



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

Estudo do polimorfismo -260C>T no promotor do gene CD14 e a expressão de mCD14 e sCD14 em pacientes sépticos e em voluntários saudáveis

Trabalho apresentado com a finalidade de obtenção de Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo PPGBCM-PUCRS

PÓS-GRADUANDA:

BIBIANA BUTKUS DE AGUIAR

ORIENTADORAS:

CLARICE SAMPAIO ALHO

CRISTINA BONORINO

Porto Alegre, RS

Outubro/ 2005

SUMÁRIO

RESUMO	3
REVISÃO DA LITERATURA SOBRE O TEMA ESTUDADO	4
1 - Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)	4
2 - Infecção e sepse	5
3 – Variações gênicas polimórficas e a sepse	6
4 – O CD14	8
5 - Referências Bibliográficas	15
MANUSCRITO COM OS RESULTADOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL	23
Title of The Paper	23
Abstract	24
Introduction	25
Subjects and Methods	26
Results	28
Discussion	29
Aknowledgement	31
References	31
Table 1	35
Figure 1	36
Figure 2	37
Figure 3	38
Figure 4	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40

Resumo

O CD14 é uma proteína de 53-55kD que não possui porção citoplasmática e atua como um receptor de uma ampla gama de microorganismos onde reconhece diferentes estruturas de lipopolissacarídeos (LPS). O CD14 pode ser encontrado sob duas formas: na superfície de monócitos, macrófagos e neutrófilos (mCD14 ou CD14 de membrana) ou na forma de CD14 solúvel (sCD14). Tanto o mCD14 quanto o sCD14 desempenham um importante papel na geração de uma resposta imune inata contra patógenos bacterianos. A ativação do sistema imune inato por componentes bacterianos pode ser modulada pela diferente expressão do mCD14 e variações do sCD14. Sugere-se que a expressão aumentada do CD14 pode trazer benefícios para pacientes com sepse. Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de transição de uma citosina para uma timina na posição -260 na região promotora do gene CD14 foi identificado. Este SNP parece ter um papel significativo na expressão do CD14. De fato, existem estudos sugerindo que homozigotos TT apresentam um aumento na densidade do mCD14 e nos níveis de sCD14 quando comparados aos indivíduos que carregam o alelo C. O objetivo deste estudo foi verificar se o polimorfismo -260C>T do promotor do gene que codifica para o CD14 interfere na sua expressão, e se se relaciona com o desfecho de sobrevida em pacientes sépticos, além de verificar se existe diferença significativa na expressão do CD14 entre indivíduos saudáveis e pacientes sépticos. Observamos que a expressão do CD14, medida pela densidade de mCD14 e níveis de sCD14, estava aumentada em pacientes sépticos quando comparados com indivíduos saudáveis e também detectamos que o genótipo TT estava associado com altos níveis de mCD14. Nós verificamos, após incubação com LPS, que existe um aumento significativo na densidade de mCD14. Esta foi a primeira vez em que pacientes sépticos foram avaliados para o polimorfismo -260C>T, expressão do CD14 e mortalidade. Entretanto, nenhuma associação estatisticamente significativa entre estas três variáveis foi encontrada. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, nos quais o aumento da expressão do CD14 pode estar associado com o genótipo TT, embora isto não tenha influenciado o desfecho clínico dos pacientes sépticos.

Introdução ao tema estudado no Mestrado

Este trabalho apresenta um forte referencial teórico acerca do conhecimento que embasou a realização do trabalho experimental abordando os temas que foram estudados.

1 - Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)

Os pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são caracterizados por apresentar um quadro patológico crítico e complexo, decorrente de fragilidades fisiológicas graves e responsáveis pela elevada taxa de mortalidade que varia de 30% a 50% (Vincent et al., 2002). Em um estudo recente, Guha et al. (2001) estimou que nos Estados Unidos 50.000 pessoas morrem a cada ano decorrente de doenças críticas manifestadas nas UTIs como, por exemplo, a sepse (Guha et al., 2001) com custo de até dez bilhões de dólares. A despeito dos progressos no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas, a incidência de sepse tem aumentado nas últimas décadas. O aumento das infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos e o desenvolvimento de tecnologias de manutenção de vida, com o uso de procedimentos e dispositivos invasivos, podem explicar esse fato (Niederman et al., 1990). Nos últimos 20 anos, vários instrumentos de medida de predição de risco têm sido aplicados aos pacientes críticos internados em UTIs na tentativa de reconhecer as melhores estratégias terapêuticas. A avaliação do quadro crítico, nos dias de hoje, é principalmente realizada através de instrumentos que analisam a disfunção de órgãos e sistemas através do monitoramento diário de seu estado fisiológico. O escore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) avalia diariamente a condição de seis sistemas orgânicos (respiratório, renal, hepático, hematopoiético, cardiovascular e neurológico), independente da terapia a qual o paciente está sendo submetido (Vincent et al., 1998; Arts et al., 2005). Dado que pacientes de UTIs são indivíduos afetados por múltiplas disfunções orgânicas e que, além disto, estão expostos ao ambiente hospitalar, o qual é rico em diversidade de microorganismos infecciosos, o risco de que estes pacientes venham a desenvolver uma infecção é muito elevado. Uma parcela elevada de pacientes desenvolve infecção bacteriana sendo que, cerca de 60% acaba por desencadear quadros de sepse, choque séptico e falência de múltiplos órgãos. O quadro de sepse é consequência de processos celulares à resposta a uma agressão de origem infecciosa. A manifestação clínica da sepse pode se agravar chegando a um quadro de choque, o qual é caracterizado pela presença de uma vasodilatação periférica acentuada e por uma excessiva presença de agentes pró-inflamatórios que juntos acentuam ainda mais a disfunção. Muito se estuda a respeito da sepse, desde os seus aspectos fisiopatológicos e clínicos, até o seu impacto social e econômico nos últimos anos. Porém, a mortalidade persiste ao longo das décadas e provavelmente é subestimada. Apesar dos inúmeros progressos obtidos nas últimas décadas na tentativa de se dar suporte ao paciente crítico com foco infeccioso e sepse, a mortalidade neste grupo tem se mantido na faixa de 50% (Friedman et al.,

1998).

Sendo a sepse uma condição freqüente no âmbito da terapia intensiva, que cursa com elevada mortalidade e com tratamento com custo econômico elevado, sua abordagem é de interesse direto no sistema de saúde. O estudo da sepse deve contribuir para os levantamentos epidemiológicos e pautar-se numa abordagem direcionada para o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares que desencadeiam as variações fisiopatológicas. Este conhecimento básico poderá contribuir para a modulação da seqüência de eventos que culmina nos desfechos desfavoráveis. Compreender os fatores genéticos envolvidos em tais eventos é, portanto, fundamental.

2 - Infecção e sepse

Responsável por 30 milhões de mortes anuais no mundo, a sepse é considerada a principal causadora de óbitos em Unidades de Tratamento Intensivo onde, segundo as estatísticas, o quadro clínico de 40% dos pacientes internados evolui para choque séptico (Levy et al, 2003).

Os termos infecção e sepse são geralmente utilizados de forma independente, no entanto a terminologia acaba simplificando uma relação complexa. O termo infecção está relacionado à presença de agente agressor em uma localização (tecido, cavidade ou fluido corporal) normalmente estéril, e o termo sepse está relacionado à conseqüente manifestação do hospedeiro, isto é, à reação inflamatória desencadeada frente uma infecção grave. A sepse é caracterizada por uma ativação consistente do sistema imune após uma infecção bacteriana (bacteremia) que se torna amplificada e, então, desregulada (Friedman et al., 1998). Em 1991, um novo conceito denominado Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS; systemic inflammatory response syndrome) foi postulado para definir o estado de pacientes que exibiam uma resposta sistêmica para episódios inflamatórios. Hoje em dia, a sepse é definida como SIRS induzida por uma infecção. A SIRS é diagnosticada como uma combinação de sinais clínicos e sintomas disponíveis apresentando, pelo menos, dois dos critérios abaixo:

1. Febre, temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou hipotermia, temperatura corporal $< 36^{\circ}\text{C}$
2. Taquicardia – freqüência cardíaca > 90 bpm
3. Taquipnéia – freqüência respiratória > 20 irpm ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
4. Leucocitose ou leucopenia – Leucócitos > 12.000 cels/mm³ ou < 4.000 céls/mm³, ou presença de $> 10\%$ de formas jovens (bastões) (Heard et al., 1991; Vincent et al., 2002; Varon et al., 1998).

A hipotensão refratária (choque séptico) é a principal causa de morte depois do começo da sepse, seguido da Falência Múltipla de Órgãos/ Síndrome de Disfunção Múltipla de Órgãos (MOF/MODS). Uma vez que o paciente desenvolve choque séptico ou falência múltipla de órgãos, o índice de mortalidade aumenta para 60 a 70%. O choque séptico define-se como uma complicação

da sepse caracterizada por uma hipotensão refratária, a qual é a principal causa dos óbitos. Se a hipotensão ou hipoperfusão induzidas pela sepse são refratárias à ressuscitação volêmica adequada, e se há necessidade subsequente de administração de agentes vasopressores, as complicações circulatórias podem levar à Falência Múltipla de Órgãos (MOF ou Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos, MODS). Embora a produção cardíaca possa ser mantida em níveis normais, a contractilidade prejudicada do miocárdio, a inadequada distribuição do fluxo sanguíneo e o uso inadequado do oxigênio são características comuns no desenvolvimento de MOF/MODS. MOF/MODS é definida como uma seqüencial falência de dois ou mais sistemas. Os pulmões, os rins, o fígado, o sistema cardiovascular, o sistema nervoso central e o sistema de coagulação são comumente envolvidos na falência de múltiplos órgãos (Karima et al., 1999).

3 – Variações gênicas polimórficas e a sepse

Variações genéticas contribuem para o desenvolvimento de diferentes fenótipos. Junto à infecção, podemos supor que influências genéticas individuais poderiam contribuir para a sensibilidade aos estímulos (Hubacek et al., 1999). Muitos estudos envolvendo polimorfismos vêm sendo publicados salientando cada vez mais a questão do envolvimento dos fatores genéticos como indicadores fisiológicos, considerados uma complementação às influências ambientais as quais os organismos estão expostos (Guttmacher et al, 2002; Philips, 2001; DeAngelis et al, 2000, Sander, 2000; Wang et al, 1998). O DNA humano está sujeita às mais variadas mutações, rearranjos e/ou reorganizações gênicas, as quais são responsáveis pelas particularidades individuais. Um dos primeiros recursos para a obtenção de informações médicas e biológicas do genoma humano têm sido o estudo e a exploração dos (SNPs) polimorfismos de nucleotídeo único (Melton, 2003). SNPs são considerados os polimorfismos mais comuns e são caracterizados pela substituição, perda ou adição de um nucleotídeo (Cavalli-Sforza, 1998) e têm demonstrado ser uma ferramenta eficiente na detecção de regiões associadas com doenças.

Verificou-se a existência de mais de 400 genes envolvidos na regulação da função vascular, estando eles ligados às diferentes repercussões nos mais variados sistemas corporais através da modulação dos processos de vasodilatação e vasoconstrição (Doevendans, 2001). Entre todo este grupo importante de características genéticas a serem investigadas, dois genes têm sido comumente estudados: o gene que codifica para a enzima conversora da angiotensina (ECA) e o gene que codifica para a síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS), os quais possuem ações antagônicas na homeostase vascular: ECA, a qual tem função na vasoconstrição e eNOS, o qual tem ação na vasodilatação.

