

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**Estudo da depressão miocárdica na sepse: papel dos
polimorfismos genéticos do TNF- α , Receptor Toll Like 2 e 4 em
relação a parâmetros ecocardiográficos**

TESE DE DOUTORADO
CYNTIA AGUIAR RIBEIRO

Professores Orientadores:

Dra. Nadine Clausell

Dra. Andréia Biolo

Porto Alegre, dezembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**Estudo da depressão miocárdica na sepse: papel dos
polimorfismos genéticos do TNF- α , Receptor Toll Like 2 e 4 em
relação a parâmetros ecocardiográficos**

CYNTIA AGUIAR RIBEIRO

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares para
Obtenção do título de Doutor em
Ciências Cardiovasculares

Professores Orientadores:

Dra. Nadine Clausell

Dra. Andréia Biolo

Porto Alegre, dezembro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul e _____ em 27/12/2012, pela Comissão
Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Roselaine Pinheiro Oliveira

Prof.Dr. Luis Eduardo Paim Rohde

Prof. Dra. Lea Fialkow

Ribeiro, Cyntia A

Estudo da depressão miocárdica na sepse: papel dos polimorfismos genéticos do TNF- α , Receptor Toll Like 2 e 4 em relação a parâmetros ecocardiográficos./Cyntia Aguiar Ribeiro

- Porto Alegre: UFRGS, 2012 p.78

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Carlos Eugenio Escovar

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS, cuja estrutura e organização foram fundamentais na realização deste projeto de doutorado.

À equipe do laboratório de pesquisa cardiovascular, em especial a Dra. Kátia Santos e à biomédica Nidiane Martinelli, pela ajuda e suporte durante as diversas fases deste trabalho.

A colega e amiga Dra. Karen Fontoura Prado pela ajuda na coleta dos pacientes e pela amizade e apoio durante a realização do doutorado.

Ao Dr. Thiago Furian pela realização das ecocardiografias que são parte importante da nossa pesquisa.

Em especial a minha orientadora professora Dra. Nadine Clausell que sempre acreditou em mim, sendo otimista e amiga nos momentos mais difíceis de execução deste projeto, pela sua disponibilidade e paciência. Não tenho como dizer em palavras toda a gratidão que tenho, pois foi com ela que iniciei nesse universo da pesquisa e desde o início ela sempre foi incansável com seus ensinamentos.

A minha coorientadora professora Dra. Andréia Biolo que sempre me deu apoio, obrigada pela ajuda na finalização deste projeto, pelas críticas construtivas e por tua delicadeza.

Aos meus pais que me ensinaram a importância de estudar e preceitos morais os quais foram fundamentais para a minha formação.

Em especial ao meu marido Eugenio pelo seu incansável apoio nas minhas escolhas e a minha filha Luiza pelo seu amor incondicional.

Esta tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Doenças Cardiovasculares da UFRGS, sendo apresentada na forma de revisão da literatura e um manuscrito sobre o tema da tese:

1. Revisão da literatura
2. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito que deverá ser submetido para publicação em periódico científico de circulação internacional, conforme norma dos mesmos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	4
I. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
Introdução.....	6
Depressão miocárdica na sepse.....	8
Disfunção cardíaca sistólica na sepse.....	10
Disfunção cardíaca diastólica na sepse.....	11
Mecanismos moleculares da disfunção miocárdica na sepse.....	13
Receptores Toll like.....	14
Receptor Toll like 4 e seus polimorfismos.....	17
Receptor Toll like 2 e seus polimorfismos.....	18
Papel do TNF α e seu polimorfismo.....	22
Conclusões.....	23
Referências bibliográficas.....	25
RACIONAL DO ESTUDO.....	33
HIPÓTESE.....	34
OBJETIVOS.....	35
II. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	37
III. APÊNDICES.....	64
Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	65
Apêndice 2 - Ficha clínica de coleta dos dados.....	67
Apêndice 3 – Ficha das ecocardiografias.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

APACHE- *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*

DMOS - Disfunção de Múltiplos Órgãos e Sistemas

ET-1 - Endotelina 1 ou *Endothelin-1*

IL - Interleucina ou *Interleukin*

ICAM – Molécula de Adesão Intracelular ou *Intracellular Adhesion Molecule*

LV - *Left Ventricle*

LVEF - *Left Ventricle Ejection Fraction*

LPS - Lipopolissacarídeos ou *Lipopolysaccharides*

LVDD- *Left Ventricle Diastolic Diameter*

LVSD- *Left Ventricle Systolic Diameter*

MO - Medula óssea

NF-kB - Fator Nuclear Kappa β ou *Nuclear Factor Kappa B*

NO- *Nitric Oxide*

ROS - Radicais de Oxigênio

RV - *Right Ventricle*

SIRS - Síndrome da resposta Inflamatória Sistêmica

TLRs - Receptores Toll Like ou *Toll Like Receptors*

TNF - Fator de Necrose Tumoral ou *Tumor Necrosis Factor*

WT - Animais Selvagens

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1 - Mecanismos da disfunção cardíaca na sepse.....9

Figura 2 – Sinalização dos Receptores Toll Like.....16

Artigo original em inglês

Figure 1- Echocardiographic parameters for survivors and nonsurvivors for days 1, 3 and 7.....47

Figure 2- Tumor necrosis factor- α levels from patients with and without diastolic dysfunction.....53

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1 - O papel dos receptores Toll like na disfunção miocárdica da sepse.....	20
---	----

Artigo original em Inglês

Table 1- Clinical characteristics of studied patients.....	49
Table 2 - Frequencies of polymorphisms.....	51
Table 3 - Diastolic function and genotypes.....	52

Revisão da literatura

**O papel dos Receptores Toll Like e do TNF- α e seus
polimorfismos genéticos na disfunção miocárdica da sepse**

Introdução

Sepse é a décima causa de morte nos Estados Unidos. Desde 1999 até 2005 houve mais de um milhão de mortes ou 6% de todas as causas de morte foram atribuídas a ela (1). Sepsé é uma resposta sistêmica mal adaptada do corpo à invasão de tecidos habitualmente estéreis por microorganismos patogênicos. É uma síndrome complexa e poligênica que é iniciada por infecção e caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que é definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: 1) febre (temperatura axilar $>38^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia (temperatura axilar $<36^{\circ}\text{C}$); 2) taquicardia (frequência cardíaca (FC) >90 batimentos por minuto); 3) taquipnéia (>20 respirações por minuto) ou pressão arterial de $\text{CO}_2 < 32\text{mmHg}$; 4) leucocitose (>12000 céls/ mm^3) ou leucopenia (<4000 céls/ mm^3) ou uma taxa $>10\%$ de bastonados dos polimorfonucleares (2,3).

Sepsé foi definida pela conferência do Consenso Internacional do *American College of Chest Physicians (ACCP)* e da *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* em 2001 como “uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica que ocorre durante a infecção” (3), e é geralmente considerada como uma doença agravada por uma resposta imune inapropriada e ineficiente que ocorre nos pacientes atingidos. Sepsé grave é definida como sepsé com hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica (hipotensão, hipoxemia, oligúria, acidose metabólica, trombocitopenia, alteração no nível de consciência). Choque séptico é definido como hipotensão refratária à ressuscitação volêmica.

A morte nesses pacientes se dá primariamente devido à disfunção de múltiplos órgãos (DMOS) com hipotensão refratária e colapso cardiovascular. As taxas de mortalidade associadas à sepse grave e choque séptico são 25-30% e 50-70%, respectivamente. A incidência de sepse levando à morte tem aumentado devido ao envelhecimento da população, às infecções por germes multirresistentes, e ao aumento no número de pacientes imunossuprimidos e das cirurgias de alto risco (4, 5).

Todo o sistema cardiovascular está envolvido na fisiopatologia da sepse grave e do choque séptico. Ocorre dilatação arterial e venosa diminuindo a pré e pós-carga, disfunção microvascular resultando em aumento da permeabilidade capilar, edema tecidual e hipóxia e ainda a disfunção cardíaca pode contribuir significativamente para esse desarranjo hemodinâmico, desempenhando um importante papel na patogênese da sepse (6).

No intuito de melhor compreender a fisiopatologia da disfunção miocárdica na sepse, estudos têm focado o papel da resposta imune inata e das citocinas secundárias a diferentes estímulos inflamatórios. Mais recentemente, o foco tem envolvido a identificação da variação genética em genes cruciais da resposta inflamatória. Em especial a identificação da variação genética dos receptores Toll like e de citocinas pró-inflamatórias tem fornecido uma reflexão sobre a influência da heterogeneidade genética em resposta a infecções bacterianas (2).

Este artigo pretende revisar o papel dos receptores Toll like 2 e 4 e do fator de necrose tumoral (TNF)- α e seus polimorfismos na disfunção miocárdica na sepse.

Depressão miocárdica na sepse

Depressão miocárdica é uma manifestação bem reconhecida de disfunção orgânica na sepse. Devido à falta de uma definição universalmente aceita e à ausência de grandes estudos epidemiológicos sua frequência é incerta. Estudos ecocardiográficos sugerem que cerca de 50% dos pacientes com choque séptico desenvolvem depressão miocárdica, definida por fração de ejeção do ventrículo esquerdo <45% (7, 8,9).

Ainda não há um claro entendimento da fisiopatologia da disfunção miocárdica da sepse, mas sabe-se que esta não é causada pela hipotensão/hipoperfusão do choque já que pacientes sépticos apresentam alto fluxo coronariano. Entretanto o desequilíbrio no metabolismo miocárdico e na microcirculação provavelmente ocorre via efeitos do tromboxano, leucotrienos e do óxido nítrico (Figura 1). Portanto a fisiopatologia multifatorial da disfunção miocárdica não é completamente entendida, mas parece envolver mecanismos da resposta imune inata, via receptores Toll like, ainda não bem elucidados. Outros mecanismos conhecidos seriam sinalização inflamatória, disfunção mitocondrial, morte celular, perda da regulação autonômica e disfunção da contratilidade de cardiomiócitos (10).

