



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

PEDRO MIGUEL TAVARES BARRETO MAGALHÃES CRESPO

IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA NO TRACTO URINÁRIO

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE MEDICINA INTERNA

TRABALHO REALIZADO SOBRE A ORIENTAÇÃO DE:

PROF. DOUTOR RUI MARQUES DOS SANTOS

JANEIRO DE 2010



1 - Índice

1 - Índice.....	2
2 - Resumo e palavras chave	4
3 - Métodos	6
4 - Introdução	
4.1 - Infecções Urinárias	
4.1.1 - Definição	7
4.1.2 - Dados epidemiológicos	7
4.1.3 - Bacteriúria assintomática vs. infecções do tracto urinário simples vs. infecções do tracto urinário complicadas	9
4.2 - Principais factores de agressividade das bactérias causadoras de infecções do tracto urinário	11
4.2.1 - <i>Escherichia coli</i>	12
4.2.2 - <i>Proteus mirabilis</i>	17
5 - Imunidade do trato urinário.	
5.1 - Considerações gerais	19
5.2 - Toll-like Receptors (TLR)	
5.2.1 - O que são?	21
5.2.2 - Que estrutura têm?	22
5.2.3 - Onde estão?	23
5.2.4 - Como actúan?	25
5.2.5 - Vias de sinalização	27
5.2.6 - Outros processos mediados pela activação dos TLRs	29
5.3 - Proteína de Tamm-Horsfall (THP)	
5.3.1 - O que é?	33



5.3.2 - Como actua e quais os efeitos da sua activação?	34
5.4 - Interação entre imunidade inata e adquirida	37
6 - Perspectivas de futuro?	39
6.1 - Utilização terapêutica de agonistas e antagonistas de TLR e THP	39
7 - Conclusões	42
8 - Bibliografia	44



2 - Resumo e palavras chave

As infecções do tracto urinário (ITU) podem atingir toda a sua extensão, desde o parênquima renal até à uretra, passando pelo bacinete, ureteres e bexiga. Têm habitualmente etiologia bacteriana (a *E. coli* uropatogénica está envolvida em 80% dos casos) sendo, actualmente, uma das principais infecções não epidémicas que afecta humanos, condicionando mortalidade e morbilidade significativas (hipertensão arterial e doença/ insuficiência renal crónica, por exemplo).

O tracto urinário não possui barreiras físicas como células ciliadas ou produtoras de muco. Ainda assim, a urina é, habitualmente, um líquido estéril. Esta questão tem suscitado interesse no estudo da imunidade inata e adquirida do tracto urinário, tendo-se tornado num dos modelos mais estudados da actualidade.

Os Toll-like receptors (TLR) são um importante componente da imunidade inata das vias urinárias. O seu número varia de espécie para espécie, sendo conhecidos pelo menos 10 tipos diferentes de TLR em humanos, cada um deles com capacidade para identificar um ligante específico. A ligação entre TLR e ligante desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a activação da imunidade celular (recrutamento de neutrófilos) e a libertação de mediadores inflamatórios, como citocinas, defensinas, peptídeos bactericidas e proteínas do complemento. O TLR4, assume preponderância na resposta imune do tracto urinário, uma vez que reconhece fragmentos de lipopolissacarídeos (LPS) constituintes da parede celular das bactérias Gram negativas.

A proteína de Tamm-Horsfall (uromodulina), produzida na porção espessa do ramo ascendente da ansa de Henle, é a proteína mais abundante da urina dos mamíferos. O seu papel na imunidade do tracto urinário era até há poucos anos desconhecida. Hoje sabe-se que tem um importante papel no desencadear da resposta



imune inata (através da activação do complemento e de células dendríticas), bem como na modulação da imunidade adquirida, através de um mecanismo dependente do TLR4. O conjunto destas respostas que visa a eliminação das bactérias pode, contudo, provocar lesão renal.

O conhecimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de ITU poderá vir a permitir saber que grupos populacionais estarão em maior risco, melhorar os métodos de diagnóstico, bem como as armas terapêuticas para este tipo de infecção, podendo a modulação da imunidade do tracto urinário através de ligantes específicos de determinados TLR vir a ser uma alternativa viável para combater as ITU.

Este trabalho faz uma revisão bibliográfica, visando esclarecer os mecanismos de interacção bactéria-hospedeiro, imunidade inata e adquirida no tracto urinário.

Palavras chave: Infecção urinária, Toll-like receptor, proteína Tamm-Horsfall, *E. coli* uropatogénica, *Proteus mirabilis*, imunidade inata, imunidade adquirida.



3 - Métodos

Foi efectuada uma pesquisa na *PubMed* usando as palavras-chave “urinary tract infection”, “innate and adaptive immunity in urinary tract”, “toll-like receptors”, “Tamm-Horsfall Protein” tanto de forma isolada como cruzando umas com as outras. Foi ainda utilizada a *MeSH database* para refinar a pesquisa.

Uma segunda pesquisa utilizando os mesmos termos foi feita através do sítio da internet *www.scirus.com*. Neste caso foram também cruzados os termos em pesquisas avançadas.

Por último, foi feita uma pesquisa no *Up To Date*[®] usando as mesmas palavras-chave.

Dos resultados da pesquisa, seleccionaram-se os artigos considerados mais relevantes para o tema em questão, dando primazia aos publicados nos últimos cinco anos.



4 - Introdução

4.1 - Infecções Urinárias

4.1.1 - Definição

Infecção é uma “invasão de um organismo por um agente estranho (seja ele uma bactéria, vírus, fungo ou parasita) capaz de nele se multiplicar e o conjunto das modificações patológicas que daí podem resultar” (Manuila, Manuila, Lewalle, & Nicoulin, 2004). Paralelamente surge a definição de contaminação, que é um processo semelhante ao da infecção, mas do qual não resulta qualquer modificação patológica no organismo invadido.

Infecção do tracto urinário (ITU) será a que atingir qualquer um dos seus constituintes: rim, bacinete, ureter, bexiga, uretra ou combinações destes. A bexiga é o órgão mais frequentemente envolvido, dando origem à sintomatologia característica: disúria, frequência, urgência, dor supra-púbica e/ ou hematúria.

4.1.2 - Dados epidemiológicos

As ITU são a infecção bacteriana não epidémica mais comum em humanos (Weichhart et al. 2005), sendo responsáveis por cerca de 7 milhões de consultas por ano, só nos EUA, sendo que, no mesmo intervalo de tempo, em cerca de 300.000 ocasiões se chegou ao diagnóstico de pielonefrite. Estima-se que no mesmo país ocorram cerca de 4 milhões de ITUs em grávidas, com o potencial de morbilidade que isso acarreta tanto para a mãe como para o feto.

Segundo um estudo sueco, 7,8% das mulheres e 1,6% dos homens em idade escolar já tiveram uma ITU sintomática, até aos 10 anos pelo menos 3% das mulheres e apenas 1,1% dos homens. Conclui ainda este estudo que 50-60% das mulheres adultas tiveram uma ITU durante a vida. (Hooton & Stamm, 2009)



Na população de mulheres sexualmente activas a incidência é superior a 0,5 episódios por ano. 20-30% delas têm infecções recorrentes, a uma taxa de 2-3 por ano, com necessidade de antibioterapia.

Estima-se que em média, cada episódio de ITU em mulheres jovens leve a: 6,1 dias de sintomas, 2,4 dias de actividade restrita, metade dos quais sem trabalhar e 0,4 dias de restrição ao leito.

Um número muito reduzido de homens entre os 15 e os 50 anos têm ITUs não complicadas, sendo que ITUs sintomáticas ocorrem apenas 5 a 8 vezes por ano por 10.000 homens neste grupo etário.

A menor incidência de ITUs em homens do que em mulheres é justificada em parte por: colonização menos frequente em torno da uretra (ambiente peri-uretral menos húmido que nas mulheres), uretra mais comprida, substâncias anti-bacterianas no fluído prostático.

O agente etiológico mais frequentemente identificado é a *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC), sendo responsável por 80 a 85% dos casos de infecção urinária. O segundo agente mais comumente associado a estas infecções é o *Proteus mirabilis*. Os factores que propiciam a sua invasão do hospedeiro serão abordados mais adiante.

Uma vez que são uma causa comum da utilização de antibióticos, as infecções do tracto urinário promovem um aumento da ocorrência de resistências a estes preciosos fármacos.



4.1.3 - Bacteriúria assintomática vs ITUs simples vs ITUs complicadas

A urina é um meio normalmente estéril podendo, contudo, transformar-se num bom meio de cultura para os invasores (habitualmente bactérias), que não sejam eliminados.

Entende-se por bacteriúria assintomática, o isolamento de uma determinada quantidade de bactérias numa amostra de urina colhida de forma correcta a um indivíduo sem sinais ou sintomas de infecção urinária (Fekete & Hooton, 2008), sendo este estado mais comum em mulheres que em homens.

