

DIOGENES SERAPHIM FERREIRA

IMUNIDADE INATA NA ASMA FATAL

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

**SÃO PAULO
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Diogenes Seraphim
Imunidade inata na asma fatal / Diogenes Seraphim Ferreira. -- São Paulo,
2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Asma/imunologia 2.Asma/patologia 3.Imunidade inata
4.Receptores toll-like 5.Linfopoetina do estroma tímico 6.*Chlamydophila
pneumoniae* 7.*Mycoplasma pneumoniae*

USP/FM/DBD-199/10

Dedicatória

Aos meus queridos mãe e pai, Glaucia Helena e João Batista,
pessoas exemplares, grandes profissionais e pais amorosos.
Muito obrigado pelo apoio e incentivo em todos os momentos
da minha vida e pelo seu grande amor.

Aos meus queridos irmãos, Georgia e José Guilherme, por terem
me dado a alegria da fraternidade e da amizade entre nós.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Thais Mauad, orientadora desta tese, meu agradecimento especial pela oportunidade de trabalhar neste grupo de pesquisa. As atividades que desenvolvi durante o doutorado serão lembradas como meus primeiros verdadeiros passos no mundo da pesquisa científica. E foram um grande aprendizado. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Sally Wenzel, muito obrigado por ter-me incentivado a estudar a asma e tentar compreendê-la melhor. Por ter-me indicado a Profa. Thais e por ter inspirado o tema deste trabalho. E pela oportunidade de continuar colaborando, junto com as Profas. Thais e Marisa, com seus projetos de pesquisa em asma.

À Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, por auxiliar na discussão dos resultados desta pesquisa, e por ser, junto à Profa. Thais, mentora deste Grupo de Pesquisa em Patologia Pulmonar.

À Ângela e Maria Cristina, do Laboratório de Imuno-Histoquímica, pelo enorme trabalho com todas as reações imuno-histoquímicas desta tese.

A todas as funcionárias que confeccionaram os blocos histológicos e as lâminas histológicas para este trabalho.

Ao Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, do Instituto Fleury, pela realização de PCR para identificação de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*.

Aos funcionários, técnicos e patologistas do SVOC, aos médicos assistentes e residentes do Departamento de Patologia, à Rosângela, ao Reginaldo e à Ana Luiza por sua contribuição em todo o trabalho de coleta das amostras pulmonares para esta pesquisa.

À querida Raquel Annoni, por tornar minha vida mais colorida na cidade de São Paulo!

Aos amigos e amigas do “Grupo Asma”, que fizeram destes anos de realização do doutorado uma época de eternas e felizes memórias!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos familiares dos indivíduos falecidos que foram sujeitos desta pesquisa, por permitirem a utilização do tecido pulmonar e dos dados clínicos para a pesquisa científica.

Aos indivíduos falecidos sujeitos desta pesquisa.

“O progresso no entendimento da asma e seus mecanismos subjacentes é lento; o tratamento pode ser difícil e a resposta imprevisível; e a prevenção e cura ainda são um sonho. A asma, uma das doenças crônicas mais importantes, continua sendo um verdadeiro mistério da medicina.”

(Tradução livre)

Editorial. *The Lancet* 2008;372:1009.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de anexos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	16
3 MÉTODOS.....	18
3.1 Casuística.....	19
3.2 Coleta e processamento do tecido pulmonar.....	20
3.3 Imuno-histoquímica.....	20
3.4 Análise de imagens.....	22
3.5 Reação em cadeia da polimerase multiplex em tempo real para <i>Chlamydophila pneumoniae</i> e <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	23
3.6 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Características clínicas.....	27
4.2 Morfometria.....	29
4.3 Expressão de TLR2.....	30
4.4 Expressão de TLR3.....	33
4.5 Expressão de TLR4.....	35
4.6 Expressão de TSLP.....	38
4.7 Comparação entre asmáticos não fumantes e fumantes.....	41
4.8 PCR multiplex em tempo real para <i>Chlamydophila pneumoniae</i> e <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	41
4.9 Correlações entre TLR2, TLR3 e TSLP.....	41
4.10 Correlações com dados clínicos.....	42
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	56
7 ANEXOS.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	65
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	asma fatal
ANOVA	análise de variância
ATCC	“American Type Culture Colection”
CE	camada externa
CI	camada interna
Ctrl	controle
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
Ep	camada epitelial
FcεRI	receptor de alta afinidade da imunoglobulina E
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN-β	interferon beta
IFN-γ	interferon gama
IgE	imunoglobulina E
IL-1	interleucina-1
IL-3	interleucina-3
IL-4	interleucina-4
IL-5	interleucina-5
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IL-12	interleucina-12
IL-13	interleucina-13
LPS	lipopolissacarídeo

MDC	“macrophage derived chemokine”
ML	camada muscular lisa
MOMP	proteína de membrana externa principal de <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
NF-κB	fator nuclear kappa B
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
TARC	“thymus and activation-regulated chemokine”
Th1	T auxiliar tipo 1
Th2	T auxiliar tipo 2
TLR	receptor Toll-like
TLR1	receptor Toll-like 1
TLR2	receptor Toll-like 2
TLR3	receptor Toll-like 3
TLR4	receptor Toll-like 4
TLR6	receptor Toll-like 6
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TSLP	linfopoetina do estroma tímico
VAG	via aérea grande
VAP	via aérea pequena

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos e clínicos dos indivíduos asmáticos e controles.....	28
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografias de via aérea grande de asma fatal não fumante e controle e de via aérea pequena de asma fatal não fumante e controle.....29
- Figura 2. Expressão do receptor Toll-like 2 em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante e controle.....31
- Figura 3. Expressão do receptor Toll-like 3 em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante e controle.....34
- Figura 4. Expressão do receptor Toll-like 4 em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante e controle.....36
- Figura 5. Expressão de linfopoetina do estroma tímico em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante e controle.....39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Expressão do receptor Toll-like 2 nas camadas epitelial, muscular e externa de vias aéreas grandes e pequenas na asma fatal e controle.....32
- Gráfico 2. Expressão do receptor Toll-like 3 na camada externa de vias aéreas grandes e pequenas na asma fatal e controle.....33
- Gráfico 3. Expressão do receptor Toll-like 4 nas camadas muscular e externa de vias aéreas grandes e pequenas na asma fatal e controle.....37
- Gráfico 4. Expressão de linfopoetina do estroma tímico nas camadas epitelial e externa de vias aéreas grandes e pequenas na asma fatal e controle.....40

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Tabela 2. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos.....	60
Anexo B. Tabela 3. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes de asmáticos e controles.....	61
Anexo C. Tabela 4. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas pequenas de asmáticos e controles.....	62
Anexo D. Tabela 5. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas pequenas de asmáticos não fumantes e fumantes.....	63
Anexo E. Tabela 6. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes de asmáticos não fumantes e fumantes.....	64

RESUMO

Ferreira DS. *Imunidade inata na asma fatal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

INTRODUÇÃO: A inflamação das vias aéreas na asma envolve respostas imunes inatas. Os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) e a citocina linfopoetina do estroma tímico (*thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) estão envolvidos na inflamação brônquica da asma, mas a expressão destas proteínas em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos ainda não foi investigada. Os objetivos deste estudo foram analisar a expressão protéica de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos, comparar sua expressão entre asmáticos tabagistas e não tabagistas e investigar se a expressão dos TLRs está associada à infecção por *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*. **MÉTODOS:** Foram analisadas por método imuno-histoquímico e análise de imagens as expressões de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de 24 indivíduos falecidos por asma (13 não tabagistas e 11 tabagistas) e 9 controles não asmáticos. A análise das proteínas foi realizada em quatro regiões das vias aéreas: camadas epitelial, interna, muscular e externa. A presença de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* no tecido pulmonar foi investigada por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real. **RESULTADOS:** Os indivíduos asmáticos apresentaram maior expressão de TLR2 nas camadas epitelial e externa de vias aéreas grandes e pequenas, e maior TLR2 na camada muscular de vias aéreas pequenas. Asmáticos tabagistas tiveram menor expressão de TLR2 nas camadas interna e externa de vias aéreas pequenas do que asmáticos não tabagistas. Indivíduos asmáticos tiveram maior expressão de TSLP na camada epitelial e externa de vias aéreas grandes, aumento de TLR3 na camada externa de vias aéreas grandes e aumento de TLR4 na camada externa de vias aéreas pequenas. O DNA de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* não foi detectado em nenhum indivíduo asmático ou controle. **CONCLUSÕES:** Os receptores da imunidade inata TLR2, 3 e 4 e a citocina TSLP estão aumentados nas vias aéreas de pacientes falecidos por asma, e a expressão dos TLRs não está associada à presença de *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* nos pulmões. O tabagismo em asmáticos parece reduzir a expressão de TLR2 em vias aéreas pequenas. Estes resultados sugerem que os TLRs 2, 3 e 4 e a TSLP podem contribuir com a inflamação brônquica presente em exacerbações graves de asma e que as bactérias *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* não estão envolvidas em óbitos por asma.

Descritores: Asma/imunidade, Asma/patologia, Imunidade inata, Receptores Toll-like, Linfopoetina do estroma tímico, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*.

SUMMARY

Ferreira DS. *Innate immunity in fatal asthma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010.

INTRODUCTION: Airway inflammation in asthma involves innate immune responses. Toll-like receptors (TLRs) and the cytokine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) are involved in bronchial inflammation in asthma, but the expression of these proteins in large and small airways of asthmatics has not been investigated. The aims of this study were to analyze the protein expression of TLR2, TLR3, TLR4 and TSLP in large and small airways of asthmatics, to compare their expression in smoking and nonsmoking asthmatics and to investigate if TLR expression is associated with infection by *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. **METHODS:** Using immunohistochemistry and image analysis, we investigated the expression of TLR2, TLR3, TLR4 and TSLP in large and small airways of 24 fatal asthma patients (13 nonsmokers and 11 smokers) and 9 nonasthmatic controls. The protein expression was analyzed in four regions of the airways: epithelial, internal, airway smooth muscle and outer layers. *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* presence in lung tissue was analyzed by real-time polymerase chain reaction. **RESULTS:** Fatal asthma patients had increased expression of TLR2 in the epithelial and outer layers of large and small airways, and also higher TLR2 in the muscle layer of small airways. Smoking asthmatics had lower TLR2 in the inner and outer layers of small airways than nonsmoking asthmatics. TSLP was increased in the epithelial and outer layers of large airways. Asthmatics also had greater TLR3 in the outer layer of large airways and greater TLR4 in the outer layer of small airways. *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* DNA was not detected in asthmatics or controls. **CONCLUSIONS:** Innate immunity receptors TLR2, 3 and 4 and innate cytokine TSLP are increased in the airways of fatal asthma patients, and TLRs expression is not associated with the presence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* in the lungs. Smoking may reduce TLR2 expression in the small airways of asthmatics. These results suggest that TLR2, 3, 4 and TSLP may contribute to the bronchial inflammation seen in severe exacerbations of asthma and that *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* are not involved in fatal asthma exacerbations.

Descriptors: Asthma/immunology, Asthma/pathology, Innate immunity, Toll-like receptors, Thymic stromal lymphopoietin, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A asma é definida como “uma doença inflamatória crônica das vias aéreas na qual muitas células e elementos celulares desempenham um papel: em particular, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T, macrófagos e células epiteliais. Em indivíduos suscetíveis, a inflamação causa episódios recorrentes de tosse, sibilância, dispnéia e opressão torácica. Estes episódios são geralmente associados a obstrução variável ao fluxo aéreo que é reversível espontaneamente ou com tratamento” (Expert Panel Report 3, 2007).

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a estes sintomas da asma são apenas parcialmente conhecidos, e sua complexidade e heterogeneidade tornaram-se notáveis com a intensa pesquisa nas últimas décadas para melhor compreendê-la (Wenzel, 2006; Holgate e Davies, 2009).

Grande parte da pesquisa sobre a patogênese da asma nas duas décadas anteriores focou-se nos mecanismos imunológicos mediados por linfócitos T auxiliares tipo 2 (*T helper type 2*, Th2) e mediados por imunoglobulina E (IgE). O conceito de diferenciação dos linfócitos T auxiliares em tipo 1 e tipo 2 originou-se de estudos em camudongos. Baseando-se no comportamento da resposta imune adaptativa deste roedor, diferentes padrões de inflamação foram categorizados como T auxiliar tipo 1 (*T helper type 1*, Th1) e tipo 2 (Th2), diferenciados pelo desenvolvimento de grupos distintos de linfócitos T CD4⁺ (Mosmann e

Coffman, 1989). No camundongo, o padrão de inflamação Th2 é direcionado pela interleucina-4 (IL-4) e é caracterizado pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 pelos linfócitos T CD4⁺, produção de IgE por plasmócitos e recrutamento eosinofílico. Em contraste, o padrão de inflamação Th1 é direcionado pela IL-12 e se caracteriza pela secreção de interferon gama (IFN- γ) pelos linfócitos T CD4⁺. Em algumas circunstâncias, os dois tipos de respostas de linfócitos T auxiliares apresentam inibição recíproca, tal que a IL-4 inibe o desenvolvimento de linfócitos Th1 enquanto a IL-12 inibe o desenvolvimento de linfócitos Th2 (Walter e Holtzman, 2005).

A demonstração de que asmáticos possuíam mais IL-3, IL-4, IL-5 e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em células do lavado broncoalveolar e que IL-4 e IL-5 eram expressas principalmente por linfócitos T levou à hipótese da inflamação Th2 na patogênese da asma (Robinson et al., 1992).