O controle do fluxo sanguíneo é feito pela interação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras (Berthold et al., 1999). A sepse é frequentemente associada a uma alteração no

balanço entre o oxigênio disponível e o seu consumo, com uma redução na extração de oxigênio pelos tecidos associado a uma alteração na regulação da microcirculação. Durante a evolução do quadro séptico é crucial o monitoramento dos níveis de oxigênio nos pacientes, sendo o aporte deste gás, em nível de macro e microcirculação, essencial para que não haja morte tecidual por necrose (Morisaki et al., 2004). Na sepse, há importantes alterações no tônus vascular e na densidade de capilares abertos proporcional à demanda metabólica. Do ponto de vista de orientação do fluxo, existe uma perda importante da modulação do tônus vascular, restringindo a capacidade das arteríolas em direcionar o fluxo, principalmente por perda da capacidade de vasoconstrição. Vários mecanismos contribuem para a queda da tensão de oxigênio em nível tecidual durante o processo séptico. Um dos mecanismos envolvidos na menor disponibilidade de oxigênio é a hipotensão arterial, resultante da vasodilatação periférica (De Backer et al., 2002; Ruokonen et al., 1993). Neste sentido, diferentes estudos tentam demonstrar associações entre variações genótípicas ou alélicas e desfechos fenotípicos. O polimorfismo no gene da ECA, encontra-se localizado no locus 17q23 e contém 26 exons (Niu et al., 2002). O gene da ECA (enzima conversora da angiotensina), o qual codifica a proteína que modula a síntese de angiotensina II, tem sido bastante estudado em razão de sua ação vasoconstritora. A estrutura do gene humano da ECA sugere ter havido uma duplicação a partir de um gene da ECA ancestral. Estudos importantes, os quais incluíram a análises de populações com mais de mil indivíduos, relacionaram a herança do alelo D ou do genótipo DD com morbidades associadas à disfunções no sistema circulatório relacionadas com vasoconstrição. 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 (Kimura et al., 1997; Gardemann et al., 1998; O'Donnell et al., 1998; Bengtsson et al., 1999; Taitinen et al., 1999; Martínez et al., 2000; Qu et al., 2001; Montgomery et al., 2002).

Em um estudo recente, a superprodução de Óxido Nítrico foi sugerida como um evento potencialmente importante nos quadros sépticos (Feihl et al., 2001). O óxido nítrico (NO) é um poderoso agente vasodilatador sintetizado a partir da oxidação da L-arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS). O polimorfismo do exon 7 (894G>T) do gene da eNOS resulta na modificação no resíduo 298 da proteína final que consiste numa substituição de um ácido glutâmico por um ácido aspártico (Glu298Asp) e seus genótipos estão associados com a vasodilatação endotelial. O alelo G, por ter uma eNOS supostamente mais funcional, vem sendo associado a uma maior vasodilatação quando comparado ao alelo T, que possui uma relatada menor atividade da eNOS (Afrasyap et al., 2004). Estuda-se se o polimorfismo 894G>T é de fato o responsável pelas alterações fisiológicas da eNOS ou se ele representa apenas um marcador que está ligado a outra variante polimórfica que seria a real causadora da patologia (Hingorami et al., 1999; Brown et al., 2003; Shoji et al., 2000).

O reconhecimento de componentes de bactérias e a subsequente ativação de citocinas são características importantes envolvidas durante o quadro séptico. Recentemente, vários polimorfismos de genes associados com estas respostas têm sido demonstrados. Entre outros, o Fator de Necrose Tumoral (TNFZ), uma citocina próinflamatória, tem sido relacionado como fator importante no curso clínico da sepse. O polimorfismo 308G>A do gene TNFZ foi identificado e associado à capacidade transcricional diferenciada do TNFZ (Nakada et al., 2005). A liberação sistêmica de TNFZ causa vasodilatação e perda de volume plasmático devido a um aumento da permeabilidade vascular, conduzindo ao choque séptico. Nakada et al. (2005), em estudo com pacientes com sepse, mostraram que a mortalidade desses pacientes foi significativamente mais elevada naqueles que eram heterozigotos GA quando comparados com os homozigotos GG (Nakada et al., 2005).

Infecções devido a organismos gram-negativos são comumente associada como a principal causa de sepse e choque séptico (Holmes et al., 2003). Estudos baseados no reconhecimento de lipopolissacarídeos, presentes em bactérias gram-negativas, por monócitos, e na regulação de genes envolvidos no processo inflamatório também podem identificar novos instrumentos terapêuticos. O CD14, um receptor de membrana que tem papel fundamental no reconhecimento de lipopolissacarídeos por monócitos, tem sido citado freqüentemente como um dos principais genes envolvidos em doenças inflamatórias. No promotor do gene CD14 foi encontrado um SNP que parece estar associado à regulação da expressão do gene CD14 (Guha et al., 2001). A regulação do CD14 parece ser de extrema importância em vários estados de doenças inflamatórias (Le Van et al, 2001) e sua expressão diferenciada pode ser crucial para o curso clínico dessas patologias (Gluck et al, 2001).

4 – O CD14

Ainda que centenas de genes estejam envolvidos na modulação fisiológica final de um indivíduo com um quadro patológico complexo, os genes que interferem em múltiplos sistemas e órgãos são, certamente, bastante decisivos. Por este motivo escolhemos estudar o gene CD14, cuja expressão tem ampla repercussão sistêmica, como um suposto marcador genético para ser usado como indicador no prognóstico, na prevenção e no tratamento das doenças complexas inflamatórias. O gene humano que codifica a proteína CD14 está localizado no locus 5q23-q31 ocupando cerca de 1500pb organizados em dois éxons que codificam para uma proteína de 375 resíduos aminoácidos [AF097942 (Long et al., 1998); X06882 (Ferrero et al., 1998)]. 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 (Zhang et al., 1994). Mutações que alterem a seqüência de reconhecimento para Sp1 diminuem a atividade

promotora do gene demonstrando um papel crítico regulador de sua expressão (Zhang et al., 1994). Em um segmento de 460pb 5' flanqueante ao éxon 1 [U00699 (Zhang et al., 1994; Simmons et al., 1989)] foi detectado um polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism ou SNP) de transição de uma citosina para uma timina na posição -159, a partir do sítio de início da transcrição, que também equivale à posição -260 a partir do início da primeira adenina do códon ATG do início da tradução. A mutação -260C>T encontra-se próxima a um sítio de reconhecimento para Sp1 o que permite sugerir, portanto, que tal substituição nucleotídica possa interferir na capacidade transcricional do gene (Figura 1).

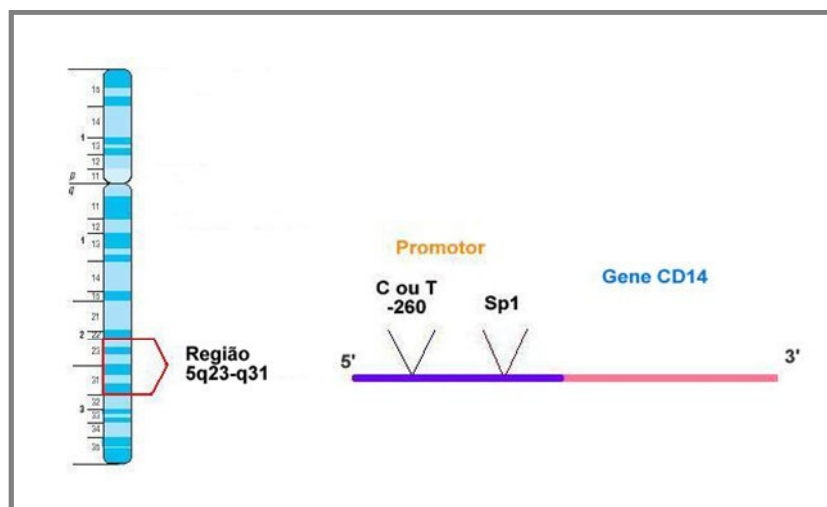


Figura 1: O gene humano que codifica a proteína CD14 está localizado no braço longo do cromossomo 5. A substituição de uma Citosina para uma Timina na posição -260, próximo à sequência de reconhecimento para o fator de transcrição Sp1, pode interferir na capacidade transcricional do gene.

Este polimorfismo no promotor do gene CD14, de uma substituição de um nucleotídeo C para um T na região promotora -260, parece ter um papel significativo na regulação de sCD14 (Fernandez-Real et al., 2003). 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 (Koppelman et al., 2001; Hubacek et al., 1999; Unkelbach et al., 1999; Baldini et al., 1999, Amar et al., 2004). Estudos prévios mostram que em pacientes com sepse, os níveis de sCD14 estão de três a cinco vezes aumentados; onde nos pacientes sobreviventes, esses níveis de sCD14 continuam aumentados quando relacionados aos pacientes não-sobreviventes (Glück et al., 2001). Zhang et al. (2006) investigaram os níveis de sCD14 igualmente em pacientes sépticos, e relacionaram níveis elevados de sCD14 aos pacientes sépticos não-sobreviventes (Zhang et al., 2006). É necessário que se elucide se o aumento de sCD14 em tais pacientes é de relevância fisiopatológica ou um mero fenômeno do acaso (Glück et al., 2001; Schütt, 1999).

Em um estudo realizado por Hubacek et al. (1999) com 135 voluntários saudáveis, a densidade de mCD14 foi significativamente mais alta em homozigotos TT quando comparadas com os outros genótipos, CC e TC (Hubacek et al., 1999).

Nosso grupo de pesquisa estudou 85 pacientes críticos com idade entre 19 e 95 anos e encontrou diferença significativa favorável aos portadores do genótipo TT em relação à sobrevida, sugerindo que o gene CD14 é ser um importante candidato para adicionais estudos que possam servir de ferramenta prognóstica para a avaliação de pacientes de risco (D'Avila et al., 2006). O CD14 é um receptor para lipopolissacarídeo (LPS), um dos componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. O CD14 é uma proteína de 53-55kD que não tem a porção citoplasmática (Karima et al., 1999), encontrada de duas formas: mCD14 a qual está intrínseca na membrana plasmática de macrófagos, monócitos e neutrófilos, e sCD14 quando na sua forma solúvel (Schütt, 1999). O CD14 na sua forma solúvel (sCD14) é abundante no soro (Baldini et al., 1999) e é aparentemente derivada da secreção do mCD14 e de sua clivagem (Fernandez-Real et al., 2003). Em ambas formas a ação do CD14 está envolvida com a sinalização imunológica inata à infecção microbiana (Ulevitch, 1999; Modlin et al., 1999).

O lipopolissacarídeo (LPS) desenvolve o papel-chave na sepse adquirida por bactérias gram-negativas (Landmann et al., 1996). O LPS é um constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas e sua principal atividade biológica está atribuída a um componente lipídico, o lipídio A (Karima et al., 1999).

LPSs presentes no plasma ligam-se a receptores HDL (high density lipoprotein) e são reconhecidas por LBPs (LPS-binding protein). LBP é uma glicoproteína sintetizada por hepatócitos (Hubacek et al., 2001) que forma um complexo de alta-afinidade com o LPS (Wright et al., 1990). Sendo assim, as LBPs transferem às LPSs do HDL tanto para o mCD14 bem como para sCD14 (Figura 2).

A sinalização imunológica é então promovida pelo complexo LBP-LPS-CD14. Este reconhecimento de componentes de bactérias tais como as LPS pelo sistema imune inato

desencadeará uma resposta inflamatória que visa eliminar o agente infeccioso. O mCD14, contudo, não possui conexão com o citoplasma celular, não podendo ativar a resposta imune isoladamente. A mediação do processo infeccioso inato se dá, portanto, pelos Toll Like Receptors (TLRs). TLRs reconhecem patógenos e induzem uma resposta imune inata via ativação de alguns fatores (Guha et al., 2001). O processo de ligação LBP-LPS-CD14 resulta na ativação do TLR isoforma 4 (TLR4) (Cohen et al., 2002). O domínio citoplasmático do TLR4 induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B que irá regular a expressão dos genes das citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF α , IL-8, IL-12, IL-6 (Guha et al., 2001). Estes mediadores são liberados durante os primeiros minutos (de 30 a 90) após a exposição ao LPS e, por sua vez, ativam um segundo nível de moléculas, incluindo outras citocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão que promovem a migração de células inflamatórias para diversos tecidos (Cohen, 2002). Os efeitos combinados desses mediadores contribuem para as reações locais contra a infecção na forma de resposta inflamatória. Um processo de defesa do organismo contra agentes infecciosos descontrolado, no entanto, causa uma série de disfunções orgânicas, entre elas coagulopatias, febre, vaso dilatação e baixa na pressão arterial o que provoca necrose em tecidos e órgãos causada pelo acúmulo de citocinas (Cohen et al., 2002; Zweigner et al., 2001).