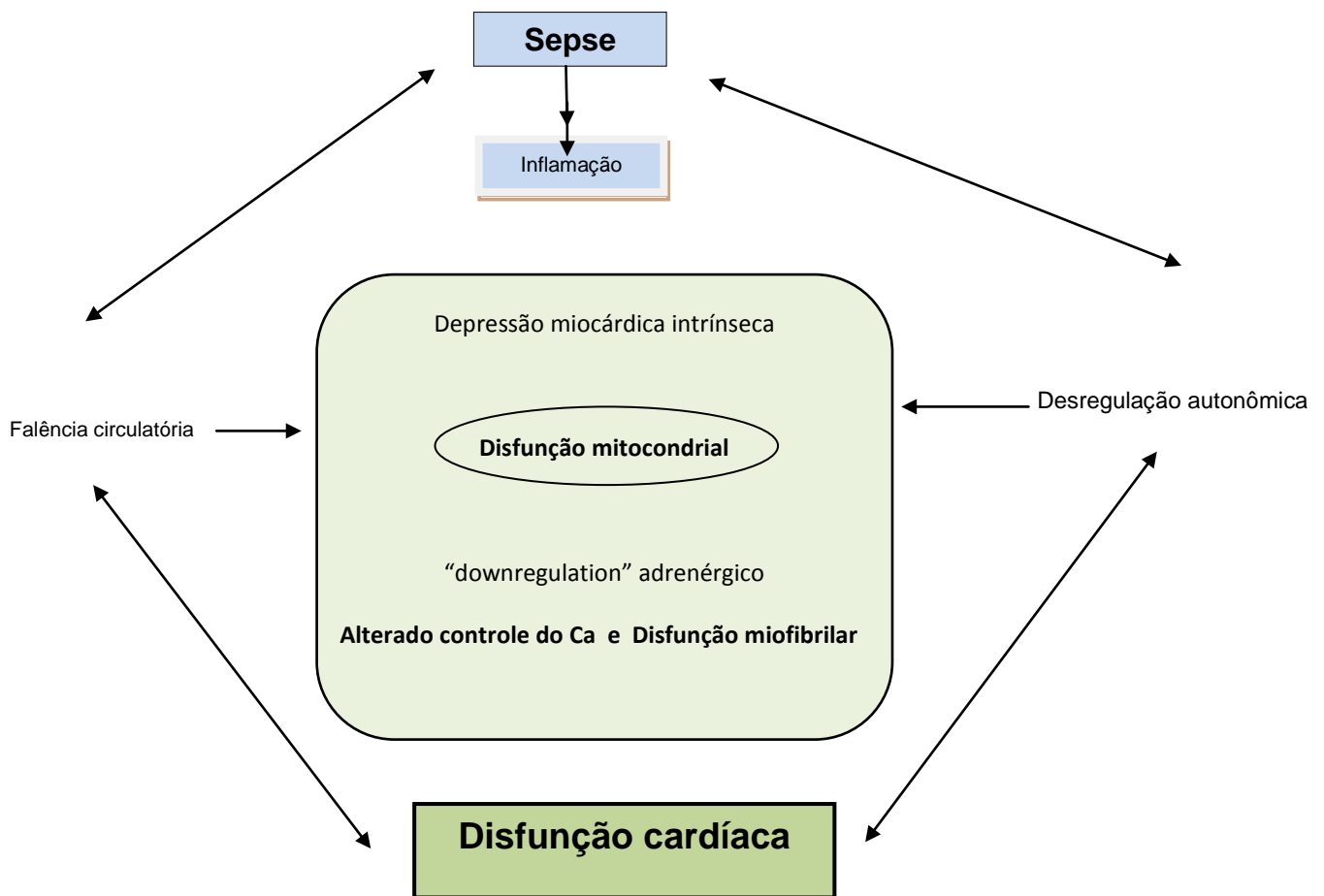


Figura 1. O desempenho cardíaco na sepse está diminuído devido a alterações na macro e microcirculação, disfunção autonômica e inflamação induzindo depressão miocárdica intrínseca. Os mecanismos da depressão miocárdica incluem “down-regulation” das vias adrenérgicas, passagem alterada de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e prejuízo no acoplamento eletromecânico miofibrilar. A disfunção mitocondrial parece exercer um papel central na disfunção orgânica induzida pela sepse. Adaptado de Rudiger (11).

Disfunção cardíaca sistólica na sepse

Nos anos 80 Parker e colaboradores foram pioneiros nos estudos de disfunção miocárdica usando cineangiocoronariografia e cateter de Swan Ganz na avaliação de 20 pacientes com choque séptico e demonstraram que 50% deles tinham moderada a grave redução na fração de ejeção. Paradoxalmente, os pacientes com disfunção sistólica e dilatação ventricular inicial apresentaram melhor sobrevida com recuperação da disfunção miocárdica em 10 dias enquanto que os não sobreviventes apresentavam fração de ejeção normal e não dilatação do ventrículo esquerdo em medidas seriadas (12). Ognibene e colaboradores compararam 21 pacientes com choque séptico e 21 pacientes com sepse e sem choque realizando medidas seriadas do trabalho do ventrículo esquerdo com cateter pulmonar. Após infusão de volume, o aumento do trabalho do ventrículo esquerdo foi menor em pacientes com choque séptico, demonstrando uma performance ventricular alterada e uma não responsividade a aumento de pré-carga (13).

Vieillard Baron e colaboradores realizaram ecocardiografia transesofágica em 40 pacientes com choque séptico e confirmaram uma diminuída função sistólica sendo que 30% dos pacientes apresentaram uma moderada dilatação do ventrículo direito (14). Estudos ecocardiográficos mais recentes realizados em 67 pacientes com choque séptico e sem doença cardíaca prévia confirmaram a presença de uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor do que 45% em 60% dos pacientes com choque séptico, sendo que essa disfunção ventricular esquerda não foi associada com pior

prognóstico. A disfunção sistólica em alguns pacientes pode ser mascarada pelo uso de vasopressores com efeito inotrópico positivo (8).

Rouby e colaboradores estudaram 45 pacientes com choque séptico, realizando ecocardiografia seriada nos dias 1, 2, 3, 4,7 e 10 e demonstraram uma dilatação aguda e reversível do ventrículo esquerdo induzindo disfunção sistólica em 30% dos pacientes (15).

Cavazzoni e colaboradores realizaram um estudo bem controlado em um modelo experimental comparando 24 ratos sépticos e seis controles utilizando ecocardiografia. Estes autores demonstraram que 37% dos animais exibiam dilatação do ventrículo esquerdo, que respondeu de forma favorável após ressuscitação volêmica com melhora do débito cardíaco e do índice sistólico em associação com uma melhor sobrevida nesse grupo (16).

Portanto um decréscimo na fração de ejeção com uma dilatação ventricular no choque séptico poderia ser uma resposta adaptativa apropriada da disfunção miocárdica.

Disfunção cardíaca diastólica na sepse

Disfunção diastólica é atualmente reconhecida como um importante causa de insuficiência cardíaca apesar de uma fração de ejeção normal e é também um grave preditor de morbimortalidade, particularmente em idosos com doença cardiovascular (17,18). Mais recentemente tem havido um interesse incipiente na disfunção diastólica na sepse explorando sua potencial importância.

Técnicas mais recentes com ecocardiografia com uso de Doppler tecidual, particularmente estudando a relação E/e' para avaliar a função diastólica, estão sendo mais comumente usadas, mas seu valor no choque séptico ainda não está bem definido. Sturgess e colaboradores avaliaram 21 pacientes com choque séptico, demonstrando uma relação E/e' maior em não sobreviventes com uma melhor discriminação comparativamente a biomarcadores cardíacos para mortalidade (19).

Nós recentemente estudamos 45 pacientes com choque séptico e sem doença cardíaca previa, realizando ecocardiografia com Doppler tecidual nas 24h, 72h e sete dias após início do choque séptico e demonstramos que a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e direito são prevalentes nesse grupo e que a não dilatação do ventrículo esquerdo assim como disfunção diastólica parecem estar relacionadas com um pior prognóstico (20).

Num outro estudo, em que 262 pacientes com sepse grave e choque séptico foram avaliados com ecocardiografia com Doppler, a disfunção diastólica (onda e' menor 8cm/s) foi vista em 50% dos casos e se constituiu em um importante preditor de mortalidade nesse grupo de pacientes (21).

Brown e colaboradores recentemente avaliaram 78 pacientes com sepse grave ou choque séptico por ecocardiografias transesofágicas seriadas e encontraram uma incidência de 36% de disfunção diastólica na ecocardiografia inicial (nas primeiras 6 horas) enquanto que 62% tinham disfunção diastólica na última ecocardiografia. Os autores concluíram que disfunção diastólica é extremamente comum em pacientes sépticos e se associa a uma maior mortalidade (9).

Desta forma, ao contrario da disfunção sistólica, que parece ser adaptativa e reversível, a presença de disfunção diastólica parece se constituir em um marcador de pior prognóstico. Entretanto, os mecanismos responsáveis por seu desenvolvimento, bem como seu papel na sepse ainda precisam ser melhor elucidados.

