



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

NOME DO AUTOR

EMILIA MARIA MEDEIROS DE ANDRADE

TÍTULO DO TRABALHO

Associação de polimorfismos nos genes de
receptores *toll like* (TLRs) com atopia e asma em
crianças da cidade de Salvador, Bahia

SALVADOR - BAHIA

2015

EMILIA MARIA MEDEIROS DE ANDRADE

**Associação de polimorfismos nos genes de receptores *toll*
like (TLRs) com atopia e asma em crianças da cidade de
Salvador, Bahia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Neuza Maria Alcântara Neves
Co-orientadora: Camila Alexandrina Viana Figueiredo

Salvador, Bahia

2015

Dedico este pequeno passo da minha estrada acadêmica àqueles que formam o símbolo da persistência e luta pelos sonhos, a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e ao Universo por possibilitar esta oportunidade única de ingressar na carreira acadêmica.

Agradeço aos meus pais, por terem me incentivado a buscar o que acredito e ter ensinado o significado da palavra ética e luta, e aos meus irmãos Fernando e Joana por todo apoio dado, mesmo estando à distância.

Aos avós, tios e primos que torcem pelo meu sucesso, em especial a agradeço a Tia Neta, uma segunda mãe, sempre participativa durante a minha caminhada.

Agradeço especialmente ao meu marido Teodoro, por ter estado presente nos momentos mais difíceis, e ter me incentivado, mostrando-se como exemplo de perseverança e atitude. Ao meu filho, meu maior presente, que mesmo sem saber, colaborou com o seu amor e carinho para o meu engrandecimento.

Agradeço a minha orientadora Neuza Maria Alcântara Neves pela oportunidade dada quando solicitei estágio, e a todo o período de aprendizado; a minha co-orientadora Profa. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, por ter me acolhido no projeto EPIGEN e transformado uma simples conversa em realidade.

Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Maurício Barreto, idealizador e líder do Projeto SCAALA, ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, aos corpos docente e discente, e funcionários. Como também aos Professores Carina e Luis Pacheco pelas colaborações nas reuniões científicas.

Agradeço a Thiago Magalhães e Cíntia Rodrigues por todo o auxílio e colaboração durante a realização do trabalho, como também ao grupo EPIGEN, que compartilha cotidianamente conhecimentos de imunogenética.

Agradeço a toda a equipe que compõem o Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA), em especial, Alana Galvão, Flávia Sena, Eduardo Santos e Samara Teles.

E por fim, agradeço as agências de fomento, CNPq, Capes e Fapesb, que permitem aos brasileiros praticar ciência.

RESUMO

Associação de polimorfismos nos genes de receptores *toll like* (TLRs) com atopia e asma em crianças da cidade de Salvador, Bahia

Os receptores toll like (TLRs) são os principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e conseqüentemente, mediadores e moduladores da resposta imunológica. Os polimorfismos localizados nos genes de alguns dos TLRs têm sido implicados no mecanismo fisiopatológico de desenvolvimento da atopia e asma. O objetivo deste trabalho foi verificar a associação entre a presença de polimorfismos nos genes dos TLRs com atopia e asma, em crianças na cidade de Salvador, Bahia. Foram estudados 160 polimorfismos nos TLRs (TLR1-TLR9) em 1247 crianças com idade entre 4-11 anos residentes na periferia urbana da cidade de Salvador – BA. Para a genotipagem foi utilizado um painel comercial da Illumina Human Omni 2.5-8 Kit BeadChip. Foram realizadas análises de regressão logística bivariada e multivariada entre os polimorfismos de única base (SNPs) e a presença de sibilos, teste de punção cutâneo (SPT) e IgE específica para aeroalérgenos (sIgE) e regressão logística politômica para associação entre os SNPs e os fenótipos de asma; e regressão logística multivariada para avaliar a interação gene-ambiente. Os modelos de regressão logística e análise politômica foram ajustados para sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual. Os polimorfismos nos genes de TLR1 (rs4833095), TLR5 (rs5744165 e rs5744139) e TLR6 (rs5743810, rs1039559 e rs6531673) foram associados com atopia e os SNPs rs4833095 (TLR1) e rs2241097 (TLR5) com o fenótipo de asma não atópica. No estudo da interação gene-ambiente foram associados a atopia, os SNPs: rs7870609 e rs5743701 (TLR2) em soropositivos para o vírus herpes simplex (VHS); rs1879026 (TLR3) em soropositivos para *T. gondii*; rs5743740 (TLR7) em soropositivos para o vírus da hepatite A (VHA) ambos aumentando o risco; *Helicobacter pylori*; rs1013151 (TLR8) foi associado negativamente com atopia. Em relação a asma, o rs1816702 (TLR2) em soropositivos para o VHA foram negativamente associados com a asma, enquanto os soronegativos foram associados ao aumento do risco. Também em soropositivos para HAV, o rs5743740 (TLR7) foi associado com o aumento do risco para desenvolvimento da asma. Além disso, em soropositivos para *H. pylori*, rs5744068 (TLR8) aumentou o risco para asma. Os resultados sugerem a relevância funcional dos polimorfismos da subfamília de TLR2, TLR5 e dos SNPs nos genes dos receptores endossomais (TLR3, TLR7 e TLR8), na atopia e asma, assim como a participação de patógenos nos mecanismos de interação gene-ambiente, modificando a associação dos polimorfismos dos genes dos TLRs na fisiopatologia da atopia e asma na população deste estudo.