A bacteriúria assintomática requer uma abordagem delicada, só devendo ser tratada em situações muito particulares: em grávidas e em doentes sujeitos a intervenção urológica em que seja previsível o sangramento de mucosas. Não se deve fazer o tratamento da bacteriúria assintomática nos seguintes casos: mulheres, diabéticos, idosos, residentes em lares ou pacientes com lesão espinhal ou cronicamente algaliados. A bacteriúria é habitualmente transitória e tem tendência a resurgir após conclusão do tratamento, com a agravante de predispor ao aparecimento de resistências antibióticas. Evitar o tratamento desnecessário é fundamental para evitar o surgimento destas resistências. (Fekete & Hooton, 2008)

As complicações mais relevantes que podem surgir no contexto de uma infecção urinária são: pielonefrite, sépsis, abscesso renal, obstrução urinária e insuficiência renal. Nos casos em que estas não surjam no decurso de uma infecção urinária esta diz-se simples.

Um tracto urinário sem alterações anatómicas ou funcionais torna mais difícil o surgimento de complicações.

Embora se apresentem com uma clínica semelhante à das ITUs em mulheres, por estarem habitualmente associadas a alterações anatomo-funcionais (obstrução por



próstata hiperplásica, sequelas de instrumentação, refluxo, alterações do colo da bexiga ou disfunção neuromuscular) todas as ITUs em homens são consideradas complicadas, o que motiva um período de tratamento mais longo do que em mulheres. Ainda assim, há um pequeno grupo de homens entre os 15-50 anos que tem infecções urinárias simples. Alguns factores que devem fazer suspeitar desta hipótese de diagnóstico são: sexo anal insertivo, relações sexuais com mulheres com ITUs e ausência de circuncisão. (Hooton & Stamm, 2008)

Na tabela I enumeram-se alguns factores sugestivos de infecções urinárias complicadas, tanto em homens como em mulheres.

Factores sugestivos de ITU complicada
Alterações anatómicas ou urinárias do tracto urinário
Algaliação
Instrumentação recente do tracto urinário
Gravidez
Idade avançada
Infecções associadas aos cuidados de saúde
Antibióterápia recente
Sintomas iniciais com mais de 7 dias de duração
Diabetes mellitus ou imunodepressão
História de ITUs na infância

Tabela I - Factores sugestivos de ITU complicada

A algaliação é um dos factores de risco para ITUs que pode ser evitado. Pela sua importância e utilidade, deve ser usada criteriosamente, quando estritamente necessário e pelo menor período de tempo possível. Estudos feitos em doentes algaliados cronicamente, detectaram a presença de uma flora polimicrobiana, que mudava duas a três vezes por mês (Fekete, 2008), variando a bacteriúria proporcionalmente com a duração da algaliação. Este facto não deve motivar a antibióterápia profilática destes doentes.



4.2 - Principais factores de agressividade das bactérias causadoras de ITUs.

Em condições normais, o tracto urinário é um meio estéril, com excepção para a porção terminal da uretra.

A infecção do tracto urinário é um óptimo modelo para estudo da interacção bactéria-hospedeiro, não só por ser uma patologia muito comum, mas também por ser possível isolar o invasor, estudar a sua carga genética. É ainda possível obter amostras de epitélio do hospedeiro e de células inflamatórias envolvidas no processo imune. Estes estudos permitem identificar factores de agressividade de bactérias e factores que tornam algumas formas de defesa do hospedeiros um sucesso. Posteriormente é ainda possível avaliar-se a resposta do hospedeiro à infecção através da colheita de urina.

A susceptibilidade às ITUs varia muito dentro de uma população, mas a base dessa susceptibilidade não é ainda completamente conhecida.

A adesão de bactérias às células uroteliais constitui o primeiro fenómeno do processo de invasão bacteriana, sendo um importante indicador da agressividade bacteriana. Este processo é sobretudo importante em condições anatómicas normais.

As ITUs estão associadas à capacidade das bactérias aderirem e colonizarem o intestino (principal reservatório de bactérias envolvidas nas ITUs), o períneo, a uretra, a bexiga, sistema pielo-calicial renal e/ ou o interstício renal.

Neste capítulo irei abordar os processos que as bactérias utilizam para escapar aos mecanismos imunes do hospedeiro. Vou apenas referir-me às duas espécies mais comumente associadas às ITUs, a *Escherichia coli* (*E. coli*) e o *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*).

Enquanto que os factores de virulência da *E. coli* são os principais responsáveis pela sua progressão através do tracto urinário, os factores de virulência de *P. mirabilis*



podendo provocar ITUs, são particularmente importantes na formação de cálculos de estruvite. (Meyrier, 2007)

Devido á carga eléctrica das *Enterobacteriaceae* ser negativa e semelhante à do urotélio, se não existissem sistemas de aderência, esta não ocorreria. As fímbrias permitem ligação irreversível à membrana celular do urotélio através de adesinas, sendo a sua ligação fortalecida pela carga eléctrica e pela hidrofobicidade.

4.2.1 - *E. coli*

A *E. coli* é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, uma grande e heterogénea família de bacilos gram negativos. Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa, que faz parte da flora comensal do tracto intestinal dos humanos.

A origem das *E. coli* responsáveis por ITUs não complicadas é a flora intestinal (infecção endógena), com posterior colonização da região vaginal, atingindo, por via ascendente a bexiga e, por vezes, os rins.

Possui alguns factores de agressividade característicos da família (Fig.1) a que pertence e outros que lhe são específicos. Os associados a todas as *Enterobacteriaceae* são: produção de endotoxinas, existência de cápsula, variação da expressão de antígenos de superfície, sequestro de factores de crescimento, resistência a antibióticos e resistência à eliminação sérica. (Murray et al., 2002)

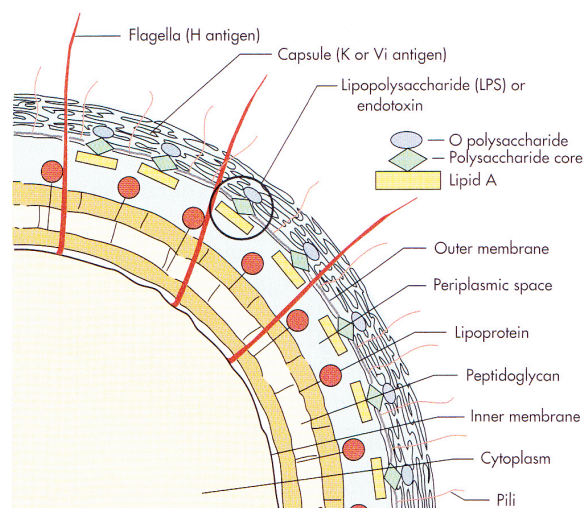


Fig.1 - Factores de agressividade das *Enterobacteriaceae*. (Murray et al., 2002)

Os factores de agressividade específicos da *E. coli* dividem-se em duas grandes categorias: as exotoxinas (por exemplo, hemolisina) e as adesinas (por exemplo, fímbrias P). As exotoxinas produzidas pelas *E. coli* são muito variadas e muito importantes na patogénese das doenças que estas bactérias provocam. Por exemplo a hemolisina é particularmente importante para a acção das *E. coli* uropatogénicas (UPEC). As adesinas existentes na parede bacteriana e nas suas fímbrias, permitem a estas bactérias aderir às células dos epitélios que invadem, nomeadamente o urinário ou o intestinal, resistindo aos mecanismos de eliminação de bactérias que os hospedeiros têm, como o fluxo urinário e a mobilidade intestinal, respectivamente.

As UPEC estão fortemente associadas a certas entidades nosológicas, como meningites, gastroenterites e sépsis, para além das ITUs. Correspondem a 20-30% da flora fecal, 50-60% das estirpes causadoras de cistite, 75-100% das causadoras de pielonefrite e urosépsis, estando ainda envolvidas em 30% dos casos de bacteriúria assintomática. Por outro lado, mulheres com ITUs complicadas (associadas a algália ou anormalidades urológicas), são habitualmente infectadas por estirpes



sem as características das UPEC e que desenvolvem infecção maioritariamente por existirem défices imunitários nos hospedeiros. (Stamm, 2006)

Tendo em conta o já referido e fazendo uma abordagem mais generalista, os factores de agressividade das UPECs podem-se dividir em 2 grandes grupos, as estruturas de superfície (fimbria ou *pili*, flagelos, cápsula de polissacarídeos, lipopolissacarídeos) e as proteínas segregadas (hemolisinas, citotoxinas e proteínas ligantes de ferro - sideroporos).

As hemolisinas induzem a formação de poros na membrana celular. A aerobactina, um sideroporo, tem um papel fundamental para o *in-take* de ferro no ambiente sideropénico do tracto urinário. (Meyrier, 2007)

As UPECs possuem 5 tipos diferentes de fimbrias, sendo as mais importantes as P (ou pap de *pyelonephritis associated pili*) e as Tipo I (ou Fim).