Mecanismos moleculares da disfunção miocárdica na sepse

A infecção sistêmica e/ou inflamação resultam em um prejuízo da função contrátil cardíaca através de uma resposta imune inata das células cardíacas. Os cardiomiócitos são células cardíacas especializadas cuja função primária é a contração para fornecer força motora e gerar o débito cardíaco e pressão arterial. Há evidências de que os cardiomiócitos também respondem a sinais de perigo com uma complexa resposta inflamatória e funcional. Por exemplo, em resposta a um estímulo inflamatório, os cardiomiócitos: 1) expressam citocinas pró e anti-inflamatórias (Interleucina [IL]-6 e 10) que iniciam e regulam uma resposta inflamatória local, 2) expressam quimioquinas, (MIP-2, MCP1, KC) as quais recrutam células necessárias para o processo de cicatrização, e 3) aumentam a expressão de moléculas de adesão da superfície das células (ICAM-1), permitindo a interação da sinalização desde células inflamatórias e da matriz extracelular, e 4) finalmente produzem duas pequenas moléculas reguladoras do cálcio (S100A8 e S100A9) que suprimem o fluxo de cálcio via receptor RAGE (22,23). Esta resposta dos cardiomiócitos envolvendo citocinas, quimioquinas e posteriormente recrutando leucócitos e moléculas de adesão da superfície da célula, leva ao decréscimo de contratilidade dos mesmos. Há dados sugerindo que alguns membros da família dos receptores Toll Like, da

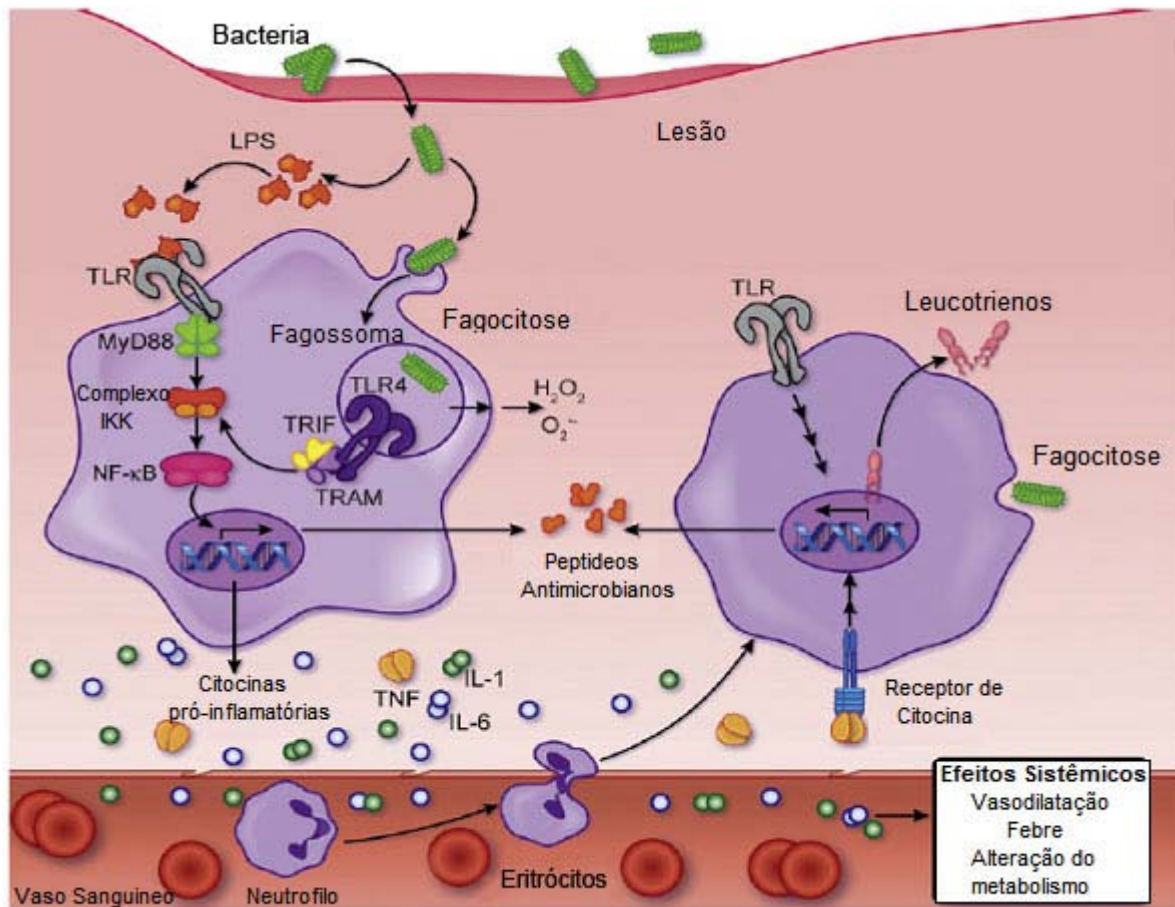
resposta imune inata, mediam o reconhecimento desses sinais de perigo local e iniciam uma resposta inflamatória (24). Boyd e colaboradores, em um estudo experimental com sepse em ratos, demonstraram que houve estimulação dos TLRs 2,4 e 5 ativando o Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e sinalizando a via inflamatória de cardiomiócitos que resultou em um decréscimo da contratilidade (23).

Receptores Toll Like

A resposta imune do hospedeiro é de dois tipos a inata e a adaptativa. A resposta imediata, a qual inclui inflamação, fagocitose de patógenos e recrutamento de uma variedade de células imunes, ocorre independente da exposição prévia e é chamada resposta imune inata. A família dos receptores chamados de Toll Like (TLRs) constitui a primeira estratégia para discriminar o próprio do não próprio. Os TLRs têm sido descritos como “necessários” ou “requeridos” para resposta imune adaptativa (Figura 2). (25, 26)

Atualmente um total de 10 TLRs é conhecido em humanos. Mais especificamente, o TLR2 e o TLR4 têm papéis centrais no reconhecimento de componentes de bactérias gram positivas e gram negativas, respectivamente. Todos os TLRs têm uma região citoplasmática (~200 aminoácidos), conhecida como os domínios Toll-IL-1R (TIR), que estão envolvidos no gatilho dos sinais intracelulares, culminando na translocação regulatória transcripcional do NF- κ B dentro do núcleo, onde participam do aumento de citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores imunorreguladores. A habilidade de uma proeminente resposta inflamatória em resposta ao estímulo bacteriano é dependente dos TLRs. Desta forma, tem havido um grande interesse em estudar se as

variações genéticas desses receptores podem ser responsáveis pela disparidade vista na susceptibilidade, gravidade e na mortalidade relacionada às infecções bacterianas (2,27).



Biologia atual

Figura 2. Sinalização dos TLRs: Patógenos, tais como bactérias podem entrar no hospedeiro levando a ativação de macrófagos via TLRs por moléculas derivadas de patógenos, incluindo LPS, levando a produção de citocinas inflamatórias. Essa sinalização depende de quatro proteínas adaptadoras-MyD88, TIRAP (também chamado MAL), TICAM1 (também chamado TRIF) e TICAM2 (também chamado TRAM) que diretamente ligam-se a TLRs ativados e promovem a sinalização. Ligandos ligados aos TLRs alteram a conformação dos ectodomínios dos TLRs, essas alterações são propagadas para o domínio intracelular TIR dos TLRs. Todos os TLRs utilizam a via MyD88-dependente resultando na produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e outras citocinas dependentes do NF- κ B. Adaptado de Beutler. (25).

Receptor Toll Like 4 e seu polimorfismo

Após a descoberta em voluntários humanos e em ratos de que a variação genética no TRL4 poderia alterar a resposta a bactérias gram negativas ou à endotoxina, alguns estudos foram realizados para avaliar o polimorfismo 299 Asp→Gly e 399 Thr→Ile em pacientes com sepse por gram negativos (28). Arbour e colaboradores demonstraram a importância destes dois polimorfismos no TRL4 em relação à sua função (29). Neste estudo, a função pulmonar após inalação de endotoxina foi avaliada em um total de 83 pessoas. Indivíduos com polimorfismo Asp299Gly e Thr399Ile apresentaram piora da função pulmonar após endotoxina inalada. Consistentes com estes achados, Lorenz e colaboradores, demonstraram que o alelo 299/399 foi mais prevalente em pacientes com sepse por gram negativo (30). Van den Berghe e colaboradores, em um estudo multicêntrico, avaliaram o sangue de 774 pacientes criticamente enfermos internados em unidades de terapia intensiva. Foram selecionados 31 polimorfismos de um simples nucleotídeo de 14 genes envolvidos na resposta imune inata. Foi encontrado que a presença do alelo G para polimorfismo TLR4 299 predispõe a infecções graves e maior mortalidade. Esse estudo sugere que polimorfismos funcionais em genes envolvidos na resposta imune podem tornar-se parte de um modelo de risco, permitindo a identificação de pacientes de pior prognóstico, que poderiam beneficiar-se desde a introdução precoce de medidas preventivas ou de intervenções terapêuticas customizadas (31).

Com relação à associação com a disfunção miocárdica não existem estudos em humanos, mas diversos estudos experimentais avaliaram o papel

dos TLRs (Tabela 1). Um estudo experimental *in vivo* e *ex vivo* em camundongos C57B1 e em animais deficientes em TLR4 avaliou a importância dos TLR4 dos cardiomiócitos comparados com o TLR4 dos leucócitos na disfunção cardíaca induzida por lipopolissacarídeos (LPS) de gram negativo. Este estudo demonstrou que os TLR4 presentes nos leucócitos e não nos cardiomiócitos exercem um papel importante na disfunção de miócitos cardíacos durante a endotoxemia (32). Nemoto e colaboradores avaliaram o efeito dos LPS na disfunção ventricular de camundongos com deficiência de TLR4 e camundongos selvagens, este estudo sugere que o TLR4 media a disfunção ventricular esquerda que ocorre no choque induzido por LPS (33). Outro estudo recente também em modelo experimental em camundongos demonstrou que deficiência de TLR4 no coração está associada com melhora na sobrevivência e função de ventrículo esquerdo após sepse por LPS (34).

Em conjunto estes estudos sugerem que os polimorfismos no TLR4 Asp299Gly e Thr399Ile podem causar certas respostas aberrantes às infecções por bactérias gram negativas, com aumento da gravidade da doença.

Receptor Toll Like 2 e seus polimorfismos

Os TLR2 desempenham um papel essencial no reconhecimento de componentes de bactérias gram positivas (35,36). Knuefermann e colaboradores em um estudo experimental em camundongos com deficiência de TLR2 e camundongos selvagens após sepse por estafilococos aureus, demonstraram que a sinalização via TLR2 contribui para a piora da

contratilidade miocárdica e aumento de citocinas no coração pós sepse (37). Zou e colaboradores examinaram o efeito dos LPS em camundongos deficientes em TLR2 e encontraram que estes tinham melhor função cardíaca durante a sepse induzida quando comparados a camundongos selvagens, estes também apresentavam uma menor concentração de citocinas (38). Contudo ainda não está claro se a infecção polimicrobiana exerce uma disfunção cardíaca diretamente ou via TLR2 (39). Zou e colaboradores em outro estudo experimental em camundongos demonstraram que TLR2 de células não hematopoiéticas desempenham um papel essencial mediando disfunção cardíaca durante a sepse (40).