Palavras-Chave: SNPs. TLRs. Imunogenética. Atopia. Asma. Interação gene-ambiente. Patógenos..

ABSTRACT

Association of polymorphisms of toll like receptors (TLRs) with atopy and asthma in children in Salvador, Bahia

Toll Like Receptors (TLRs) are the main receptors responsible for the recognition of molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) and consequently important mediator and modulator of immune response. Polymorphisms in genes located TLRs have been implicated in the physiopathological mechanism of atopy and asthma *development*. The aim of this study was to assess the association between the presence of polymorphisms on TLRs and atopy/ asthma in children in the city of Salvador, Bahia. One hundred and sixty polymorphisms were studied in TLRs genes (TLR1-TLR9) in 1,247 children aged 4-11 years living in the urban periphery of Salvador - BA. Genotyping was performed using a commercial panel of Illumina Human Omni 2.5-8 Kit BeadChip. Bivariate analysis (unadjusted) were performed to evaluate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TLRs and the presence of wheezing, skin prick test (SPT) and specific IgE to aeroallergens (sIgE); polytomous logistic regression was performed to see the association between TLRs SNPs and asthma phenotypes; and finally, logistic regression was used to assess gene-environment interaction. The logistic regression models and polytomous analysis were adjusted for sex, age, helminth infection and individual ancestry. Polymorphisms in *TLR1* (rs4833095), *TLR5* (rs5744165 and rs5744139) and *TLR6* (rs5743810, rs1039559 and rs6531673) were associated with atopy, the SNPs rs4833095 (*TLR1*) and rs2241097 (*TLR5*) with non-atopic asthma phenotype. In the gene-environment interaction analysis, were found association with atopy for the following SNPs: rs7870609 and rs5743701 (*TLR2*) in seropositive for herpes simplex virus (HSV); rs1879026 (*TLR3*) in seropositive for *T. gondii*; rs5743740 (*TLR7*) in seropositive for hepatitis A virus (HAV) both increasing the risk; *H. pylori*: rs1013151 (*TLR8*) negatively associated with this atopy. Regarding asthma, rs1816702 (*TLR2*) in seropositive for HAV were negatively associated with asthma, while seronegative were associated with increased risk. Also in case of HAV seropositivity, rs5743740 (*TLR7*) increased the risk for asthma development. In addition, in case of seropositivity to *H. pylori*, rs5744068 (*TLR8*) increased the risk for asthma. The results suggest functional significance of polymorphisms on *TLR2* subfamily, *TLR5* and endosomal receptors (*TLR3*, *TLR7* and *TLR8*) on atopy and asthma, as well as pathogens involved in gene-environment interaction which could all together underlies the pathophysiology of atopy and asthma in the study population.

