



ESTUDO DA EXPRESSÃO DE TLR4 EM MUCOSA DE RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS POR RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA



Luiza Manhezi de Freitas Oliveira¹; Claudio Saddy Rodrigues Coy²; Raquel Franco Leal³

¹ Acadêmica da XLVI turma de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, ² Orientador, ³ Co-orientadora

Serviço de Coloproctologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O epitélio intestinal atua como uma barreira imunológica contra bactérias e antígenos dos alimentos; dentre os mecanismos de proteção do epitélio, destaca-se o reconhecimento de antígenos por receptores proteicos de membrana. Uma importante classe de receptores é a família dos *toll-like receptors* (TLR) - proteínas expressas predominantemente em células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas. Há dois subtipos de TLRs: os receptores de membrana (TLRs 2, 4, 5 e 11) e os receptores localizados em compartimento endossomal (TLRs 3, 7, 8 e 9). Cada um deles está envolvido na detecção de padrões moleculares associados a antígenos (PAMPs), estruturas importantes na diferenciação do que é 'próprio' ou 'não-próprio' ao organismo. Os TLRs também se destacam nas reações inflamatórias, agindo como intermediários entre as respostas imunes inatas e as adaptativas¹⁻⁴.

O TLR4, receptor de membrana presente em macrófagos, células dendríticas e epiteliais, reconhece lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos na luz intestinal e desencadeia a atividade transcricional do NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias⁵⁻⁷. Entretanto, o aumento da expressão de TLR4 parece estar associado ao processo inflamatório que ocorre na retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), doença inflamatória intestinal crônica, mesmo na ausência do reconhecimento de um patógeno bacteriano^{5,6,8-10}.

A figura 1 apresenta a complexa cadeia de eventos que culminam com a transcrição do NF- κ B após o reconhecimento de antígenos bacterianos pelo TLR4.