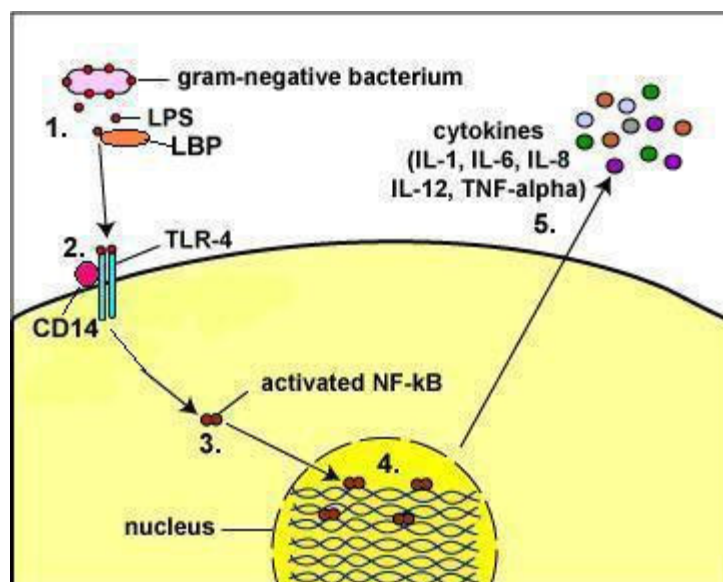


Figura 2: O complexo LPS-LBP liga-se ao receptor de membrana mCD14 o qual não possui porção intracelular, tornando impossível a ativação celular. Através do TLR4 pôde-se entender como o complexo LPS-LBP-CD14 ativa a célula. Este receptor Toll-like ativa uma série de eventos intracelulares que culmina com a ativação do NF- κ B e, por consequência, ativação dos genes relacionados à produção de citocinas
Modificado de: <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/toll/lpssignal.html>)

A ligação LBP-LPS ao CD14 solúvel resulta na ativação de tipos celulares que não expressam CD14 na superfície (Goyert et al., 1988; Landmann et al., 1996), porém pouco ainda é conhecido sobre o papel fisiológico do CD14 solúvel (Burgmann et al., 1996). Em certos tipos de células, tais como células endoteliais, que não expressam mCD14, o CD14 solúvel (sCD14) substitui reconhecimento do complexo LPS-LBP (Karima et al., 1999), podendo liberar mediadores inflamatórios (Schütt, 1999). No entanto, o sCD14 pode neutralizar o possível efeito tóxico da resposta imunológica desencadeada pela liberação de mediadores inibindo a ligação das LPSs ao mCD14 (Glück et al., 2001) e devolvendo LPSs ao HDL (Schütt, 1999) (Figura 3).

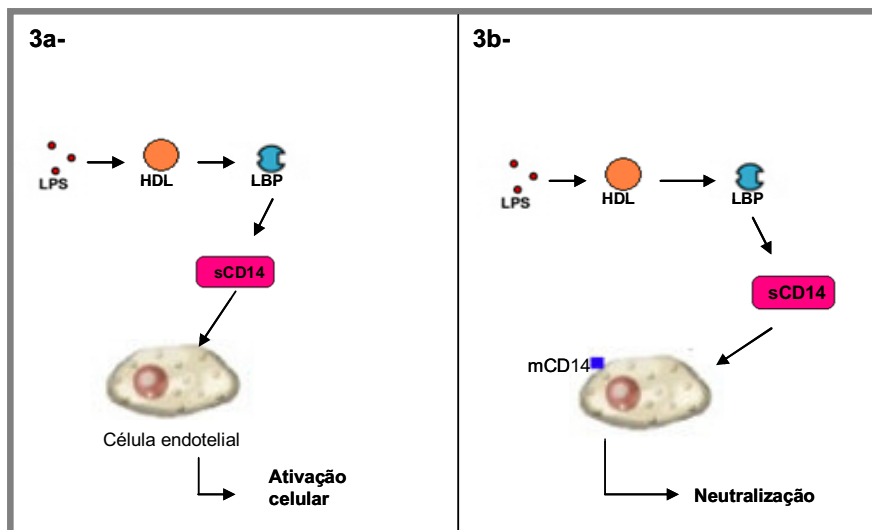


Figura 3: As duas hipóteses sobre o papel do sCD14: em 3a, onde o sCD14 pode ativar células que não possuem o CD14 de membrana, tais como células endoteliais. A segunda hipótese, mostrada em 3b, defende a idéia de que o sCD14 pode neutralizar o possível efeito tóxico da resposta inflamatória.

Estudos experimentais mostram que camundongos transgênicos que expressam elevados níveis de mCD14 são mais sensíveis ao LPS quando comparados com uma linhagem não transgênica. Em contraste, camundongos CD14 knockout são, no mínimo, 10 vezes menos sensíveis ao LPS do que camundongos normais. Assim, em experimentos onde foram injetadas doses de *E. coli* nas quais causavam 100% de letalidade em camundongos normais, a mesma dose de *E. coli* injetada em camundongos CD14 knockout, resultou em uma baixa ou nenhuma resposta. Alguns dados sugerem que mudanças significantes na expressão do mCD14 ocorrem no início do quadro séptico. Em vista disso, Glück et al., demonstraram que a expressão reduzida do mCD14 parece ser um marcador para maior severidade da doença em pacientes com sepse (Glück et al., 2001) embora outros estudos recentes, não tenham conseguido revelar o mesmo, onde em pacientes com sepse, a expressão do mCD14 em monócitos continua desconhecida, devido ao reduzido número de pacientes envolvidos nesses estudos (Barth et al., 2001; Creery et al., 2002). Diversos estudos revelam diferentes expressões do mCD14, e isso pode ocorrer devido aos diferentes estados de infecção e a regulação diferenciada de citocinas (Barth et al., 2001). Landman et al., mostraram que a expressão de mCD14 em monócitos humanos é aumentada após estímulo com LPS. Na verdade, isso ocorre apenas após as 15 primeiras horas de estímulo. Nas 3 primeiras horas de estímulo com

LPS nenhuma mudança na expressão de mCD14 é observada. Imediatamente depois de 6 a 15 horas do estímulo com LPS observa-se uma redução na expressão do mCD14. E, enfim, após 24 horas de estímulo com LPS, a expressão de mCD14 torna-se aumentada. O estudo foi realizado com até 44 horas de estímulo e, de 24h até 44h de estímulo com LPS, observou-se uma expressão aumentada do mCD14.

Os resultados desta investigação mostraram uma mudança bifásica na expressão do mCD14 depois de incubação *in vitro* com LPS, onde após poucas horas de incubação com LPS observou-se uma redução na expressão do mCD14 e, após a incubação com LPS durante 24 horas observou-se um forte aumento. Isso pode ser explicado pela ação de citocinas, que, após o estímulo com LPS, podem modular a expressão do CD14 (Landman et al., 1996). Fearn et al., em seu estudo, demonstraram que a expressão do gene CD14 em células mielóides em camundongos é modulada por LPS. Os autores revelaram o aumento da liberação de TNF alfa, após estímulo com LPS, e relacionou o TNF alfa (um dos principais mediadores da resposta sistêmica na endotoxemia) com níveis elevados de mRNA do gene CD14 (Fearn et al., 1997). Além disso, Creery et al. investigaram a expressão do mCD14 e os níveis de sCD14 em pacientes infectados com vírus HIV e compararam com controles saudáveis. A expressão do mCD14 bem como os níveis de sCD14 foram estatisticamente mais elevados em pacientes infectados com o vírus HIV quando comparados aos controles saudáveis. Esse aumento pode ser atribuído por diversos fatores, tais como uma infecção bacteriana prévia ou expressão alterada de citocinas imunoregulatórias como IL-10, TNF alfa, IL-1, IL-4 ou IL-6. Ainda nesse estudo, para determinar se o aumento da expressão do mCD14 e da liberação de sCD14 foi mediado por LPS, os autores desafiaram Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) de controles saudáveis com LPS por 48 horas. A expressão do mCD14 e os níveis de sCD14 foram aumentados após o estímulo com LPS (Creery et al., 2002).

Diferentes mecanismos que podem levar ao aumento dos níveis de sCD14 estão sendo sugeridos em estudos prévios. Além da secreção do CD14 diretamente sob sua forma solúvel, alguns estudos defendem a hipótese de que ocorre a proteólise do mCD14 pela Leucócito Elastase, uma protease que é usualmente encontrada em elevadas concentrações durante a sepse. Esta pode ser uma explicação para o aumento dos níveis de sCD14 (Glück et al., 2001).

Estudos *in vitro* e em animais experimentais mostram, igualmente, que altos níveis de sCD14 inibem a ativação de monócitos, inibindo a liberação de citocinas (Glück et al., 2001). Ainda que a completa função biológica do CD14 permaneça desconhecida, o aumento da concentração sérica do sCD14 pode ser considerado um marcador prognóstico de mortalidade em pacientes com sepse decorrente de infecções por bactérias gram-positivas e gram-negativas (Landmann et al., 1996; Burgmann et al., 1996).

5 - Referências Bibliográficas

Afrasyap, L., Ozturk, G. (2004) NO level and Endothelial NO Synthase Gene Polymorphism with Coronary Artery Disease from the Turkish Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36, 661-666.

Amar, J., Ruidavets, J.B., Baldit Sollier, C., Bongard, V., Boccalon, H., Chamontin, B., Drouet, L., Ferrieres, J. (2004) CD14 C(-260)T gene polymorphism, circulating soluble CD14 levels and arteriosclerosis. *Journal of Hypertension*. 22(8), 1523-1528.

Arts, D.G., de Keizer, N.F., Vroom, M.B., de Jonge, E. (2005) Reliability and accuracy of Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scoring. *Critical Care Medicine*, 33(9), 1988-1993.

Baldini, M., Lohman, C., Halonen, M., Erickson, R.P., Holt, P.G., Martinez, F.D.(1999) A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20, 976-983.

Bengtsson, K., Orho-Melander, M., Lindblad, U., Melander, O., Bog-Hansen, E., Ranstam, J., Rastam, L., Groop L. (1999) 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. *Journal of Hypertension*., 17, 1569-1575.

Berthold, H., Just A., Kirchheim, H.R., Ehmke, H. (1999) Interactions Between Nitric Oxide and Endogenous Vasoconstrictors in Control of Renal Blood Flow. *Hypertension*, 34, 1254:1258.

Brown, K.S., Kluijtmans, L.A., Young, I.S., Woodside, J., Yarnell, J.W., McMaster, D., Murray, L., Evans, A.E., Boreham, C.A., McNulty, H., Strain, J.J., Mitchell, L.E., Whitehead, A.S. (2003) Genetics evidence that Nitric Oxide modulates homocysteine: the NOS3 894TT genotype is a risk factor for hyperhomocystenemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*., 23, 1014-1020.

Burgmann, H., Winkler, S., Locker, G.J., Presterl, E., Laczika, K., Staudinger, T., Knapp, S., Thalhammer, F., Wenisch, C., Zedwitz-Liebenstein, K., Frass, M., Graninger, W. (1996) Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clinical*

immunology and immunopathology, 80, 307-310.

Burnett, G.W., Schuster, G.S. (1982) *Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas*. Panamericana, Buenos Aires, 31-70.

Cavalli-Sforza, L.L. (1998) The DNA revolution in population genetics. *Trends in genetics : TIG*, 14(2), 60-65.

Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-891.

Creery, D., Angel, J.B., Aucoin, S., Weiss, W., Cameron, W.D., Diaz-Mitoma, F., Kumar, A. (2002) Nef protein of human immunodeficiency virus and lipopolysaccharide induce expression of CD14 on human monocytes through differential utilization of interleukin-10. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(6), 1212-1221.

