF $\alpha$**  – Fator  $\alpha$  de necrose tumoral

**UTI** - Unidade de terapia intensiva

**UTIG**- Unidade de terapia intensiva geral

**VE** – Ventrículo esquerdo

## 6.2 Lista de Figuras

### Artigo 1

<b>Figura 1.</b> Visualização dos fragmentos de DNA em eletroforese com Agarose/Brometo de Etídio/TBE, dos pacientes (uma amostra representativa).....	64
<b>Figura 2.</b> Fluxograma de inclusão de pacientes.....	65
<b>Figura 3.</b> Curva de sobrevivência em relação ao sexo.....	66
<b>Figura 4.</b> Curva de sobrevivência por idade.....	67
<b>Figura 5.</b> Curva de sobrevivência por genótipos.....	68
<b>Figura 6.</b> Curva de sobrevivência em pacientes do grupo 2.....	69
<b>Figura 7.</b> Curva de sobrevivência em pacientes que tiveram um aumento no escore SOFA ao final de uma semana de internação na UTI.....	70

### Artigo 2

<b>Figura 1</b> Análise do Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) para os sete dias de internação na Unidade de Terapia Intensiva em relação a sobrevivência.....	113
<b>Figura 2.</b> Análise do Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) para os sete dias de internação na Unidade de Terapia Intensiva em relação aos genótipos. ....	114
<b>Figura 3.</b> Análise do genótipo em relação a sobrevivência ao longo de 100 dias após a admissão do paciente na UTI.....	115

### 6.3 Lista de Tabelas

#### Revisão da Literatura

<b>Tabela 1</b> - Associação positiva e negativa com morbidades e o CD14.....	13
<b>Tabela 2</b> - Associação positiva com morbidades e a ECA.....	15
<b>Tabela 3</b> - Associação negativa com morbidades e a ECA.....	19

#### Artigo 2

<b>Tabela 1.</b> Perfil dos pacientes quanto à sobrevivência no hospital em relação ao sexo, tempo de internação no hospital, idade e escore de disfunção orgânica no dia da admissão na UTI medida pelos instrumentos APACHE II, MODS e SOFA.....	111
<b>Tabela 2.</b> Perfil dos pacientes quanto ao genótipo em relação ao sexo, tempo de internação no hospital, idade e disfunção orgânica no dia da admissão na UTI, medida pelos índices APACHE II, MODS e SOFA.....	112