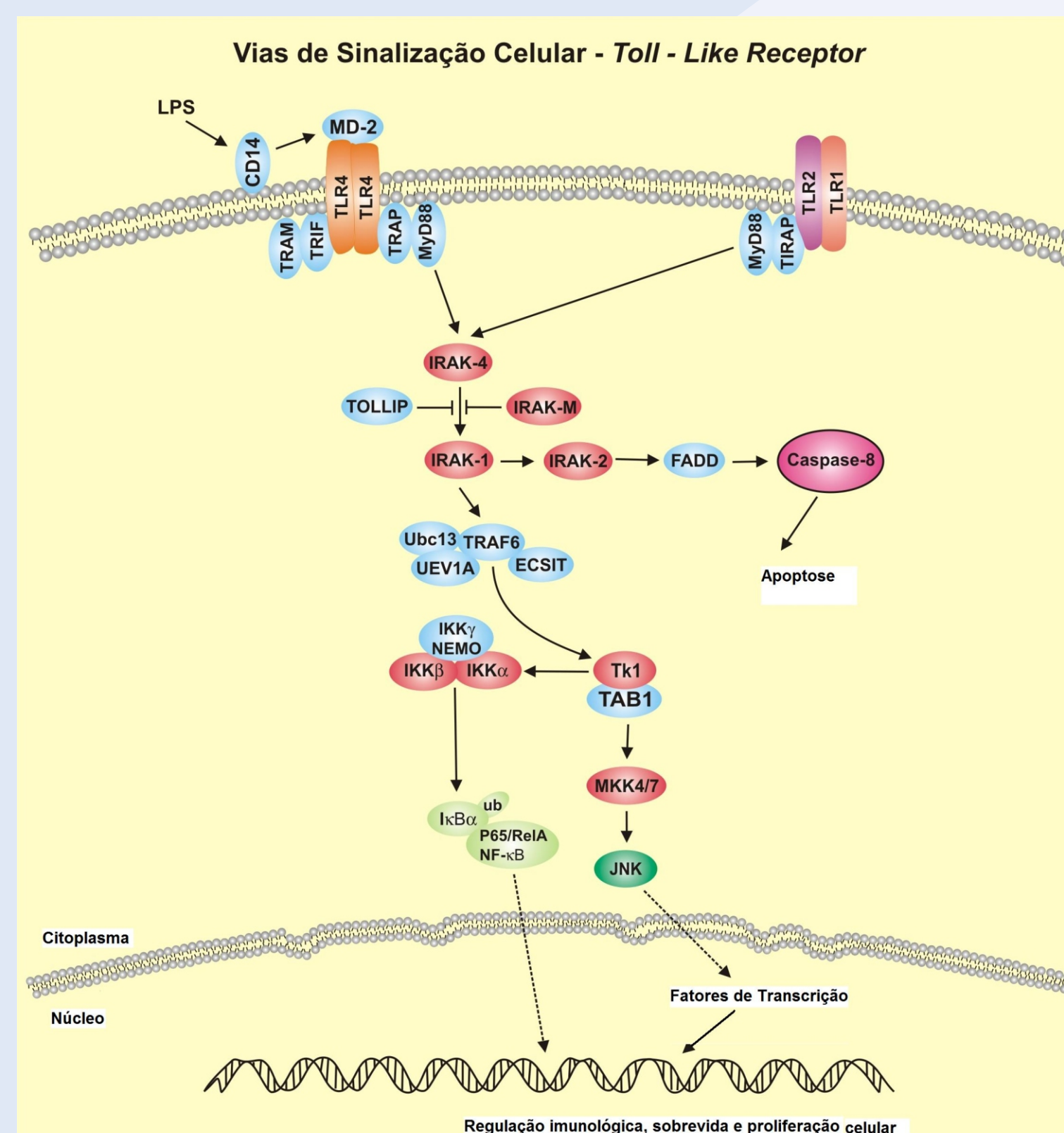


Figura 1 - Vias de sinalização celular do Toll-like receptor 4, em resposta à presença de LPS.

A retocolite total com anastomose do reservatório ileal (RI) ao canal anal é a cirurgia de escolha para pacientes com RCUI refratária a tratamento clínico e para polipose adenomatosa familiar (PAF) com pólipos retais^{11,12}. Uma das complicações mais comuns em doentes com RCUI após serem submetidos à cirurgia é a ileíte do reservatório (IR), intercorrência rara em pacientes com PAF^{5,13}. O aparecimento da ileíte do reservatório pode estar associado à alteração da expressão de TLR4 em células intestinais desses pacientes. A etiologia da IR é desconhecida, no entanto, está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β e também de fatores de sinalização nuclear do TNF- α , como o STAT-1, encontrado mais comumente na mucosa cólica com RCUI ativa^{14,15}. A raridade da IR entre os doentes com PAF tem levado os pesquisadores a postularem que a etiologia dessa afecção envolveria a reativação da RCUI. Alguns doentes com esta complicação apresentam até mesmo manifestações extra-intestinais da RCUI, de forma semelhante aos períodos de maior atividade da doença antes da intervenção cirúrgica¹⁴.

O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão da proteína TLR4 em biópsias de mucosas de RI endoscopicamente normais de doentes operados por RCUI e PAF, por meio de extrato protéico e imunoblot, comparando com mucosa de íleo distal normal.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

As biópsias da mucosa dos RI foram coletadas por endoscopia (Figura 2) de doze pacientes que haviam sido submetidos a retocolite total e anastomose íleoanal com confecção do RI (Figura 3), sendo seis portadores de RCUI (Tabela 1) e seis portadores de PAF (Tabela 2) assintomáticos no momento do procedimento. Selecionaram-se também biópsias de íleo distal endoscopicamente normal de seis doentes submetidos à colonoscopia por outros motivos para compor o grupo controle (Tabela 3). As coletas das biópsias foram realizadas no Serviço de Colonoscopia do Gastrocentro - UNICAMP. As amostras estavam congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C; as expressões de TLR4 foram avaliadas por meio de imunoblot de extrato protéico total; fez-se o processamento das amostras e a eletroforese em gel de poliacrilamida, com leitura das bandas protéicas nas auto-radiografias das membranas de nitrocelulose. Os resultados foram notificados como média com variação do erro padrão. Foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Teste de Tukey-Kramer). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