Estudos clínicos de broncoprovocação com alérgeno são um bom modelo para o estudo da reação alérgica e deram suporte para o papel da inflamação Th2 na asma. A provocação com o alérgeno em pacientes sensibilizados provoca uma reação inflamatória precoce e, em alguns casos, pode ser seguida por uma reação tardia. A reação imediata inicia-se alguns minutos após a ativação de mastócitos portando IgE específica. Os mastócitos ativados rapidamente liberam mediadores pró-inflamatórios como a histamina e eicosanóides que induzem contração do músculo liso das vias aéreas, secreção de muco e vasodilatação. Juntos, estes efeitos contribuem para a obstrução das vias aéreas (Bousquet et al., 2000). A fase

tardia ocorre em torno de 6 a 9h após a provocação com o alérgeno e envolve o recrutamento e ativação de eosinófilos, linfócitos T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos. Há retenção seletiva de linfócitos T nas vias aéreas, expressão de moléculas de adesão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas envolvidas no recrutamento e ativação das células inflamatórias. A ativação de linfócitos T após a provocação com alérgeno causa a secreção de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, o que pode ser um mecanismo importante para a resposta tardia. A fase tardia é considerada um modelo de estudo dos mecanismos da inflamação crônica na asma (Bousquet et al., 2000).

Apesar da força deste paradigma Th2, ele não explica suficientemente algumas características da asma. Como exemplo, a inflamação neutrofílica em biópsias brônquicas é comum em asmáticos, correlacionando-se moderadamente com a gravidade da asma, e a inflamação neutrofílica sem eosinófilos é encontrada em um subgrupo de asmáticos graves dependentes de corticosteróides, reforçando a heterogeneidade da doença. As características histopatológicas da inflamação brônquica – incluindo influxo eosinofílico e ativação de mastócitos – são semelhantes na asma “intrínseca”, em que não há desencadeante alérgico dos sintomas, história pessoal ou familiar de atopia e nenhuma evidência de IgE específica ou aumento de IgE total, sugerindo que vias adicionais estariam desencadeando a inflamação. Além disso, mesmo em asmáticos alérgicos bem caracterizados, a administração de anticorpos que previnem a ligação da IgE ao seu receptor FcεRI ou que neutralizam a IL-5 têm eficácia

terapêutica limitada, e o sucesso de intervenções direcionadas à IL-4 ou IL-13 ainda não foi comprovado. Ademais, a hiperreatividade brônquica induzida por alérgeno na fase tardia da broncoprovocação é suscetível a inibidores que não são capazes de melhorar a hiperreatividade “intrínseca” ou independente da inflamação. Estas observações sugerem que mecanismos adicionais, além da clássica ativação de linfócitos Th2 ou ligação cruzada de IgE, possam existir provocando inflamação brônquica nos asmáticos (Barrett e Austen, 2009).

O recente interesse pelo estudo da imunidade inata direcionou-se para o envolvimento de seus mecanismos na patogênese de doenças alérgicas e da asma, explorando várias lacunas no conhecimento destas enfermidades (Liu, 2008; Finn e Bigby, 2009).

A imunidade inata é uma forma de resposta imune evolutivamente conservada que representa a primeira linha de defesa contra patógenos. Os mecanismos da imunidade inata estão presentes antes do encontro com patógenos e são rapidamente ativados antes do desenvolvimento das respostas imunes adaptativas (Abbas e Lichtman, 2005). Os componentes da imunidade inata são representados pelas barreiras epiteliais, como a pele e as mucosas respiratória e digestiva; por células efetoras como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos e células “natural killer”; por proteínas efetoras circulantes, como as proteínas do sistema complemento, colectinas, peptídeos antimicrobianos, proteína C reativa e fatores de coagulação e por várias citocinas, tais como IL-1, fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ e IL-12 (Abbas e Lichtman, 2005; Turvey e Broide, 2010).

Além de efetuar a resposta inicial aos patógenos, a imunidade inata estimula o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa e influencia a natureza desta. A imunidade inata serve como o sinal de alerta para o sistema imune adaptativo montar uma resposta protetora, e diferentes componentes da resposta inata respondem de maneira distinta a diversos patógenos (ex: microorganismo intracelular vs. extracelular), conseqüentemente influenciando o tipo de resposta adaptativa (ex: celular ou humoral, respectivamente) (Abbas e Lichtman, 2005).

A estratégia usada para reconhecimento imune é a principal característica que distingue as imunidades inata e adaptativa. Em contraste com o enorme repertório gerado aleatoriamente de receptores de antígenos expressos por linfócitos B e T, o sistema imune inato depende de um número limitado de receptores geneticamente predeterminados que reconhecem estruturas altamente conservadas de um grande grupo de microorganismos. O sistema imune inato se desenvolveu para reconhecer componentes de patógenos que são essenciais para sua virulência e viabilidade, e, portanto, são menos sujeitos a modificações. Estas estruturas moleculares patógeno-específicas são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*), e os receptores que os reconhecem são os receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors*) (Turvey e Broide, 2010).

Os receptores do tipo Toll ou receptores Toll-like (*Toll-like receptors*, TLRs) são considerados os receptores de reconhecimento de padrão prototípicos. O envolvimento dos receptores Toll na imunidade inata foi primeiramente descrito em *Drosophila*. A proteína Toll de *Drosophila* foi originalmente identificada como um receptor transmembrana necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral do embrião em desenvolvimento. A via de sinalização do Toll de *Drosophila* possui grande semelhança com a via da IL-1 de mamíferos, que leva à ativação de fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição responsável por muitas respostas inflamatórias e imunológicas. De fato, os domínios citoplasmáticos do Toll de *Drosophila* e do receptor de IL-1 de mamíferos são altamente conservados e são referidos como o domínio do receptor Toll/IL-1. Com base nesta similaridade, foi proposto que a via mediada por Toll estaria envolvida na regulação de respostas imunes (Belvin e Anderson, 1996). Isto foi claramente demonstrado em um estudo com moscas mutantes deficientes em componentes individuais da via mediada por Toll, em que as moscas mutantes eram altamente suscetíveis a infecção fúngica devido à ausência de expressão de um peptídeo antifúngico (Lemaitre et al., 1996). Um ano após a descoberta do papel do Toll de *Drosophila* na defesa contra infecção fúngica, um homólogo mamífero ao Toll de *Drosophila* foi identificado (Medzhitov et al., 1997). Subsequentemente, uma família de proteínas estruturalmente relacionadas foi identificada em mamíferos, conjuntamente chamada de família dos receptores Toll-like. Dez membros desta família já foram identificados em humanos, TLR1 a TLR10.

Os TLRs permitem o reconhecimento de padrões moleculares de patógenos e a resposta a estes, possibilitando ao sistema imune inato discriminar entre grupos de patógenos e induzir uma cascata apropriada de respostas efetoras adaptativas. As células de resposta imediata do sistema imune inato (ex: monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e neutrófilos) e muitas outras células, como células epiteliais e células musculares lisas expressam TLRs (Takeda et al., 2003; Sukkar et al., 2006).

Diversos estudos demonstraram a participação de elementos da imunidade inata na patogênese da asma – por exemplo, no risco de desenvolvimento da doença, na inflamação brônquica e na resposta antiviral do epitélio respiratório de asmáticos. Há estudos demonstrando a associação entre genes de receptores da imunidade inata e a suscetibilidade à asma (Eder et al., 2004; Woo et al., 2003), a inflamação brônquica neutrofílica em um subgrupo de asmáticos (Wenzel et al., 1999), o aumento de receptores do sistema complemento nas vias aéreas de pacientes falecidos por asma (Fregonese et al., 2005) e uma deficiente resposta inata antiviral em células epiteliais brônquicas de asmáticos (Wark et al., 2005).

O TLR2 reconhece componentes de uma grande variedade de microorganismos. Estes incluem peptidoglicano e ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas, lipoproteínas e lipopetídeos de patógenos como *Mycoplasma*, espiroquetas e bactérias Gram-negativas, lipoarabinomanana de micobactéria, glicoinositolfosfolipídeos de *Trypanosoma cruzi*, zimosan de fungos e porinas que constituem a membrana externa de *Neisseria*

(Takeda et al., 2003). Uma explicação para a grande variedade de ligantes que se associam ao TLR2 é que ele forma heterodímeros funcionais com TLR1 e TLR6 (Ozinsky et al., 2000).

De particular interesse para a asma é o reconhecimento de *Chlamydophila pneumoniae* (Netea et al., 2002) e *Mycoplasma pneumoniae* (Chu et al., 2005) por TLR2. Estas duas bactérias estão associadas à cronicidade da inflamação brônquica na asma e são possíveis desencadeantes de exacerbações da doença (Johnston e Martin, 2005).

A relação entre a ativação de TLR2 e alergia tem resultados contraditórios publicados. Estudos iniciais *in vitro* mostraram que a estimulação com agonistas de TLR2 pode induzir respostas imunológicas Th2. Células dendríticas humanas (Re e Strominger, 2001) estimuladas com lipopeptídeo não secretaram a forma ativa da IL-12, mas sim seu homodímero inibitório, criando condições que favorecem o desenvolvimento Th2. Agrawal et al. (2003) estimularam células dendríticas humanas com lipopeptídeo que foram posteriormente co-cultivadas com linfócitos T CD4⁺. Estes linfócitos secretaram níveis elevados de IL-5 e IL-13. Mastócitos humanos estimulados com peptideoglicano secretaram IL-5, IL-13 e TNF- α , além de liberarem histamina (Varadaradjalou et al., 2003). Estudos em modelos animais de inflamação pulmonar alérgica (Redecke et al., 2004; Chisholm et al., 2004) forneceram evidências *in vivo* que ligantes de TLR2 podem também promover respostas Th2 pulmonares, hiperresponsividade de vias aéreas e eosinofilia pulmonar.

Por outro lado, há também relatos de inibição da resposta Th2 e inibição da produção de IgE em modelos animais expostos à agonistas de TLR2 (Akdis et al., 2003; Patel et al., 2005). Além disso, um estudo clínico demonstrou que células mononucleares de sangue periférico de indivíduos alérgicos estimuladas com ácaro secretaram menor quantidade de citocinas Th2 quando cultivadas na presença de agonistas de TLR2 (Taylor et al., 2006). Acredita-se que diferenças na via e momento de exposição ao agonista de TLR2 possam contribuir com estas respostas divergentes.

O TLR3 reconhece ácido ribonucléico de fita dupla produzido pela maioria dos vírus durante seu ciclo replicativo (Aloxopoulou et al., 2001), incluindo vírus tais como o vírus sincicial respiratório (Groskreutz et al., 2006), influenza (Guillot et al., 2005) e rinovírus (Hewson et al., 2005).

As infecções respiratórias virais representam a principal causa de exacerbações de asma em adultos, sendo os vírus identificados em 57 a 75% das exacerbações nesta população (Nicholson et al., 1993, Wark et al., 2002). Dentre os vírus isolados, aproximadamente dois terços são rinovírus, mas vírus sincicial respiratório e influenza, entre outros, também são detectados (Nicholson et al., 1993; Wark et al., 2002; Grissell et al., 2005). O TLR3 pode, portanto, participar das exacerbações de asma provocadas por infecções virais.

O TLR4 tem papel central no reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas (Poltorak et al., 1998). O LPS consiste tipicamente de um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A (ou endotoxina), uma região central

oligossacarídica e um polissacarídeo distal (ou antígeno O) (Raetz e Whitfield, 2002). A endotoxina é o componente bioativo do LPS reconhecido pelo TLR4 (Raetz e Whitfield, 2002). Além de LPS, o TLR4 também reconhece a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório, manana fúngica e ligantes endógenos, como proteínas de choque térmico 60 e 70 do hospedeiro, fibrinogênio, fibronectina, ácido hialurônico e sulfato de heparana (Takeda et al., 2003). O TLR4 também é capaz de reconhecer proteína de choque térmico de *Chlamydia* (Da Costa et al., 2004), maneira pela qual o sistema imune inato pode ser ativado com a presença desta bactéria nas vias aéreas de asmáticos.

Vários estudos estabeleceram uma associação entre a exposição à endotoxina e piora da asma. Michel et al. (1989, 1992) demonstraram que a inalação de LPS provoca obstrução brônquica e aumento da hiperresponsividade brônquica à histamina em asmáticos. A inalação de endotoxina induz uma resposta inflamatória em pulmões de asmáticos (Hunt et al., 1994) e aumenta a hiperresponsividade a um alérgeno (Boehlecke et al., 2003). A exposição doméstica à endotoxina também está associada a maior gravidade da asma (Michel et al., 1991, 1996). Desta forma, o TLR4 pode participar de exacerbações de asma provocadas por exposição ao LPS.

Estudos prévios avaliaram a expressão gênica e protéica de receptores Toll-like em algumas doenças pulmonares. Fenhalls et al. (2003) descreveram por meio de imuno-histoquímica a expressão dos TLRs 1 a 5 e TLR9 em granulomas pulmonares por *Mycobacterium tuberculosis* de

pacientes submetidos a lobectomia, contudo sem descrição da expressão dos receptores em brônquios. Hauber et al. (2005) estudaram biópsias brônquicas de pacientes com fibrose cística e relataram a expressão protéica de TLR2 e 4 no epitélio brônquico e de TLR4 em neutrófilos e macrófagos da mucosa brônquica.

Simpson et al. (2007) estudaram a expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de TLR2 e TLR4 em escarro induzido de asmáticos categorizados pelo perfil inflamatório celular no escarro. Estes autores relataram maior expressão de TLR2 em asmáticos com aumento de neutrófilos no escarro (asma neutrofílica) em comparação aos asmáticos com elevação de eosinófilos no escarro (asma eosinofílica) e controles não asmáticos. A expressão de TLR4 foi maior na asma neutrofílica do que na asma eosinofílica, porém sem diferença quando comparada à expressão nos controles não asmáticos.