Keywords: SNPs. TLRs. Immunogenetics. Atopy. Asthma. Gene-environment interaction. Pathogens.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa mundial da prevalência de asma	p. 17
Figura 2: Resposta alérgica das vias aéreas. Células e mediadores envolvidos na asma e na rinite alérgica.	p. 20
Figura 3: Diagrama da ação de Th17 na mediação da inflamação asmática	p. 23
Figura 4: Figura representativa da cascata de sinalização dos TLRs	p. 30
Figura 5: Representação da localização do gene do TLR6 no cromossomo 4	p. 35
Figura 6: Fluxograma apresentando os métodos empregados no estudo	p. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os TLRs e seus principais ligantes fisiológicos e sintéticos	p. 28
Tabela 2 – Frequência das variáveis utilizadas em 1.247 crianças estudadas	p. 48
Tabela 3 - SNPs nos genes dos <i>TLRs</i> significativamente associados com atopia e asma em 1247 crianças estudadas.	p. 49
Tabela 4 - Associação entre os SNPs dos <i>TLRs</i> para atopia e sintomas de asma em 1247 crianças estudadas	p. 50
Tabela 5 - Associação entre os SNPs em <i>TLRs</i> e fenótipos de asma nas crianças estudadas	p. 51
Tabela 6. Interação gene-ambiente. Efeito modificador dos patógenos sobre a associação entre polimorfismos de <i>TLRs</i> e asma	p. 52
Tabela 7. Interação gene-ambiente. Efeito modificador dos patógenos sobre a associação entre polimorfismos de <i>TLRs</i> e atopia (SPT e sIgE)	p. 53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Células apresentadoras de antígenos
Breg	Células B regulatórias
CCL	Quimicima (motivo CC) ligante
CD	Grupo/Agrupamento de diferenciação
CPG ODN	Oligodesoxinucleotídeos CPG
CXCL	Quimiocina (motivo CXC) ligante
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
DNA	Ácido dextrorribonucléico
Fc	Fragmento cristalino
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a região Fc de IgE
FEno	Fração Exalada do Óxido Nítrico
GM-CSF	Fator estimulatório de colônias – granulócitos e monócitos
IgE	Imunoglobulina E
IC	Intervalo de Confiança
IL	Interleucina
ILCs	Células linfoides inatas
iNKTs	Células T <i>natural killer</i> (matadoras naturais) inariantes
IRAK	Cinase associada ao receptor de interleucina-1
ISAAC	The International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LD	Linkage disequilibrium (Desequilíbrio de ligação)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAF	Minor Allele Frequency (Alelo de menor frequência na população)
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear κB
NK	<i>Natural killer</i>
OR	Odds ratio
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PeNSE	Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar

PROAR	Programa Para o Controle da Asma e da Rinite Alérgica
RNA	Ácido ribonucleico
SCAALA	Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America
sIgE	Imunoglobulina E alérgeno-específica
SNPs	Polimorfismos de única base
SPT	Skin prick test (Teste de puntura cutâneo)
STAT5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
TGF - β	Fator de transformação do crescimento β
Th	Linfócito T auxiliary
TIR	Toll/receptor de IL-1
TIRAP	Receptor Toll/interleucina-1 contendo proteína adaptadora
TLRs	Receptores toll like
TLR	Receptor toll like
TRAM	Molécula adaptadora TRIF relacionado
Treg	Linfócito T regulatório
TRIF	Adaptador indutor de interferon β contendo o domínio TIR
<i>TSLP</i>	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> (Linfopoetina tímica stromal)
VHS	Vírus do Herpes Simples
VHA	Vírus da Hepatite A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	p. 15
2.1 Problematização das doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no mundo	p. 15
2.2 Fisiopatologia das doenças alérgicas respiratórias	p. 18
2.3 Da hipótese da higiene e à teoria dos velhos amigos	p. 23
2.4 A Resposta imune inata na atopia e asma	p. 26
2.4.1. Os receptores “ <i>toll like</i> ”	p. 26
2.4.2 Mecanismos de atuação dos TLRs na atopia e asma	p. 31
2.5 Polimorfismos nos genes de receptores <i>toll like</i> e doenças alérgicas	p. 34
2.5.1 Polimorfismos nos genes da subfamília do TLR2	p. 35
2.5.1.1 <i>TLR2</i>	p. 36
2.5.1.2 Heterodímeros TLR1/2 e TLR2/6	p. 36
2.5.2 Polimorfismos no <i>TLR3</i>	p. 37
2.5.3 Polimorfismos no <i>TLR4</i>	p. 37
2.5.4 Polimorfismos no <i>TLR5</i>	p. 37
2.5.5 Polimorfismos no <i>TLR7</i> e <i>TLR8</i>	p. 38
2.5.6 Polimorfismos no <i>TLR9</i>	p. 39
3 HIPÓTESE	p. 40
4 OBJETIVOS	p. 41
4.1 Objetivo geral	p. 41
4.2 Objetivos específicos	p. 41
5 MATERIAIS E MÉTODOS	p. 42
5.1 Caracterização da população de estudo	p. 42
5.2 Inquérito epidemiológico	p. 43
5.3 Inquérito sorológico	p. 43
5.4 Teste de puntura cutâneo, dosagem de IgE e definição de atopia	p. 44
5.5 Parasitológico de fezes	p. 44
5.6 Genotipagem e associação entre polimorfismos nos genes dos	p. 45