Dois polimorfismos no gene do TLR2 foram identificados consistindo na substituição da arginina pelo triptofano no aminoácido 677 (677Arg→Trp) e na substituição da arginina pela glutamina no aminoácido 753 (753 Arg→Gln). Alguns estudos mostram que estes polimorfismos podem predispor indivíduos a certas infecções por gram positivos (41). Sutherland e colaboradores demonstraram, em um estudo em 252 pacientes com SIRS, associação do polimorfismo do TLR2 -16933AA com aumento da prevalência de infecção por gram positivo (47).

Estes estudos sugerem que a sinalização via TLR 2 pode exercer um papel crítico mediando a cardiomiopatia, com efeitos deletérios no miocárdio e maior mortalidade durante a sepse polimicrobiana. Entretanto, não há estudos em humanos avaliando especificamente o papel dos polimorfismos do TLR2 com disfunção miocárdica na sepse.

Tabela 1. O papel dos receptores Toll like na disfunção miocárdica da sepse

TLRs	Animal Modelo	Tipo de célula	Efeito	Função Cardíaca	Referencia
TLR2	Camundongos TLR-/- e WT <i>Ex vivo</i>	Cardiomiócitos	↑TNF e IL1(WT)	↓(WT)	Knuefermann 2004(37)
	Camundongos TLR-/-MyD88- e WT <i>In vivo e ex vivo</i>	Cardiomiócitos	↑TNF e ↑mortalidade (WT)	↓(WT)	Zhu 2007(42)
	Camundongos TLR-/- e WT <i>In vivo e ex vivo</i>	Cardiomiócitos e células da medula	↑TNF e IL6(WT)	↓(WT)	Zou 2010 (38)
	Camundongos TLR-/(MO) e WT Camundongos TLR2-/- e WT <i>Ex vivo</i>	Célula hematopoiética (MO) Célula não hematopoiética	↑TNF e ROS e IL1(WT)	↓(WT/ WT-MO) ↓(WT/KO-MO)	Zou 2011(40)
TLR2 e 4	Camundongos TLR2 -/- e +/+ Camundongos TLR4-/- e +/+ <i>Ex vivo</i>	Cardiomiócitos	↑ ET-1(+/+)	↓(+/+)	Patel 2007 (43)

TLR4					
Camundongos C3H/HeJ (TLR4 não funcional) C3H/HeN (controle) <i>Ex vivo</i>	Cardiomiócitos	↑iNOSm RNA (controles)	↓(controles)		Nemoto 2002(33)
Camundongos C57B1/6 Camundongos deficientes TLR4 C57B1/6e Def TLR4(quimeras) <i>Ex vivo</i>	Cardiomiócitos e células da medula	Leucócitos são importantes para depressão miocárdica		↓controles	Tavener 2004(32)
Camundongos C3HHeJ e C3HeBFeJ <i>In vivo</i>	Cardiomiócitos	Produção cardíaca de ↑TNF-α e IL1β em controles		↓controles	Baumgarten 2001(44)
Camundongos TLR-/- e WT e quimeras C57BL10/ (TLR4_/_) <i>Ex vivo</i>	Células da medula			↓WT e quimeras	Bink 2004 (45)
Camundongos C3HHeJ e C3HeBFeJ <i>Ex vivo</i>	Cardiomiócitos	E5564 preveniu a disfunção contrátil		↓controles	Baumgarten 2006 (46)
Camundongos TLR-/- e WT e quimeras- <i>In vivo e ex vivo</i>	Cardiomiócitos	↓Mortalidade em TLR-/- ↑TNFα e IL1β em WT TLR de miócitos são importantes para depressão miocárdica		↓WT e quimeras	Fallach 2010(34)

WT= selvagens; camundongos WT= TLR +/-; C3HHeJ (deficientes em TLR4), C3HeBFeJ (controles), WT-MO: transplante de medula óssea; KO-MO: sem céls de medula óssea; E5564: inibidor competitivo dos LPS e inibidor oxido nítrico sintase induzível.

Fator de necrose tumoral- α e seu polimorfismo

O fator de necrose tumoral (TNF)- α é uma citocina pró-inflamatória que é encontrada em altos níveis em pacientes com choque séptico e causa disfunção cardíaca durante a sepse (6, 48). O papel depressor miocárdico do TNF- α ocorre através de diversos mecanismos, sendo ainda incerto aquele que seria o primordial, mas é consensual que esta citocina aumenta a produção de óxido nítrico e modula a entrada e saída de cálcio da célula. Tavener e colaboradores em um estudo experimental em ratos deficientes em receptores 1 e 2 do TNF- α , demonstraram que estes não desenvolviam disfunção miocárdica após o estímulo com LPS, evidenciando assim a importância dos receptores do TNF- α na depressão miocárdica da sepse (49).

Variações inter individuais na produção desta citocina têm sido descritas, variações essas que parecem ter origem genética (50,51). Stuber e colaboradores em um estudo em 40 pacientes sépticos encontraram um polimorfismo bi alélico Ncol dentro do locus do TNF- α como sendo um marcador genômico de pior prognóstico, além de apresentarem níveis aumentados de TNF- α , e concluíram que níveis de TNF- α durante as infecções parecem ser modulados geneticamente (52). Um estudo multicêntrico conduzido por Mira e colaboradores avaliou uma coorte de 89 pacientes com choque séptico e relatou um aumento significativo na frequência do alelo -308 em pacientes que morreram e concluiu que pacientes com o alelo -308 no gene do TNF- α tinham 3,7 vezes maior chance de morrer. Apesar disso, os níveis circulantes de TNF- α não foram diferentes no grupo controle e no grupo com o alelo -308 (53). Tomasdottir e colaboradores avaliaram o polimorfismo bi alélico

no gene do TNF- α para determinar sua associação com aumentada resposta a SIRS com aumento da morbidade cardiopulmonar após cirurgia cardíaca. Neste estudo foram avaliados 95 pacientes, e aqueles homozigotos para o alelo TNFB2 desenvolveram SIRS exacerbada após cirurgia cardíaca com um aumento da morbidade cardiopulmonar (54).

Assim, polimorfismos no gene do TNF- α parecem estar relacionados à pior prognóstico na sepse. Entretanto, o papel destes polimorfismos ainda não está bem definido, pois estudos são escassos neste tema, e seu papel na disfunção miocárdica associada à sepse em humanos ainda não foi estudado.

Conclusões

A disfunção miocárdica é comum no contexto da sepse e parece estar relacionada a um pior prognóstico; recentemente tem sido explorado o papel da disfunção diastólica nesse cenário. Seus mecanismos moleculares ainda não estão claramente elucidados em estudos em humanos, porém vários estudos experimentais sugerem um papel dos polimorfismos dos TLRs e do TNF- α na disfunção miocárdica da sepse.

Considerando que a sepse é uma síndrome poligênica, é improvável que um único polimorfismo irá determinar um fenótipo particular, mas quando múltiplos fenótipos agem juntos e há presença de infecção a manifestação da disfunção miocárdica pode ser mais grave e até fatal.

O progresso nesse entendimento tem sido rápido, porém várias lacunas no conhecimento persistem. Uma vez entendendo o papel dos receptores Toll

like neste contexto, o maior desafio para o futuro talvez seja alterar a sinalização destes receptores no processo imune, e talvez buscar novas estratégias de modulação do TNF- α , para prevenir infecções, tratar a sepse e modular a inflamação.

Referencias Bibliográficas

1. Melamed A, Sorvillo FJ. The burden of sepsis-associated mortality in the United States from 1999-2005: an analysis of multiple-cause-of-death data. *Crit Care* 2009; 13:R28.
2. Arcaroli J, Fessler M and Abraham E. Genetic Polymorphisms and Sepsis. *Shock*. 2005; 24: 300-312.
3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644-1655.
4. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-150.
5. Russel JA. Management of Sepsis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1699- 1713.
6. Court O, Kumar A, Parrillo JE, et al. Clinical Review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002; 6: 500-508.
7. Jardin F, Fourme T, Page B, et al. Persistent Preload Defect in the Severe Sepsis Despite Fluid Loading: A Longitudinal Echocardiography Study in Patients with Septic Shock. *Chest* 1999; 116: 1354-1359.
8. Vieillard-Baron A, Caille V, Chergui K, et al. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med* 2008, 36: 1701-1706.

- 9.** Brown SM, Pittman JE, Hirshberg EL, et al. Diastolic dysfunction and mortality in early severe sepsis and septic shock: a prospective, observational echocardiography study. *Crit Ultrasound J* 2012; 4: 1-9.
- 10.** Balija TM and Lowry SF. Lipopolysaccharide and sepsis-associated myocardial dysfunction. *Curr Opin Infect Dis* 2011, 24: 248-253.
- 11.** Rudiger A and Singer M. Mechanisms of Sepsis-induced Cardiac Dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35: 1-10.
- 12.** Parker MM, Schelharmer JH, Bacharach SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984; 100: 483-490.
- 13.** Ognibene FP, Parker MM, Natanson C, et al. Depressed left ventricular performance. Reponse to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest* 1988; 93: 903-910.
- 14.** Vieillard-Baron A, Schmitt JM, Beauchet A, et al. Early preload adaptation in septic shock. A transesophageal echocardiographic study. *Anesthesiology* 2001; 94: 400-406.
- 15.** Bouhemad B, Nicolas-Robin A, Arbelot C, et al. Acute left ventricular dilatation and shock induced myocardial dysfunction. *Crit Care Med* 2009; 37: 441-447.
- 16.** Zanotti-Cavazzoni SL, Guglielmi M, Parrillo JE, et al. Ventricular dilation is associated with improved cardiovascular performance and survival in sepsis. *Chest* 2010; 138: 848-855.

- 17.** Wachtell K, Palmieri V, Gerds E, et al. Prognostic significance of left ventricular diastolic dysfunction in patients with left ventricular hypertrophy and systemic hypertension (the LIFE Study). *Am J Cardiol* 2010; 106: 999- 1005.
- 18.** Zhang Y, Safar ME, Iaria P, et al. Prevalence and prognosis of left ventricular diastolic dysfunction in the elderly: The PROTEGER Study. *Am Heart J* 2010; 160: 471-478.
- 19.** Sturgess DJ, Marwijk TH, Joice C et al. Prediction of hospital outcome in septic shock: a prospective comparison of tissue Doppler and cardiac biomarkers. *Crit Care* 2010; 14: 1-12.
- 20.** Furian T, Aguiar C, Prado K, et al. Ventricular dysfunction and dilatation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care* 2012; 27:319.e9-15.
- 21.** Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, et al. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J* 2012; 33: 895-903.
- 22.** Boyd JH, Mathur S, Wang Y, et al. S100a8 and S100a9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res* 2008; 102: 1239-1246.
- 23.** Boyd JH, Mathur S, Wang Y, et al. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decrease contractility and initiates an nf-kappab dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 384-393.
- 24.** Marchant D, Boyd J, Lin DC, et al. Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res* 2012; 110: 126-144.