D'Avila, L.C., Albarus, M.H., Franco, C.R., Aguiar, B.B., Oliveira, J.R., Dias, F.S., Alho, C.S. (2006) Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunology and Cell Biology*, 84(3), 342-348.

De Angelis, C.D., Rosenberg, R.N., Smith, J.M. (2000) Genomic medicine and the individual patient. *The Journal of the American Medical Association*, 284, 22-29.

De Backer, D., Creteur, J., Preseir, J.C., Dubois, M.J., Vincent, J.L. (2002) Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 98-104.

Doevendans, P.A., Jukema, W., Spiering, W., Defesche, J.C., Kastelein, J.J. (2001) Molecular Genetics an gene expression in atherosclerosis. *International Journal of Cardiology*, 80, 161-172.

Fearns, C., Kravchenko, V. V., Ulevitch, R. J., Loskutoff, D. J. (1995) Murine CD14 gene expression in vivo: Extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 181, 857-866.

Fearns, C., Loskutoff, D.J. (1997) Role of tumor necrosis factor alpha in induction of murine CD14 gene expression by lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 65(11), 4822-4831.

Fernandez-Real, J.M., Broch, M., Richart, C., Vendrell, J., Lopez-Bermejo, A., Ricart, W. (2003) CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *Journal of*

Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(4), 1780-1784.

Ferrero, E., Goyert, S.M. (1998) Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Research*, 16, 4173.

Friedman, G., Silva, E., Vincent, J.L. (1998) Has the mortality of septic shock changed with time? *Critical Care Medicine*, 26, 2078-2086.

Gardemann, A., Fink, M., Stricker, J., Nguyen, Q.D., Humme, J., Katz, N., Tillmanns, H., Hehrlein, F.W., Rau, M., Haberbosch, W. (1998) ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals. *Atherosclerosis*, 139, 153-159.

Goyert, S.M., Ferrero, E., Retting, W.J., Yenamandra, A.K., Obata, F., Le Beau, M.M. (1988) The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science*, 239, 497-500.

Gluck, T., Silver, J., Epstein, M., Cao, P., Farber, B., Goyert, S.M. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. (2001) *European Journal of Medicine Research*, 6, 351-358.

Guha, M., Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13, 85-94.

Guttmacher, A.E., Collins, F.S. (2002) Genomic Medicine. *The New England Journal of Medicine*, 19, 1512-1520.

Heard, S.O., Fink, M.P. (1991) Multiple organ failure syndrome – Part I: Epidemiology, prognosis, and pathophysiology. *Intensive Care Medicine*, 6, 279-294.

Hingorami, A.D., Liang, C.F., Fatibene, J. (1999) A common variant of the endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu298bAsp) is a major risk for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 100, 1515-1520.

Holmes, C.L., Russell, J.A., Walley, K.R. (2003) Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest Journal*, 124, 1103-1115.

Hubacek, J.A., Pit'ha, J., Skodová, Z., Stanek, V., Poledne, R., Schmitz, G. (1999) C(-260) b T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 99, 3218-3220.

Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H., Matsushima, K. (1999) The Molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, 5(3), 122-132.

Kimura, M., Yokota, M., Fujimura, T., Kato, S., Hirayama, H., Tsunekawa, A., Maeda, M., Inagaki, H., Ogawa, S., Nakashima, N., Yamada, Y. (1997). 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*, 88, 309-314.

Koppelman, G.H., Reijmerink, N.E., Colin Stine, O., Howard, T.D., Whittaker, P.A., Meyers, D.A., Postma, D.S., Bleecker, E.R. (2001) Association of a Promoter Polymorphism of the CD14 Gene and Atopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 965-969.

Levy, M.M., Marshal, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G. (2003) International Sepsis Definitions Conference, *Intensive Care Medicine*, 29(4), 530-538.

Landmann, R., Reber, A. M., Sansano, S., Zimmerli, W. (1996) Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *The Journal of Infectious Disease*, 173, 661-668.

Landmann, R., Knopf, H.P., Link, S., Sansano, S., Schumann, R., Zimmerli, W.. (1996) Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 64(5), 1762-1769.

Le Van, T.D., Bloom, J.W., Bailey, T.J., Karp, C.L., Halonen, M., Martinez, F.D., Vescelli, D. (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *The Journal of Immunology*, 167(10), 5838-5844.

Long, J.Y., Xue, Y.N., Sun, L., Wang, H.X. (1998) Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene. *ShenhWu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* 25:377-378 In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Accession AF097942; Version AF097942.1; GI:3983126.

Modlin, R.L., Brightbill, H.D., Godowski, P.J. (1999) The toll of innate immunity on microbial

pathogens. *New England Journal of Medicine*, 340, 1834-1835.

Montgomery, H., Brull, D., Humphries, S.E. (2002) Analysis of gene-environment interactions by “stressing-the-genotype” studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. *Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology*, 3, 10-14.

Martinez, E., Puras, A., Escribano, J., Sanchis, C., Carrion, L., Artigao, M., Divison, J.A., Masso, J., Vidal, A., Fernandez, J.A. (2000) Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population.

Morisaki, H., Sibbald, W.J. (2004) Tissue oxygen delivery and the microcirculation. *Critical Care Clinics*. 20(2), 213-23.

Nakada, T.A., Hirasawa, H., Oda, S., Shiga, H., Matsuda, K., Nakamura, M., Watanabe, E., Abe, R., Hatano, M., Tokuhisa, T. (2005) Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *The Journal of Surgical Research*, 129, 322-328.

Niederman, M.S., Fein, A.M. (1990) Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clinics in chest medicine*, 11(4), 633-656.

Nisengard, R.J., Newman, M.G. (1994) *Oral Microbiology and Immunology*. 2^a ed., Philadelphia, Saunders, 477.

Niu, T., Chen, X., Xu, X. (2002). Angiotensin Converting Enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease. *Drugs*, 62, 977-993.

O'Donnell, C.J., Lindpaintner, K., Larson, M.G., Rao, V.S., Ordovas, J.M., Schaefer, E.J., Myers, R.H., Levy, D. (1998). 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*, 97, 1766-1772.

Phillips, J.A. (2001) Genomic Medicine: managing the complexity. *The Journal of the American Medical Association*, 286, 1639.

Qu, H., Lu, Y., Lin, S. (2001) Meta-analysis on the association of ACE/ID polymorphism and essential hypertension in Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 35, 408-411.

Ruokonen, E., Takala, J., Kari, A., Saxen, H., Mertsola, J., Hansen, E.J. (1993) Regional blood flow and oxygen transport in septic shock. *Critical Care Medicine*, 21, 1296-1303.

Sander, C. (2000) Genomic medicine and the future of health care. *Science*, 287, 1977-1978.

Shoji, M., Tsutaya, S., Saito, R., Takamatu, H., Yasujima, M. (2000) Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern japan. *Life Sciences*, 66, 2557-2562.

Simmons, D.L., Tan, S., Tenen, D.G., Nicholson-Weller, A., Seed, B. (1989) Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*, 73, 284-289.

Schütt, C. (1999) Molecular in focus CD14. *International Journal of Biochemistry & Cellular Biology*, 31, 545-549.

Taittonen, L., Uhari, M., Kontula, K., Kainulainen, K., Miettinen, H., Turtinen, J., Nuutinen, M. (1999) Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiotensinogen gene polymorphisms, family history of hypertension, and childhood blood pressure. *American Journal of Hypertension*, 12, 858-866.

Ulevitch, R.J. (1999) Toll gates for pathogen selection. *Nature*, 401, 755-756.

Unkelbach, K., Gardemann, A., Kostrzewa, M., Philipp, M., Tillmanns, H., Haberbosch, W. (1999) A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 932-938.

Varon, J., Marik, P.E., Irwin, R.S. (1999) Multiple organ dysfunction síndrome. *Intensive Care Medicine*, Lippincott-Raven Philadelphia, 2044-2048.

Vincent, J.L., de Mendonça, A., Cantraine, F., Moreno, R., Takala, J., Suter, P.M., Sprung, C.L., Colardyn, F., Blecher, S. (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine*, 26, 1793-1800.

- Vincent, J. L., Carlet, J., Opal, S. (2002) Sepsis: The magnitude of the problem. The Sepsis Text Kluwer Academy Publisher.
- Vincent, J.L., Ferreira, F.L, Evans, T.W. (2002) Multiple organ failure: Clinical syndrome. In Mechanisms of organ dysfunction in critical illness. Intensive Care Medicine Springer, 394-403.
- Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Tan, S., Dziennis, S.E., Gonzalez, D.A., Chen, H.M., Tenen, D.G. (1994) Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. The Journal of Biological Chemistry, 269, 11425-11434.
- Zhang, Y.T., Ding, G.J., Fang, Q. (2006) Clinical study of serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in severe sepsis patients. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 18(2), 78-81.
- Zweigner, J., Gramm, H.J., Singer, O.C., Wegscheider K., Schumann R.R. (2001) High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibits the lipopolysaccharide response in human monocytes. Blood Journal, 98, 3800-3808.
- Wright, S., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R. J., Mathinson, J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science, 249, 1431-1433.

Hipótese

Alguns estudos revelam que a expressão do CD14 pode estar relacionada ao polimorfismo -260C>T do promotor do gene que codifica para o CD14. A partir disso, acreditamos que possa existir uma diferença na expressão do CD14 entre indivíduos saudáveis e pacientes com sepse e que essa expressão pode estar relacionada com maior sobrevida desses pacientes.

Objetivos

Objetivo Geral:

Verificar se existe diferença significativa na expressão do CD14 entre indivíduos saudáveis e pacientes sépticos e se isso se relaciona com o desfecho de sobrevida em pacientes sépticos.]

Objetivos Específicos:

- 1- Genotipar o polimorfismo -260C>T do promotor do gene CD14 (genótipos: TT, CT e CC) em pacientes com sepse admitidos no Hospital São Lucas da PUCRS (HSL-PUCRS) e em voluntários saudáveis incluídos no estudo;
- 2- Medir a densidade do CD14 na superfície de macrófagos / monócitos (mCD14) nos pacientes e nos voluntários saudáveis incluídos no estudo;
- 3- Medir os níveis de CD14 solúvel no soro (sCD14) nos pacientes e nos voluntários saudáveis incluídos no estudo;
- 4- Determinar a frequência dos genótipos TT, TC e CC e dos alelos C e T do polimorfismo -260C>T do CD14 na amostra de pacientes e de voluntários saudáveis incluídos no estudo;
- 5- Acompanhar a evolução clínica dos pacientes incluídos no estudo (até o 28º dia de suas internações na UTI ou no hospital) e registrar seu desfecho de sobrevida;
- 6- Verificar se existe relação entre a herança genética e a expressão do CD14 (mCD14 + sCD14) nos pacientes e nos voluntários saudáveis incluídos no estudo;
- 7- Verificar se existe relação entre a herança genética e a sobrevida dos pacientes incluídos no estudo;
- 8- Verificar se existe relação entre a expressão do CD14 (mCD14 + sCD14) e a sobrevida dos pacientes incluídos no estudo.

Manuscrito com os resultados do trabalho experimental

Este manuscrito de artigo científico contém as investigações científicas realizadas pela pós-graduanda, durante o período do Mestrado e será submetido à revista Immunogenetics.

Title of the paper:

CD14 expression and -260C>T CD14 polymorphism in septic and in healthy subjects

The full name of authors:

Bibiana Butkus de Aguiar; Ingrid Girardi; Adriane Rodrigues; Everaldo de França; Fernando Suparregui Dias; Cristina Bonorino; Clarice Sampaio Alho.

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

Faculdade de Biociências and Hospital São Lucas (HSL), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

Address and name of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent:

Dr. Clarice Sampaio Alho. Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 P12 - 2o andar. 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil; Telephone number: (55) (51) 33203545; Fax number: (55) (51) 33203568; E-mail address: csalho@pucrs.br

Key Words:

-260C>T CD14 polymorphism; mCD14 density in monocytes; sCD14; sepsis; critically ill patient, LPS.