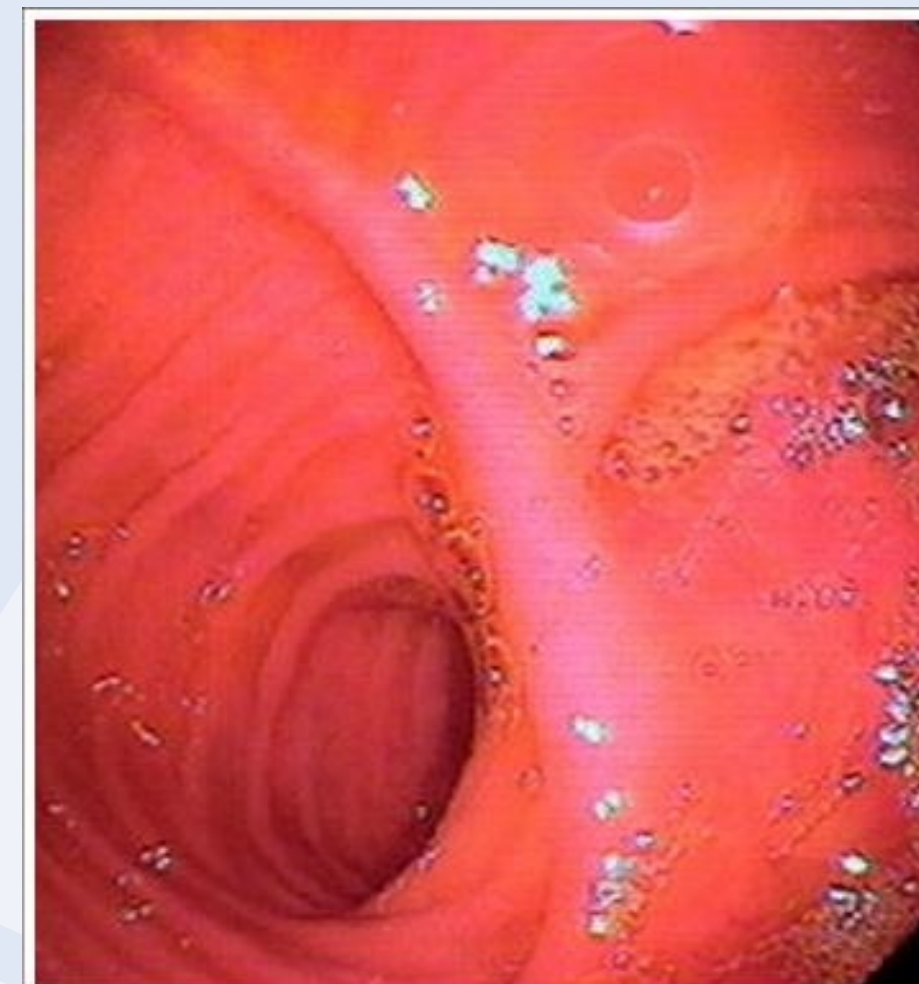


Figura 2 - Aspecto endoscópico de mucosa normal de RI.