- 25.** Moresco EM, LaVine D and Beutler Bruce. Toll-like receptors. *Curr Biol* 2011; 21: 488-493.
- 26.** Doherty TM and Arditi Moshe. Innate Immunity Toll-like receptors and host response to infection. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 643- 644.
- 27.** Blasius AL and Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 2010; 32: 305-315.
- 28.** Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ et al. Human toll like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 1522-1525.
- 29.** Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TRL4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
- 30.** Lorenz E, Mira JP, Fress KL et al. Relevance of mutation in the TRL4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1028-1032.
- 31.** Liesbet Henckaerts, Kaspar Nielsen, Steffensen R et al. Polymorphisms in innate immunity genes predispose to bacteremia and death in the medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2009; 37: 192-201.
- 32.** Tavener S, Long EM, Robbins SM, et al. Immune cell Toll-Like Receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 2004; 95: 700-707.

- 33.** Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P et al. Escherichia coli LPS-induced LF dysfunction: role of toll-like in adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 2316- 2323.
- 34.** Fallach R, Shainberg A, AvlasO, et al. Cardiomyocyte toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardio* 2010; 48: 1236-1244.
- 35.** Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, et al: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406–17409.
- 36.** Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274: 33419–33425.
- 37.** Knuefermann P, Sakata Y, Baker S, et al. Toll-Like Receptor 2 mediates Staphylococcus aureus- Induced Myocardial Dysfunction and Cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693-3698.
- 38.** Zou L, Feng Y, Jung-Chen Y, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38: 1-18.
- 39.** Mersmann J and Zacharowski K. Does polymicrobial sepsis exert cardiac dysfunction directly through toll like receptor 2? *Crit Care Med* 2010; 38: 1384-1385.

- 40.** Zou L, Feng Y, Zhang M, et al. Nonhematopoietic Toll-Like Receptor 2 contributes to neutrophil and cardiac function impairment during polymicrobial sepsis. *Shock* 2011; 36: 370-380.
- 41.** Lorenz E, Mira JP, Cornish KL et al. A novel polymorphism in the toll-Like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000; 68: 6398-6401.
- 42.** Zhu X, Bagchi A, ZhaoH, et al. Toll-like receptor 2 activation by bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein activates cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction. *Crit Care Med* 2007, 35: 886-892.
- 43.** Patel TA, Belcher E, Warner TD, et al. Identification and characterization of dysfunctional cardiac myocyte phenotype: role of bacteria, toll-like receptors and endothelin. *Shock* 2007; 28: 434-440.
- 44.** Baumgarten G, Knuefermann P, Schumacher G, et al. In Vivo Expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: The role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; 183: 1617-1624.
- 45.** Binck BW, Tsen MF, Islas M, et al. Bone marrow derived cells contribute to contractile dysfunction in endotoxic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 577-583.
- 46.** Baumgarten G, Knuefermann P, Schumacher G, et al. Toll-like receptor 4, nitric oxide and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49.

- 47.** Sutherland AL, Walley KR, Russel JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005; 33: 638-644.
- 48.** Kumar A, Thota V, Dee L, et al: Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958.
- 49.** Tavener SA and Kubes P. Cellular and molecular mechanisms underlying LPS associated myocyte impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 800-806.
- 50.** Wilson AG, Symons JA, Mc Dowell TL, et al: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3195–3199.
- 51.** Louis E, Franchimont D, Piron A, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401–406.
- 52.** Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, et al. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 381-384.

53. Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multimer study. *JAMA* 1999; 282: 561-568.

54. Tomasdottir H, Hjartarson H, Ricksten A, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesth Analg* 2003; 97: 944-949.

RACIONAL DO ESTUDO

A sepse grave e o choque séptico têm uma prevalência muito alta, sendo a décima causa de mortalidade globalmente. Apesar dos avanços no seu tratamento nos últimos anos sua mortalidade permanece em torno de 30-60%. A morte nesse grupo de pacientes se dá principalmente por disfunção de múltiplos órgãos e choque refratário. Nesse cenário, a depressão miocárdica é responsável pela alta mortalidade porém sua fisiopatologia permanece ainda não bem esclarecida.

Estudos ecocardiográficos sugerem que cerca de 50% dos pacientes com choque séptico desenvolvem depressão miocárdica, definida por uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo <45%. A fisiopatologia da depressão miocárdica é complexa e envolve múltiplos fatores. Atualmente se sabe que a resposta imune inata tem um papel importante nesse contexto. Os receptores Toll like (TLRs) são os principais efetores da resposta imune inata, da inflamação e da defesa do hospedeiro contra patógenos bacterianos. Mais recentemente, o foco tem envolvido a identificação da variação genética em genes cruciais da resposta inflamatória fornecendo uma reflexão sobre a influência da heterogeneidade genética em resposta a infecções bacterianas. Entretanto não existem estudos em humanos explorando uma potencial associação da disfunção cardíaca na sepse com os polimorfismos genéticos dos TLRs 2 e 4 e do TNF- α e seu prognóstico. Assim, o presente estudo poderá contribuir para um melhor entendimento do papel da heterogeneidade genética dos receptores Toll-like 2 e 4 e do TNF- α em resposta às infecções e do seu papel na fisiopatologia da disfunção miocárdica da sepse.

HIPÓTESE

A disfunção miocárdica na sepse pode estar associada a um perfil diferenciado de expressão dos polimorfismos receptores toll like 2 e 4 e do fator de necrose tumoral- α .

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o comportamento do polimorfismo genético dos TLRs 2 e 4, do TNF- α e o nível sérico do TNF- α em pacientes com sepse grave e choque séptico em relação à função ventricular.

Objetivos específicos

1. Determinar a frequência de polimorfismos dos TLR 2 e 4, do TNF- α em pacientes com sepse grave e choque séptico.
2. Determinar a frequência de disfunção miocárdica sistólica e diastólica em pacientes com sepse grave e choque séptico.
3. Determinar os níveis séricos do TNF- α .
4. Analisar a associação dos níveis séricos dos marcadores biológicos, e dos seus polimorfismos isolados e seu sinergismo com relação à disfunção miocárdica e mortalidade na sepse.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**Patterns of cardiac dysfunction in patients with sepsis relative
to Toll Like receptors 2 and 4 and TNF- α polymorphisms**

Abstract

Purpose: The aim of study was to evaluate echocardiography-based indices of myocardial function in sepsis and septic shock, comparing toll like receptors 2 and 4 and TNF- α polymorphisms with the presence of systolic and diastolic dysfunction.

Material and Methods: Fifty-four adults patients (60% women; mean age 51 ± 18 years; Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II score 27 ± 7) admitted to intensive care unit up to 24 hours after fulfilling criteria for severe sepsis or septic shock were studied. Clinical and laboratory data, and blood samples were collected within the first 24 hours. Tumor necrosis factor [TNF]- α levels, and genotyping for toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) and TNF- α were performed. Echocardiography was performed within the first 24 hours and again 72 hours and 7 days after admission.

Results: Mortality of patients with sepsis was 39%. Systolic dysfunctions of the left and right ventricle were present in 37% and 33% of patients, respectively. Diastolic dysfunction was evident in 74% of the patients and was associated with higher mortality ($P=0.017$). The prevalence of polymorphisms for TLR2 (Arg677Trp, TLR2 Arg753Gln, TLR4 Asp299Gly) and TLR4 (Trh 399Ile) was low, and was moderate for TNF- α (-308G>A) polymorphism, showing no association with clinical or echocardiographic findings.

Conclusions: Myocardial dysfunctions, both systolic and diastolic, were highly prevalent in severe sepsis. Diastolic dysfunction was associated with higher

mortality. However, we could not demonstrate any association of TLR and TNF- α polymorphisms with either systolic or diastolic dysfunction.

Introduction

Sepsis and septic shock remain important causes of morbidity and mortality worldwide (1, 2). Cardiac dysfunction contributes importantly to this scenario (3). Classically, it is considered that early dilatation of the left ventricle and depressed ejection fraction is associated with better chances of reversibility and consequent survival (4). Subsequently, similar findings were observed relative to the right ventricle in patients with septic shock, in whom improvement in right ventricle function was also associated with better survival (5). Our group has recently showed that left ventricular dysfunction in patients with sepsis or septic shock was associated with endothelial dysfunction as assessed by endothelin-1 levels and that diastolic function is also impaired, the latter being associated with poorer survival rates (6). However, the complex nature of sepsis-related cardiac dysfunction is incompletely understood.

There is growing evidence that the innate immune response plays important roles in the pathogenesis of sepsis and its consequences, including the sepsis-related cardiac injury (7, 8). Toll like receptors (TLRs) are important effectors of the innate immune response, involved in the release of inflammatory mediators and host defense mechanisms against bacterial pathogens. Circulating TLRs membrane-bound to leucocytes are triggers of the inflammatory cascade once activated by bacterial pathogens. Ten TLRs have been described, while TLR2 and 4 are central to the recognition of gram positive and gram negative bacterial components, respectively (9, 10). More recently, genetic variations of these receptors have emerged as an important focus of research related to genes involved in the inflammatory response. The

identification of TLR polymorphisms and that of inflammatory cytokines has shed light into the genetic heterogeneity response to different bacterial infections (11). Interestingly, experimental studies suggest that both TLRs 2 and 4 are involved in the development of sepsis-related myocardial dysfunction (12, 13, 14).

Among cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α is a well known cytokine that can cause negative inotropic effects related to sepsis (3). The -308 polymorphism on the TNF- α gene enhances TNF-mediated responses in sepsis and is associated with worse clinical outcomes (15). However, the association between distinct cardiac dysfunction parameters in sepsis with genetic polymorphisms of TLR 2 and 4 and of TNF- α and prognosis is poorly explored.