Abstract

CD14 is a 53-55kDa glycoprotein with a high affinity for lipopolysaccharide (LPS), found anchored to the surface (membrane bound CD14 or mCD14) of monocytes, macrophages, neutrophils, and other non-myeloid cells such as endothelial and epithelial cells. It is also found in a soluble form (sCD14). mCD14 and sCD14 play an important role in the generation of innate immune responses against bacterial pathogens. The activation of the innate immune system by bacterial compounds may be modulated by differential expression of mCD14 and levels of sCD14. It was suggested that a higher CD14 expression may be beneficial for the survival of septic patients. A -260C>T single nucleotide polymorphism (SNP) has been detected in the promoter of the CD14 human gene. This SNP seems to have a significant role in CD14 expression, and it was suggested that TT homozygous present increased mCD14 density in monocytes and sCD14 levels, in comparison to the C allele carriers. The aim of this study was to evaluate CD14 gene expression, in septic patient and in healthy subjects correlating this with the -260C>T CD14 genotype. We observed that CD14 expression, measured by mCD14 density in monocytes and sCD14 levels, was increased in septic patients compared to healthy subjects ($p<0.001$), and that TT genotype is significantly associated with higher mCD14 density ($p=0.024$). We verified that after incubation with LPS there was a significant increase of mCD14 ($p<0.001$) in healthy subjects, although no significant differences among genotype groups ($p=0.334$). This is the first time that septic patients were analyzed simultaneously for CD14 polymorphism, CD14 expression (measured by mCD14 density and sCD14 levels), and mortality. However no significant associations among these three variables were detected. Our results agree with previous studies that demonstrated that increased CD14 expression could be associated with TT genotype, although it does not significantly influences outcome for septic patients.

Introduction

The cluster of differentiation 14 (CD14) is a 53-55kDa glycoprotein with a high affinity receptor for lipopolysaccharide (LPS) expressed on the surface of myeloid cells such as monocytes, macrophages, neutrophils, and on non-myeloid cells such as endothelial and epithelial cells (mCD14) (Jersmann, 2005). It can also be found in a soluble form (sCD14) (Schütt, 1999). Both mCD14 and sCD14 are pattern recognition receptors for bacterial cell wall fragments and play an important role in innate immune response against bacterial pathogens (Landmann et al., 1996; Glück et al., 2001). sCD14 apparently derives from the secretion of CD14 or from proteolysis of mCD14 (Fernandez-Real et al., 2003), is abundant in the serum and plays a crucial role in microbial responses of cells that do not express mCD14, enabling it to produce inflammatory cytokines in response to LPS challenge (Goyert et al., 1988; Frey et al., 1992; Landmann et al., 1996).

LPS, a structural component of gram-negative bacteria, is bound by LBP (LPS binding protein). The complex LPS-LBP is recognized by CD14 that triggers the pro-inflammatory cytokine synthesis (IL-1, TNF, IL-8, IL-12, IL-6), activating the innate immunity against the infection (Ulevitch, 1999; Modlin et al., 1999).

Activation of the innate immune system by bacterial cell wall fragments might be modulated by differential expression of mCD14 or sCD14 levels. Thus, persistently reduced mCD14 density was associated with sepsis and mortality of septic patients, while higher sCD14 levels were beneficial for the survival of septic patients (Glück et al., 2001).

The CD14 human gene is located in the locus 5q23-31 occupying about 1500bp organized into two exons that code for a protein of 375 residues (Long et al., 1998; Ferrero, 1998). In the CD14 promoter, the -260C>T single nucleotide polymorphism (SNP) seems to have a significant role in the CD14 regulation (Fernandez-Real et al., 2003) once it can interfere quantitatively in the transcriptional capacity of the gene (Zhang et al., 1994). It was observed that TT homozygous present increased mCD14 density and sCD14 serum levels when compared with C allele carriers (Hubacek et al., 1999; Baldini et al., 1999; Koenig et al., 2002; Karhukorpi et al., 2002; Kabesch et al., 2004). As CD14 gene expression appears to be important in several inflammatory disease states (Le Van et al., 2001), it was hypothesized that TT genotype could result in an altered susceptibility to, or course of, infectious or inflammatory associated disease. In a previous study with septic, shock septic and critically ill patients, we found a significant difference favoring the survival of TT subjects (D'Ávila et al., 2006).

In this study, we analyze the -260C>T CD14 SNP, mCD14 monocyte density, and sCD14 level in septic patients, as well as the mortality. We also compared mCD14 monocyte density and sCD14 levels between septic patients and healthy subjects. This is the first time that septic patients were analyzed simultaneously for CD14 polymorphism, CD14 expression (measured by mCD14 monocyte density and sCD14 levels), and mortality.

Subjects and Methods

Study approval and design

This was a prospective, randomized study of unrelated subjects. Approval for human study protocols was obtained of Research Ethics Committee of the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (Protocol # 05/02537). All subjects enrolled, or their answerable, gave written, informed consent.

We studied 15 septic patients admitted in Recovery Unit (RU) (n=4) and in Intensive Care Unit (ICU) (n=11) of the São Lucas Hospital (HSL), Porto Alegre, RS, Brazil, between Jun 1st, 2005, and January 1st, 2006, and 30 healthy blood donors volunteers that were chosen serving as the normal control group. There was no significant difference in age between healthy volunteers (52.2 ± 15.1), and septic patients (58.8 ± 19.5) ($p=0.213$). The controls enrolled informed to be healthy in the moment of the donation of biological material. All patients and volunteers were from the southern Brazilian population.

Clinical Data.

We monitored the septic patients daily during their total in RU or ICU and post-ICU (hospital) stay which resulted in measurements from the ICU admission day to a maximum of 57 days. Patients were not eligible if they were under 16 years old or diagnosed with HIV-infection, pregnant or lactating or taking immunosuppressive drugs. All patients had diagnosis of recent onset of sepsis (onset of symptoms within 24 h) according to the American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Consensus Conference definition: at least two of the following criteria: Fever or hypotermia (temperature in the core of the body $> 38^{\circ}\text{C}$ or $< 36^{\circ}\text{C}$); Tachycardia (ventricular rate > 90 heartbeats per minute); Tachypnea or Hyperventilation (> 20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg); Leucocytosis above 12.000 mm^{-3} or leucopenia below 4.000 mm^{-3} .

To measure mortality rates, we used the time in days, instead of the usual categories of until 21 or 28 days mortality, because we consider it more precise and informative. Clinical endpoints of the study were discharge from the hospital (considered survivors), or death (considered non-survivors). For illness severity evaluation we used the APACHE-II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) score (Knaus et al., 1985) obtained on ICU admission day and used as an estimate for severity of disease. For organ dysfunction evaluation we used the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) (Vincent et al., 1998) score obtained on ICU admission day (SOFA-1) and daily during the first week from the ICU admission.

Genotyping of -260C>T SNP

A 5ml blood sample was collected in a sterile system with EDTA anticoagulant (Becton Dickson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) and maintained refrigerated at 4°C or frozen at -20°C until DNA extraction. Genomic DNA were isolated from leucocytes by standard procedures (Lahiri et al., 1991) and maintained at -20°C . The -260C>T CD14 SNP was determined in patients and healthy controls by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of polymerase chain reaction (PCR) products

according Hubacek et al. (Hubacek, et al., 1999) and described in D'Ávila et al, 2006. The Homo sapiens cluster of differentiation 14 (CD14) promoter DNA sequence and both -260C>T alleles are registered in the EMBL data base as GI:4557416; GenBank accession number X74984 and U00699. Genotyping was performed in a blinded approach; the investigators were uninformed of patient data.

Flow Cytometry (FACS) mCD14 analysis

All patients were enrolled during the first 24 hours after the onset of the sepsis symptoms. Immediately after enrollment, 5 ml of blood was drawn without anticoagulant and the mCD14 processed within two hours. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients and health volunteers were isolated by Ficoll-Paque centrifugation (TM Plus- Amersham-Biosciences, AB, Uppsala, Sweden). mCD14 expression on monocytes was measured by flow cytometry according the standard protocol (Diatec AS, Oslo, Norway). The cells were analysed with a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) flow cytometer. Monocytes were identified according to their forward/side scatter characteristics and gated accordingly. FITC-isotype control antibody (isotypic control IgG1 FITC-Diatec AS, Oslo, Norway) was used with each sample to set the cutoffs for analysis. PBMCs from 12 healthy volunteers were stimulated with LPS (1mg/ml) in 24 well tissue culture plates (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J.). Cells were harvested after 24h and analyzed for CD14 expression by flow cytometry as previously described. Data were analyzed using the WinMDI 2.8 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) software program.

Quantification of sCD14

Five milliliter of blood was drawn with EDTA anticoagulant, centrifuged, and stored at -20°C to further sCD14 analyses. sCD14 serum levels were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Duoset Kit - R&D Systems - ELISA Development System, USA). All tests were performed in 96 well plates (Nunc-Immuno Module, Naperville, IL, USA). Optical density was read at 450nm on Bio-Rad Microplate reader (Bio-Rad Laboratories, USA). Concentrations were extrapolated from a standard curve and analyzed with the GraphPadPrism-4 software program (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Statistical Analysis

Statistical calculations were performed using the statistical package SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). Continuous variable results are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and the categorical variables as frequencies and percents. Non-normally distributed scalar variables were analyzed using Kruskal-Wallis, Mann-Whitney. mCD14 and sCD14 were analyzed by 2x3 Factorial ANOVA test. mCD14 data were log transformed to satisfy requirements for 2x3 factorial ANOVA, with post-test Bonferroni's multiple comparison when necessary. For categorical data, we used the Fisher Exact test. To test Hardy-Weinberg equilibrium the

Chi-square test was used. To compare paired groups (before and after LPS challenge) we used a non-parametric Wilcoxon test. All reported p-values are two-tailed, and differences were considered significant with $p < 0.05$.

Results

We found that total genotype (CC= 0.24, CT=0.58, TT=0.18) and allele (C=0.53, T=0.47) frequencies were at Hardy–Weinberg equilibrium (Chi-square test $p=0.761$), and there was no significant difference in it between septic patients and health volunteers ($p=0.466$).

The genotype distribution in septic patients was random for demographic and clinical characteristics at ICU admission: age (Kruskal-Wallis test, $p=0.512$); gender (Chi-square test, $p=0.754$); APACHE II score (Kruskal-Wallis test, $p=0.744$); SOFA-1 score (Kruskal-Wallis test, $p=0.559$). The table 1 presents a complete description of 15 septic patients. As the table results shown the age varied from 16 to 86 years (58.8 ± 19.5); all the blood samples were obtain during the first 24 hours from the sepsis diagnosis (mean in 13h30min after sepsis diagnosis); the blood samples were regularly collected between 12:00 and 15:00 o'clock to avoid the effect of the circadian rhythm variations in mCD14 and sCD14 measures. The total mCD14 monocyte density measured by mean fluorescence was 291 ± 62.9 , and total sCD14 measured by $\mu\text{g/ml}$ was 6.7 ± 0.7 . The mean and standard deviation to APACHE II score, total SOFA score, and days in ICU and in hospital were, respectively, 19.36 ± 4.86 , 7.70 ± 2.68 , 10.72 ± 8.83 , 18.72 ± 16.16 .

Considering survivors ($n=8$) and deceased ($n=7$) septic patients, there was no significant difference as age (Student test, $p=0.104$); gender (Chi-square test $p=0.916$); APACHE II score (Mann-Whitney test, $p=0.485$); SOFA scores (Kruskal-Wallis test, $p=0.829$); genotypes (Chi-square test, $p=0.212$); mCD14 monocyte density (Mann-Whitney test, $p=0.779$); or sCD14 levels (Mann-Whitney test, $p=0.125$). The figure 1 show there was no significant difference among mCD14 monocyte density [Mann-Whitney test, $p=0.862$; Figure 1-A (I)] or sCD14 [Mann-Whitney test, $p=0.165$; Figure 1-B (I)] levels in survivors and deceased septic patients according to genotypes, and no significant difference was found among monocyte density [Kruskal-Wallis test, $p=0.182$; Figure 1-A (II)] or sCD14 [Kruskal-Wallis test, $p=0.852$; Figure 1-B (II)] levels by genotypes according to mortality.