Outros investigadores avaliaram a expressão de TLRs por citometria de fluxo em células de sangue periférico de asmáticos adultos. Lun et al. (2009), reportaram diminuição da expressão de TLR2, 4, 5 e 6 em células de sangue periférico de asmáticos. Chun et al. (2010) relataram resultados divergentes em células mononucleares periféricas de asmáticos, como aumento de TLR1, 2 e 9 e semelhante expressão de TLR4 em asmáticos e indivíduos não asmáticos. Estes investigadores (Chun et al., 2010) estudaram pacientes com maior gravidade da asma, o que poderia contribuir para os resultados díspares. É importante ressaltar, entretanto,

que as células avaliadas no escarro e em sangue periférico podem não representar as células residentes nos pulmões de indivíduos asmáticos.

A linfopoetina do estroma tímico (*thymic stromal lymphopoietin*, TSLP) é uma citocina produzida primariamente por células epiteliais que ativa e instrui células dendríticas a promoverem a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos Th2 (Soumellis et al., 2002). As células dendríticas ativadas por TSLP secretam níveis elevados de quimiocinas atrativas de linfócitos Th2, a CCL17 (ou TARC, *thymus and activation-regulated chemokine*) e a CCL22 (ou MDC, *macrophage derived chemokine*). Estas quimiocinas podem contribuir para a atração de linfócitos Th2 ao sítio de inflamação e desencadear inflamação alérgica. Em modelos animais, a TSLP mostrou-se necessária para o desenvolvimento de inflamação alérgica pulmonar, com infiltração de linfócitos Th2, hiperplasia de células caliciformes e aumento de IgE (Al-Shami et al., 2005; Zhou et al., 2005).

A ativação de células epiteliais humanas por peptideoglicano, agonista de TLR2, e ácido poliinosínico:policitidílico, um agonista de TLR3, induz a liberação de TSLP, e este, sinergisticamente com IL-1 e TNF- α , estimula a secreção das citocinas Th2 IL-5, IL-6, IL-13 e GM-CSF por mastócitos (Allakhverdi et al., 2007). Estes dados promovem um elo de ligação direto entre a ativação do sistema imune inato e a indução de respostas adaptativas Th2. Em um estudo com biópsias brônquicas demonstrou-se o aumento da TSLP no epitélio brônquico e submucosa de pacientes asmáticos e os níveis de TSLP correlacionaram-se com a obstrução

brônquica (Ying et al., 2005), sugerindo um papel para esta citocina na patogênese da asma.

O tabagismo é um reconhecido fator agravante da asma, associado a sintomas mais graves, maior uso de medicação de resgate, declínio acelerado da função pulmonar, menor resposta terapêutica a corticosteróides inalatórios e maior número de internações (Thomson et al., 2004). No entanto, poucos estudos avaliaram a inflamação das vias aéreas em asmáticos tabagistas. Em escarro induzido, a contagem de eosinófilos está diminuída e a de neutrófilos está aumentada em asmáticos tabagistas em comparação a asmáticos não tabagistas, com aumento nos níveis de IL-8 no escarro dos fumantes (Chalmers et al., 2001). Em um estudo com biópsias brônquicas de asmáticos fumantes e não fumantes demonstrou-se diminuição de células dendríticas e linfócitos B na submucosa de asmáticos tabagistas, sugerindo que o cigarro pode alterar a imunidade das vias aéreas (Tsoumakidou et al., 2007). A expressão de TLRs foi avaliada em macrófagos alveolares de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e fumantes sem DPOC, demonstrando que indivíduos destes dois grupos apresentam redução na expressão de TLR2 em relação a não fumantes (Droemann et al., 2005). Em conjunto, estes resultados sugerem que o tabagismo pode alterar a imunidade e a expressão de TLR2 nos pulmões, mas a expressão de TLRs em vias aéreas de asmáticos tabagistas não é conhecida.

Apesar da intensa investigação sobre a imunidade inata e sobre seu papel na patogênese da asma, seja no desenvolvimento da doença ou nas

exacerbações, a expressão dos TLRs ainda não foi descrita em vias aéreas grandes e pequenas de pacientes asmáticos. A inflamação brônquica na asma estende-se até as vias aéreas distais, e nesta região pode ser mais intensa do que nas grandes vias aéreas (Hamid et al., 1997; de Magalhães Simões et al., 2005).

Hipotetizou-se que os receptores da imunidade inata TLR2, TLR3, TLR4 e a citocina TSLP estariam envolvidos em exacerbações graves de asma e as bactérias *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, que são reconhecidas por TLR2 e TLR4, estariam associadas à expressão destes receptores.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 2.1 Analisar a expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de pacientes falecidos de asma e comparar com indivíduos não asmáticos falecidos de causas não pulmonares.
- 2.2 Comparar a expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP entre indivíduos asmáticos fumantes e asmáticos não fumantes.
- 2.3 Investigar a presença de *Chlamydophila pneumoniae* e de *Mycoplasma pneumoniae* nos pulmões dos pacientes asmáticos e controles e correlacioná-la com a expressão de TLR2 e TLR4.
- 2.4 Investigar a existência de correlação entre a expressão de TLR2, TLR3 e TSLP.
- 2.5 Investigar a existência de correlação entre a expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP e características demográficas e clínicas dos asmáticos.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP), Protocolo de Pesquisa nº 0309/09. Foram estudados 24 indivíduos que faleceram em decorrência de uma exacerbação aguda de asma (asma fatal, AF), cujas autópsias foram realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP), ligado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 2001 e 2006. Destes, 13 eram não fumantes e 11 fumantes. Dados clínicos referentes à doença, como início da asma, duração da doença, hábito tabágico, tratamento e hospitalizações prévias foram obtidos por meio de uma entrevista com um parente próximo. Os critérios de inclusão patológicos foram hiperinsuflação pulmonar e hipersecreção de muco e as seguintes alterações histológicas relacionadas à asma: descamação epitelial, espessamento da membrana basal, espessamento da musculatura lisa brônquica e infiltrado inflamatório brônquico com ou sem eosinófilos. Nove indivíduos não fumantes, falecidos de causas não pulmonares, sem história prévia de doenças respiratórias e sem alterações macro e microscópicas pulmonares foram incluídos como controles (Ctrl). Em média, 14 horas decorreram entre o óbito e a realização da autópsia com coleta de tecido pulmonar.

3.2 Coleta e processamento do tecido pulmonar

Para as reações imuno-histoquímicas de identificação das proteínas TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP foi coletado tecido pulmonar aleatoriamente de áreas centrais e periféricas dos pulmões de cada paciente. O tecido foi fixado em formalina tamponada a 10%, processado rotineiramente e embocado em parafina. Cortes de 5µm de tecido pulmonar foram corados com hematoxilina e eosina para a seleção de vias aéreas apropriadas para análise.

Para identificação de ácido desoxirribonucléico (DNA) bacteriano por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), fragmentos de vias aéreas grandes foram coletados dos pulmões durante a autópsia e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido até o momento da análise. Somente vias aéreas grandes foram utilizadas para PCR porque, à época em que o armazenamento em nitrogênio líquido de fragmentos foi iniciado, não eram coletados fragmentos de vias aéreas pequenas para esta finalidade.

3.3 Imuno-histoquímica

Inicialmente a parafina dos cortes foi removida com xilol. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,5% e metanol por 10 minutos em temperatura ambiente para as reações com os anticorpos anti-TLR4 e anti-TSLP. Para as reações com os

anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR3 foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada quando necessária. Em seguida os cortes foram incubados de um dia para outro em câmara úmida com os seguintes anticorpos primários: TLR2 (H-175), anticorpo policlonal anti-humano produzido em coelho, diluição 1:30, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; TLR3 (H-125), anticorpo policlonal anti-humano produzido em coelho, diluição 1:75, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; TLR4 (H-80), anticorpo anti-humano policlonal produzido em coelho, diluição 1:20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; TSLP, anticorpo policlonal anti-humano, produzido em ovelha, diluição 1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA. O complexo biotina-estreptavidina LSAB (Dako, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado após os anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 conforme instruções do fabricante, e o kit Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), foi utilizado após os anticorpos secundários anti-TLR3 seguindo instruções do fabricante. Um anticorpo anti-ovelha produzido em coelho conjugado com *horseradish peroxidase* (Dako, Glostrup, Denmark) foi usado na reação com o anticorpo anti-TSLP. Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por um anticorpo controle de mesmo isotipo e com a substituição do anticorpo primário por solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS).

3.4 Análise de imagens

Vias aéreas cortadas transversalmente foram classificadas de acordo com o perímetro da membrana basal em vias aéreas grandes, VAG, (perímetro da membrana basal > 6 mm) e vias aéreas pequenas, VAP, (perímetro da membrana basal ≤ 6 mm). Duas VAGs e 3 VAPs foram analisadas de cada indivíduo. A medida das áreas coradas positivamente foram realizadas com o software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) instalado em um computador pessoal ligado a uma Vídeo Câmera Microscópica Zeiss AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) conectada a um microscópio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, Bensheim, Alemanha). As medidas foram realizadas por um observador cego para os grupos de estudo (Diogenes Seraphim Ferreira). Cada via aérea foi dividida em 4 camadas para análise, a camada epitelial (Ep), interna (área compreendida entre a membrana basal e a borda interna do músculo liso brônquico, CI), muscular lisa (ML) e externa (área compreendida entre a borda externa do músculo liso e o parênquima, CE). A área com marcação positiva para cada anticorpo dentro da camada delimitada foi determinada por limiar de cor. Para definição do limiar de cor, diferentes cortes corados para cada anticorpo (entre 6 e 8 cortes por anticorpo), assim como controles negativos, foram avaliados para se obter o melhor intervalo de positividade entre estes casos, e checados pelas patologistas pulmonares Marisa Dolhnikoff e Thais Mauad. Estes procedimentos geraram um arquivo contendo todas as informações de

seleção de cores, o qual foi aplicado posteriormente para todos os casos corados com o mesmo anticorpo (Araujo et al., 2008). Foram medidas as áreas coradas positivamente em 10 campos selecionados aleatoriamente em aumento de 200x para cada camada das vias aéreas grandes e em toda circunferência das vias aéreas pequenas. Para a análise do Ep, apenas vias aéreas com pelo menos 25% do epitélio intacto ou semi-intacto foram utilizadas. A expressão de cada proteína é apresentada como área positiva corrigida pelo comprimento da membrana basal para as camadas Ep, CI e CE ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) e como porcentagem da área corada para a ML. Dados numéricos são apresentados como medianas (intervalo interquartil) ou média \pm desvio padrão.

3.5 Reação em cadeia da polimerase multiplex em tempo real para *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*

Os fragmentos pulmonares disponíveis para PCR foram provenientes de 11 asmáticos não fumantes, 6 asmáticos fumantes e 5 controles. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Fleury (São Paulo, SP) para realização das reações sob a supervisão do Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio. O DNA foi extraído com o Kit QIAmp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O PCR Multiplex em tempo real foi realizado para detecção simultânea de genes específicos de *Chlamydomphila pneumoniae* - gene da proteína de membrana externa principal (MOMP, *major outer membrane protein gene*) e

de *Mycoplasma pneumoniae* (gene P1). Para a detecção de *C. pneumoniae* os seguintes primers e sondas foram utilizados: MOMP, 5'-GGAAGGTGCTGCAGGAGATC-3', 5'-TCTCCGTAAAATCCAGCACGTA-3' e MGB-Cpneu-P: 5'- FAM- TTGCGCTACTTGGTGCG - MGBNFQ -3'. Para a detecção de *M. pneumoniae* os seguintes primers e sonda foram utilizados: P1, 5'-GATACCCAACCAAACAACACGT-3', 5'-ACCTTGACTGGAGGCCGTAA-3' e MGB-Mpneu-P: 5'- VIC - CAATCCGAATAACGGTGACT - MGBNFQ -3'. Para garantir a qualidade da extração do DNA e a ausência de inibidores do PCR, todas as amostras também foram avaliadas pela amplificação do gene da β -actina utilizando os seguintes primers e sonda: β -actina-F-5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTAG-3', β -actina-R-5'-TCTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC-3', β -actina-P 5'-VIC-TGACTTAGTTGCGTTACACC-MGB-3'. Os primers e sondas foram adquiridos respectivamente da IDT Technologies (San Diego, CA, USA) e da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Os primers e sondas foram adicionados ao TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) perfazendo uma concentração final de 0,3 pmol/ μ L. As amplificações por PCR foram realizadas em um Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) programado com os seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min seguido de 45 ciclos a 95°C por 10 s e 60°C por 45 s. Em cada lote de PCR foram incluídos um controle negativo (água esterilizada) e controles positivos (*M. pneumoniae* ATCC 29085 e *C. pneumoniae* TW-183). O limite de detecção destas reações,

determinado anteriormente no próprio laboratório, é de 10 cópias por reação.