As fimbrias tipo I estão presentes em quase todas as estirpes de *E. coli* e não apenas nas uropatógenicas. Não estando epidemiologicamente ligadas às ITUs, a expressão dos seus genes é induzida imediatamente após a entrada na bexiga, sendo importantes na manutenção da infecção e na exacerbação da resposta inflamatória à infecção através de febre mais alta, maior duração da doença, mais rápida instalação da mesma e leucocitose mais elevada. (Meyrier, 2007)

A FimH é uma adesina, existente na extremidade das fimbrias tipo I, que se liga à uroplaquina da superfície do epitélio da bexiga. Os mutantes FimH negativos não provocam infecção em modelos animais de ITU. (Stamm, 2006)

As consequências da interacção da UPEC através da FimH são a adesão bacteriana, a indução da esfoliação urotelial e a internalização de organismos para formar colónias bacterianas intracelulares.



As fimbrias P, estão associadas às estirpes causadoras de pielonefrites e urosépsis. A ligação ao epitélio é feita entre a adesina PapG e meios de digalactose envolvidos em glicosfingolípido existentes no urotélio, o que leva à secreção de IL-6 e IL-8 pelo urotélio. A secreção destas citocinas também é induzida pelos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, que se ligam aos TLR4 do epitélio. A adesina PapG está associada ao início das pielonefrites, provavelmente por maior densidade do epitélio renal em glicosfingolípido. (Stamm, 2006)

Em modelos animais as UPEC conseguiram provocar o seu *uptake* pelas células uroteliais, promovendo a formação de colónias intracelulares. Com a multiplicação das *E. coli* a ser feita a cada 30 minutos, o crescimento intracelular destas comunidades é rápido, havendo a possibilidade de saída de bactérias para infectar células vizinhas ou para o fluxo urinário.

As UPECs têm ainda a capacidade de se apresentarem como longos filamentos não septados de bactérias, que podem resistir à fagocitose.

Segundo Walter E. Stamm, os factos referidos nos dois últimos parágrafos constituem um novo paradigma para a justificação da recorrências das ITUs. As UPECs ligam-se ao urotélio, invadindo as suas células superficiais, formando colónias intracelulares e, eventualmente, biofilmes com capacidade de evasão às respostas do hospedeiro. Estas colónias, mesmo estando quiescentes, formam um reservatório que pode originar infecções posteriores por fluxo de bactérias ou formação de filamentos de bactérias, que desta forma saem das células uroteliais. O *uptake* das UPEC pelo urotélio é um processo FimH dependente e a sua velocidade depende do hospedeiro. Este processo providencia às UPEC uma forma não só de escapar à acção das defesas do hospedeiro como também à acção de antibióticos, promovendo infecções recorrentes.



É importante salientar que este modelo é conhecido de estudos em ratos, não se conhecendo ainda resultados conclusivos em humanos.

Um estudo de Ann Stapleton demonstrou que as mulheres não secretoras de antígenos do grupo sanguíneo possuíam, no epitélio vaginal, uma elevada quantidade de gangliosídeos aos quais as fimbrias P se ligavam, ao passo que as não secretoras não os apresentavam. Além do epitélio vaginal, estes gangliosídeos também foram identificados a nível do epitélio renal das mesmas mulheres, o que pode estar por trás do risco mais elevado para ITUs não complicadas destas mulheres. Em mulheres com história de ITUs recorrentes ou pielonefrites, é mais comum haver antecedentes familiares de ITUs (mães ou irmãos) do que naquelas sem ITUs. Estes factos sugerem que possam haver mecanismos que justifiquem uma predisposição hereditária para as ITUs recorrentes. (Stamm, 2006). O mesmo autor, juntamente com outros investigadores, está a fazer um estudo em que acompanha uma coorte de mulheres, para avaliar a taxa de recorrência de infecções, determinar as características de agressividade das estirpes infectantes, verificar quais os mecanismos da imunidade inata do hospedeiro activados e tentar identificar biofilmes de UPECs nas células uroteliais exfoliadas.

Outro grupo estava a desenvolver um estudo que comparava mulheres com ITUs recorrentes e/ ou pielonefrites com um grupo controlo, procurando identificar alterações em genes específicos, como de TLRs, receptores de quimiocinas (CXCR1 e CXCR2) e de interferão gama. Estes estudos podem vir a trazer um melhor entendimento das ITUs recorrentes e ajudar a delinear novas medidas de prevenção das mesmas.

Como conclusão, pode-se referir que os mecanismos descritos podem permitir às UPECs escapar à acção de leucócitos, à secreção de quimiocinas e citocinas e



ainda à esfoliação celular. As colónias intracelulares podem ser responsáveis por recorrências de ITUs, o que leva a repensar como estas são vistas do ponto de vista clínico.

4.2.2 - *Proteus mirabilis*.

Como a *E. coli*, o *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, possuindo os factores de agressividade característicos desta família já apresentados anteriormente (Fig.1).

A ITU é a patologia mais frequentemente causada por *P. mirabilis* (Murray et al., 2002).

O factor de agressividade mais importante e que mais distingue esta bactéria é a produção de urease, que hidroliza a ureia em amónia e dióxido de carbono. A amónia combina-se com hidrogénio e forma amoníaco. A redução da concentração de iões de hidrogénio leva à alcalinização da urina que, por sua vez, favorece a precipitação de carbonato, fosfato e magnésio com subsequente formação de cálculos de estruvite. Os cálculos além de estruvite contêm bactérias, matriz proteica e leucócitos, factores que favorecem a perpetuação da infecção e a estase, o que propicia a multiplicação de bactérias. Além da urease o *P. mirabilis* segrega proteases de IgA, que vão diminuir a eficácia destas imunoglobulinas protectoras da mucosa.

Apesar de existir uma grande diversidade serológica, não há nenhuma que se associe especificamente com as ITUs.

A nível de adesão, o *P. mirabilis* tem pelo menos 4 tipos diferente de fimbrias, dos quais apenas 2 são indispensáveis para a indução da infecção. Umas (MR/P) para infecções da bexiga e rim e outras (PMF) para bexiga. Por outro lado, e em contraste



com a *E. coli*, a presença de fimbrias pode também contribuir para a diminuição da agressividade de *P. mirabilis*, por facilitar a sua fagocitose. (Meyrier, 2007)



5 - Imunidade do trato urinário

5.1 - Considerações gerais

As superfícies mucosas estão na fronteira entre o hospedeiro e o ambiente e são a primeira barreira para potenciais patógenos.

Este papel de defesa é particularmente importante na mucosa do tracto GI, pulmonar e urinário. Nestes tecidos/ órgãos, as células das mucosas têm de cumprir um papel de defesa para além do seu papel fisiológico.

O tracto urinário não possui células especializadas na sua protecção. Não tem células ciliadas nem células produtoras de muco como tem, por exemplo, o tracto respiratório. Ainda assim, é um meio estéril. Nos últimos anos, têm sido feitos inúmeros estudos para tentar compreender melhor os mecanismos envolvidos na defesa do organismo contra os agentes agressores.

No passado, a importância primordial no processo inflamatório era dada aos linfócitos, macrófagos e neutrófilos das mucosas e à agressividade dos seus subprodutos sobre a integridade da membrana. Actualmente, a importância recai sobre o epitélio propriamente dito e a sua capacidade de neutralizar as ameaças microbianas. Os epitélios não são meros observadores nem alvos do processo que culmina com a inflamação das mucosas, mas sim um participante central e fundamental desencadeador de todo o processo. (Gribar et al., 2008)

O epitélio tem um papel activo na defesa do hospedeiro contra o invasor, nomeadamente em dois aspectos: secreção de citocinas e quimiocinas, com subsequente recrutamento de leucócitos para a mucosa e ainda através da esfoliação das células infectadas, por forma a eliminar as bactérias nelas contidas. Como referido anteriormente, o epitélio nem sempre é eficaz a eliminar totalmente a agressão



bacteriana, conseguindo estas invadir as células e evadir das respostas do hospedeiro, formando colónias intracelulares.

Por forma a compreender a patogénese da resposta inflamatória das mucosas é necessário definir os receptores e as vias de sinalização que medeiam a resposta inflamatória.

O sistema imune inato do tracto urinário é formado por um conjunto de receptores e moléculas de sinalização associadas

O sistema inato é formado por receptores reconhecedores de padrões, como os TLRs, os NOD-like receptors (NLRs), RIG-like receptors (RLRs), lectinas do tipo C. Fazem ainda parte deste sistema as moléculas de sinalização associadas a estes receptores. Estes elementos existem tanto em leucócitos como em células epiteliais, não só no tracto urinário como em todo o organismo. O papel destes receptores na sinalização inflamatória dos leucócitos também tem sido alvo de grande quantidade de estudos.

O sistema imunitário adquirido, existe apenas em vertebrados e implica a criação de respostas dirigidas a um factor agressor específico. A sua resposta é mediada por linfócitos e anticorpos, podendo ser mais vigorosa ou suprimida a cada exposição ao patogene desencadeador, dependendo dos episódios anteriores de exposição a esse (e outros) patógenes e ainda das condições do hospedeiro.

O sistema imunitário inato é muito importante, senão vejamos. O nosso organismo leva cerca de 12 horas a desenvolver uma resposta imune adquirida/adaptada para determinado microorganismo, ao passo que os microorganismos se podem multiplicar a cada 20 minutos. Caso não houvesse defesas inatas, no momento em que as defesas adaptadas estivessem desenvolvidas, já o processo infeccioso



estaria completamente instalado. Além disso, têm um papel importante na activação e modulação da imunidade adquirida.