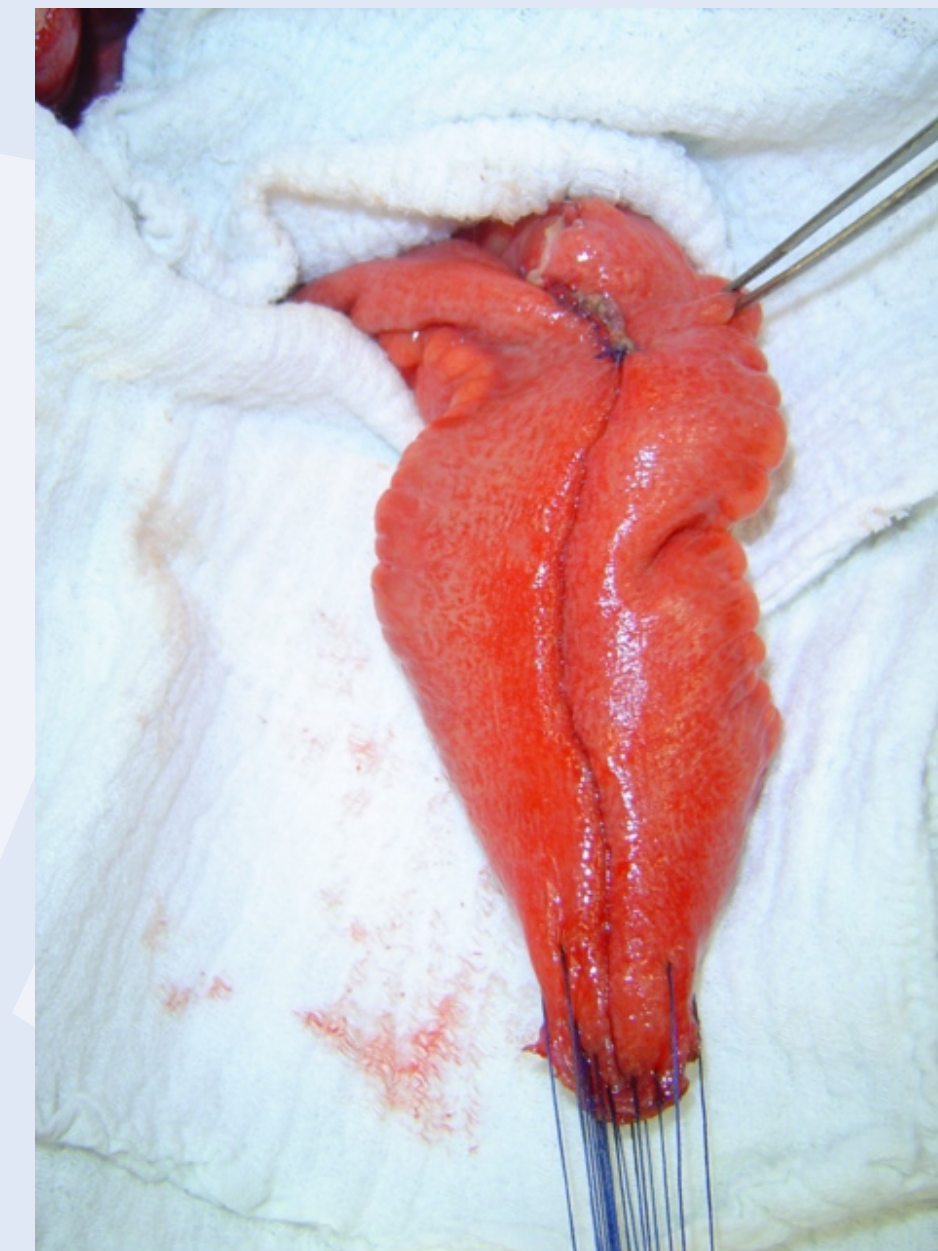


Figura 3 - Aspecto cirúrgico do RI.

Tabela 1 - Grupo RCUI

Doentes	Idade	Sexo	Indicação da cirurgia	Tempo pós-operatório (meses)	Tempo pós-fechamento ileostomia (meses)
1 - JSN	48	M	displasia de alto grau	120	108
2 - INB	55	F	megacólon tóxico	168	144
3 - JS	63	M	displasia de alto grau	84	72
4 - RMGDS	48	F	megacólon tóxico	60	55
5 - CSS	36	F	intratabilidade clínica	48	42
6 - FV	53	M	megacólon tóxico	42	30

Tabela 2 - Grupo PAF

Doentes	Idade	Sexo	Indicação da cirurgia	Tempo pós-operatório (meses)	Tempo pós-fechamento ileostomia (meses)
1 - VCH	37	M	polipose	86	82
2 - LRA	33	F	polipose	62	50
3 - JMF	59	M	polipose	86	79
4 - CMSS	21	F	polipose	84	79
5 - RPS	35	M	polipose	72	63
6 - ACB	28	F	Polipose	60	57

Tabela 3 - Grupo controle

Doentes	Idade	Sexo
1 - CRJ	50	F
2 - MLCL	52	F
3 - VPS	70	F
4 - JPR	68	M
5 - CUS	41	M
6 - NM	63	M

RESULTADOS

Houve maior expressão de TLR4 em mucosa de RI de doentes operados por RCUI, quando comparada aos grupos PAF e controle, não havendo, entretanto, diferença significativa na expressão do receptor entre pacientes dos grupos PAF e controle.

Os níveis de expressão da β -actina foram utilizados para normalização dos valores arbitrários para os níveis de expressão do TLR4.

As bandas auto-radiografadas estão ilustradas abaixo na Figura 4.

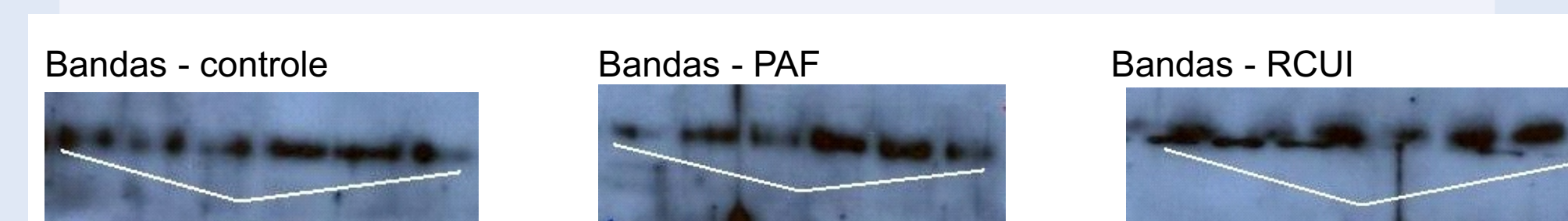


Figura 4

Por meio dos valores obtidos, construiu-se um gráfico que ilustra a diferença na expressão da proteína (após a normalização com a β -actina) entre os 3 grupos de pacientes (Figura 5).