3.6 Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a distribuição das variáveis. Para as variáveis cuja distribuição foi normal, os testes de análise de variância (ANOVA) ou teste-t não pareado para comparação de médias foram utilizados. Quando a variável teve distribuição não paramétrica, o teste de Mann-Whitney foi utilizado. O teste *post hoc* de Bonferroni foi usado para discriminar diferenças entre os grupos. A comparação da expressão das proteínas entre vias aéreas grandes e pequenas foram realizadas com teste-t pareado ou com teste de Wilcoxon. Os testes de correlação utilizados foram o teste de Pearson ou de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas

As características demográficas e clínicas dos pacientes estudados estão descritas na Tabela 1. A mediana de idade dos asmáticos e controles é 37 e 55 anos, respectivamente ($p < 0,001$). Apenas 25% dos pacientes asmáticos eram acompanhados regularmente por um médico para tratamento da asma, apesar de 33% terem sido hospitalizados em decorrência de uma exacerbação de asma no ano anterior ao óbito e 12% terem sido internados em Unidade de Terapia Intensiva por uma crise de asma anteriormente ao óbito. Dez (41,7%) asmáticos usavam metilxantinas (aminofilina ou teofilina) regularmente para o tratamento da asma. A duração da crise de asma até o óbito foi maior que 24h em 13 pacientes (54,2%), durou entre 2h e 24h em 8 pacientes (33,3%) e menos de 2h em 2 pacientes (8,3%). Esta informação não estava disponível para um paciente. O óbito ocorreu em casa, na rua ou a caminho do hospital em 20 casos (83,3%). Quatro (6,7%) óbitos ocorreram em ambiente hospitalar. Não há informação se estes 4 pacientes permaneceram internados antes do óbito e se receberam medicações no hospital. A carga tabágica dos asmáticos fumantes era 20 (13-60) anos-maço. Não há diferenças significativas entre as características clínicas dos asmáticos fumantes e não fumantes.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos asmáticos e controles

	Asmáticos	Controles
Indivíduos, n (M/F)	24 (11/13)	9 (4/5)
Idade* (anos)	37 (28-51)	55 (49,5-58,5)
Não tabagistas/tabagistas (n)	13/11	9/0
Início da asma (anos)	6,5 (3,5-18)	-
Duração da asma (anos)	24,5 (20-38)	-
Corticóide sistêmico ou inalatório (%)	29	0
Corticóide sistêmico (%)	25	0
Corticóide inalatório (%)	9	0
Broncodilatador de curta ação (%)	96	0
Causa de óbito (n)		
Asma	24	
Doença cardiovascular		8
Pancreatite aguda		1

Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil, ou conforme especificado.

Abreviações: F, feminino; M, masculino.

*p<0,001

4.2 Morfometria

Os perímetros médios das vias aéreas grandes de asmáticos e controles foram 10,50 mm e 10 mm (variação 6,02-27,61 mm e 6,12-22,65 mm), respectivamente. Os perímetros médios das vias aéreas pequenas de asmáticos e controles foram 2,18 mm e 2,34 mm (variação 0,69-5,57 mm e 0,53-5,64 mm), respectivamente. Não houve diferença significativa entre os perímetros de vias aéreas de asmáticos e controles. Fotomicrografias representativas de vias aéreas grandes e pequenas de AF e de Ctrl estão apresentadas na Figura 1.

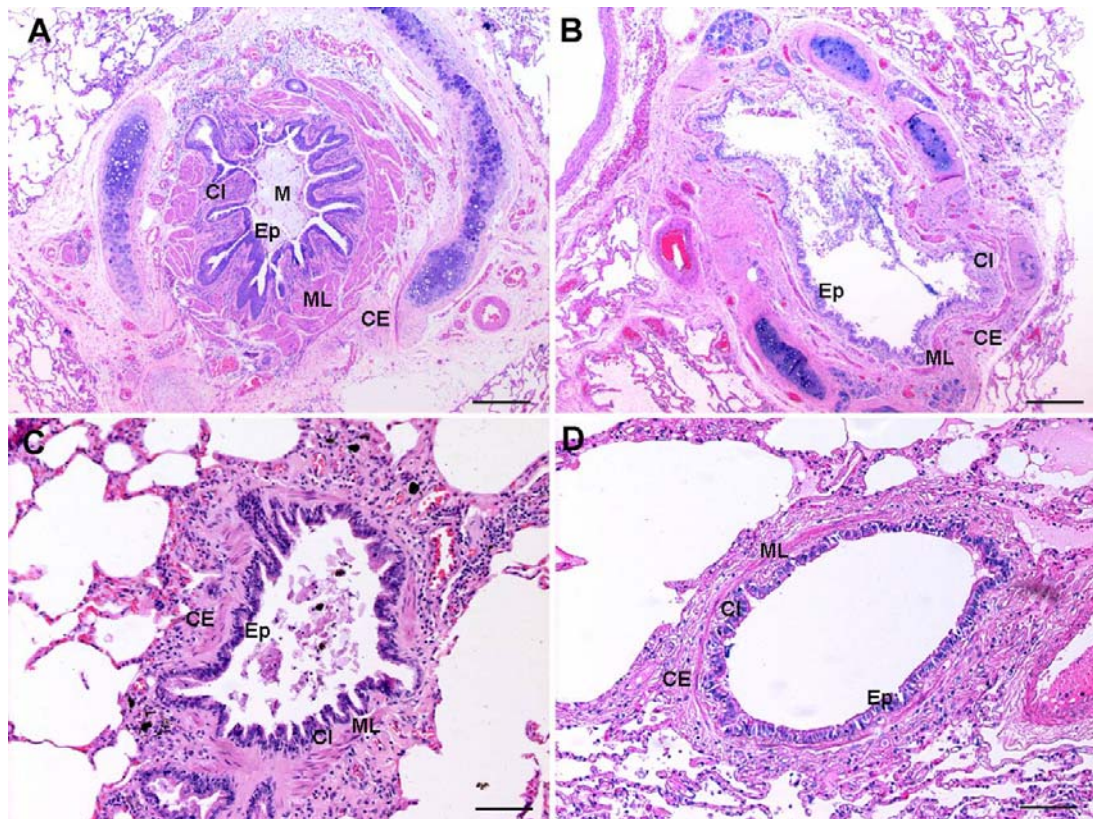


Figura 1. Fotomicrografias de via aérea grande de (A) asma fatal não fumante e (B) controle e de via aérea pequena de (C) asma fatal não fumante e (D) controle. Observe em A o acúmulo de muco na luz brônquica, o espessamento da camada muscular e sinais de broncoconstrição (dobraduras epiteliais). CE, camada externa; CI, camada interna; Ep,

camada epitelial; M, mucosa; ML, camada muscular. A barra de escala em A e B corresponde a 400µm; em C e D corresponde a 100µm. Coloração hematoxilina e eosina.

4.3 Expressão de TLR2

O TLR2 corou células epiteliais, células mononucleares e músculo liso brônquico em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos e controles (Figura 2). Nos asmáticos, o TLR2 também corou células endoteliais. Na comparação entre vias aéreas grandes e pequenas dos asmáticos, o TLR2 apresentou maior expressão no Ep e CI das vias aéreas grandes (Anexo A, Tabela 2).

A expressão de TLR2 foi maior nas grandes vias aéreas de AF em comparação com Ctrl no Ep e CE (Gráfico 1). Nas pequenas vias aéreas, houve maior expressão de TLR2 na AF em comparação com Ctrl no Ep, ML e CE (Gráfico 1). As tabelas apresentando as medidas da expressão de TLR2 em AF e Ctrl nas vias aéreas grandes e pequenas estão no Anexo B, Tabela 3 e Anexo C, Tabela 4, respectivamente.

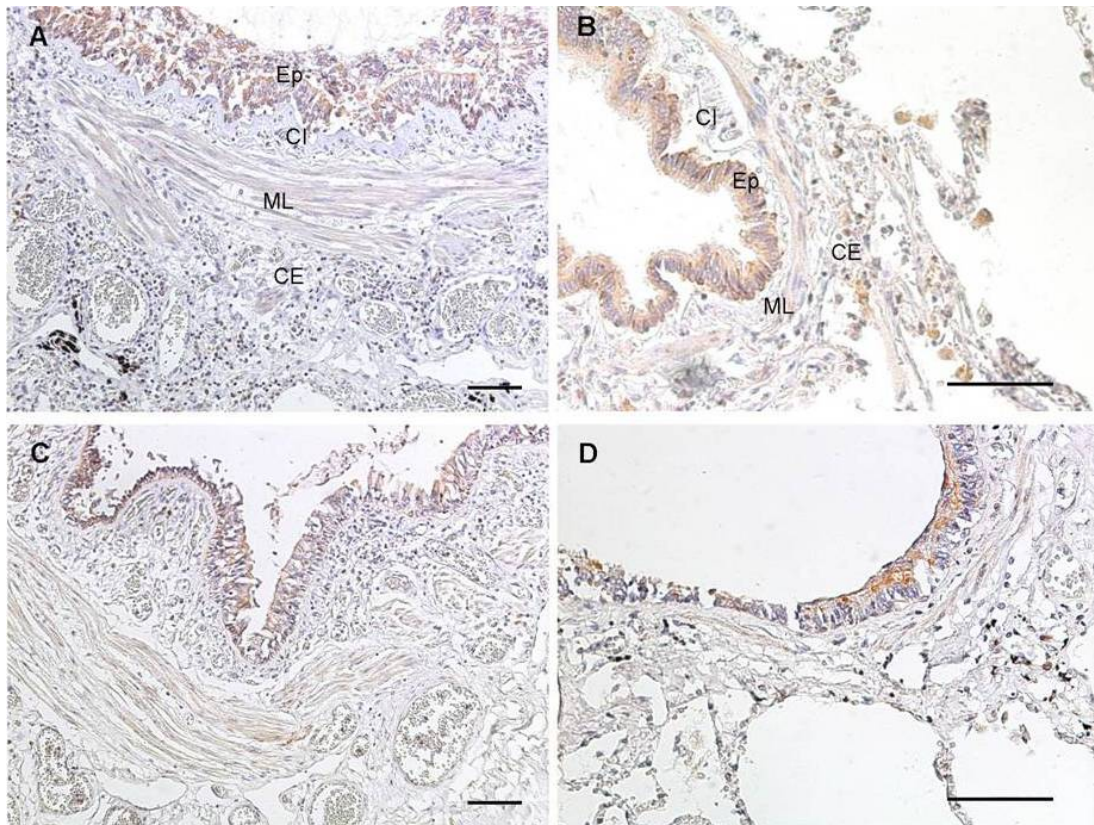
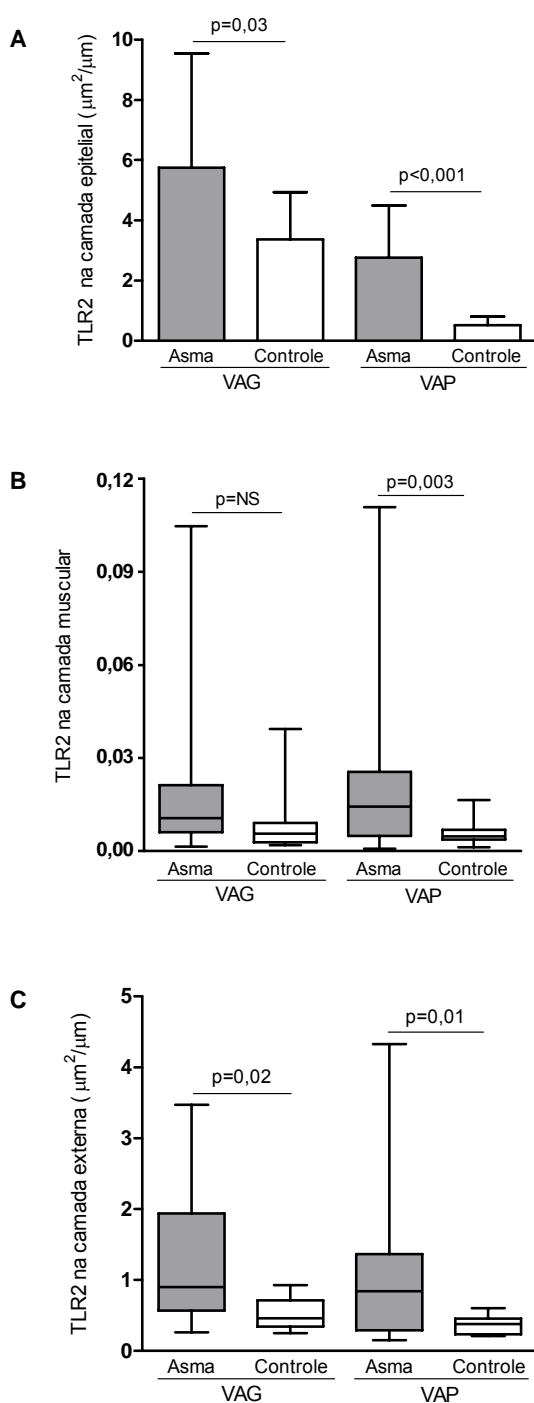


Figura 2. Expressão do receptor Toll-like 2 (TLR2) em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante (AF) e controle (Ctrl). (A) Expressão de TLR2 em via aérea grande de AF; (B) expressão de TLR2 em via aérea pequena de AF; (C) expressão de TLR2 em via aérea grande de Ctrl; (D) expressão de TLR2 em via aérea pequena de Ctrl; CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular. Estas abreviações se referem às camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D). Barra de escala = 100 μ m.

Gráfico 1. Expressão do receptor Toll-like 2 (TLR2) nas camadas (A) epitelial, (B) muscular e (C) externa de vias aéreas grandes (VAG) e pequenas (VAP) na asma fatal e controles. Em A, os dados são apresentados como média e desvio padrão. Em B e C, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. NS, não significativo

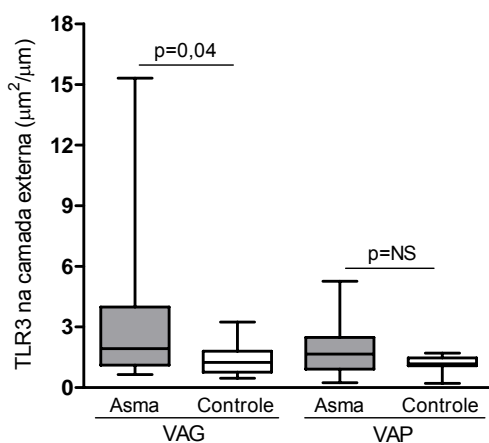


4.4 Expressão de TLR3

O TLR3 corou células epiteliais, células mononucleares, músculo liso brônquico, músculo liso vascular e células endoteliais em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos e controles (Figura 3). Houve maior expressão de TLR3 na CI das vias aéreas grandes dos asmáticos em comparação com as vias aéreas pequenas dos asmáticos (Anexo A, Tabela 2). As medidas da expressão de TLR3 nas vias aéreas grandes e pequenas de AF e Ctrl estão nos Anexos B, Tabela 3 e Anexo C, Tabela 4, respectivamente.