While we did not find significant differences for these parameters, other studies (Baldini et al., 1999; Hubacek et al, 1999; Karhukorpi et al, 2002; Koenig et al., 2002; Kabesch et al, 2004; D'Ávila et al, 2006) indicated that CD14 expression and mortality is influenced by -260C>T genotypes. To investigate the genotype influence on the CD14 expression, we compared mCD14 and sCD14 in septic patients and in healthy volunteers according to genotype. Flow cytometry analysis of mCD14 expression is shown in Figure 2-A. Figure 2-B presents means \pm SD of mCD14 density on monocytes for patients and healthy subjects. We observed that septic patients always presented a higher mCD14 expression as compared to healthy subjects, independently of the genotype group (Figure 2-B) ($p < 0.001$). Finally, we detected significant differences

among genotypes ($p=0.024$), where TT homozygotes and CC homozygotes differed significantly ($p=0.003$), as well as TT homozygotes and CT subjects ($p=0.001$) (Figure 2-B).

We also observed that sCD14 serum levels were always significantly higher in septic patients than healthy subjects, independently of the genotype group (Figure 3) ($p<0.001$). However, sCD14 levels were not significantly influenced by genotype (Figure 3) ($p=0.594$). The interaction effect genotype/group was not statistically significant neither in the 2x3 Factorial ANOVA of mCD14 monocyte density and sCD14 levels. These findings suggested that exposure to inflammatory milieu and/or infection actively modulated CD14 levels.

To investigate if the exposure to inflammatory scene and/or infection actively modulated CD14 synthesis, we isolated PBMCs from 12 healthy subjects and stimulated them in culture with LPS for 24h. Figure 4-A shows typical results for analysis of mCD14 density before and after 24 hours of LPS challenge in a healthy subject. As predicted, mean mCD14 density was significantly increased after LPS challenge (Figure 4-B) ($p<0.001$). The increase was of 1.9 times, which is very similar to the increase of 1.7 verified between the healthy subjects and septic patients (Figure 2-B). Although no significant differences among TT, CT or CC genotypes for modulation of mCD14 levels were detected ($p=0.334$), the data suggests that major increase could occur in allele C carrying individuals (Figure 4-C).

Discussion

APACHE II is a point score based upon initial values of 12 routine physiologic measurements, age, and previous health status to provide a general measure of severity of disease. An increasing score (range 0 to 71) is closely correlated with the subsequent risk of hospital death (Knaus et al., 1985). In our study, non-survivors showed a greater severity of disease with a higher mean APACHE II score as compared to survivors, although differences were not statistically significant. Glück et al. found that mCD14 density negatively correlated with severity of disease as measured by the APACHE II score, although mCD14 expression was not discriminated between survivors and non-survivors (Glück et al., 2001). The SOFA score was developed to quantify the severity of 13 patients' illness, based on the degree of organ dysfunction and the association of this score with mortality. In our previous study, we verify that higher APACHE I and SOFA-1 scores both significantly associate with non-survivors critically ill patients ($p=0.004$, and $p<0.001$, respectively) (D'Ávila et al., 2006). In this study, we found that SOFA-1 scores were higher in non-survivors patients as compared to survivor's patients.

The trend toward difference in SOFA-1 score was found ($p=0.079$) among survivors and deceased, confirming that this score evidences severity of organ dysfunction. Some studies suggested that sCD14 levels can reflect severity of multi organ failure. In our study, sCD14 levels were not associated with mortality or disease severity scores. However, we did observe significantly higher serum sCD14 levels in septic patients as compared to healthy volunteers, confirming findings of Glück et al., 2001; Landmann et al., 1995; and

Burgmann et al., 1996. In the Glück study, sCD14 was measured during several days. Their results in the entry of study were similar with our investigation, when they found an increased sCD14 levels in septic patients compared to healthy volunteers (Glück et al., 2001). Nevertheless, when initial sCD14 levels were compared with values determined in the end of the Glück's study, sCD14 levels were increased in survivor patients with sepsis if compared to non-survivors patients with sepsis. These authors suggested that higher sCD14 plasma levels may be beneficial in sepsis and that persistently reduced mCD14 density seems to be a marker of severity of disease in patients with sepsis. While we observed a significant mCD14 density increase in septic patients as compared to healthy subjects, Glück et al., found a significant reduction among the septic group when compared with healthy volunteers (Glück et al., 2001). We agree with Glück et al., when they showed that significant changes of mCD14 expression occur in the early phase of sepsis, but the functional significance of the enhanced expression of mCD14 on monocytic cells is not clear at the present.

Some authors observed that CD14 expression could be modulated by the LPS presence (Bazil and Strominger, 1991; Landmann et al., 1997; Creery et al., 2002). Landmann et al. (Landmann et al., 1997), in a study with human monocytes showed that mCD14 expression is modulated by cytokines and the presence of LPS. In this study, the authors observed no changes during the first 3 hours of LPS incubation. After 6 to 15 hours, LPS weakly reduced CD14 mRNA and mCD14 and transiently enhanced sCD14 release. After 24 hours, LPS increased mCD14 expression and this was stable for up to 44 hours of incubation with LPS (Landmann et al., 1996). Accordingly, in our investigation, incubation of healthy volunteers PBMCs with LPS during 24 hours significantly enhanced mCD14 expression. Our finding agrees with two other studies that showed that TNF α , IL-10, IL-1, IL-4 or IL-6 induce CD14 gene expression in a time-dependent manner with increases in CD14 mRNA, mCD14 and sCD14 (Creery et al., 2002; Landmann et al., 1997). We suppose that higher density of mCD14 and sCD14 levels in our sample of septic patients may reflect their chronic state of inflammation and may be involved in enhanced susceptibility to Gram-negative infections, as well as the production of cytokines.

Glück et al. showed increased sCD14 levels and decreased density of mCD14 in septic patients compared to healthy volunteers and explained it through the release of mCD14, which has been shed into extra cellular environment such as sCD14. However, concomitant increases in the levels of sCD14 and mCD14 expression could suggest that mCD14 upregulation could be mediated through transcription/translation or through release of intracellular stores. Furthermore, it has to be considered that molecules other than CD14 could be involved in monocyte activation during sepsis. LPS from Gram-negative bacteria are recognized by CD14 that activates, through the Toll-like receptor (TLR)-4 and nuclear factor (NF)- κ B pathways, the pro-inflammatory cytokine gene expression (IL-1, TNF-a, IL-8, IL-12, IL-6) and activates the innate immunity against the infection (Landman et al. 1996; Modlin et al., 1999). Recently, an association between TLR-4 polymorphism Asp299Gly, leading to a change in the extracellular domain of the receptor and possible hyporesponsiveness to LPS and a clinical outcome in critically ill patients (Nakada et al., 2005).

Identification of this molecule as mediator of LPS effects, could question the role of CD14 and of CD14 gene polymorphism for the susceptibility to sepsis.

To our knowledge, this is the first study to simultaneously analyze -260C>T CD14 polymorphism, CD14 expression, and mortality in septic patients. We did not observe any significant association of genotypes with mortality. Gibot et al. studied 90 patients with septic shock suggesting that TT genotype can affect susceptibility to death (Gibot et al., 2002). However, in a previous study with 85 critically ill patients (36 patients with septic shock) we found that TT patients presented lower mortality when compared to the CT+CC patients (D'Avila et al., 2006). Thus, because sepsis and septic shock are complex and multifactorial diseases, other genetic and environment factors are interfering in the disease severity and mortality susceptibilities. Our finding that TT homozygotes showed higher mCD14 values compared to the other genotypes agreed with a previous study where the authors measured mCD14 density in healthy volunteers with different genotypes and found a significantly higher density of mCD14 in TT homozygotes when compared with CT or CC genotypes (Hubacek et al., 1999). While sCD14 serum levels have also been shown by others (Koenig et al., 2002; Baldini et al., 1999) to be higher in the TT genotype, compared with the CT or CC genotype, the same was not evidenced for serum levels of sCD14 in our study. However, Heesen et al. studying 95 blood donors observed that - 260C>T CD14 polymorphism does not affect the CD14 expression.

Finally, in our in vitro LPS challenge lead to a more marked increase, but not significant, in mCD14 levels in individuals with CC genotype. This in vitro finding suggests that the intensity of individual response to potential inflammatory stimuli may play a major role in determining the magnitude of the inflammatory reaction. Although sample size could account for some of these unexpected findings, further studies might reveal unknown mechanisms associated with this polymorphism. We believe that population differences like clinical, ethnic or sociodemographic differences might play a role in the variation of regulation of CD14 expression observed, and we are currently investigating this possibility.

Acknowledgements

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

References

ACCP-SCCM. Anonymous. (1992) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 20: 864-874.

Balci C, Sungurtekin H, Gurses E, Sungurtekin U (2005) APACHE II, APACHE III, SOFA scoring systems, platelet counts and mortality in septic and nonseptic patients. *Ulusal travma dergisi* 11(1): 29-34.

- Baldini M, Lohman C, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD (1999) A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20: 976-983.
- Burgmann H, Winkler S, Locker GJ, Presterl E, Laczika K, Staudinger T, Knapp S, Thalhammer F, Wenisch C, Zedwitz-Liebenstein K, Frass M, Graninger W (1996) Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clinical immunology and immunopathology* 80: 307-10.
- Collins FC, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS (2003) A vision for the future genomics research. *Nature* 422: 835-46.
- D'Avila LC, CS (2006) Effect of CD14 -260C>T polymorphism on the mortality of critically ill patients. *Immunology and cell biology* 84(3): 342-348.
- DeAngelis CD, Rosenberg RN, Simth, J.M. (2000) Genomic medicine and the individual patient. *JAMA* 284: 22-9.
- Fearn C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ (1995) Murine CD14 gene expression in vivo: Extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 857-866.
- Ferrero E, Goyert SM (1998) Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Research* 16: 4173. 17
- Fernandez-Real JM, Broch M, Richart C, Vendrell J, Lopez-Bermejo A, Ricart W (2003) CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(4): 1780-1784.
- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil, Espevik T, Finlay BB, Wright SD (1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 176: 1665-1671.
- Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L (2002) Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Critical Care Medicine* Albarus MH, Franco CR, Aguiar BB, Oliveira JR, Dias FS, Alho 30: 969-973.
- Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM (1988) The CD14 monocyte differentiation antigen maps to region encoding growth factors and receptors. *Science* 239: 497-500.
- Glück T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *European Journal of Medicine Research* 6: 351-358.
- Heesen M, Bloemeke B, Schade U, Obertacke U, Majetschak M (2002) The -260-CaT promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. *Intensive Care Medicine* 28: 1161-1163.
- Hubacek JA, Piřha J, Skodová Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G (1999) C(-260) a T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 99: 3218-3220.
- Jersmann HPA (2005) Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunology and Cell Biology* 83: 462-467.

- Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K (1999) The Molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today* 5(3):122-132.
- Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, Bohnert A, Carr D, Baldini M, Hackstein H, Leupold W, Weiland SK, Martinez FD, von Mutius E, Bein G (2004) A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic disease. *Allergy* 59: 520-525.
- Karhukorpi J, Yan Y, Niemelä S, Valtonen J, Koistinen P, Joensuu T, Saikku P, Karttunen R (2002) Effect of CD14 promoter polymorphism and *H. pylori* infection and its clinical outcomes on circulating CD14. *Clinical and Experimental Immunology* 128: 326-332.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical Care Medicine* 13: 818-29.
- Koch W, Kastrati A, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A (2002) CD14 gene -159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction. *American Heart Journal* 143: 950-951.
- Koenig W, Khuseyinova N, Hoffmann MM, Marz W, Frohlich M, Hoffmeister A, Brenner H, Rothenbacher D (2002) CD14 C(-260) aT polymorphism plasma levels of the soluble endotoxin receptor CD14, their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 40: 34-42.
- Lahiri DK, Nernberger Jr JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Research* 19: 5444.
- Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T (1995) Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *The Journal of infectious diseases* 171(3): 639-44.
- Landmann R, Reber AM, Sansano S, Zimmerli W (1996) Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *The Journal of Infectious Disease* 173: 661-8.
- Le Van TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vescelli D (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *The Journal of Immunology* 167(10): 5838-5844.
- Le-Barillec K, Si-Tahar M, Balloy V, Chignard M (1999) Proteolysis of monocyte CD14 by human leucocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *Journal Clinical Investigation* 103: 1039-1046.
- Lichy C, Meiser H, Grond-Ginsbach C, Buggle F, Dörfer C, Grau A (2002) Lipopolysaccharide receptor CD14 polymorphism and risk of stroke in a south-german population. *Journal of Neurology* 249: 821-823.
- Long JY, Xue YN, Sun L, Wang HX (1998) Cloning and Sequencing of Human CD14 Gene. *ShenhWu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* 25:377-378 In: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Accession AF097942; Version AF097942.1; GI:3983126.
- Modlin RL, Brightbill HD, Godowski PJ (1999) The toll of innate immunity on microbial pathogens. *New England Journal of Medicine* 340: 1834-5.

- Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Watanabe E, Abe R, Hatano M, Tokuhisa T (2005) Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *Journal of Surgery Research* 129(2):322-8.
- Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A, Sala F, Gaminde I (2001) Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive Care Medicine* 27(6): 970-7.
- Schütt C (1999) Molecules in focus: CD14. *International Journal of Cell Biology* 31: 45-9. Ulevitch RJ (1999) Toll gates for pathogen selection. *Nature* 401: 755-6.
- Zee RY, Lindpaintner K, Struk B, Hennekens CH, Ridker PM (2001) A prospective evaluation of the CD14 C(-260) T gene polymorphism and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 154: 699-702. 19
- Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998) 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* 26:1793-1800.
- Wurfel M, Hailman E, Wright SD (1995) Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 1743-1754.
- Zhang DE, Hetherington C, Tan S, Dziennis SE, Gonzalez DA, Chen H M, Tenen DG (1994) Sp1 is critical factor for the monocyte specific expression of human CD14. *Journal of Biological Chemistry* 269: 11425-11434.

Table 1: Septic patient's characterization.

Pac	Age	Time	Sepsis	-260C>T	mCD14	sCD14	APACHE II	SOFA-1	SOFA-2	SOFA-3	SOFA-4	SOFA-5	SOFA-6	SOFA-7	ICU-LOS	H-LOS	Survivor
1	74	12:30	16h	CC	304.02	7.185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No
2	53	15:00	14h30m	TC	197.75	6.088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No
3	61	12:30	16h	TT	372.39	8.140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No
4	40	15:00	19h30m	TC	320.99	6.088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Yes
5	64	14:30	8h30m	TT	312.65	6.768	19	8	8	8	5	6	5	6	35	35	No
6	86	15:00	7h30m	CC	224.56	5.868	15	9	7	10	5	9	6	3	7	18	Yes
7	33	14:30	23h	TT	359.78	6.714	26	9	10	10	9	9	6	9	10	15	Yes
8	79	14:30	19h	TC	302.21	7.142	12	8	8	8	8	-	-	-	5	5	No
9	47	13:00	5h30m	TC	247.32	6.779	21	11	13	15	-	-	-	-	4	4	No
10	64	15:00	7h30m	TC	302.62	6.725	20	5	7	5	3	-	-	-	4	9	Yes
11	16	15:00	7h30m	CC	180.07	7.109	15	8	11	8	6	5	5	0	9	30	Yes
12	61	11:30	22h	TC	216.71	5.726	26	9	12	12	11	11	10	10	12	12	No
13	48	12:30	5h	TT	319.65	6.253	14	4	5	5	5	4	3	3	14	57	Yes
14	80	12:30	16h	TC	374.86	8.052	24	12	10	9	12	-	-	-	5	5	No
15	76	12:00	15h30m	CC	330.91	5.770	21	7	7	5	3	3	4	3	13	16	Yes

Time: hour in that the sample was collected; Sepsis: estimated sepsis time from when the sepsis was diagnosed; -260C>T: genotypes to promoter CD14 single nucleotide polymorphism; mCD14: flow cytometry analysis of density of monocytes surface CD14; sCD14: concentration of sCD14 in serum measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II score obtained on ICU admission day; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment score obtained daily during the first week from the ICU admission (day 1 to day 7); ICU-LOS: Length of stay at intensive care unit, measured by number of days; H-LOS: Total length of stay at hospital, measured by number of days; Survivor: outcome of septic patients in total length of stay at hospital.

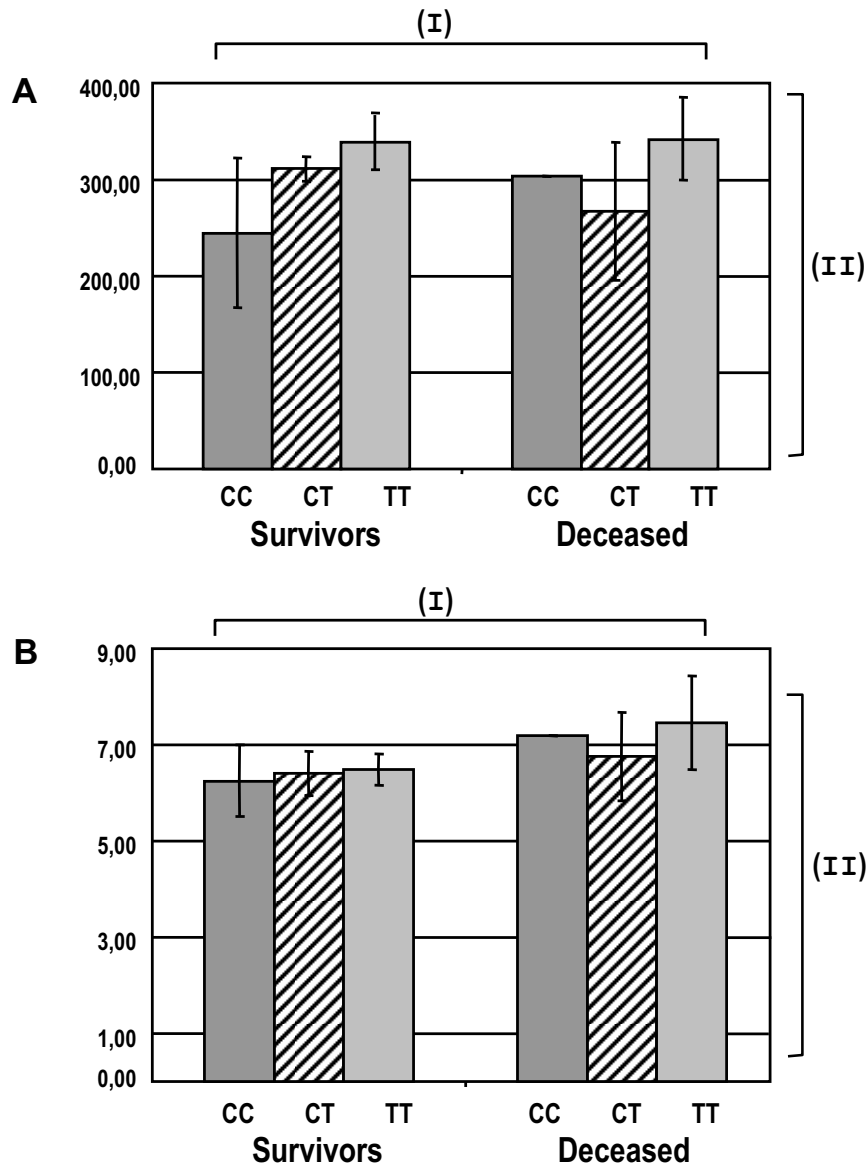


Figure 1. Expression of mCD14 (A) and sCD14 levels (B) by each genotype group in survivors and deceased septic patients. (A) Mean \pm standard deviations of mCD14 monocyte density by genotypes in survivors patients [CC = 245.2 ± 77.5 (n = 3), CT = 311.8 ± 13.0 (n = 2), TT = 339.7 ± 28.4 (n = 2)] and in deceased patients [CC = 304.02 (n = 1), CT = 267.8 ± 71.7 (n = 5), TT = 342.5 ± 42.2 (n = 2)]. (B) Mean \pm standard deviations of sCD14 levels by genotypes in survivors patients [CC = 80.5 ± 8.9 (n = 3), CT = 82.4 ± 5.7 (n = 2), TT = 83.2 ± 3.9 (n = 2)] and in deceased patients [CC = 92.0 (n = 1), CT = 86.6 ± 11.1 (n = 5), TT = 94.7 ± 12.6 (n = 2)]. Bars indicate standard deviations. (I): difference between survivors and deceased patients calculated by Mann-Whitney test (mCD14: p=0.862; sCD14: p=0.165); (II): difference between genotypes CC, CT, and TT calculated by Kruskal-Wallis test (mCD14: p=0.182; sCD14: p=0.852).

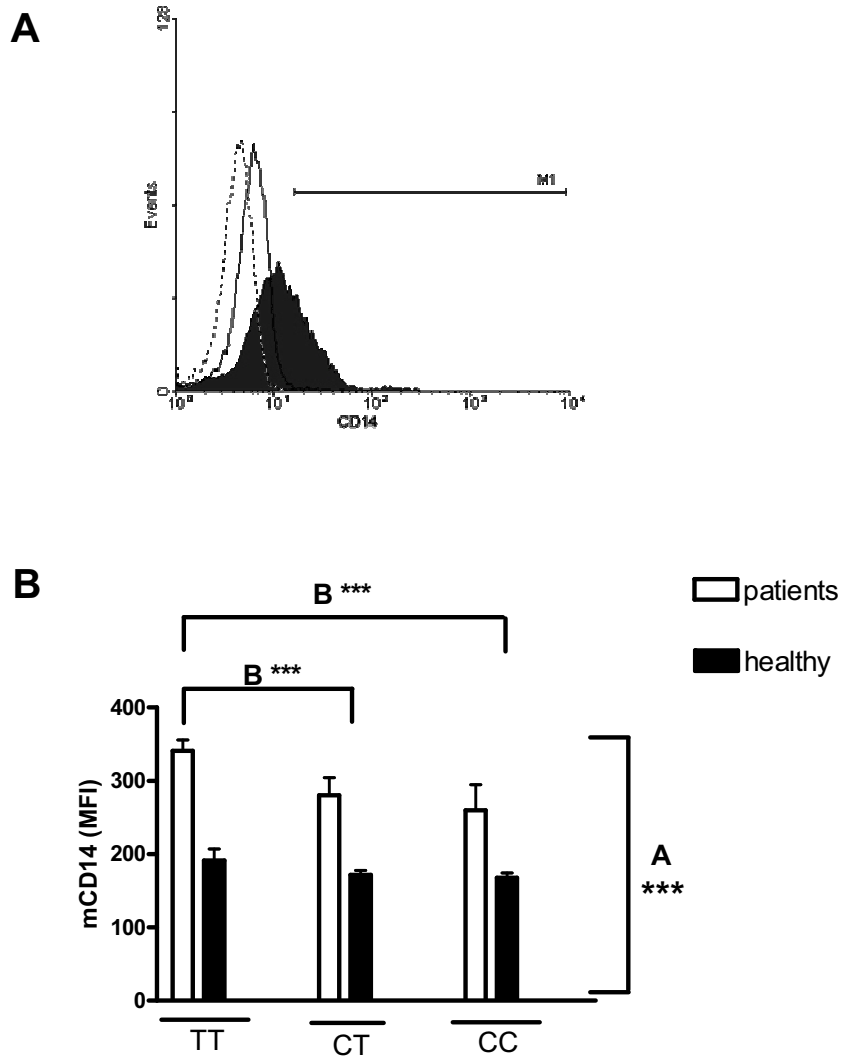


Figure 2. Expression of mCD14 by each genotype group. (A) Typical flow cytometry analysis of mCD14 expression of one patient (dotted line: cells; continuous line: isotype control; black, CD14). (B) Mean \pm standard deviations of mCD14 monocyte density by genotypes in patients [TT = 341.1 ± 29.4 (n = 4), CT = 280.3 ± 62.6 (n = 7), CC = 259.9 ± 69.8 (n = 4)] and healthy subjects [TT = 191.7 ± 30.3 (n = 4), CT = 172.0 ± 25.1 (n = 19), CC = 167.8 ± 18.1 (n = 7)]; 2x3 Factorial ANOVA test, Bonferroni test. Bars indicate standard deviations. A: difference between groups (septic patients and healthy subjects); B: difference between genotypes (TT, CT, CC). ***, $p < 0.01$.