TLRs com atopia/asma	
5.7 Análises estatísticas	p. 45
6 RESULTADOS	p. 48
7 DISCUSSÃO	p. 55
8 CONCLUSÃO	p. 67
7 REFERÊNCIAS	p. 68
8 APÊNDICES	p. 85
9. ANEXOS	p. 97

1 INTRODUÇÃO

A prevalência das doenças alérgicas, nos últimos anos, vem crescendo em todo o mundo (VON MUTIUS, et al., 1998). Nos países desenvolvidos, o percentual é superior a 20% e nos países em desenvolvimento, a citar o Brasil, a média percentual é semelhante aos países ricos e industrializados (SOLÉ et al., 2007). Em Salvador, dados do programa - Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE), reportam um percentual de escolares com sintomas de asma de 18,8% (BARRETO et al., 2014). O crescimento da prevalência das doenças alérgicas, segundo a hipótese da higiene (STRACHAN, 1989; STRACHAN, 2000), estaria associado à redução da exposição aos agentes microbianos na primeira infância, resultado do crescente processo de industrialização, melhorias das condições sanitárias e de higiene, além do uso indiscriminado de antibióticos e do acesso às campanhas de vacinação, o que contribuiria para o aumento da susceptibilidade e o desenvolvimento de doenças alérgicas.

Os mecanismos patogênicos das doenças alérgicas são altamente complexos, com interação de inúmeros fatores, robusta associação entre a herança genética e os fatores ambientais (BOUSQUET J et al, 2008). A atopia, principal responsável pelo desenvolvimento das doenças alérgicas, é caracterizada como uma susceptibilidade determinada geneticamente de produção exagerada de IgE em resposta a antígenos comuns, inócuos para os indivíduos não-atópicos (alérgenos), a qual é denominada hipersensibilização (JOHASSON et al., 2004). A asma atópica (ou alérgica) apresenta como principal aspecto, a presença de IgE específica para alérgenos e um desequilíbrio na balança da condução da resposta imunológica, com a polarização para o perfil Th2 e a presença de inflamação com predomínio de eosinófilos (BARNES, 2008; FINKELMANN et al., 2010; DIAMANT et al., 2010). Este fenótipo de asma é o mais estudado e predomina nos países desenvolvidos. No entanto, os achados entre as crianças da cidade de Salvador – Bahia, Brasil, mostram que a fração com asma atribuível a alergia foi de apenas 24,5% (SOUZA DA CUNHA, et al., 2010). Este dado sugere a presença de outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento da asma não-atópica, que pode apresentar tanto o caráter misto de resposta, tendo a presença das células Th2 e Th17, como a

ausência de resposta Th2 e o predomínio de inflamação devido a presença de neutrófilos (STERK & LUTTER, R, 2013).

Variações genéticas nas barreiras dos organismos e nos receptores responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos podem promover uma resposta imune inadequada e propiciar o surgimento de atopia e asma (KORMANN et al.,2008). Os receptores *toll like* (TLRs) são os principais receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Estes receptores podem se apresentar de forma homodímera e heterodímera, estão presentes nas células apresentadora de antígenos (APCs), como os macrófagos, células B e principalmente, células dendríticas; células T e células epiteliais (KUMAR et al., 2009; REIJMERINK et al., 2010). Os TLRs possuem como função o reconhecimento de PAMPs de bactérias, vírus e fungos, que serão apresentados às células efetoras imunes, produzindo ações imunológicas diretas e indiretas (SANDIG & BULFONE-PAPUS, 2012; KVARNHAMMAR, 2013).