In the present prospective study we sought to investigate the association of cardiac dysfunction, focusing on the presence of diastolic dysfunction, as assessed by echocardiography, and the presence of TLR2 Arg677Trp, TLR2 Arg753Gln, TLR4 Asp299Gly, TLR4 Trh 399Ile and TNF- α -308G>A as well as levels of TNF- α in patients with sepsis or septic shock.

Methods

Patients and study design

The study included 54 consecutive adult patients admitted to the intensive care unit at Hospital de Clinicas de Porto Alegre within 24 hours of diagnosis of severe sepsis or septic shock according to internationally accepted consensus definitions (16). Briefly, *sepsis* was defined based on clinical evidence of infection and at least 2 of the following: 1) fever (core temperature $>38^{\circ}\text{C}$) or hypothermia (core temperature $<36^{\circ}\text{C}$), 2) tachycardia (heart rate >90 beats per minute), 3) tachypnea (>20 breaths per minute) or PaCO_2 less than 32 mmHg, 4) leucocytosis (>12000 cells/ mm^3), or a ratio of greater than 10% band cells to polymorphonuclear cells. Severe sepsis was defined as sepsis with hypotension even after volume expansion. Exclusion criteria were as follows: 1) age greater than 80 years, 2) heart failure, 3) liver failure (Child-Pugh class C), 4) bone marrow failure (leukocytes $<500/\mu\text{L}$), or 5) immunosuppression (acquired human immunodeficiency, use of immunosuppressants, including corticosteroids [prednisone $>1\text{mg/Kg}$ per day], or cancer), 5) pancreatitis, and 7) infective endocarditis.

Study protocol

Clinical features and laboratory data of patients were collected at admission, including Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II score (APACHEII). Serial transthoracic echocardiography were performed within the first 24 hours from admission (H24) and repeated after 72 hours (H72) and 7 days (D7). Informed consent

was signed by all patients or guardians before inclusion in the study. The study was approved by the institution's research ethics committee.

Echocardiography

Transthoracic two-dimensional echocardiography was performed in the intensive care unit, using an adult transducer (2.0-5.0 MHz), with harmonic imaging capability, and a commercially available ultrasound system (Philips EnVisor, Andover, MA). Analysis was focused on parameters of systolic and diastolic function of both right and left ventricles, including left ventricle (LV) diameters and left ventricle ejection fraction (LVEF), pulse wave Doppler of inflow mitral (E wave and A wave), tissue Doppler analysis of lateral corner of the mitral ring movement (early diastolic velocity [Em]), as well peak systolic velocities (Sm of the right and left ventricles). Left ventricular dysfunction systolic was defined as LVEF less than 55% or tissue Doppler peak systolic velocity (LV-Sm) less than 12cm/s, and right ventricle (RV) dysfunction was defined as RV tissue Doppler peak systolic velocity (RV-Sm) 12cm/s or less. Diastolic dysfunction was defined as tissue Doppler analysis of lateral corner of the mitral ring movement (early diastolic velocity) Em less than 12 cm/s. Measurements were performed in triplicates, according to accepted guidelines and protocols (17, 18), and the mean value was used for statistical analysis.

Blood sampling

Immediately after inclusion of the study, 10 ml blood samples were collected from patients in EDTA-containing tubes. The material was immediately centrifuged at 3000 rpm during 20 minutes. The plasma obtained was stored at

-70°C for posterior analyses. Immunoreactive TNF- α levels were measured by ELISA assay, using duplicate samples and run simultaneously to minimize assay variability (R&D Systems, MN). Inferior detection limits for the TNF- α , according to the manufacturer was 1.6pg/ml. This assay does not measure biological activity, rather a quantitative assessment of immunoreactivity is provided.

Genotyping TLR2 and 4 and TNF α

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a salting out method as previously described (19). Genotypes were identified by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods, using primers and conditions as described elsewhere for the TLR2 Arg677Trp (20), TLR2 Arg753Gln (21), TLR4 Asp299Gly, TLR4 Thr 399Ile (22) and TNF- α -308G>A (23) polymorphisms. The digest fragments were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide (TLR2 Arg677Trp, TLR4 Asp299Gly and TNF α -308G>A polymorphisms) or 2% agarose gels (TLR2 Arg753Gln and TLR4 Thr399Ile polymorphisms) and visualized with ethidium bromide under ultraviolet light. Samples with known genotypes were used in each run and genotyping was performed by laboratory personnel blinded to clinical and echocardiographic variables.

Statistical analysis

Quantitative variables are presented as mean \pm SD or median and interquartile range; categorical variables are expressed as absolute numbers and percentages. Variables without normal distribution underwent logarithmic

transformation. Student *t* test, χ^2 , or Fisher exact test was used for comparisons between the groups, as appropriate. Correlation between echocardiographic parameters and TNF- α were assessed by Pearson. To study the association between polymorphisms and echocardiographic parameters we used Mann-Whitney or Student test *t*. Two tailed $P < 0.05$ was considered as statistically significant. All statistical analysis was performed using SPSS version 17.0 for Windows.

Results

Patient's clinical characteristics

We enrolled 54 septic patients (60% women; mean age 51 ± 18 years; 64% of abdominal and respiratory sepsis etiology). Mean length of stay in intensive care unit was 9 days (median, 6 days; 1-36 days). In 83% of patients, vasoactive therapy was required, and 87% of them were on mechanical ventilation (29 patients with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300\text{mmHg}$). During hospitalization, 21 (39%) patients died because of sepsis.

Left and right ventricular echocardiography parameters

Left ventricular systolic dysfunction was detected in nearly a third of the enrolled patients by using LVEF (37%) and in about half of patients by using LV-Sm. Right ventricular dysfunction detected by RV-Sm occurred in 33% of patients. On the other hand, diastolic dysfunction was detected in 74% of patients.

Figure 1 depicts main echocardiographic parameters for survivors and nonsurvivors for days 1, 3 and 7. Systolic dysfunction, either evaluated by LVEF or LV-Sm, as well as right ventricular dysfunction, was not associated to prognosis. On the other hand, diastolic dysfunction was associated to prognosis in this group of patients. Nonsurvivors had lower Em values in all three evaluations. Finally, follow-up echocardiographies showed no significant changes in either systolic or diastolic dysfunction during the period of follow-up.

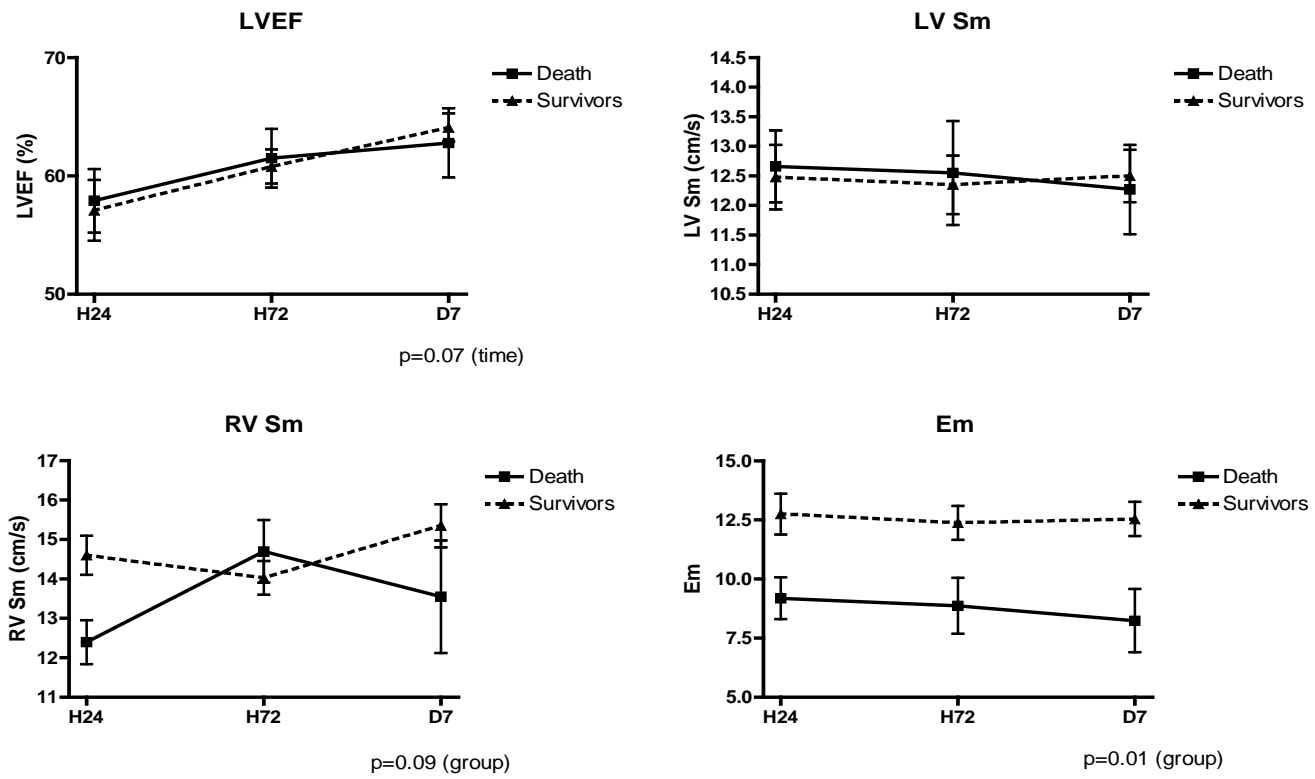


Figure1. Echocardiographic parameters for survivors and nonsurvivors for days 1, 3 and 7. LVEF: left ventricular ejection fraction; LV-Sm: left ventricle Sm; RV-Sm: right ventricle Sm; Em:early diastolic velocity

Diastolic dysfunction

Given the association of diastolic dysfunction to mortality, we evaluated cutoff values for this parameter, based on quartiles of distribution, to discriminate survivors from nonsurvivors in our sample. Patients with $E_m \leq 15$ cm/s were compared with the others and those with $E_r \leq 15$ cm/s had significant higher mortality ($P=0.017$); that was maintained after controlling for age ($P=0.038$). Characteristics of patients with and without diastolic dysfunction are presented on Table 1.