Nesta parte do trabalho irei falar dos TLR, da Proteína de Tamm-Horsfall (THP) e da forma como estes se articulam na modulação da imunidade inata e adquirida no tracto urinário. Particular atenção será dada ao TLR4, uma vez que é um dos principais intervenientes na interacção hospedeiro-agressor a nível do tracto urinário.

5.2 - Toll-like Receptors (TLR)

5.2.1 - O que são?

Os *Toll-like receptors* são moléculas de superfície das células eucarióticas que detectam e respondem à infecção microbiana.

O seu nome surge da homologia com a molécula Toll da *Drosophila*, componente dos mecanismos de defesa antifúngica daquela mosca. Já existia nos invertebrados e foi conservado ao longo da evolução.

Das moscas aos mamíferos, os TLRs providenciam uma primeira linha de defesa, estando envolvidos no desenvolvimento de doenças infecciosas e auto-imunes.

Pertencem a uma classe de moléculas conhecidas como receptores reconhecedores de padrões (PRR de *pattern recognition receptors*). Os seus ligantes são componentes de microrganismos patogénicos comumente chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP de *pathogen-associated molecular patterns*).

Fazem parte de um sistema de imunidade inespecífica ou inata, significando isto que a resposta à sua activação é igual durante toda a vida e ocorre da mesma forma,



sempre que exista exposição ao mesmo PAMP. Em contraposição, a resposta imune adquirida sofre alterações durante o tempo de vida do hospedeiro.

Os TLR desempenham um papel importante no reconhecimento de componentes microbianos derivados de organismos como fungos, bactérias, vírus ou protozoários e ainda no reconhecimento de outros elementos não pertencentes (do inglês *non-self*) ao organismo.

Nos vertebrados, os TLRs além de terem papéis na imunidade inata, modulam mecanismos com profundo impacto na formação da resposta imune específica.

Espécies diferentes têm números e tipos diferentes de TLRs.

Nos mamíferos há pelo menos 11 tipos diferentes (Khan, et al., 2009), tendo o TLR4 sido o primeiro TLR a ser identificado.

Todos os TLR, do TLR1 ao TLR9 são muito semelhantes em humanos e ratos, enquanto que o TLR 10 é funcionante em humanos mas não em ratos.

5.2.2 - Que estrutura têm?

A estrutura de todos os TLRs é semelhante (Fig. 2). Possuem um domínio extra-celular reconhecedor de ligandos, que contém repetições ricas em leucina (LRR de *leucin-rich repeats*), um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático (sinalizador) que é homólogo ao receptor da Interleucina 1 e que é chamado Toll/IL-1 *receptor* (TIR).

O TLR4 necessita da presença das moléculas MD2 e CD14 para o reconhecimento do seu principal ligante, os LPS das bactérias Gram negativas. O MD2 está associado ao domínio extra-celular do TLR4 e potencia a activação de moléculas adaptadoras intra-celulares provocada pelo LPS, ao passo que o CD14 está associado ao TLR4 na sinalização do estímulo desencadeado pelo LPS. Associa-se

ainda a proteína ligadora de LPS (LPSBP ou LBP de *LPS binding protein*), o que forma um conjunto complexo com várias proteínas para poder fazer uma sinalização mais eficaz das LPS.

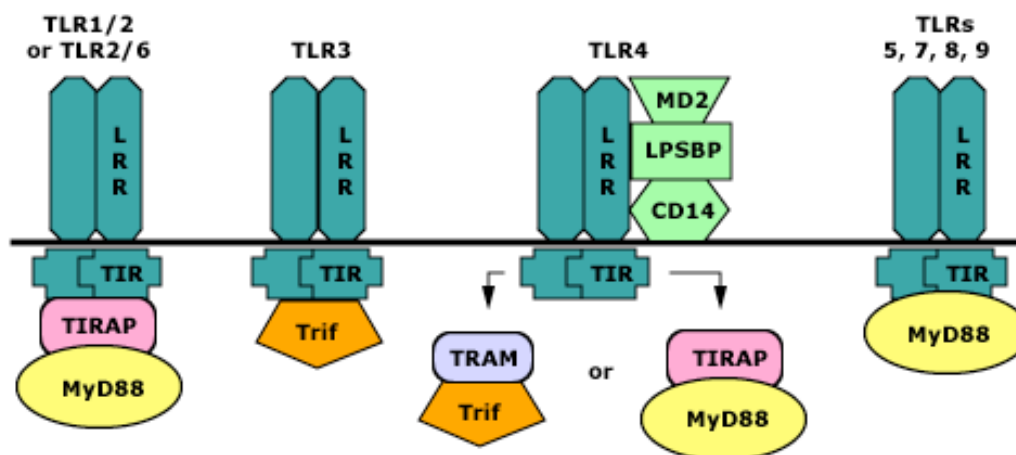


Fig.2 - Estrutura dos TLRs. (Bonilla, 2008)

A via final de sinalização comum dos TLRs envolve a transcrição de vários factores de transcrição, como o factor nuclear para a estimulação da cadeia *kappa* leve nas células B (NF- κ B de *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e proteína activadora 1 (AP-1 de *activating protein-1*). Estes factores regulam a expressão de inúmeros genes, incluindo os das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 beta, IL-6, IL-8 e IL-12. Alguns factores de transcrição estão também associados à produção de Interferão tipo 1 (alfa e beta) por induzirem a transcrição dos factores reguladores de Interferão 3 e 7 (IRF3 e IRF7 de *interferon regulatory factor*).

5.2.3 - Onde estão?

Os TLR encontram-se na membrana celular tanto de células móveis (monócitos, macrófagos) como de células dos tecidos (enterócitos, células renais e mesangiais). Encontram-se expressos em várias populações de leucócitos (Tabela II).

Células	TLRs expressos
Monócitos e Macrófagos	Todos menos o 3
Células Dendríticas Mielóides (MDC)	1, 2, 4, 5, 7 e 8.
Células Dendríticas Plasmocitoides (PDC)	7 e 9
Mastócitos	2, 4, 6 e 8
Linfócitos B	3, 7, 9 e 10
Linfócitos T	3 e 9

Tabela II - TLRs expressos em leucócitos

As células de vários tecidos sólidos podem expressar 1 ou mais TLRs.

Os TLR 1, 2, 3, 4, 5 e 6 estão presentes na superfície da célula. TLR 7, 8 e 9 encontram-se no seu interior, em endossomas (Fig.3).

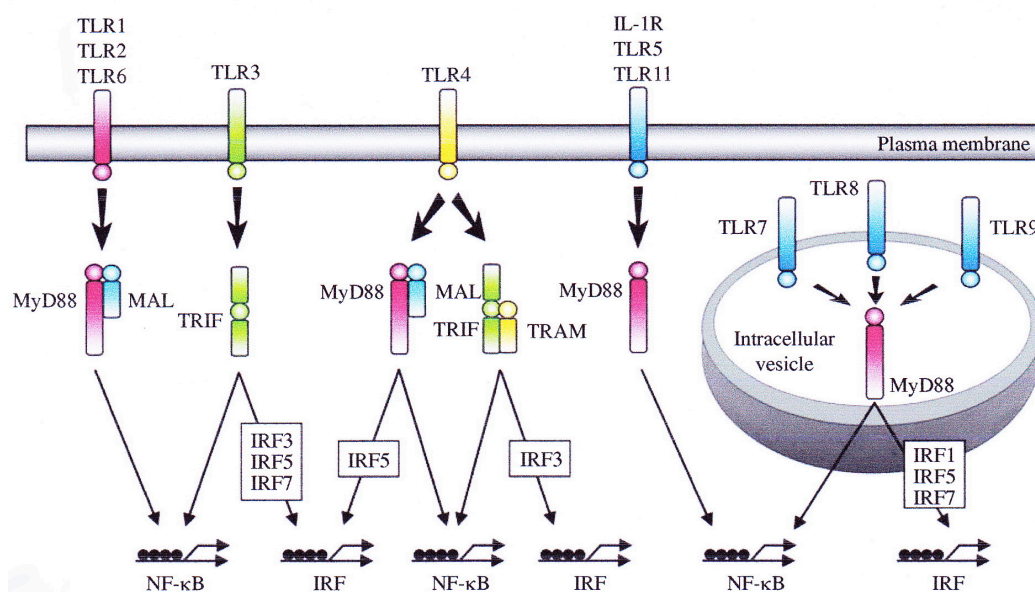


Fig. 3 - Distribuição dos TLRs a nível celular.