Houve maior expressão de TLR3 na CE das vias aéreas grandes dos asmáticos em relação ao controles (Gráfico 2). Não houve diferença significativa na expressão de TLR3 nas vias aéreas pequenas entre AF e Ctrl.

Gráfico 2. Expressão do receptor Toll-like 3 (TLR3) na camada externa de vias aéreas grandes (VAG) e pequenas (VAP) na asma fatal e controles. A linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. NS, não significativo



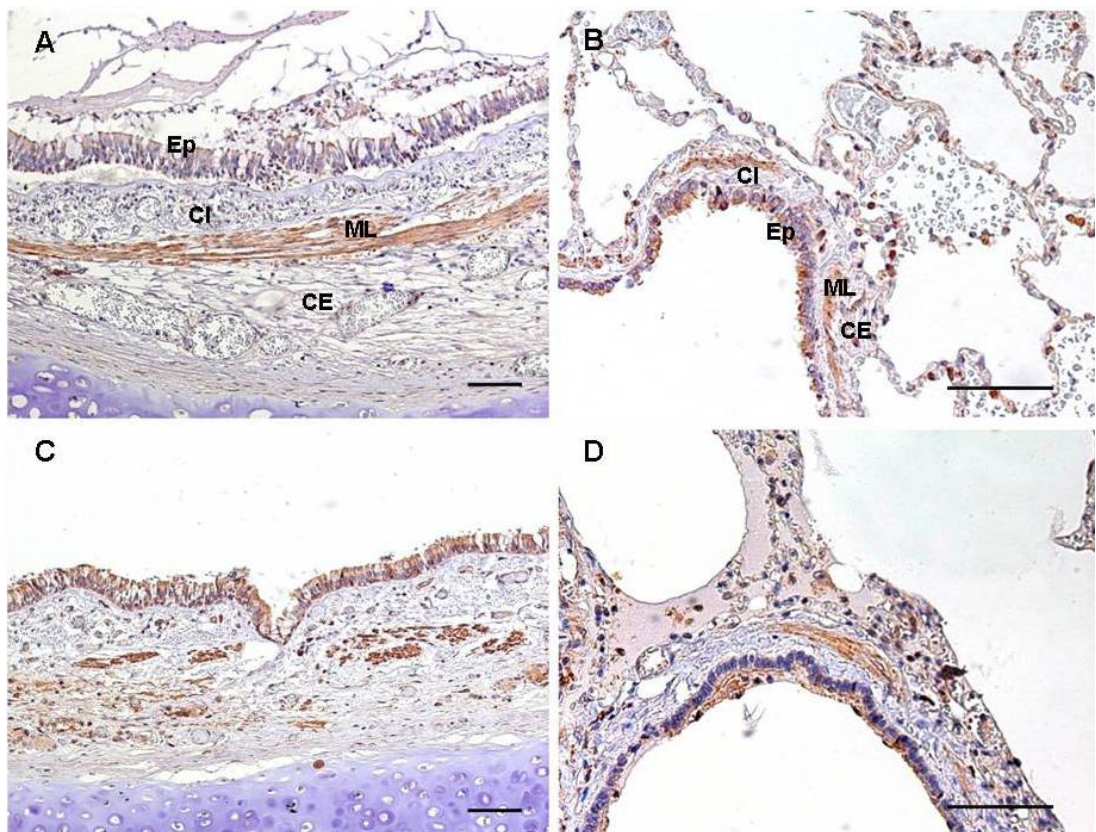


Figura 3. Expressão do receptor Toll-like (TLR3) em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante (AF) e controle (Ctrl). (A) Expressão de TLR3 em via aérea grande de AF; (B) expressão de TLR3 em via aérea pequena de AF; (C) expressão de TLR3 em via aérea grande de Ctrl; (D) expressão de TLR3 em via aérea pequena de Ctrl. CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular. Estas abreviações se referem às camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D). Barra de escala = 100 μ m

4.5 Expressão de TLR4

O TLR4 corou células epiteliais e células musculares lisas em controles e asmáticos, e também corou células endoteliais e poucas células polimorfonucleares nas vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos (Figura 4). O TLR4 teve maior expressão no Ep, CI e ML das vias aéreas grandes de asmáticos em comparação com as vias aéreas pequenas (Anexo A, Tabela 2). As medidas da expressão de TLR4 nas vias aéreas grandes e pequenas de AF e Ctrl estão nos Anexos B, Tabela 3 e Anexo C, Tabela 4, respectivamente.

Houve aumento não significativo de TLR4 no ML das vias aéreas grandes de AF comparado a Ctrl (Gráfico 3, A). Nas vias aéreas pequenas, o TLR4 apresentou maior expressão na CE dos asmáticos em relação aos controles (Gráfico 3, B).

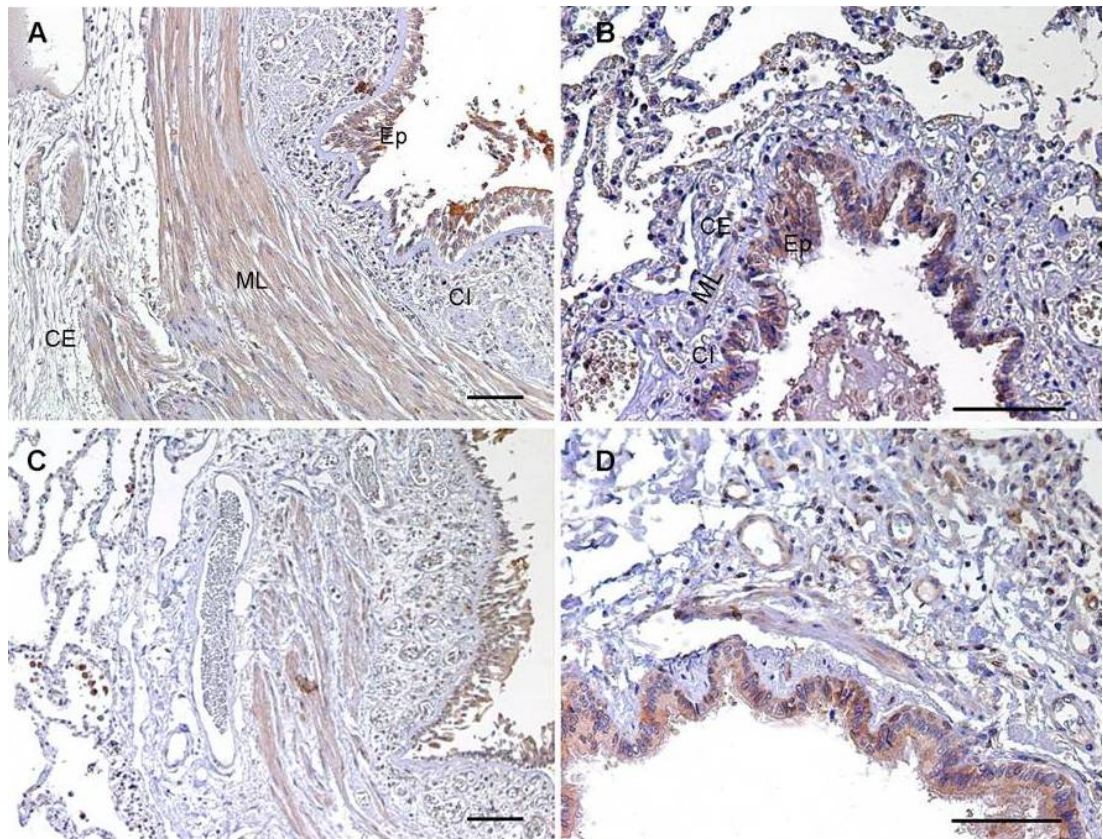
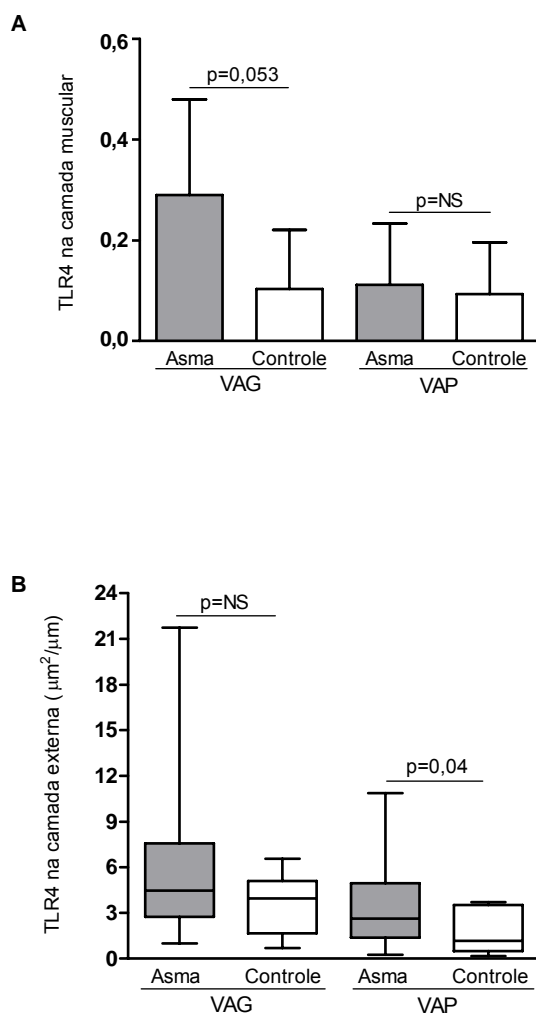


Figura 4. Expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4) em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante (AF) e controle (Ctrl). (A) Expressão de TLR4 em via aérea grande de AF; (B) expressão de TLR4 em via aérea pequena de AF; (C) expressão de TLR4 em via aérea grande de Ctrl; (D) expressão de TLR4 em via aérea pequena de Ctrl. CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular. Estas abreviações se referem às camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D). Barra de escala = 100 μ m.

Gráfico 3. Expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4) nas camadas (A) muscular e (B) externa de vias aéreas grandes (VAG) e pequenas (VAP) na asma fatal e controles. Em A, os dados são apresentados como média e desvio padrão. Em B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. NS, não significativo



4.6 Expressão de TSLP

O TSLP corou o epitélio, células mononucleares, células polimorfonucleares esparsas, células musculares lisas brônquicas e células endoteliais em grandes e pequenas vias aéreas (Figura 5). A CI das vias aéreas grandes de AF mostrou maior expressão de TSLP do que as vias aéreas pequenas (Anexo A, Tabela 2). As medidas da expressão de TSLP nas vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos e controles estão nos Anexos B, Tabela 3 e Anexo C, Tabela 4, respectivamente.

A expressão de TSLP foi maior no Ep e CE das vias grandes de asmáticos do que em controles (Gráfico 4). Não houve diferença na expressão de TSLP nas vias aéreas pequenas.

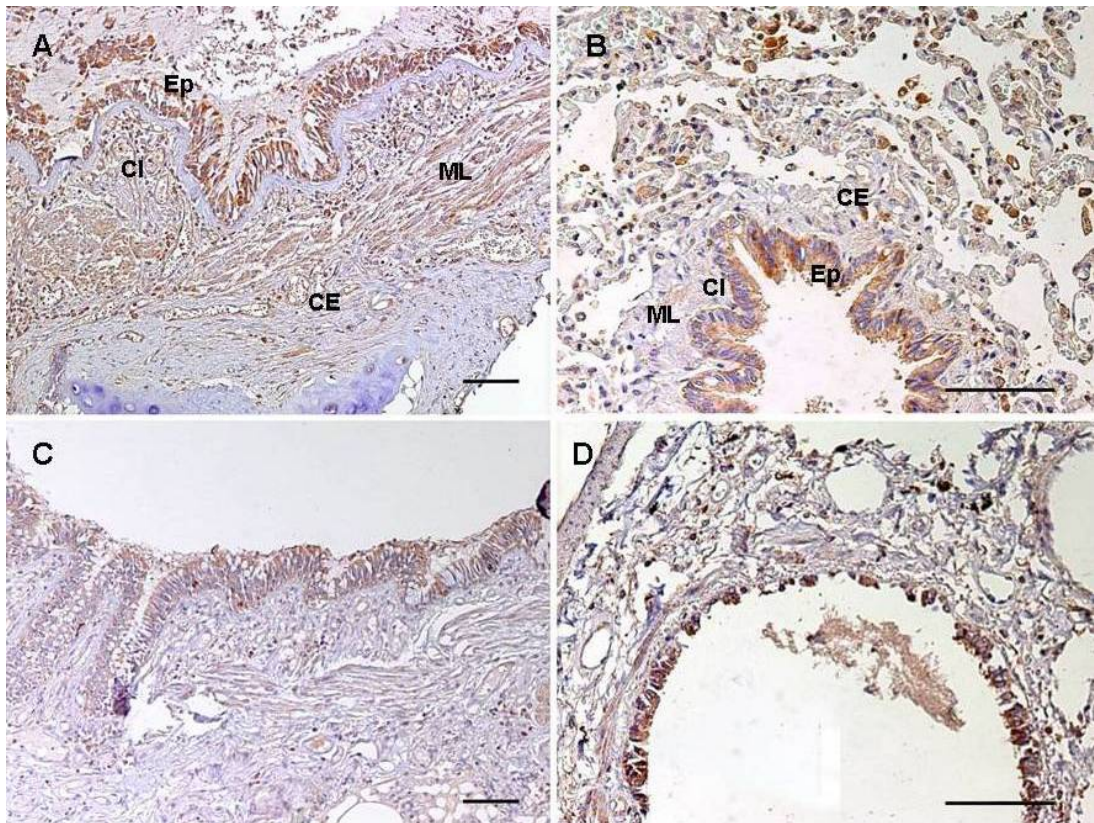
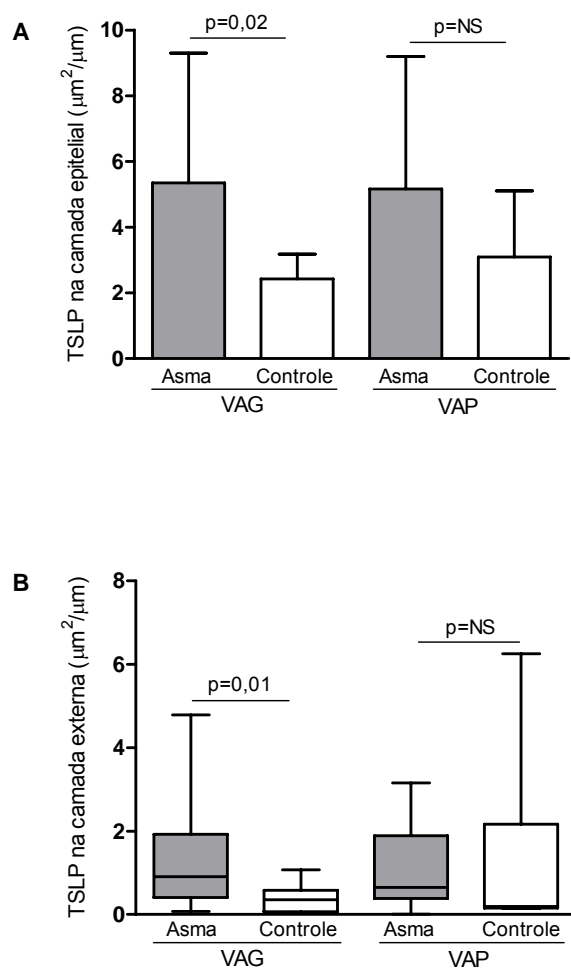