Table1. Clinical characteristics of studied patients

	Diastolic dysfunction (n=40)	No diastolic dysfunction (n=13)	P
Age –years	55±15	40±22	0.03
Female-n(%)	22(69)	9(55)	0.56
Caucasian (%)	35(87)	12(97)	>0.99
APACHE II	25(8)	20(5)	0.018
Mechanical ventilation (%)	37(92)	9(69)	0.09
Infection site-n ^o (%)			
abdominal	13(50)	8(31)	0.39
respiratory	7(27)	6(23)	
urinary	3(11)	6(23)	
others	3(11)	6(23)	
LogTNFα (ng/ml)	1.12(0.43-1.62)	1.0(0.73-1.29)	0.91
Echocardiography			
LVDD(mm)	4.5±0.5	4.8±0.7	0.10
LVSD(mm)	3.1±0.7	3.3±0.9	0.40
Left Atrium	3.6±0.5	3.7±0.5	0.25
Right ventricle (cm)	2.3±0.4	2.4±0.5	0.51
E/A ratio	1.3±1.2	1.5±0.8	0.56
LVEF (%)	56±13	60±13	0.46
RV-Sm (cm/s)	12±2.7	14±2	0.008
LV-Sm (cm/s)	12.7±2.8	12.5±3	0.83
Em (cm/s)	9.2±0.3	17.6±2.3	<0.001
Nonsurvivors-n (%)	20(50)	1(8)	0.017

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Disease, LVDD: left ventricle diastolic diameter, LVSD: left ventricle systolic diameter, E/A ratio: wave E/wave A, LVEF: left ventricle ejection fraction: RV-Sm and LV-Sm peak systolic velocities right and left ventricle, Em: early diastolic velocity

Toll like receptors genotyping and myocardial dysfunction

To investigate possible mechanisms involved in ventricular dysfunction of severe sepsis and septic shock, we evaluated the correlation between polymorphisms of TLR2 (677 and 753), TLR4 (299 and 399) and TNF- α (-308) and systolic and diastolic cardiac dysfunction in sepsis. The frequencies of risk allele was extremely low for TLR2 (alleles T and A) 0.01 and 0.02% respectively, TLR4 (allele G and T) was 0.05% for both of them and TNF- α (-308) was 0.15% (Table 2). There was no difference between genotypes and diastolic dysfunction even when we included all genotypes of risk (Table 3). Similar results were found regarding left and right systolic dysfunction (data not shown).

Table 2. Frequencies of polymorphisms

	Frequencies	Percentage (%)
TNF- α (-308) n=54		
GG	38	70
GA	16	30
Frequency allele A	0.15	
TLR4 (299) n=53		
AA	47	87
AG	6	11
Frequency allele G	0.05	
TLR4 (399) n=53		
CC	47	87
CT	6	11
Frequency allele T	0.05	
TLR2 (677) n=53		
CC	52	98
CT	1	2
Frequency allele T	0.01	
TLR2 (753) n=53		
GG	51	96
GA	2	4
Frequency allele A	0.02	

Table 3. Diastolic function and genotypes

	Diastolic dysfunction n=40	No diastolic dysfunction n=13	P
TLR4 (299)			
AA (%)	36 (92)	11(85)	0.41
AG (%)	3 (7)	2(15)	
TLR4 (399)			
CC (%)	34 (87)	12(92)	0.99
CT (%)	5 (13)	1 (8)	
TLR2 (677)			
CC (%)	38 (97)	13(100)	0.99
CT (%)	1 (2)	0	
TLR2 (753)			
GG (%)	38 (97)	12(92)	0.99
GA (%)	1 (2)	1 (8)	
TNF- α (308)			
GG (%)	30 (75)	7 (54)	0.14
GA (%)	10(25)	6 (46)	
Excluding TNF*			
Without risk allele	34 (85)	11(84)	0.99
With at least one risk allele	6 (15)	2(15)	
Including TNF*			
Without risk allele	27 (67)	7(54)	0.37
With at least one risk allele	13 (32)	6(46)	

*Analysis using combination of TLR receptor polymorphisms, excluding or including the TNF polymorphism, respectively.

Tumor necrosis factor- α and myocardial dysfunction

To investigate possible mechanisms associated to diastolic dysfunction in severe sepsis we further evaluated the correlation between levels of TNF- α and diastolic dysfunction (Em). Patients with diastolic dysfunction had no significant differences observed for TNF- α values (Figure 2).

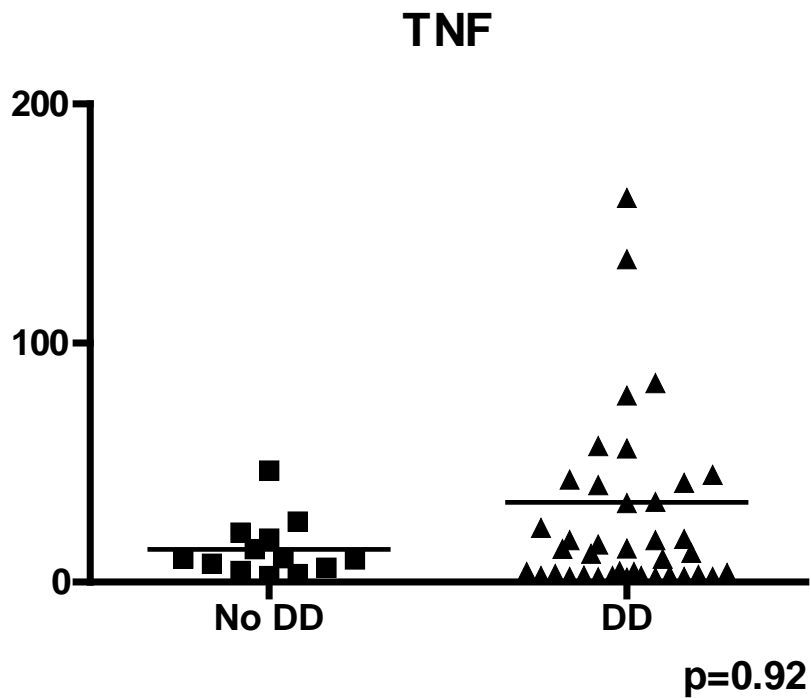


Figure 2. Tumor necrosis factor- α levels from patients with and without diastolic dysfunction. DD: diastolic dysfunction.

Discussion

In the present prospective study, we showed that in 54 patients with sepsis or septic shock, 1) left ventricular dysfunction was present in 50% and right ventricular dysfunction in 33%, 2) diastolic dysfunction was evident in 74% of the patients and was associated with higher mortality, and 3) the prevalence of polymorphisms for TLR2 Arg677Trp, TLR2 Arg753Gln, TLR4 Asp299Gly, TLR4 Trh 399Ile was low and was moderate for TNF- α -308G>A, showing no association with clinical or echocardiographic findings.

Left ventricular dysfunction pattern associated with sepsis has long being described by Parker and colleagues in a classical study (4). Others have confirmed that according to the cardiac response to septic injury, different outcomes may develop (6, 24, 25). Descriptive studies have shown that dilatation of the left ventricle early in sepsis indicates a better chance to recuperate ventricular function and is associated with better prognosis (6, 26)

The importance of diastolic dysfunction in cardiovascular disease is well known, and thought to precede systolic dysfunction in most conditions. In sepsis, however this particular phenomenon is less well studied. Bouhemad and colleagues described isolated and transient impairment in left ventricular relaxation together with rise in troponin I levels and cytokines but without association with outcome in 20% of 54 patients with sepsis that were studied (27). More recently, our group and others have shown that altered diastolic echocardiographic parameters correlated with poorer outcome in sepsis (6, 24, 28).

Our present data reinforce this concept, with emphasis on the diastolic pattern observed by Doppler echocardiography. We showed that nonsurvivors had low Em values compared to survivors, indicating that early, diastolic-related injury can accurately predict outcome in these patients. Also, our consecutive data demonstrated that echocardiography can easily be performed at the bedside, avoiding invasive hemodynamic assessments, and yet provide useful clinical information. However, the complex nature of cardiac dysfunction in sepsis could not be further explained by means of echocardiographic imaging only.

We then investigated underlying pathogenic mechanisms of cardiac dysfunction in sepsis, especially those related to Toll-like receptors and TNF- α -related effects. Toll-like receptors 2 and 4 are involved in responses to lipopolysaccharides (LPS) in different bacterial-mediated sepsis. In fact, TLR 2 and 4 are necessary for LPS-induced cytokine (TNF- α), interleukins and nitric oxide (NO) signaling to occur leading to cardiac dysfunction (7, 8, 29). Different knockout models have shown that animals that do not express TLR 2 or 4 respond less markedly to LPS-induced deleterious effects (7, 12, 14, 30). In other words, the absence of or potential polymorphisms of TLR's may indeed protect the heart from sepsis-induced cardiac injury. However, it remains unclear whether these effects are purely dependent of myocyte-expressed TLR or leucocyte-expressed TLR or both (12, 13, 31).

Considering the heterogeneous cardiac response to sepsis, we analyzed the presence of specific polymorphisms TLR2 Arg677Trp, TLR2 Arg753Gln, TLR4 Asp299Gly, TLR4 Trh 399Ile and TNF- α -308G>A expressed in circulating leucocytes and studied their association with cardiac function in

septic patients. Our main findings were twofold: 1) the prevalence of TLRs polymorphisms was rare and was moderate for TNF- α polymorphism, and 2) no association of any polymorphism was observed with either systolic or diastolic dysfunction.

Previous reports have shown that the prevalence of the TLR polymorphisms studied may vary widely. We found a very low prevalence for all TLR studied polymorphisms which may be relevant to the Brazilian population; indeed, previous studies involving these markers were generated in other countries, possibly reflecting different genetic backgrounds (21,32). Nonetheless, the importance of TLR4 Asp299Gly and Trh 399Ile to mediate different response to inhaled LPS was described (33). Others have shown that TLR4 Asp299Gly and TLR4 Trh 399Ile are associated with poor outcome in sepsis (34,35). Similarly, investigators assessed whether TNF- α polymorphisms were associated with different outcomes in sepsis – Mira and colleagues observed higher mortality rate in septic patients carrying the TNF2 allele (36). Higher susceptibility for increased inflammatory response, left ventricular dysfunction, sepsis and mortality was observed in patients submitted to cardiac surgery when carrying TNFB1 and/or TNFB2 alleles (37). We found a slightly higher prevalence of TNF- α -308 compared to the TLRs polymorphisms, and yet no correlation was found with cardiac dysfunction parameters.