A nível renal, apenas se detectou a expressão de TLR 1, 2, 3, 4, 6 e 11, estando estes distribuídos por todo o nefrónio (Fig. 4)

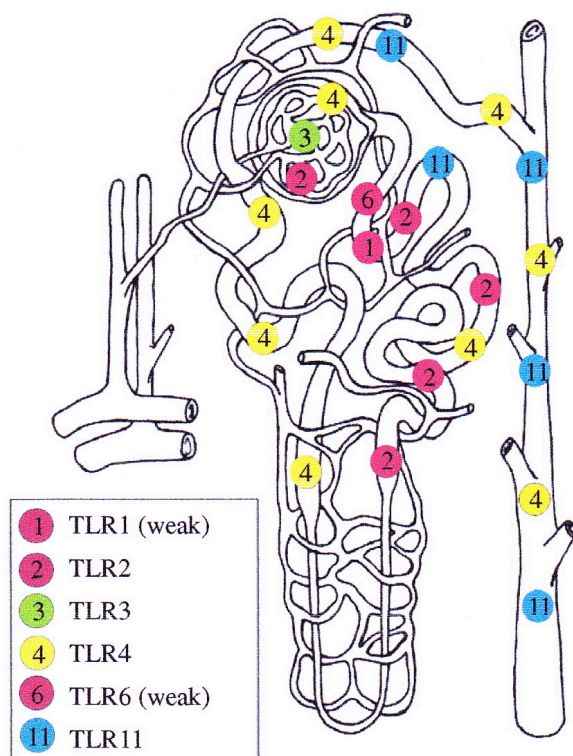


Fig. 4 - Distribuição de TLRs no nefrônio.

5.2.4 - Como actuam?

A activação de TLRs desencadeia a tradução de sinais através de uma cascata que culmina com a expressão de genes. Estes têm um papel activo no controlo da imunidade inata e no desenvolvimento de anticorpos da imunidade adquirida específica.

O epitélio pode responder a estímulos exógenos (produtos microbianos), mas também a estímulos endógenos libertados em situações de hipóxia, stress ou agressão.

As fimbrias da *E. coli* ligam-se aos receptores de glicolípidos das células uroepiteliais e tubulares renais, activando o TLR4 com o conseqüente recrutamento de leucócitos e libertação de citocinas.



À excepção do TLR2, todos os restantes iniciam a sua acção por homodimerização. O TLR2 inicia a sua activação através da formação de heterodímeros com TLR 1 ou com TLR6.

Na tabela III apresenta-se uma lista dos ligantes de cada TLR, de acordo com Gribar et al. (2008).

TLR	Ligand(s)
1	Triacyl lipoproteins
2	Lipoproteins Peptidoglycan Lipoteichoic acid Zymosan Heat shock proteins
3	Double stranded RNA
4	LPS Taxol Heat shock proteins Fibronectin Hyaluronic Acid Heparan Sulfate Fibrinogen Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Murine Retroviral Envelope Protein
5	Flagellin
6	Diacyl Lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan
7	Single-stranded RNA Imidazoquinoline
8	Single-stranded RNA Imidazoquinoline
9	Bacterial (demethylated CpG) DNA
10	Unknown
11	Profilin Uropathogenic Bacteria

Tabela III - TLRs e seus ligantes

Os ligantes do TLR4 podem ter origem endógena ou exógena.

O LPS da membrana das bactérias gram negativas é o mais potente e o principal de entre os ligantes exógenos. Outros são a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório, proteína de choque térmico (Hsp de *Heat-shock protein*) 60 da clamídia e



o a agente anti-tumoral Taxol, que consegue mimetizar a acção do LPS em ratos mas não em humanos.

Os ligantes endógenos do TLR4 são: fibrinogénio, fibronectina, sulfato de heparano, ácido hialurónico e Hsp 60 e 70.

Embora sejam ambos capazes de activar o TLR4, os ligantes endógenos necessitam de estar presentes em concentração muito elevada para conseguirem activar a sinalização do TLR4, ao passo que os ligantes exógenos desencadeiam a resposta do TLR4 estando presentes em concentrações muito reduzidas.

5.2.5 - Vias de sinalização.

As vias de sinalização são um complexo processo iniciado após a activação dos TLRs pelos seus ligantes e que termina com a activação de múltiplos factores de transcrição com importante papel no controlo de genes associados à sobrevivência celular, sua activação e proliferação, nomeadamente citocinas, quimiocinas, factores de crescimento, receptores linfocitários, moléculas de adesão e marcadores da fase aguda.

Todos os TLRs, excepto o TLR3 utilizam o sinalizador intermediário citoplasmático proximal Proteína 88 da resposta primária da diferenciação mielóide (MyD88 de *myeloid differentiation primary response protein 88*) tanto de forma isolada como nos TLR 5, 7, 8 e 9, como associado à molécula adaptadora TIRAP (de *TIR domain-containing adaptor protein*) como é o caso dos TLR 2/1, 2/6 e 4 (Fig. 2).

Há ainda uma via independente do MyD88 que é usada pelo TLR 3 e 4. Esta usa o domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN beta (Trif de *TIR domain-containing adapter inducing IFN beta*). O TLR4 utiliza o Trif através da molécula adaptadora relacionada com o Trif (TRAM de *Trif related adapter molecule*).

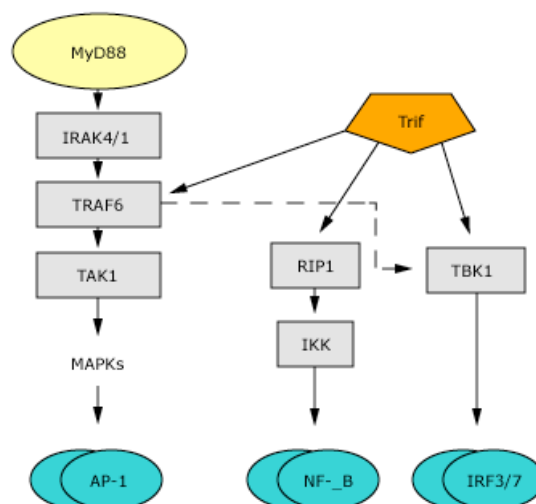


Fig. 5 - Vias de sinalização das moléculas adaptadoras MyD88 e Trif. (Bonilla, 2008)

A via dependente de MyD88 liga-se às MAPK (de *mitogen activated protein kinase*) através de IRAK 1 e 4 (IRAK de *interleukin-1 receptor associated kinase*), TRAF6 (de *tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) e TAK1 (de *transforming growth factor beta activated kinase 1*), culminando com a activação da AP-1. Esta controla inúmeros genes associados à sobrevivência celular, activação e proliferação.

O adaptador TAK1 pode também levar à activação do inibidor da cinase do NF-κB (IKK de *inhibitor of NF-κB kinase*), com consequente activação do NF-κB. Este é um factor de transcrição que controla expressão de inúmeras moléculas envolvidas no processo inflamatório.

O TRAF6 pode ainda interagir com TBK1 (de *TRAF-family-member-associated NF-κB activator-binding kinase*), que vai activar IRF 3 e 7. O IRF3 dimeriza e entra no núcleo, onde se liga a motivos de elementos de resposta sensíveis ao interferão (ISRE-motifs de *interferon-sensitive response elements*) e induz a expressão de



interferão de tipo I (IFN-alfa e beta), a sintetase de óxido nírico (iNOS) e proteína induzível pelo IFN (IP-10).

Na via independente da MyD88, o adaptador Trif está associado à activação do NF-kB através de RIP1 (de *receptor interacting protein 1*), à activação de AP-1 através de TRAF6 e ainda à activação de IRF3 e 7 pela acção de TBK1.

Nos mamíferos, a sinalização por TLR4 requer a activação de proteínas adaptadoras. As fundamentais na sinalização do TLR4 são a MyD88, TIRAP, Trif e TRAM. A MyD88 recruta a cinase IRAK para o complexo de receptores do TLR4 após estimulação pelo LPS.

A resposta LPS é mediada por duas vias, uma dependente do MyD88 e outra independente do MyD88, sendo que ambas levam à activação de MAP cinases e de NF-kB. A via dependente do MyD88 é fundamental para a resposta inflamatória mediada pelos LPS. O TIRAP tem um papel muito importante na via dependente do MyD88 partilhada pelo TLR2 e TLR4.

5.2.6 - Outros processos mediados pela activação dos TLRs

Como já foi referido anteriormente, através da activação das vias de sinalização desencadeada pela ligação dos PAMP aos TLRs, vai ocorrer a activação de múltiplos factores de transcrição com importante papel no controlo de genes associados à sobrevivência celular, sua activação e proliferação. Nesta parte do trabalho, irei objectivar o papel dos TLRs em alguns processos fisiológicos e patológicos.

A activação dos TLRs em células mononucleares pode potenciar a actividade microbicida das bactérias fagocíticas. Por exemplo, TLR2/1 e TLR2/6, quando activados por componentes da parede de *M. tuberculosis* levam ao desencadear de



mecanismos bactericidas, nomeadamente dependentes do óxido nítrico. (Bonilla, 2008)

A estimulação por produtos microbianos (por exemplo LPS) pode levar à produção de peptídeos antimicrobianos (defensinas) com actividade contra uma grande variedade de patógenos.

A resposta a combinações de TLRs depende das quantidades relativas de TLRs na superfície celular, bem como de outros estímulos e do programa de desenvolvimento da célula alvo.

Por co-evolução dos microrganismos invasores juntamente com o sistema imunitário do hospedeiro, parte das bactérias desenvolveu mecanismos de resistência e formas de escape ao controlo dos TLRs.