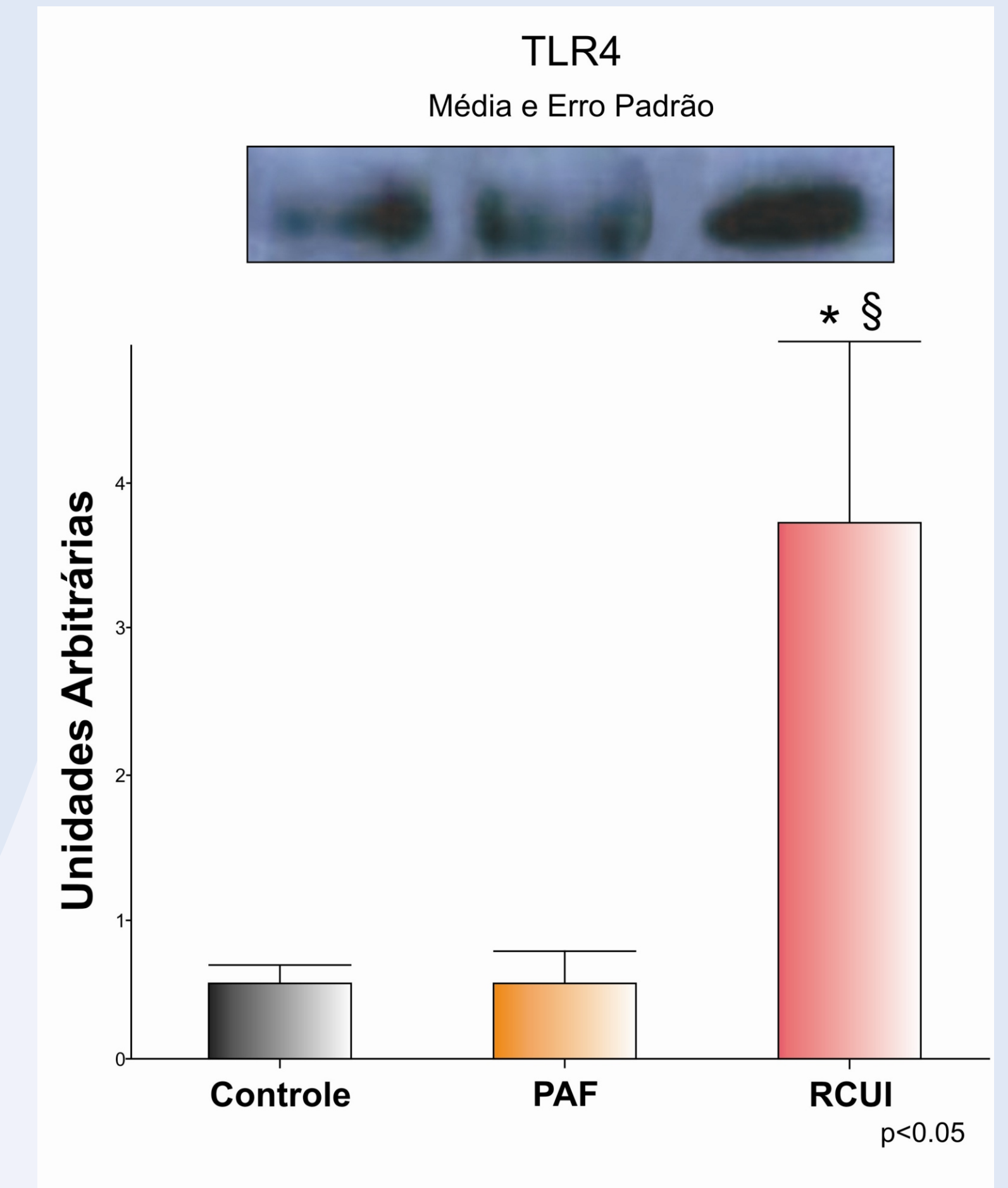


Figura 5 - Expressão de TLR4 nos Grupos Controle, PAF e RCUI. Representa-se uma banda para cada grupo de pacientes. Para todas as condições, n=06, * vs Controle, p<0,05; § vs PAF, p<0,05.