Ours was the first study to seek for associations involving the presence of TLR4 Asp299Gly and Trh 399Ile, TLR2 Arg677Trp and Arg753Gln and TNF α -308 with cardiac dysfunction in patients with sepsis. In spite of moderate prevalence of systolic and diastolic dysfunction detected in the studied patients

- the latter being associated with higher mortality - we found no association of any type of cardiac dysfunction and the presence of any of studied polymorphisms. We speculate that these negative findings may be related to the low prevalence of the searched alleles (previously unstudied in similar Brazilian cohort), to the polygenic characteristic of sepsis and/or to the potential involvement of other non-studied TLR signaling pathways such as MyD88 and others. Finally, it might be considered that cardiac expressed TLR may be more functionally relevant to the myocardium during sepsis, compared to leucocyte-circulating TLR (38, 39); however, *in vivo* assessment of myocyte-based TLR requires endomyocardial biopsy which imposes substantial risks which may not be acceptable for research only purposes.

Study limitations

Our data should be viewed considering some limitations. Firstly, we detected a very low prevalence of the studied polymorphisms in our patient sample which naturally limits the ability to draw consistent associations; secondly, we measured circulating-leucocyte binded TLRs which may not necessarily reflect myocardium specific effects and finally it is possible that among several signaling pathways involved in the pathogenesis of myocardial dysfunction related to sepsis in humans, both TLRs and TNF- α effects play minor roles.

Conclusions

In this prospective study we showed that almost half of patients with sepsis or septic shock develop left ventricular dysfunction and that two thirds of

them present diastolic dysfunction which was associated with higher mortality. However, we could not demonstrate any association of four different circulating TLR and TNF- α polymorphisms with the development of either systolic or diastolic dysfunction. It is unclear whether these data can be generalized to populations with different genetic backgrounds.

References

1. Russel JA. Management of Sepsis. N Engl J Med 2006; 355: 1699-1713.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003; 348: 138-150.
3. Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical Review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. Crit Care 2002; 6: 500-508.
4. Parker MM, Schelharmer JH, Bacharach SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. Ann Intern Med 1984; 100: 483-490.
5. Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, et al. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. Chest 1990; 97: 126-131.
6. Furian T, Aguiar C, Prado K, et al. Ventricular dysfunction and dilatation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. J Crit Care 2012, 27: 319. E9-15.
7. Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, et al. Escherichia coli LPS-induced LF dysfunction: role of toll-like in adult heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282: 2316-2323.

8. Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, et al. Toll-Like Receptor 2 mediates Staphylococcus aureus- Induced Myocardial Dysfunction and Cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693-3698.
9. Kumar H, Kawai T and Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 2009; 420:1–16.
10. Moresco EM, LaVine D and Beutler Bruce. Toll-like receptors. *Curr Biol* 2011; 21: 488-493.
11. Arcaroli J, Fessler M and Abraham E. Genetic Polymorphisms and Sepsis. *Shock* 2005; 24: 300-312.
12. Tavener S, Long EM, Robbins SM, et al. Immune cell Toll-Like Receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 2004; 95: 700-707.
13. Fallach R, Shainberg A, Avlas O, et al. Cardiomyocyte toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 1236-1244
14. Zou L, Feng Y, Jung-Chen Y, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38:1-18
15. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, et al. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 381-384.

- 16.** Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644-1655.
- 17.** Griffe MJ, Merkel MJ, Wei KS. The role of echocardiography in hemodynamic assessment of septic shock. *Crit Care Clin* 2010; 26: 365-382.
- 18.** Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography. Endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010; 23:685-713.
- 19.** Lahiri DK and Nurnberger J Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMVDNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
- 20.** Folwaczny M, Glas J, Torok HP, et al. Toll-like receptor (TLR)2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 330-335.
- 21.** Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, et al. A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infection and Immunity* 2000; 68: 6398-6401.
- 22.** Lorenz E, Schwartz DA, Martin PF, et al. Association of TLR4 Mutation and the Risk for Acute GVHD After HLA-Matched-Sibling Hematopoietic

- Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 384-387.
- 23.**Wilson AG, Giovine FS, Blakemore AIF and Duff GW. Single base polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353.
- 24.**Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, et al. Diastolic Dysfunction and mortality in Severe Sepsis and septic Shock. *Eur Heart J* 2011; 33: 885-903.
- 25.**Brown SM, Pittman JE, Hirshberg EL, et al. Diastolic dysfunction and mortality in early severe sepsis and septic shock: a prospective, observational echocardiography study. *Crit Ultrasound J* 2012; 4: 1-9.
- 26.**Zanotti-Cavazzoni SL, Guglielmi M, Parrillo JE, et al. Ventricular dilation is associated with improved cardiovascular performance and survival in sepsis. *Chest* 2010; 138: 848-855.
- 27.**Bouhemad B, Nicolas-Robin A, Arbelot C, et al. Acute left ventricular dilatation and shock induced myocardial dysfunction. *Crit Care Med* 2009; 37: 441-447.
- 28.**Sturgess DJ, Marwui TH, Joice C, et al. Prediction of hospital outcome in septic shock: a prospective comparison of tissue Doppler and cardiac biomarkers. *Crit Care* 2010; 14: 1-11.

29. Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, et al. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: The role of Toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; 183: 1617-1624.
30. Zou L, Feng Y, Zhang M, et al. Nonhematopoietic Toll-Like Receptor 2 contributes to neutrophil and cardiac function impairment during polymicrobial sepsis. *Shock* 2011;36: 370-380
31. Tavener SA and Kubes P. Cellular and molecular mechanisms underlying LPS associated myocyte impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 800-806
32. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, et al. Functional consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol Med* 2008; 14: 346-352.
33. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
34. Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ et al. Human toll like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 1522-1525.
35. Lorenz E, Mira JP, Fress KL, et al. Relevance of mutation in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1028-1032.

- 36.**Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multimember study. *JAMA* 1999; 282: 561-568.
- 37.**Tomasdottir H, Hjartarson H, Ricksten A, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism is associated with enhanced systemic inflammatory response and increased cardiopulmonary morbidity after cardiac surgery. *Anesth Analg*. 2003; 97: 944-949.
- 38.**Patel TA, Belcher E, Warner TD, et al. Identification and characterization of dysfunctional cardiac myocyte phenotype: role of bacteria, toll-like receptors and endothelin. *Shock* 2007; 28:434-440.
- 39.**Zhu X, Bagchi A, Zhao H, et al. Toll-like receptor 2 activation by bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein activates cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction. *Crit Care Med* 2007; 35: 886-892.

APÊNDICES

Apêndice 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: **Associação de Polimorfismos genéticos com depressão miocárdica na sepse**

Prezado Sr/a:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver um problema no coração chamado depressão miocárdica durante a infecção. Os polimorfismos são alteração que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr/a tem infecção, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue – na ocasião de sua entrada no estudo. Após, estaremos registrando informações durante a internação na CTI. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 4 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da função cardíaca durante a infecção, que podem estar associadas ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca durante a infecção e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr/a concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na escolha mais individualizada dos medicamentos, com mais

benefícios para os pacientes sépticos. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr/a.

O Sr/a é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Eu (ou responsável), _____ fui informado (a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Dra. Nadine Clausell, a Dra. Cyntia Aguiar Ribeiro e o Dr. Tiago Furian (fone para contato com os pesquisadores 98061556), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável: _____

Nome

Assinatura

Apêndice 2

Ficha de coleta de dados

Protocolo de avaliação do uso de estatinas no choque séptico (GPPG: 05589) e da associação de polimorfismos genéticos com depressão miocárdica na sepse (GPPG: 05617)

Número pac

Nome: _____

Prontuário: _____ Idade: _____ sexo: _____ Raça: _____

Internação no HCPA: _____

Internação na UTI: _____ Data da alta ou óbito: _____

Escore APACHE: _____

Motivo da internação no HCPA:

Comorbidades

Início do choque séptico: _____

Origem da sepse: _____

Etiologia: _____

Antibióticos:

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Vasopressor:

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Corticóide:

Tipo: _____ início: _____ término _____

Ventilação:

Tipo: _____ início: _____ término _____

Tipo: _____ início: _____ término _____

Data e hora da avaliação basal: _____

Data e hora da randomização: _____

Data e hora do início da histatina/placebo: _____

Data e hora da primeira ecocardio: _____

CULTURAIS:

Hemoculturas: _____

Uroculturas: _____

Aspirado Traqueal: _____

Exames laboratoriais

Dia										
hora										
TGO										
TGP										
Cr										
Ur										
CPK										
PCR										
VCAM										
TNF										
IL-6										
Coolest										
triglicer										
LDL										

Apêndice 3

Ficha de Ecocardiografia

	ECO 1	ECO 2	ECO 3
Data			
Hora			
TA (mmHg)			
FC (bpm)			
PVC			
Medidas			
Átrio esquerdo (cm)			
Átrio esquerdo (cm ³)			
DDVE (cm)			
DSVE (cm)			
Distância E-septo (mm)			
FE (Teicholz) %			
Espessura septo (cm)			
Espessura PP (cm)			
VD (cm)			
Veia cava inf (cm)			
VE – função sistólica			
FE (Simpson)			
dP/dT (mmHg/s)			
Volume sistólico (cm ³)			
Tempo aceleração de ejeção (ms)			
Sa (cm/s)			

Sa' (cm/s)			
VE – função diastólica			
Éa (cm/s)			
Aa (cm/s)			
Ea/Aa			
Tempo desaleceração onda E (ms)			
Ea' (cm/s)			
Aa' (cm/s)			
VD			
Mudança na área fracional			
Excursão do anel tricúspide (cm)			
Encurtamento anular do VD (cm)			
Volume sistólico (cm ³)			
Sa (cm/s)			
Sa' (cm/s)			
IVA (m/s ²)			
Ea (cm/s)			
Aa (cm/s)			
Pressão pulmonar			
VD/AD (mmHg)			
PSAP (mmHg)			