Figura 5. Expressão de linfopoetina do estroma tímico (TSLP) em via aérea grande e pequena de asma fatal não fumante (AF) e controle (Ctrl). (A) Expressão de TSLP em via aérea grande de AF; (B) expressão de TSLP em via aérea pequena de AF; (C) Expressão de TSLP em via aérea grande de Ctrl; (D) Expressão de TSLP em via aérea pequena de Ctrl. CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular. Estas abreviações se referem às camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D). Barra de escala = 100 μ m.

Gráfico 4. Expressão de linfopoetina do estroma tímico (TSLP) nas camadas (A) epitelial e (B) externa de vias aéreas grandes (VAG) e pequenas (VAP) na asma fatal e controles. Em A, os dados são apresentados como média e desvio padrão. Em B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. NS, não significativo



4.7 Comparação entre asmáticos não fumantes e fumantes

Na comparação entre asmáticos não fumantes e fumantes, o TLR2 apresentou menor expressão nas pequenas vias aéreas de fumantes na CI e na CE (Anexo D, Tabela 5). Não foram encontradas outras diferenças na expressão de TLR3, TLR4 e TSLP entre asmáticos fumantes e não fumantes. As medidas da expressão das proteínas em vias aéreas grandes estão no Anexo E, Tabela 6.

4.8 PCR multiplex em tempo real para *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*

Nenhuma amostra de asmático ou controle avaliada resultou em amplificação de DNA de *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae*. Todas amostras foram positivas para o controle interno β -actina.

4.9 Correlações entre TLR2, TLR3 e TSLP

Houve correlação negativa entre a expressão de TLR2 e TSLP no Ep das vias aéreas pequenas de asmáticos ($r=-0,46$, $p=0,05$). Não foram encontradas outras correlações entre a expressão de TLR2, TLR3 e TSLP em vias aéreas grandes ou pequenas.

4.10 Correlações com dados clínicos

Em asmáticos fumantes houve correlação negativa entre a expressão de TLR4 e a carga tabágica na CI ($r=-0,64$, $p=0,05$), ML ($r=-0,78$, $p=0,005$) e CE ($r=-0,68$, $p=0,03$) das vias aéreas grandes. Além disso, asmáticos com início precoce da doença (< 12 anos) (Miranda et al., 2004) tiveram maior expressão de TLR2 no Ep das vias aéreas grandes do que asmáticos com início tardio da doença (>12 anos), $p=0,002$. Não foram encontradas outras correlações entre as proteínas marcadas ou entre estas e parâmetros clínicos.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas as expressões de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de indivíduos falecidos por asma e controles não asmáticos falecidos de causas não pulmonares. Todas as proteínas foram detectadas em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos e controles, em células inflamatórias e células estruturais. Os receptores Toll-like e a TSLP estão diferencialmente expressos ao longo da árvore brônquica na asma fatal, com maior expressão nas grandes vias aéreas em comparação às pequenas vias aéreas. O TLR2 tem expressão aumentada nas vias aéreas grandes e pequenas dos asmáticos em comparação aos controles e a TSLP apresenta maior expressão nas vias aéreas grandes de asmáticos. Também foi demonstrado que os asmáticos têm maior expressão de TLR3 na camada externa de vias aéreas grandes e maior expressão de TLR4 na camada externa de vias aéreas pequenas. Asmáticos tabagistas tiveram menor expressão de TLR2 em vias aéreas pequenas. Além disso, não foi amplificado DNA de *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* nos pulmões de pacientes asmáticos e controles. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a expressão tecidual dos TLRs 2, 3 e 4 em vias aéreas proximais e distais de indivíduos asmáticos.

A expressão dos receptores no epitélio ressalta o papel deste na regulação da homeostase pulmonar. Ele é o primeiro ponto de contato com vários insultos ambientais inalados como microorganismos, poluentes,

fumaça de cigarro e alérgenos. Além desta função de barreira, o epitélio é imunologicamente ativo, secretando diversas citocinas e quimiocinas, peptídeos antibacterianos e proteínas do complemento. A diversidade de receptores que ele expressa, incluindo TLR2, 3 e 4, permite que ele responda dinamicamente a estímulos constantes e variados e ajuste a produção de mediadores para enfrentar as ameaças inaladas (Holt et al., 2008).

Em asmáticos, as expressões alteradas de TLR2, 3 e 4 e da TSLP podem ter relevância para a inflamação das vias aéreas, conforme discutiremos a seguir.

Os asmáticos apresentaram expressão aumentada de TLR2 em vias aéreas grandes e pequenas, consistentemente no epitélio e camada externa e também na camada muscular de pequenas vias aéreas. Foi demonstrado que o TNF- α pode aumentar a expressão de TLR2 em células epiteliais humanas *in vitro* (Homma et al., 2004). Sabe-se que asmáticos apresentam níveis elevados de TNF- α nas vias aéreas (Bradding et al., 1994), com maior elevação em asmáticos graves (Howarth et al., 2005), portanto é plausível que a presença desta citocina tenha contribuído para o aumento de TLR2 no epitélio de nossos asmáticos. Além disso, o TNF- α aumenta a expressão de TLR2 em macrófagos murinos (Matsuguchi et al., 2000), sendo possível que este mediador tenha influenciado o aumento de TLR2 que demonstramos nas camadas externas de vias aéreas grandes e pequenas, regiões que são infiltradas por macrófagos, entre outras células.

Diversos estudos sugerem que a ativação de TLR2 pode favorecer respostas imunes Th2, tanto em estudos humanos *in vitro* (Re e Strominger, 2001; Agrawal et al., 2003; Varadaradjalou et al., 2003) quanto em modelos experimentais animais (Redecke et al., 2004; Chisholm et al., 2004). No entanto, resultados divergentes foram reportados também em modelos animais de inflamação alérgica pulmonar (Akdis et al., 2003; Patel et al., 2005) e inclusive em um estudo clínico (Taylor et al., 2006), mostrando inibição de respostas alérgicas por meio da estimulação de TLR2.

Embora no presente estudo não haja avaliação funcional de estimulação ao TLR2, considerando a capacidade do epitélio secretar TSLP em resposta à ativação deste receptor (Allakhverdi et al., 2007) e o aumento de TSLP que encontramos no epitélio dos asmáticos, pode-se especular que o aumento da expressão de TLR2 nas vias aéreas de asmáticos crônicos contribuiu com a persistência de respostas Th2 e perpetuação da inflamação nas vias aéreas.

A maior expressão de TLR2 encontrada nos asmáticos falecidos não é explicada pela presença das bactérias *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae*, uma vez que nenhum dos pacientes teve DNA bacteriano detectado por PCR nos pulmões. Apesar de vários estudos associarem a infecção por estas bactérias com a asma crônica (Martin et al., 2001) e com exacerbações de asma (Miyashita et al., 1998), há investigações que não detectaram estes patógenos na asma estável (Harju et al., 2006) e em pacientes internados com asma aguda (Green et al., 2002). Curiosamente, nossos resultados correspondem aos de O'Sullivan et al. (2001), que

também não encontraram DNA de *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* em pulmões de paciente falecidos por asma, em asmáticos falecidos por outras causas e controles não asmáticos.

No Brasil não há estudos que investigaram a associação entre a infecção por *C. pneumoniae* e *M. pneumoniae* e asma, seja por sorologia, a metodologia mais utilizada, ou por PCR, e poucos estudos brasileiros investigaram a prevalência de infecção por estas bactérias. Com dados de um estudo brasileiro, a soroprevalência para *M. pneumoniae* parece ser menor no Brasil (Machado et al., 1991) do que em outros países (Tuuminen et al., 2000), no entanto a soroprevalência para *C. pneumoniae* (Chedid et al., 2007) é semelhante à reportada em outros países (Kuo et al., 1995). Estes dados podem ajudar a explicar os resultados negativos para *M. pneumoniae* em nossa população, mas não os resultados para *C. pneumoniae*. Todavia, a ausência de DNA de *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae* nos pulmões dos pacientes falecidos por asma neste estudo sugere que estas bactérias não estejam envolvidas em exacerbações graves de asma levando ao óbito.

Por outro lado, não se pode excluir que a exposição a fungos ou baratas esteve envolvida nas exacerbações de asma destes pacientes. A sensibilização e exposição a fungos têm associação com maior gravidade da asma e exacerbações graves (Denning et al., 2006). Além disso, sabe-se que o TLR2 colabora com o receptor dectina-1 no reconhecimento de componentes fúngicos de *Aspergillus fumigatus* (Luther et al., 2007) e o TLR2 contribuiu com a produção de níveis pulmonares elevados de

citocinas Th2 e com alterações de remodelamento brônquico em um modelo animal de asma fúngica crônica (Buckland et al., 2008). Outro fator que pode agravar a asma é a sensibilização e exposição à barata (Rosenstreich et al., 1997). Um proposto mecanismo inato para esta associação é a demonstração que fezes de barata podem induzir a secreção de TNF- α e IL-8 por neutrófilos via TLR2 (Page et al., 2008). Desta maneira, o aumento de TLR2 nas vias aéreas destes asmáticos pode ter contribuído para maior resposta inflamatória com exposição a fungos ou baratas.

Este estudo, o primeiro a analisar a expressão de TLRs nas vias aéreas de asmáticos tabagistas, mostrou que asmáticos que fumavam tiveram menor expressão de TLR2 nas vias aéreas pequenas. Este resultado está em conformidade com um estudo anterior que mostrou redução de TLR2 em macrófagos alveolares de pacientes portadores de DPOC e fumantes sem obstrução brônquica em comparação com não fumantes (Droemann et al., 2005). Além da expressão alterada de TLR2 nas vias aéreas pequenas de asmáticos fumantes, a carga tabágica destes indivíduos mostrou correlação com menor expressão de TLR4 em vias aéreas grandes. Nos asmáticos tabagistas, estes efeitos do fumo poderiam estar envolvidos na maior suscetibilidade a infecções respiratórias (Talbot et al., 2005).

Juntamente com outros estudos que demonstraram redução de linfócitos CD8⁺ expressando TLR4 em adenóides de crianças expostas a tabagismo passivo (Ricci et al., 2005) e redução nas respostas imunes mediadas por TLRs em crianças nascidas de mães tabagistas (Noakes et

al., 2006), nosso estudo fornece evidências adicionais para efeitos negativos do tabagismo na imunidade inata.

Um estudo prévio (Simpson et al., 2007) mostrou que indivíduos com asma neutrofílica têm maiores níveis de RNAm de TLR2 e TLR4 no escarro induzido do que pacientes com asma eosinofílica e controles não asmáticos. Posteriormente, investigadores deste mesmo grupo avaliaram neutrófilos isolados do escarro induzido de asmáticos, sem separação entre asma neutrofílica e eosinofílica, e demonstraram que os neutrófilos de asmáticos expressaram menor quantidade de RNAm de TLR4 do que controles não asmáticos, sem diferença na expressão de TLR2 (Baines et al., 2009). Estes estudos, apesar dos desenhos metodológicos distintos – Simpson et al. (2007) estudaram a expressão dos receptores no escarro induzido comparando asma neutrofílica e eosinofílica; Baines et al. (2009) avaliaram a expressão dos receptores em neutrófilos isolados do escarro comparando asmáticos com não asmáticos – sugerem que células no escarro diferentes dos neutrófilos podem ter contribuído para maior expressão gênica de TLR2 e TLR4 na asma neutrofílica (Simpson et al., 2007).