DISCUSSÃO

Apesar de ser a melhor opção terapêutica para a RCUI, a retocolite total com anastomose do RI ao canal anal é uma cirurgia complexa e por isso está associada a alto risco de complicações pós-operatórias inflamatórias e não inflamatórias. As causas mais comuns de morbidade no período pós-cirúrgico são sepse pélvica, diagnóstico de doença de Crohn no RI e IR crônica⁶. A IR, que ocorre em aproximadamente 30% dos casos operados, é uma das afecções do RI de tratamento mais desafiador^{6,16}. A IR surge de alterações na microflora luminal, o que leva também a uma resposta imune da mucosa em hospedeiros geneticamente susceptíveis⁶.

A atuação dos TLRs pode ser considerada o gatilho para a secreção de peptídeos antibacterianos, além de estabelecer elo entre as respostas imune inata e adaptativa, no processo que ocorre na mucosa intestinal, resultando na quimiotaxia de células do sistema imunológico para a lâmina própria da região afetada^{4,10}.

Os LPS presentes no lúmen intestinal sadio são geralmente bem tolerados mesmo em quantidades elevadas; essa tolerância pode resultar de uma diminuição da expressão de TLR4, o que minimiza o seu reconhecimento pelas células da mucosa. Porém, em pacientes com RCUI essa tolerância aos antígenos bacterianos é afetada, pois há um aumento da expressão do receptor, com consequente hiper-responsividade à presença de bactérias intraluminais, o que ocasiona a inflamação da mucosa¹⁷.

O esclarecimento sobre a expressão de TLR4 em mucosa de RI é, portanto, de grande importância para a elucidação da etiologia da IR, o que poderia estar relacionada à reativação da RCUI na mucosa do RI.

O presente estudo avaliou a expressão de TLR4 na mucosa de RI de pacientes submetidos à retocolite total por RCUI, mas que estavam assintomáticos no momento da coleta da biópsia. Ao comparar a expressão da proteína desses pacientes com aquelas do grupo PAF e controle, notou-se significativo aumento da expressão de TLR4 em mucosa de RI de pacientes operados por RCUI, o que pode explicar a influência de antígenos bacterianos como coadjuvantes do processo inflamatório inicial na mucosa do RI, mesmo em doentes assintomáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Liu, G, Zhang, L, Zhao, Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Brit Soc Immunol. Clinical and Experimental Immunology* 2010;168-175.
- Kawai, T, Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009; 21:317-37.
- Akira, S, Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85-95.
- Passare, C, Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560:11-18.
- Medzhitov, R, Janeway, CJ. The toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000;8:452-456.
- Hornel, MW, Frisan, T, Vandewalle, A et al. Toll-like receptor-4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2002; 195:559-570.
- Watanabe, T, Higashi, K, Kobata, A et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut* 2008;57:181-187.
- Cario, E, Podolsky, D. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7017.
- MKoma, AE. Serum biochemical evaluation of patients with functional pouches ten to 20 years after restorative proctocolectomy. *Int J Colorectal Dis* 2006;21(7):711-20.
- Kiehne, K, Brunke, G, Wegner, F et al. Defensin expression in chronic pouchitis in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis coli. *World J Gastroenterol* 2006;21(12):1055-1062.
- Leal, RF, Ayizono, M, S, Milanski, M et al. Atividade inflamatória em mucosa de reservatório ileal na polipose adenomatosa familiar e retocolite ulcerativa inespecífica. Avaliação da expressão de TNF- α e IL-1 β e da ativação do NF- κ B. *Rev Bras Coloproct* 2007;26(4):399-405.
- Gionchetti, P, Campieri, M, Belluzzi, A et al. Mucosal concentration of interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in pelvic ileal pouches. *Dig Dis Sci* 1994;39:1526-1531.
- Holubar, SD, Cima, RR, Sandborn, WJ et al. Treatment and prevention of pouchitis after ileal-pouch anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Jun 16;CD001176.
- Nomura, F, Akashi, S, Sakao, Y et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with downregulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-9.