Vários estudos tentaram correlacionar mutações em TLRs com a patogénese de algumas patologias, sem conseguir obter conclusões consistentes. Ainda assim, enumero de seguida alguns dos exemplos descritos por Francisco A. Bonilla (2008)

- SIDA - Parece haver uma relação entre a diminuição do título de TLR2 em doentes VIH positivos e evolução para SIDA, comparativamente a doentes não progressores. Os mecanismos concretos continuam desconhecidos.
- Aterosclerose - Vários agentes infecciosos estão associados com a progressão da doença cardíaca aterosclerótica. Placas ateroscleróticas contêm macrófagos que expressam TLR2/1 e TLR4. LDL ligeiramente modificada actua como agonista do TLR4, podendo levar à produção de IL-8.

Há estudos que sugerem que os TLR possam estar implicados no reconhecimento de células *self* e *non-self*, com activação de células



endoteliais, recrutamento e activação de monócitos e macrófagos, com formação de focos inflamatórios que podem levar à formação de placas ateromatosas.

- Alergias - Em alguns estudos foi encontrada associação entre exposição a endotoxinas e formação de complexos com TLR4 que levam à protecção da sensibilização alérgica. Referem ainda que TLR2 interage com ácido lipoteicóico das paredes celulares, levando à inibição da expressão do receptor IgE nos mastócitos.
- Imunodeficiência primária - não existe associação directa com alterações de TLRs. Há estudos com intermediários das vias de sinalização em que ocorre aumento do número de infecções graves (sobretudo por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*) em pessoas com défices de IRAK4. A deficiência de MyD88 foi detectada em crianças com infecções graves recorrentes e/ ou por bactérias piogénicas. As demonstrações químicas e analíticas da deficiência de MyD88 são muito semelhantes à da deficiência em IRAK4, uma vez que fazem parte da mesma via de sinalização. O NEMO (*NF-kB essential modulator*) é fundamental para a activação do NF-kB (é inibidor da cadeia gama de IKK) e é codificado por um gene localizado no cromossoma X. A sua acção é fundamental para o funcionamento correcto do IKK e, consequentemente, da actividade do NF-kB. A sua deficiência impede a transcrição a nível nuclear, bloqueando várias cascatas de sinalização, incluindo todas as iniciadas nos TLRs. Um defeito genético que abula a função do NEMO é letal em homens, provocando em mulheres *incontinentia pigmenti* ou Síndrome de Bloch-Sulzberger, uma doença



cutânea rara com alterações da pigmentação. Se existir função parcial, podem surgir défices imunitários marcados, com aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas em homens e da possibilidade de desenvolvimento de displasias ectodérmicas, uma vez que NF- κ B está associado a etapas do desenvolvimento da pele e anexos.

Gribar et al. sugerem o desempenho de um papel importante pelos TLRs na patologia inflamatória intestinal, na patologia pulmonar (infecciosa e inflamatória) e também nos já referidos casos de ITUs. Khan, et al. sugerem o envolvimento dos TLRs na patogénese da endometriose.

Pensa-se que a própria localização dos TLRs seja importante para a obtenção de respostas com diferentes graus de intensidade. Se os TLR4 em vez de estarem na membrana estiverem no espaço de Golgi, torna-se mais difícil haver interacção entre TLR e LPS. O facto de algumas células poderem passar a expressar os TLR a nível citoplasmático e não na membrana pode ser um mecanismo de hiporesposta a alguns estímulos. A localização dos receptores a nível da membrana apical torna mais provável a sua activação em circunstâncias normais que a nível baso-lateral, onde quase só ocorrerá em situação de doença. (Gribar et al., 2008)

O mesmo autor sugere que a intensidade da sinalização dos TLR a nível epitelial dependa do grau de “stress” sistémico. Em situação basal, as interacções entre bactérias e TLRs desempenharão um papel na regulação de processos que regulam a integridade da barreira (migração, proliferação e apoptose). Em situações de stress sistémico, como hipóxia ou infecção remota, a intensidade da resposta da activação dos TLR pelos PAMPS e DAMPS (de *damage associated molecular patterns*) torna-se exagerada. Isto leva a balança a pender para o lado da lesão da barreira, dificultando a sua reparação e agravando a lesão. A extensão da inflamação



posterior pode depender da activação dos TLRs dos leucócitos e da libertação de moléculas pró-inflamatórias. Em situações em que o equilíbrio possa voltar à homeostasia a inflamação da mucosa não se desenvolve. Por outro lado, quando a extensão da sinalização pelos TLRs é significativa, cria-se um ciclo vicioso com activação de TLRs, libertação de citocinas e inflamação da mucosa. É pois fundamental a manutenção do equilíbrio entre uma resposta inflamatória suficientemente intensa para inibir a agressão externa, mas não tão intensa que o seu efeito se possa revelar deletério para o próprio hospedeiro. Por exemplo, a nível renal, uma resposta inflamatória em excesso pode provocar lesões renais irreversíveis, com posterior desenvolvimento de insuficiência renal.

5.3 - Proteína de Tamm-Horsfall (THP)

5.3.1 - O que é?

A proteína de Tamm-Horsfall ou uromodulina é a proteína mais abundante da urina dos mamíferos. É produzida exclusivamente na porção espessa do ramo ascendente da ansa de Henle, sendo segregado para a urina, após clivagem do seu precursor. Vários estudos relatam o seu envolvimento em várias patologias infecciosas que afectam o rim.

Na sua constituição entra um conjunto muitíssimo variado de oligossacarídeos, que possibilitam que se ligue a vários tipos de receptores diferentes.

A deposição anormal de THP pode levar à formação de cálculos renais. Em situações de rejeição aguda de rins transplantados, foram encontrados cálculos de THP envolvidos por infiltrados mononucleares semelhantes aos observados no rim do mieloma. (Saemann, et al., 2005)



A THP constitui um factor de defesa do hospedeiro em infecções contra *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. (Raffi et al., 2009)

A ocorrência de mutações no gene que codifica a THP origina duas doenças autosómicas dominantes: a nefropatia hiperuricémica juvenil familiar e a doença renal quística medular tipo2. (Rose & Post, 2004). Pensa-se que estas mutações possam estar também associadas com a doença glomerulocística renal.

5.3.2 - Como actua e quais os efeitos da sua activação?

A sua função fisiológica não é totalmente conhecida, mas pensa-se que possa estar associada com a sua capacidade de estimular o sistema imune inato, recrutando ainda componentes do adquirido.

O fluxo de urina é mais eficaz em eliminar bactérias em suspensão na urina que as bactérias aderentes ao urotélio. Por este motivo, factores solúveis que possam ligar-se a bactérias, impedindo a sua adesão ao urotélio (e facilitando a sua eliminação), têm importância particular. A THP liga-se preferencialmente às fimbrias Tipo1 das UPEC, diminuindo a adesão destas ao urotélio, que como já vimos constitui o primeiro passo no desenvolvimento da infecção.

Saemann, et al. demonstram que a THP activa células dendríticas (DC) mielóides via TLR4, adquirindo estas um fenótipo de célula dendrítica madura. Além disso, a THP desencadeia sinalização típica dos TLRs, que culminam com a activação do NF-κB. Os mesmos autores afirmam ainda que são encontrados sistematicamente no sangue periférico de doentes com nefrite intersticial e ITUs anticorpos anti-THP.

O papel pró-inflamatório da THP foi demonstrado através da sua acção no desencadear da indução de moléculas inflamatórias em monócitos e granulócitos. Foi



também demonstrado o seu papel como importante protector anti-bacteriano do hospedeiro, uma vez que ratos THP *knockout* eram muito susceptíveis a ITU severas e com atingimento renal e não conseguiam desenvolver anticorpos anti-THP nem citocinas pró-inflamatórias.

Pensa-se ainda que a THP possa actuar como potenciadora de quantidades de LPS (ou outras moléculas) abaixo do limiar de activação do TLR4. Assim sendo, teria um papel anti-bacteriano importante, uma vez que iria potenciar sinais de perigo oriundos de microrganismos que estivessem a invadir o tracto urinário, podendo assim ser gerada uma resposta imune apropriada por parte do hospedeiro.

Scherberich e Hartinger são da opinião de que a THP se liga às fímbrias tipo 1 das *E. coli*, activando a cascata do complemento e células dendríticas.

Saeman et al., obtiveram resultados muito importantes no seu estudo em que demonstram que a THP liga a imunidade inata à adquirida, num processo dependente de TLR4. A saber:

1. THP induz a maturação fenotípica de DC derivadas de monócitos humanos - Células dendríticas expostas a THP durante 48h passaram a apresentar os marcadores de maturação CD83 e CD25. Este padrão de maturação é o mesmo provocado pela exposição a LPS.
2. Consequências funcionais da maturação de DC induzida por THP - DCs adultas são capazes de desencadear estimulação potente de células T. As células dendríticas imaturas, após exposição a THP também conseguiam activar células T, com produção subsequente de IL-2 e INF-gama.
3. THP induz a activação de p38-MAPK, ERK-1/2 e Akt - A maturação de DC está associada à fosforilação de diferentes tirosina-cinases, incluindo



ERK, p38 e Akt. A adição de THP às DC imaturas levou à produção destas cinases em 15 a 30 minutos.