A inflamação nas vias aéreas dos asmáticos do nosso estudo é predominantemente eosinofílica, conforme mostrou um estudo prévio com população muito semelhante de asma fatal, no qual não foi identificado um grupo distinto com aumento de neutrófilos nas vias aéreas (de Magalhães Simões et al., 2005). Além disso, o tabagismo não se associou ao aumento da inflamação neutrofílica nas vias aéreas distais da asma fatal (Senhorini et al., 2008). Portanto, na população do nosso estudo, a maior expressão de

TLR2 não parece estar associada ao fenótipo de asma fatal pobre em eosinófilos e rico em neutrófilos descrito por Sur et al. (1993).

A associação entre exposição à endotoxina, sinalização por TLR4 e asma tem resultados aparentemente contraditórios provenientes de estudos epidemiológicos. Enquanto a exposição a altos níveis de endotoxina no início da vida parece proteger contra o desenvolvimento da asma (Braun-Fahrländer et al., 2002; Gehring et al., 2008), a exposição à endotoxina no ambiente doméstico quando a asma já se manifestou relaciona-se à gravidade da asma (Michel et al., 1996; Rizzo et al., 1997).

No presente estudo houve um aumento não significativo ($p=0,053$) na expressão de TLR4 no músculo liso das grandes vias aéreas dos asmáticos. É interessante notar que o músculo liso de via aérea humana em cultura expressa TLR4 e a exposição ao LPS induz secreção de IL-6, IL-8 e eotaxina (Shan et al., 2006, Sukkar et al., 2006). Além disso, o músculo traqueal murino cultivado com LPS aumenta as contrações induzidas por bradicinina (Bachar et al., 2004), e a exposição de músculo liso traqueal de coelho ao LPS provoca aumento na resposta constritiva e atenuação no relaxamento muscular mediados por acetilcolina (Shan et al., 2006). Portanto, é possível que o aumento da sinalização por TLR4 no músculo liso brônquico contribua com a intensa inflamação e broncoconstrição observada em ataques fatais de asma.

Avaliada em conjunto, a expressão protéica de TLR2, TLR3 e TLR4 no músculo liso brônquico de asmáticos reforça o papel imunomodulador do músculo na asma (Damera et al., 2009).

Além deste aumento de TLR4 na camada muscular de vias aéreas grandes, este receptor também teve maior expressão na camada externa de vias aéreas pequenas da AF. Este dado infere que mecanismos da imunidade inata possam contribuir com o desenvolvimento das alterações inflamatórias e estruturais marcantes observadas nas regiões distais dos pulmões de pacientes falecidos por asma (Mauad et al., 2004; de Magalhães Simões et al., 2005; Dolhnikoff et al., 2009).

O TLR3, que reconhece vírus respiratórios, mostrou-se aumentado apenas na camada externa das grandes vias aéreas, e não no epitélio, como esperávamos. As infecções respiratórias virais estão implicadas no desenvolvimento da asma (Gern, 2009) e são reconhecidas como principal causa de exacerbações da doença (Nicholson et al., 1993; Wark et al., 2002), no entanto o seu papel nos óbitos por asma ainda não está esclarecido. Os poucos estudos que avaliaram a presença de vírus nas vias aéreas de pacientes falecidos por asma não demonstraram maior prevalência de infecções virais na asma fatal em comparação com asmáticos falecidos por outras causas (Macek et al., 1999; O'Sullivan et al., 2001). Além do mais, Watson et al. (2003) não foram capazes de detectar a presença de rinovírus em compartimentos distais do pulmão em tecido arquivado de pacientes falecidos de asma. Não podemos excluir, contudo, que outros mecanismos relacionados a infecções virais possam contribuir com os eventos inflamatórios que culminam no óbito por asma, tais como resposta citotóxica inadequada de linfócitos T CD8⁺, produzindo menos

IFN- γ e mais IL-4 (O'Sullivan et al., 2001) e deficiente secreção de IFN- β por células epiteliais de asmáticos (Wark et al., 2005).

No presente estudo foi demonstrada maior expressão da citocina TSLP no epitélio e camada externa da asma fatal. Há um interesse recente nesta citocina porque ela representa um elo de ligação entre o estímulo da imunidade inata no epitélio e a inflamação Th2 (Liu, 2006). A produção de TSLP pode ser induzida em células epiteliais humanas por ligantes que ativam TLR2 e TLR3, e a TSLP, na presença de IL-1 e TNF- α , pode ativar mastócitos a secretarem citocinas pró-alérgicas (Allakhverdi et al., 2007), um processo independente de linfócitos T. Já foi demonstrado anteriormente que asmáticos clinicamente estáveis tem aumento de RNAm de TSLP no epitélio e submucosa em biópsias brônquicas (Ying et al., 2005) e aumento da proteína TSLP no lavado broncoalveolar (Ying et al., 2008). Aqui nós confirmamos o aumento da expressão da proteína por imuno-histoquímica no epitélio de asmáticos que sofreram uma exacerbação grave e estendemos este achado para a camada adventícia.

A expressão de TLR2 no epitélio das pequenas vias aéreas dos asmáticos correlacionou-se negativamente com a expressão de TSLP. Esta associação não foi observada no epitélio das grandes vias aéreas dos asmáticos, onde as duas proteínas também estão aumentadas, sugerindo que o controle da expressão protéica de TLR2 e TSLP seja diferente no epitélio de vias aéreas proximais e distais.

Das características demográficas e clínicas que temos disponíveis, encontramos associações entre o tabagismo e a expressão de TLR4,

comentada anteriormente, e o início da asma e a expressão de TLR2. Asmáticos com início precoce da doença (< 12 anos) tiveram maior expressão de TLR2 no Ep das vias aéreas grandes em relação a asmáticos com início tardio da doença (>12 anos). Uma interpretação especulativa é que, entre asmáticos, o tempo de evolução da doença possa influenciar a expressão de TLR2 no epitélio.

É importante também comentar sobre dois fatores que não influenciaram a expressão das proteínas nas vias aéreas. Os indivíduos controles do nosso estudo são mais velhos do que os asmáticos, e durante algum tempo acreditou-se que a expressão de TLRs diminuiria com o avançar da idade (Renshaw et al., 2002). Isto poderia ter influenciado a menor expressão de TLR2 nos controles, porém, não houve influência da idade na expressão de TLR2 na nossa população, confirmando o resultado de um estudo com voluntários humanos idosos (van Duin et al., 2007). O uso de corticosteróides por parte de nossos asmáticos também não aumentou a expressão de TLR2, ao contrário de resultados obtidos em células epiteliais *in vitro* (Homma et al., 2004).

Associações entre expressão das proteínas e eventos ocorridos após o início da crise não puderam ser avaliados, uma vez que não estão disponíveis. Dois fatores contribuíram para a dificuldade de obtenção destas informações – a entrevista com o familiar, fornecendo informações retrospectivas, assim como o fato de apenas 25% dos pacientes terem feito seguimento médico para tratamento da asma. É importante observar que em mais da metade dos casos a duração da crise até o óbito foi maior que

24h. Enquanto é provável que quase todos asmáticos tenham usado broncodilatadores nas horas anteriores ao óbito, os asmáticos cuja crise foi mais longa têm mais probabilidade de terem utilizado medicações anti-inflamatórias como metilxantinas ou corticosteróides antes do falecimento. No entanto, em toda população estudada, acreditamos que a influência de medicações utilizadas no hospital para tratamento da crise tenha sido pequena, uma vez que apenas 4 óbitos ocorreram em ambiente hospitalar.

Nossas tentativas para extrair o RNA tecidual não foram bem sucedidas, provavelmente pelos longos períodos *post mortem* levando à extensa degradação do RNA. Isto também limitou a análise da expressão gênica dos TLRs. Além disso, nós não estudamos a expressão de outros receptores envolvidos no reconhecimento imune inato, sejam aqueles associados ao TLR4, como o CD14, ou associados ao TLR2, como o TLR1 e TLR6. Nós optamos por estudar a expressão do TLR2, 3 e 4 porque eles são os receptores Toll-like mais estudados até agora, com melhor entendimento de seus possíveis papéis na asma. A ausência de um grupo de asmáticos para comparação, tal como asmáticos leves ou asmáticos falecidos de causas não pulmonares, restringe nossa interpretação sobre o significado do aumento de TLRs2, 3 e 4 nas vias aéreas da asma fatal – ele poderia ser uma característica de asmáticos que sofreram uma exacerbação de asma grave ou uma característica de todos asmáticos.

Estudos adicionais são necessários para comparar a expressão dos receptores Toll-like nas vias aéreas de asmáticos de diferentes gravidades,

assim como ensaios funcionais com células das vias aéreas de asmáticos para entender seu comportamento frente a diferentes agonistas de TLRs.

Em resumo, nossos resultados mostraram haver aumento de TLR2, 3, 4 e TSLP na asma fatal, sem associação com a presença das bactérias *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*. Estes resultados sugerem que o TLR2, 3, 4 e a TSLP podem contribuir com a inflamação brônquica presente em exacerbações graves de asma e fornecem evidências adicionais para a participação do sistema imune inato na patologia da asma fatal.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Indivíduos falecidos de asma apresentaram maior expressão de TLR2 na camada epitelial e externa de vias aéreas grandes e pequenas, além de maior expressão na camada muscular de vias aéreas pequenas. Estes asmáticos apresentaram também, em vias aéreas grandes, aumento de TSLP na camada epitelial e externa e maior expressão de TLR3 na camada externa, e, nas vias aéreas pequenas, aumento de TLR4 na camada externa.
- O tabagismo em asmáticos associou-se à menor expressão de TLR2 na camada interna e externa de pequenas vias aéreas, e a carga tabágica associou-se à menor expressão de TLR4 nas camadas interna, muscular e externa de grandes vias aéreas.
- A expressão de TLR2 e 4 nas vias aéreas de indivíduos falecidos de asma não foi associada à presença das bactérias *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.
- A expressão de TLR2 correlacionou-se negativamente com a expressão de TSLP na camada epitelial de pequenas vias aéreas de indivíduos falecidos de asma.

- O início da asma anterior aos 12 anos de idade associou-se à maior expressão de TLR2 na camada epitelial de grandes vias aéreas.
- As bactérias *Chlamydomphila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* não foram associadas aos óbitos por asma.

7 ANEXOS

Anexo A

Tabela 2. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes e pequenas de asmáticos

	Ep($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	CI($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	ML	CE($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TLR2 VAG	5,74 \pm 3,79*	0,74(0,83)*	0,010(0,015)	0,90(1,37)
TLR2 VAP	2,76 \pm 1,73	0,10(0,13)	0,014(0,020)	0,84(1,07)
TLR3 VAG	6,26(7,58)	1,23(1,47)*	0,23(0,22)	1,93(2,86)
TLR3 VAP	5,91(5,11)	0,16(0,26)	0,34(0,30)	1,67(1,57)
TLR4 VAG	22,97(32,37)*	5,06(4,96)*	0,29(0,40)*	4,46(4,84)
TLR4 VAP	9,53(8,76)	0,45(0,64)	0,05(0,18)	2,61(3,57)
TSLP VAG	4,22(5,49)	0,51(2,03)*	0,02(0,05)	0,91(1,51)
TSLP VAP	3,96(7,57)	0,05(0,24)	0,01(0,11)	0,65(1,51)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular lisa; TLR2, receptor Toll-like 2; TLR3, receptor Toll-like 3; TLR4, receptor Toll-like 4; TSLP, linfopoetina do estroma tímico; VAG, via aérea grande; VAP, via aérea pequena.

*p<0,001 comparado com VAP.

Anexo B

Tabela 3. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes de asmáticos e controles

	Ep($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	CI($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	ML	CE($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TLR2 AF	5,74 \pm 3,79*	0,74(0,83)	0,010(0,015)	0,90(1,37) [†]
TLR2 Ctrl	3,37 \pm 1,56	0,46(1,55)	0,005(0,006)	0,46(0,37)
TLR3 AF	6,26(7,58)	1,23(1,47)	0,23(0,22)	1,93(2,86) [‡]
TLR3 Ctrl	9,05(4,42)	1,22(1,89)	0,24(0,29)	1,25(1,04)
TLR4 AF	22,97(32,37)	5,06(4,96)	0,29 \pm 0,19	4,46(4,84)
TLR4 Ctrl	27,41(30,55)	3,87(3,50)	0,15 \pm 0,13	3,96(3,44)
TSLP AF	5,35 \pm 3,94 [†]	0,51(2,03)	0,02(0,05)	0,91(1,51) [§]
TSLP Ctrl	2,43 \pm 0,75	0,27(0,41)	0,002(0,01)	0,36(0,51)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Abreviações: AF, asma fatal; CE, camada externa; CI, camada interna; Ctrl, controle; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular lisa; TLR2, receptor Toll-like 2; TLR3, receptor Toll-like 3; TLR4, receptor Toll-like 4; TSLP, linfopoetina do estroma tímico.

*p=0,03 comparado com Ctrl.

[†]p=0,02 comparado com Ctrl.

[‡]p=0,04 comparado com Ctrl.

[§]p=0,01 comparado com Ctrl.