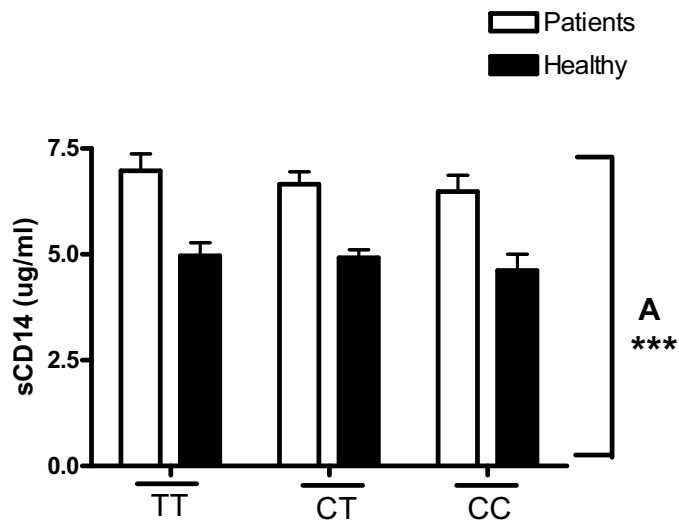


Figure 3. Concentration of sCD14 in serum of septic patients and healthy subjects. (A) Mean \pm standard deviations of sCD14 levels by genotypes in patients [TT = 7.0 ± 0.8 (n = 4), CT = 6.7 ± 0.8 (n = 7), CC = 6.5 ± 0.7 (n = 4)] and healthy subjects [TT = 5.0 ± 0.7 (n = 4), CT = 4.9 ± 0.8 (n = 19), CC = 4.6 ± 1.0 (n = 7)], 2x3 Factorial ANOVA test. Bars indicate standard deviations. A, difference between groups (septic patients and healthy subjects). ***, $p < 0.01$.

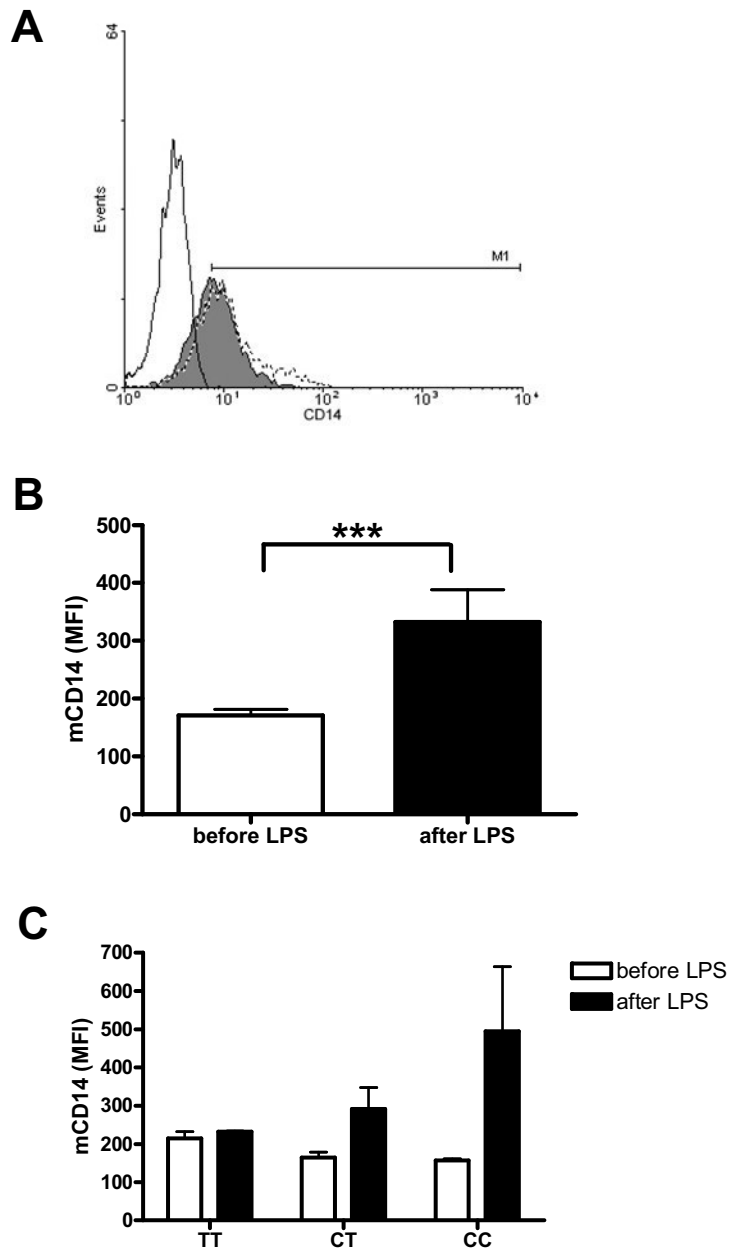


Figure 4. Upregulation of mCD14 on monocytes upon stimulation with LPS. (A) Flow cytometry analysis of mCD14 expression in monocytes of a healthy subject before and after 24h of LPS challenge (continuous line: isotype control; gray: CD14; dotted line: after LPS challenge) (B). Mean of mCD14 density in twelve healthy subjects before and after 24h of LPS challenge, Wilcoxon test. (C) Mean of mCD14 density before and after LPS challenge by genotype (TT, n=2, CT, n=7, CC, n=3), Kruskal-Wallis test. Bars indicate standard deviations. ***, p<0.01.

Considerações Finais

O estado de saúde, o prognóstico e o desfecho do tratamento de pacientes com sepse pode estar intimamente relacionado a sua suscetibilidade genética. Ainda que centenas de genes estejam envolvidos na modulação fisiológica final de um indivíduo com um quadro patológico complexo, como a sepse, aqueles genes que interferem em múltiplos sistemas e órgãos são sempre os mais decisivos. Por este motivo, escolhemos o gene CD14, cuja expressão tem ampla repercussão sistêmica, como um suposto marcador genético para ser usado como indicador no prognóstico, na prevenção e no tratamento da sepse.

Assim, neste estudo, nós realizamos a genotipagem do CD14 para o polimorfismo do promotor -260C>T juntamente com o estudo da sua expressão nas duas formas, mCD14 e sCD14, em pacientes sépticos com a intenção de buscar associações entre a herança e seu perfil fenotípico. Num primeiro trabalho experimental, nosso grupo estudou 85 pacientes de UTI e identificou que pacientes com o genótipo TT apresentavam significativamente maior sobrevida que pacientes CT ou CC, após terem passado pelo estado crítico e, em alguns casos, pela sepse. Nossos resultados sugeriram um melhor desfecho para os indivíduos que apresentem características imunológicas e/ou genéticas particulares.

Nas nossas buscas, nós não encontramos diferença significativa entre sobreviventes e não-sobreviventes quando comparados em relação à idade, ao sexo, aos escores APACHE-II e SOFA-dia1, ainda que tenhamos observado uma sugestão de que os não-sobreviventes têm APACHE-II e SOFA-dia1 mais altos. Tal sugestão seria aceitável, pois valores altos em ambos escores são preditivos de mortalidade. Não encontramos diferença significativa entre sobreviventes e não-sobreviventes quando comparados em relação ao genótipo, mas este resultado pode ser devido ao número reduzido de pacientes incluídos neste estudo: apenas 15. Da mesma forma, não encontramos diferença significativa entre sobreviventes e não-sobreviventes quando comparados em relação às medidas de expressão do CD14.

Numa busca em relação direta ao genótipo, nós não encontramos diferença significativa entre genótipos quando comparados em relação à idade, ao sexo, aos escores APACHE-II e SOFA-dia1, às medidas de expressão do CD14 ou à mortalidade.

Nosso trabalho, da mesma forma estendeu-se na busca de associação entre o SNP -260C>T do gene CD14 e a expressão do CD14 entre os pacientes sépticos estudados e voluntários saudáveis. Quando avaliamos a densidade de mCD14 comparado ao genótipo (CC, CT ou TT), os homozigotos TT tiveram densidades estatisticamente aumentadas quando comparados com homozigotos CC e heterozigotos CT. Na nossa investigação, encontramos valores com diferença estatística significativa em relação à densidade de mCD14 entre pacientes sépticos e voluntários

saudáveis. De fato, nosso estudo observou alguns resultados conflitantes em relação ao trabalho mostrado por Gluck et al., em 2001. Enquanto o grupo citado mostrou que a densidade de mCD14 diminuía em pacientes sépticos quando comparados com voluntários saudáveis, nós encontramos que a densidade de mCD14 em pacientes sépticos estava aumentada em relação aos indivíduos saudáveis. Sugerimos então que a expressão do CD14 pode ser modulada pelo tempo de exposição ao LPS. Em um ensaio in vitro, a expressão do mCD14 de 12 indivíduos saudáveis foi analisada antes e após 24 horas de estímulo com LPS. O ensaio demonstrou um aumento significativo na densidade de mCD14 após estímulo com LPS, apresentando o genótipo CC valores superiores, embora não estatisticamente significativo. Estes resultados são conflitantes com os encontrados anteriormente, onde os homocigotos TT demonstraram maior densidade de mCD14 quando comparados com CC e CT. Porém, também sugerimos que além da modulação da expressão do CD14 pelo LPS, ainda existam outros parâmetros que possam interferir na sua expressão. Por problemas técnicos, não foi possível a avaliação dos níveis do sCD14 após o desafio com LPS. Esse é um dado importante e irá complementar o estudo, talvez esclarecendo o aumento concomitante dos níveis de sCD14 e mCD14 quando expostos ao LPS. Nós pretendemos realizar estas medidas posteriormente.

Demonstramos também que os níveis do sCD14 em pacientes sépticos quando comparados com voluntários saudáveis foram significativamente superiores. Estes resultados estão de acordo com o encontrado na literatura. E, mesmo que não tenhamos encontrado diferença significativa entre os genótipos, observamos que o genótipo TT sempre expressa maiores níveis do sCD14. Pela primeira vez um trabalho apresenta uma descrição que une polimorfismo, a expressão do CD14 e mortalidade em pacientes sépticos. Nós também investigamos a diferença entre o polimorfismo do promotor -260C>T, a expressão do CD14 entre os mesmos pacientes sépticos e os comparamos com indivíduos saudáveis. Nossos dados são inéditos e compatíveis com o que a literatura apresenta, e sugerem que estudos similares, com um tamanho amostral superior, poderão revelar uma tendência diferencial dos níveis de mCD14 e sCD14 elevados e da herança do alelo T como sendo benéficos para pacientes com sepse. Contudo, nossos resultados de desafio in vitro com LPS parecem sugerir que o alelo C é benéfico para o aumento de CD14 em 24 h de contato com LPS. É possível que o alelo T esteja associado com a alta expressão do CD14, enquanto que o alelo C esteja associado com intensidade de resposta a estímulos inflamatórios. Estudos posteriores deverão analisar esta possibilidade.