4. THP activa a via de sinalização do NF-kB em DC imaturas.
5. Envolvimento do TLR4 nos efeitos imunoestimulatórios da THP - O facto de os padrões de activação do THP e do LPS serem sobreponíveis, levanta a possibilidade de um papel para a sinalização por TLR nos efeitos imunoestimuladores exercidos pelas THP. Por exemplo, a inibição da TIRAP (que desempenha papel fundamental nas vias de sinalização dos TLR 1, 2, 4 e 6) leva à diminuição de produção de citocinas induzida pela THP em ratos. Num estudo em que DC foram incubadas com anticorpos anti-TLR4, observou-se uma diminuição marcada da produção de citocinas.
6. Produção de citocinas diminuída após estimulação por THP em ratos *TLR4-null* e *MyD88-null*, mas não em ratos *TLR2* ou *TLR9-null* - Para obter evidências da activação dos TLR na sequência da activação pela THP, foi feito estudo com macrófagos derivados da medula de ratos *wild type* (WT) e *MyD88*, *TLR 2*, *4* e *9 null*. A THP estimulou potentemente a produção de TNF-alfa em ratos WT e *TLR2* e *9 null*, ao passo que as células de ratos *TLR4-null* e *MyD88-null* eram resistentes aos estímulos do THP ou LPS. A conclusão que se pode retirar é a de que a indução de produção de citocinas pela THP ocorre por um mecanismo dependente do TLR4.

Segundo Weichhart et al., a ablação do gene da THP propicia o aparecimento de infecções graves em modelos de ITUs.



5.4 - Interação entre imunidade inata e adquirida

A activação da imunidade adquirida requer que células apresentadoras de antígenos como os macrófagos e as células dendríticas expressem moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e que produzam citocinas pro-inflamatórias (IL-12). (Saemann, et al., 2005)

Quando o TLR4 reconhece LPS na superfície de macrófagos ou de células dendríticas, leva à produção de citocinas pela via dependente do MyD88/ TIRAP e de moléculas co-estimuladoras através da via Trif/ TRAM, disponibilizando os componentes necessários à activação de linfócitos T *helper* da imunidade adquirida.

Quando são apresentados antígenos às células T *helper* naíves por células apresentadoras de antígenos, as células T dividem-se em 2 sub-tipos, T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2).

As células Th1 segregam Interferão gama que promove principalmente a imunidade celular, ao passo que as células Th2 segregam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e promovem sobretudo imunidade humoral (Fig. 6).

Está demonstrado que doenças auto-imunes como Doença de Crohn ou esclerose múltipla estão associadas a uma resposta Th1 muito exuberante, ao passo que as doenças alérgicas estão relacionadas com uma resposta Th2 anormalmente elevada. (Khan, et al., 2009)

Pode ser a resposta inata a modular a via a seguir. Ratos MyD88 deficientes tendem a evoluir no sentido Th2, ao passo que a activação do TLR4 pelos LPS estimulam uma actividade Th1. Este facto sugere que a via (por defeito) seguida nos casos de ausência da sinalização pela via dependente do MyD88 é a Th2.

O conhecimento integrado da imunidade adquirida e inata pode vir a abrir novos horizontes terapêuticos para doenças infecciosas, alérgicas e auto-imunes.

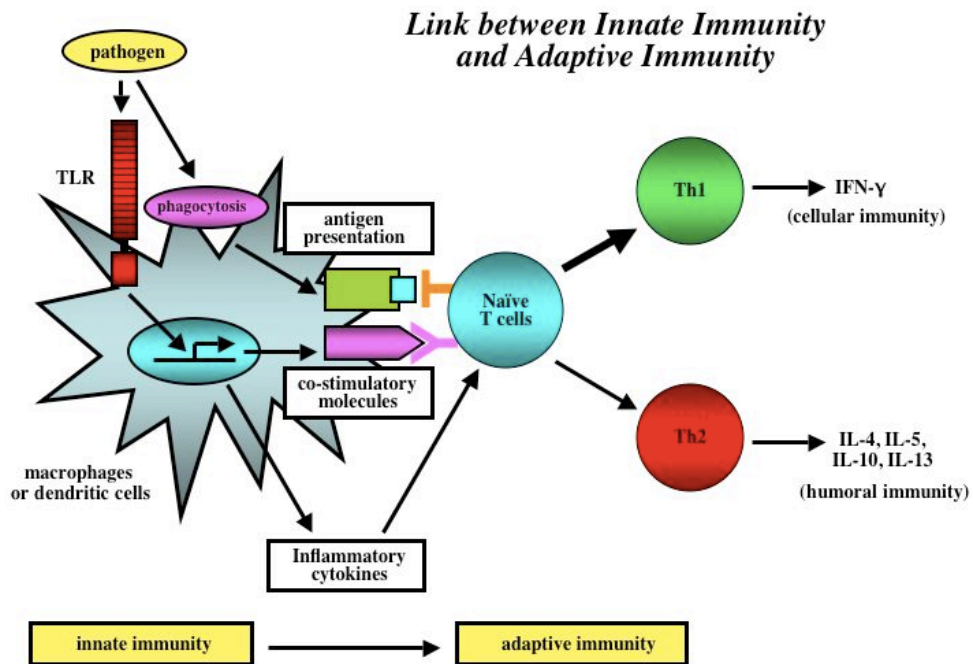


Fig. 6 - Ligação entre imunidade inata e adquirida. (Khan, et al., 2009)



6 - Perspectivas de futuro?

Tendo em conta a importância da sinalização por TLR no desenvolvimento da inflamação das mucosas, entende-se que haja um grande interesse no desenvolvimento de agentes que possam interferir nos processos de sinalização dos TLR. A possibilidade de criar novos anti-inflamatórios de acção tópica a nível pulmonar, intestinal ou urinário através de inalação, ingestão ou instilação, respectivamente, são hipóteses de futuro.

6.1 - Utilização terapêutica de agonistas e antagonistas de TLR e THP

As utilizações que se imagina vir a ser possível dar a estas descobertas são vastíssimas. Nesta última parte do trabalho, irei referir alguns exemplos avançados por grupos de estudo.

Num modelo em ratos, (Meyrier, 2007) os animais vacinados contra uma adesina FimH desenvolveram anticorpos que impediram a ligação da *E. coli* a células vesicais humanas *in vitro* e reduziram a colonização vesical em mais de 90%. O mesmo estudo refere estar uma vacina em desenvolvimento.

Walter E. Stam refere já ter sido tentada uma vacina baseada na adesina TipoI e proteínas acompanhantes mas sem sucesso em humanos, uma vez que a produção de anticorpos na urina foi muito reduzida.

Gribar et al. levantam a possibilidade de realizar manipulação terapêutica da sinalização dos TLR em situações de inflamação das mucosas. Segundo os autores, estudos com metade lipídica A do LPS (AGP – *aminoalkyl glucosaminide phosphates*) demonstram diminuir a resposta inflamatória em modelos de sépsis induzida por *Listeria monocytogenes*, em modelos de infecção respiratória após inalação de vírus *influenza* e em modelos murinos de doença inflamatória intestinal.



Outra alternativa sugerida por este grupo seria a de produzir TLR solúveis, que iriam ligar a ligantes circulantes, diminuindo o número de ligantes livres disponíveis para desencadear estímulo nos TLR epiteliais e diminuindo assim a resposta inflamatória.

Scherberich e Hartinger defendem que o uso de agonistas e antagonistas de TLRs oferecem uma oportunidade para o desenvolvimento de drogas baseadas em TLRs. Uma vez que vários ligantes sintéticos conseguem activar TLRs envolvidos na resposta imune celular, doentes com défices de TLRs e ITUs de repetição podem ser tratados com moduladores da função de TLR por forma a ultrapassar as suas deficiências nos mecanismos da imunidade. Os mesmos autores, pensam que venha a ser possível utilizar os agonistas de TLRs associados a fármacos para potenciar a sua acção na eliminação de bactérias. Por outro lado, os fenómenos de hiperinflamação e sépsis, poderiam ser controlados com o uso de antagonistas dos TLRs.

Os agonistas e antagonistas dos TLRs podem influenciar a resposta imune do hospedeiro, podendo alguns destes ajudar a ultrapassar défices imunitários intrínsecos, constituindo novas alternativas terapêuticas para as ITUs.

Estudos referidos por Song e Abraham, demonstram que a imunidade adquirida é eficaz no tracto urinário e que vacinas constituídas por bactérias mortas ou por factores de agressividade das bactérias podem evocar imunidade protectora contra ITUs. Estes autores acrescentam ainda que tendo em conta o crescente número de resistências a antibióticos e sua consequente ineficácia, a modulação da imunidade inata e adquirida no tracto urinário utilizando ligantes do TLR4 e outros imunomoduladores pode vir a ser uma alternativa viável no tratamento das ITUs.