Anexo C

Tabela 4. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas pequenas de asmáticos e controles

	Ep($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	CI($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	ML	CE($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TLR2 AF	2,76 \pm 1,73*	0,10(0,13)	0,014(0,020) [†]	0,84(1,07) [‡]
TLR2 Ctrl	0,52 \pm 0,29	0,07(0,03)	0,004(0,002)	0,38(0,21)
TLR3 AF	7,09 \pm 3,09	0,16(0,26)	0,30 \pm 0,18	1,67(1,57)
TLR3 Ctrl	6,30 \pm 2,49	0,27(0,27)	0,30 \pm 0,15	1,17(0,38)
TLR4 AF	9,85 \pm 5,65	0,45(0,64)	0,05(0,18)	2,61(3,57) [§]
TLR4 Ctrl	7,98 \pm 4,87	0,44(0,50)	0,06(0,13)	1,16(3,05)
TSLP AF	3,96(7,57)	0,05(0,24)	0,009(0,109)	0,65(1,51)
TSLP Ctrl	2,61(1,20)	0,08(0,32)	0,011(0,007)	0,20(2,01)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Abreviações: AF, asma fatal; CE, camada externa; CI, camada interna; Ctrl, controle; Ep, camada epitelial; ML, camada muscular lisa; TLR2, receptor Toll-like 2; TLR3, receptor Toll-like 3; TLR4, receptor Toll-like 4; TSLP, linfopoetina do estroma tímico.

*p<0,001 comparado com Ctrl.

[†]p=0,003 comparado com Ctrl.

[‡]p=0,01 comparado com Ctrl.

[§]p=0,04 comparado com Ctrl.

Anexo D

Tabela 5. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas pequenas de asmáticos não fumantes e fumantes

	Ep($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	CI($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	ML	CE($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TLR2 NF	3,00 \pm 1,90	0,16(0,19)*	0,02(0,03)	1,30(1,30) [†]
TLR2 F	2,49 \pm 1,59	0,05(0,06)	0,01(0,01)	0,36(0,60)
TLR3 NF	6,80 \pm 2,69	0,14(0,34)	0,26 \pm 0,19	1,72(1,76)
TLR3 F	7,58 \pm 3,86	0,19(0,18)	0,35 \pm 0,16	1,54(1,35)
TLR4 NF	11,74 \pm 6,04	0,41(0,69)	0,10(0,21)	3,33(3,90)
TLR4 F	7,76 \pm 4,62	0,45(0,64)	0,05(0,16)	2,53(3,36)
TSLP NF	3,36(9,52)	0,03(0,28)	0,004(0,11)	1,55(2,08)
TSLP F	4,58(5,81)	0,05(0,11)	0,009(0,04)	0,58(0,93)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; F, asmáticos fumantes; ML, camada muscular lisa; NF, asmáticos não fumantes; TLR2, receptor Toll-like 2; TLR3, receptor Toll-like 3; TLR4, receptor Toll-like 4; TSLP, linfopoetina do estroma tímico.

*p=0,03 comparado com F.

[†]p=0,005 comparado com F.

Anexo E

Tabela 6. Expressão de TLR2, TLR3, TLR4 e TSLP em vias aéreas grandes de asmáticos não fumantes e fumantes

	Ep($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	CI($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	ML	CE($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)
TLR2 NF	6,32 \pm 3,79	0,83(0,91)	0,016(0,06)	1,20(1,07)
TLR2 F	4,98 \pm 3,89	0,43(0,88)	0,008(0,01)	1,24(0,62)
TLR3 NF	6,26(6,84)	1,04(1,59)	0,22(0,24)	1,74(1,26)
TLR3 F	6,36(7,17)	1,55(5,33)	0,24(0,22)	3,97(3,30)
TLR4 NF	33,57(31,41)	4,95(3,26)	0,28 \pm 0,19	4,31(4,26)
TLR4 F	14,54(31,14)	5,37(7,61)	0,31 \pm 0,20	5,70(6,51)
TSLP NF	6,30 \pm 4,16	0,95(2,64)	0,022(0,05)	0,91(1,41)
TSLP F	3,20 \pm 4,71	0,38(1,49)	0,002(0,09)	0,87(2,15)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; Ep, camada epitelial; F, asmáticos fumantes; ML, camada muscular lisa; NF, asmáticos não fumantes; TLR2, receptor Toll-like 2; TLR3, receptor Toll-like 3; TLR4, receptor Toll-like 4; TSLP, linfopoetina do estroma tímico.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. Innate Immunity. In: Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p.275-297.

Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. Cutting Edge: Different toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-4989.

Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, Akdis M, Lauener RP, Schmidt-Weber CB, Klunker S, Isitmangil G, Hansjee N, Wynn TA, Dillon S, Erb P, Baschang G, Blaser K, Alkan SS. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol* 2003;33:2717-2726.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.

Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Ziegler SF, Sarfati M, Delespesse G. Thymic stromal

lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007;204:253-258.

Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 2005;202:829-839.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008;32:1-9.

Bachar O, Adner M, Uddman R, Cardell LO. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. *Eur J Immunol* 2004;34:1196-1207.

Baines KJ, Simpson JL, Scott RJ, Gibson PG. Immune responses of airway neutrophils are impaired in asthma. *Exp Lung Res* 2009;35:554-569.

Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity* 2009;31:425-437.

Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:393-416.

Boehlecke B, Hazucha M, Alexis NE, Jacobs R, Reist P, Bromberg PA, Peden DB. Low-dose airborne endotoxin exposure enhances bronchial responsiveness to inhaled allergen in atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1241-1243.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-1745.

Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:471-480.

Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-877.

Buckland KF, O'Connor E, Murray LA, Hogaboam CM. Toll-like receptor-2 modulates both innate and adaptive immune responses during chronic fungal asthma in mice. *Inflamm Res* 2008;57:379-387.

Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, Little SA, McSharry C, Thomson NC. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest* 2001;120:1917-1922.

Chedid MB, Chedid MF, Ilha DO, Bozzetti MC, Chaves L, Griza D, Dalcin PR. Community-acquired pneumonia by *Chlamydophila pneumoniae*: a clinical and incidence study in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2007;11:75-82.

Chisholm D, Libet L, Hayashi T, Horner AA. Airway peptidoglycan and immunostimulatory DNA exposures have divergent effects on the development of airway allergen hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:448-454.

Chu HW, Jeyaseelan S, Rino JG, Voelker DR, Wexler RB, Campbell K, Harbeck RJ, Martin RJ. TLR2 signaling is critical for *Mycoplasma pneumoniae*-induced airway mucin expression. *J Immunol* 2005;174:5713-5719.

Chun E, Lee SH, Lee SY, Shim EJ, Cho SH, Min KU, Kim YY, Park HW. Toll-like Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in

Asthmatics; Implications for Asthma Management. *J Clin Immunol* 2010 Jan 14. [Epub ahead of print]

Da Costa CU, Wantia N, Kirschning CJ, Busch DH, Rodriguez N, Wagner H, Miethke T. Heat shock protein 60 from *Chlamydia pneumoniae* elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *Eur J Immunol* 2004;34:2874-2884.

Damera G, Tliba O, Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;22:353-359.

de Magalhaes Simoes S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35:602-611.

Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J* 2006;27:615-626.

Dolhnikoff M, Silva LFF, Araujo BB, Gomes HA, Fernezlian S, Mulder A, Lindeman JH, Mauad T. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1090-1097.

Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6:68.

Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD; ALEX Study Team. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:482-488.

Expert Panel Report 3 (EPR-3). Guidelines for the diagnosis and management of asthma: summary report 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:S94–S138.

Fenhalls G, Squires GR, Stevens-Muller L, Bezuidenhout J, Amphlett G, Duncan K, Lukey PT. Associations between toll-like receptors and interleukin-4 in the lungs of patients with tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:28-38.

Finn PW, Bigby TD. Innate immunity and asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:260-265.

Gern JE. Rhinovirus and the initiation of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:73-78.

Green RM, Custovic A, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL, Woodcock A. Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study. *BMJ* 2002;324:763. [Published erratum in *BMJ* 324:1131].

Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, Whitehead BF, Gibson PG. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:433-439.

Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:1733-1740.

Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005; 280:5571-5580.

Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:44-51.

Harju TH, Leinonen M, Nokso-Koivisto J, Korhonen T, Rätty R, He Q, Hovi T, Mertsola J, Bloigu A, Ryttilä P, Saikku P. Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* 2006;61:579-584.

Hauber HP, Tulic MK, Tsiopoulos A, Wallaert B, Olivenstein R, Daigneault P, Hamid Q. Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Can Respir J* 2005;12:13-18.

Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, et al. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005;79:12273-12279.

Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity* 2009;31:362-367.

Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 2008;8:142-152.

Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:463-469.

Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, McConnell W, Beckett P, Al Ali M, Chauhan A, Wilson SJ, Reynolds A, Davies DE, Holgate ST. Tumour necrosis factor (TNF- α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid-dependent asthma. *Thorax* 2005;73:1012-1018.

Hunt LW, Gleich GJ, Ohnishi T, Weiler DA, Mansfield ES, Kita H, Sur S. Endotoxin contamination causes neutrophilia following pulmonary allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1471-1475.

Johnston SL, Martin RJ. Chlamydomphila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae – a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1078-1089.

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;8:451-461.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996;86:973-983.

Liu AH. Innate microbial sensors and their relevance to allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:846-858.

Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 2006;203:269-273.

Lun SW, Wong CK, Ko FW, Hui DS, Lam CW. Expression and functional analysis of toll-like receptors of peripheral blood cells in asthmatic patients: implication for immunopathological mechanism in asthma. *J Clin Immunol* 2009;29:330-342.

Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 2007;9:368-381.

Macek V, Dakhama A, Hogg JC, Green FH, Rubin BK, Hegele RG. PCR detection of viral nucleic acid in fatal asthma: is the lower respiratory tract a reservoir for common viruses? *Can Respir J* 1999;6:37-43.

Machado AA, Couch RB, Rossini AJ, da Costa JC. Role of *Mycoplasma pneumoniae* in the etiology of acute respiratory infections in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1991;24:43-50.

Martin RJ, Kraft M, Chu HW, Berns EA, Cassell GH. A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:595-601.

Matsuguchi T, Musikachoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000;165:5767-5772.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:857-862.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.

Michel O, Duchateau J, Sergysels R. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J Appl Physiol* 1989;66:1059-1064.

Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 1991;21:441-448.

Michel O, Ginanni R, Le Bon B, Content J, Duchateau J, Sergysels R. Inflammatory response to acute inhalation of endotoxin in asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:352-357.

Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Pauwels R, Sergysels R. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1641-1646.

Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:101-108.

Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, Niki Y, Kawane H, Matsushima T. *Chlamydia pneumoniae* and exacerbations of asthma in adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80:405-409.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.

Netea MG, Kullberg BJ, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW. Non-LPS components of *Chlamydia pneumoniae* stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways. *Eur J Immunol* 2002;32:1188-1195.

Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993;307:982-986.

Noakes PS, Hale J, Thomas R, Lane C, Devadason SG, Prescott SL. Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur Respir J* 2006;28:721-729.

O'Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:560-564.

Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000;6:393-396.

Page K, Lierl KM, Hughes VS, Zhou P, Ledford JR, Wills-Karp M. TLR2-mediated activation of neutrophils in response to German cockroach frass. *J Immunol* 2008;180:6317-6324.

Patel M, Xu D, Kewin P, Choo-Kang B, Mc-Sharry C, Thomson NC, Liew F. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* 2005;174:7558-7563.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-2088.

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002;71:635-700.

Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276:37692-37699.

Redecke V, Häcker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E. Cutting Edge: Activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004;172:2739-2743.

Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002;169:4697-4701.

Ricci A, Avanzini MA, Scaramuzza C, Castellazzi AM, Marconi M, Marseglia GL. Toll-like receptor 2-positive and Toll-like receptor 4-positive cells in adenoids of children exposed to passive smoking. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:631-2.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-593.

Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin RG, Gergen P, Mitchell H, McNiff-Mortimer K, Lynn H, Ownby D, Malveaux F. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997;336:1356-1363.

Senhorini A, Silva LFF, Araujo BB, Dolhnikoff M, Mauad T. Increased mast cell density within the airway smooth muscle in small airways of fatal smoking asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:A100. (Presented at the American Thoracic Society 2008 International Conference; 2008 May 16-21; Toronto, Canada. Abstracts).

Shan X, Hu A, Veler H, Fatma S, Grunstein JS, Chuang S, Grunstein MM. Regulation of Toll-like receptor 4-induced proasthmatic changes in airway smooth muscle function by opposing actions of ERK1/2 and p38 MAPK signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L324-L333.

Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax* 2007;62:211-218.

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3:673-680.

Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 1993;148:713-719.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.

Talbot TR, Hartert TV, Mitchel E, Halasa NB, Arbogast PG, Poehling KA, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR. Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med* 2005;352:2082-2090.

Taylor RC, Richmond P, Upham JW. Toll-like receptor 2 ligands inhibit Th2 responses to mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1148-1154.

Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J* 2004;24:822-833.

Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Siafakas NM, Barnes NC, Jeffery PK. Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:919-925.

Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S24-S32.

Tuuminen T, Varjo S, Ingman H, Weber T, Oksi J, Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:734-738.

van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E, Allore HG, Medzhitov R, Shaw AC. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol* 2007;178:970-975.

Varadaradjalou S, Féger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* 2003;33:899-906.

Walter MJ, Holtzman MJ. A centennial history of research on asthma pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:483-489.

Wark PA, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J* 2002;19:68-75.

Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005;201:937-947.

Watson MW, Beasley R, Holgate ST, Bardin PG. Rhinovirus is not detectable in peripheral lung tissue after asthma death. *Respirology* 2003;8:234-238.

Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1001-1008.

Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006;368:804-813.

Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:438-444.

Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, Robinson D, Zhang G, Zhao J, Lee TH, Corrigan C. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005;174:8183-8190.

Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, Zhang G, Gu S, Gao Z, Shamji B, Edwards MJ, Lee TH, Corrigan CJ. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2008;181:2790-2798.

Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, Gyarmati D, Aye T, Campbell DJ, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 2005;6:1047-1053.

Apêndice

1. Documento de aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP) para realização desta pesquisa.

2. Artigo sobre a caracterização de 73 indivíduos falecidos de asma autopsiados no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP), vinculado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, do qual participei como coautor no período de realização deste doutorado.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)