Francisco Bonilla, no seu trabalho sobre TLRs dá conta de vários métodos terapêuticos (em patologias diferentes das ITUs) introduzidos recentemente ou em



desenvolvimento e que se baseiam no conhecimento do funcionamento dos TLRs.

Nomeadamente:

- Agonistas de TLR7 - Podem ser utilizados no atraso de crescimento de patologias neoplásicas e inibição de replicação viral. Um exemplo é o Imiquimod, agonista sintético do TLR7 usado no tratamento do carcinoma de células basais e em queratoses. Outro exemplo é o da Isatoribina, agonista sintético do TLR7 que diminui a carga viral em doentes com Hepatite C crónica. O último exemplo tem, contudo, efeito anti-viral modesto.
- Vacinação - Vacina da Hepatite B associada a oligodesoxinucleótidos (ODN) leva a um aumento mais rápido e a valores mais elevados do título dos anticorpos de superfície da hepatite B. Desta associação resultou também uma maior incidência de efeitos adversos leves a moderados.
- Terapêutica anti-neoplásica - ODN contendo motivos CpG estão a ser estudados neste tipo de tratamentos. Foram administrados em associação com rituximab, tendo-se obtido um aumento do nível de mRNA de genes induzíveis pelo interferão.
- Imunoterapia de alérgenos - ODN associados a alérgenos podem ser uma hipótese de tratamento da doença atópica. Os resultados obtidos demonstraram uma mudança do perfil de secreção de citocinas pelas células T do sangue periférico de Th2 para Th1 num dos estudos e uma melhoria significativa das queixas dos doente noutra.



7 - Conclusões

Este trabalho apresentou-se para o autor como um enorme desafio, uma vez que o seu conhecimento das principais moléculas intervenientes na interacção entre hospedeiro e agressor era muito reduzido. Por este motivo, veio-se a revelar extremamente proveitoso, por ter permitido um melhor e muito mais profundo conhecimento destes mecanismos de um modo geral e, mais particularmente, dos subjacentes ao desenvolvimento das infecções urinárias.

Nos dias que correm, a quantidade de informação científica facilmente acessível é cada vez maior. Por este motivo, a escolha correcta dos artigos foi uma das maiores dificuldades sentidas pelo autor, sobretudo na fase inicial em que a maioria da informação constituía novidade e o caminho a seguir ainda não estava totalmente definido. Após a consulta das fontes de informação de referência e uma vez concluída a familiarização com os principais intervenientes da interacção hospedeiro-agressor a nível molecular (adesinas bacterianas, TLRs, THP e principais citocinas) as dificuldades foram-se tornando menores.

As ITUs vão continuar a ser uma das patologias mais comuns da prática clínica diária. Os seus agentes etiológicos são conhecidos, os factores de agressividade destes estão identificados, mas ainda há muito para aprender sobre a forma como o hospedeiro lhes consegue fazer frente e os eliminar ou, por outro lado, o que faz com que os agentes agressores se consigam evadir das defesas do hospedeiro.

Um conhecimento ainda mais aprofundado do funcionamento de TLRs e THP, seu papel nos processos inflamatórios/ infecciosos, seus activadores e inibidores irá certamente permitir colocar ao dispôr dos clínicos novas e ainda mais potentes terapêuticas para o controlo das infecções urinárias, bem como de outras patologias já referidas. Mais que isso, permitirá actuar a nível da prevenção de várias entidades



nosológicas, uma vez que possibilitará conhecer os elementos da população com maior propensão para desenvolver determinadas patologias.

O facto de se imaginar a utilização destes conhecimentos para ultrapassar o cada vez mais preocupante problema da resistência de microrganismos a antibióticos é sem dúvida um motivo para encarar com optimismo o futuro próximo.

Este trabalho evidenciou ainda a importância da proximidade entre a actividade clínica e de investigação para uma compreensão mais completa de várias patologias e não de apenas um dos seus vários pontos de vista.



8 - Bibliografia

- 1 - Billips, B., Forrestal, S., Rycyk, M., Johnson, J., Klumpp, D., & Schaeffer, A. (2007). Modulation of Host Innate Immune Response in the Bladder by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* , 75, 5353-5360.
- 2 - Bonilla, F. (2008, Outubro 10). Toll-like receptors. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 3 - Chowdhury, P., Sacks, S., & Sheerin, N. (2004). Minireview: functions of the renal epithelium in coordinating the innate immune response to infection. *Kidney Int* , 66, 1334-1344.
- 4 - Chowdhury, P., Sacks, S., & Sheerin, N. (2006). Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products. *Clinical and Experimental immunology* , 145, 346-356.
- 5 - Dou, W., Thompson-Jaeger, S., Laulederkind, S., Becker, J., Montgomery, J., Ruiz-Bustos, E., et al. (2005). Defective expression o Tamm-Horsfall protein/uromodulin in COX-2-deficient mice increases their susceptibility to urinary tract infections. *Am J Physiol - Renal Physiol* , 289, F49-F60.
- 6 - Fekete, T. (2008, Novembro 24). Urinary tract infection associated with indwelling bladder catheters. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 7 - Fekete, T., & Hooton, T. (2008, Julho 15). Approach to the adult with asymptomatic bacteriuria. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 8 - Gribar, S., Richardson, W., Sodhi, C., & Hackam, D. (2008). No longer an Innocent Bystander: Epithelial Toll-Like Receptor Signaling in the Development of Mucosal Inflammation. *Mol Med* , 14, 645-659.
- 9 - Hooton, T., & Stamm, W. (2008, October 21). Acute cystitis and asymptomatic bacteriuria in men. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 10 - Hooton, T., & Stamm, W. (2009, Janeiro 26). Acute cystitis in women. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 11 - Khan, K., Kitajima, M., Hiraki, K., Fujishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T., et al. (2009). Toll-like receptors in Innate Immunity: Role of Bacterial Endotoxin and Toll-Like Receptor 4 in Endometrium and Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest 2009* , 68, 40-52.
- 12 - Liptáková, A., Podracká, L., & Siegfried, L. (2007). Urinary tract infections in children caused by uropathogenic strains of *Escherichia coli* and the role of the innate immune response mediated by the toll-like receptor 4 and antimicrobial peptide cathelicidin in their clinical course. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* , 56, 72-77.
- 13 - Manuila, L., Manuila, A., Lewalle, P., & Nicoulin, M. (2004). *Dicionário Médico* (3ª ed.). (J. Alves, Trans.) Lisboa: Climepsi Editores.
- 14 - Mark, R., & Kuo, H. (2006). Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Curr Opin Pediatr* , 18, 148-152.
- 15 - Meyrier, A. (2007, Julho 31). Bacterial adherence and other virulence factors for urinary tract infection. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com



- 16 - Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., & Pfaller, M. (2002). *Medical Microbiology* (4th edition ed.). Mosby.
- 17 - Raffi, H., Bates Jr, J., Laszik, Z., & Kumar, S. (200'). Tamm-Horsfall Protein Protects Against Urinary Tract Infections by *Proteus mirabilis*. *The Journal of Urology* , 181, 2332-2338.
- 18 - Ragnarsdóttir, B., Fischer, H., Godaly, G., Gronberg-Hernandez, J., Gustafsson, M., Karpman, D., et al. (2008). TLR and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of urinary tract infections. *Eur J Clin Invest* , 38 Suppl, 12-20.
- 19 - Rose, B., & Post, T. (2004, Abril 12). Chapter 4E: Tamm-Horsfall mucoprotein. Retrieved from Up To Date: www.uptodate.com
- 20 - Saemann, M., Weichhart, T., Horl, W., & Zlabinger, G. (2005). Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur J Clin Invest* , 35, 227-235.
- 21 - Saemann, M., Weichhart, T., Zeyda, M., Staffler, G., Schunn, M., Stuhlmeier, K., et al. (2005). Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor 4 dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation* , 115, 468-475.
- 22 - Scherberich, J., & Hartinger, A. (2008). Impact of Toll-like receptor signalling on urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents* , 31 Suppl, S9-S14.
- 23 - Song, J., & Abraham, S. (2008). Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *Eur J Clin Invest* , 38, 21-28.
- 24 - Stamm, W. (2006). Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* , 117, 75-84.
- 25 - Svanborg, C., Bergsten, G., Fischer, H., Frendeus, B., Godaly, G., Gustafsson, E., et al. (2001). The "innate" host response protects and damages the infected urinary tract. *Ann Med* , 33, 563-570.
- 26 - Svanborg, C., Bergsten, G., Fischer, H., Godaly, G., Gustafsson, M., Karpman, D., et al. (2006). Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol* , 9, 33-39.
- 27 - Vandewalle, A. (2008). Toll-like Receptors and Renal Bacterial Infections. *Chang Gung Med J* , 31, 525-537.
- 28 - Weichhart, T., Zlabinger, G., & Saemann, M. (2005). The multiple functions of Tamm-Horsfall protein in human health and disease: a mystery clears up. *Wien klin Wochenschr* , 117, 316-322.
- 29 - Wullt, B., Bergsten, G., Fischer, H., Godaly, G., Karpman, D., Leijonhufvud, I., et al. (2003). The host response to urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* , 17, 279-301.