Muitos trabalhos têm relacionado a presença de polimorfismos nos genes dos TLRs como fator de risco para a atopia e asma (KANAGARATHAM et al., 2011). Especialmente dos genes da subfamília de TLR2, composta pelos *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* e *TLR10* (TANTSIRA et al., 2004; HOFFJAN et al.,2005; KORMANN et al.,2008; REIJMERINK et al., 2011; QIAN et al, 2010; KOPONEN et al., 2014). Entretanto, a maioria dos artigos publicados estão inseridos no eixo Estados Unidos (TANTSIRA et al., 2004), Europa (KORMANN et al.,2008; REIJMERINK et al., 2011) e oriente (QIAN et al, 2010; TIZAOUI et al., 2015). Além disso, nenhum trabalho foi publicado mostrando o envolvimento dos polimorfismos nos genes de TLRs com o risco para asma e atopia na população brasileira, que possui alta taxa de miscigenação. Desta forma, analisando a complexidade e a multifatorialidade no surgimento da atopia e asma, a relação conjunta entre gene e ambiente e os mecanismos imunogênicos que não foram completamente elucidados. E sabendo que os TLRs estão envolvidos nos mecanismos de polarização das respostas imunes, torna-se de especial interesse estudar a presença de polimorfismos nos *TLRs* e a sua associação com o risco de atopia e asma brônquica na população brasileira. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, investigar o possível papel de polimorfismos nos genes dos TLRs como fatores de risco ou de proteção para atopia e asma, em crianças na cidade de Salvador, Bahia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Problematização das doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no Mundo

As doenças respiratórias alérgicas, incluindo asma e rinite, constituem um dos principais problemas de saúde pública e as suas prevalências vêm aumentando mundialmente (MARTINEZ, 2008). Estatísticas da Organização Mundial da Saúde - OMS (WHO – World Health Organization; 2007) estimam que 300 milhões de pessoas em todo o mundo tenham asma, sendo contabilizadas a cada ano 250.000 mortes por conta desta enfermidade.

Dentre as doenças crônicas tratáveis, a asma brônquica é a única que teve um número crescente nas internações hospitalares desde a década de 1950. Em todo o mundo, o crescimento das desordens alérgicas, incluindo a asma, tem sido associado com o aumento da sensibilização atópica, devido ao processo de ocidentalização das culturas e a urbanização da população, de acordo com a hipótese da higiene. Segundo estimativas, a população mundial de asmáticos passará de 45% para 59% em 2025, com a estimativa de um adicional de 100 milhões de pessoas com esta patologia (GINA, 2014).

Durante muito tempo, o processo de investigação das doenças alérgicas, no que tange aos aspectos epidemiológicos, ficou restrito em decorrência da ausência de um instrumento confiável que reproduzisse com sensibilidade e especificidade questões associadas à asma; o que impossibilitava o entendimento do processo da doença e o impacto desta para os serviços de saúde e sociedade (BARRETO et al., 2014). Com o Estudo Internacional de Asma e Alergia (ISAAC), este contexto foi modificado, em virtude do desenvolvimento de ferramentas padronizadas como o seu questionário, que permitiram avaliar a prevalência das doenças alérgicas em diversas partes do mundo (ISAAC, 1998).

Os dados de prevalência de sintomas de asma no mundo, quando comparados as fases 1 e 3 do ISAAC, em crianças com idade entre 6-7 anos, sugerem que a maioria das regiões do mundo continuam apresentando tendência ao crescimento, a citar, América do Norte (+0,32%), Norte e Oriente da Europa (+0,05%), Índia (+0,06%), Mediterrâneo Oriental (+0,79%) (ASHER et al., 2006 apud

CHONG NETO et al., 2012). Quando foram analisados os dados de crescimento da asma entre os adolescentes, a tendência de crescimento também permaneceu, por exemplo: países da África (+0,16%), América Latina (+0,32%), Norte e Oriente da Europa (+0,26%), e Índia (+0,02%), no entanto, na Europa Ocidental houve redução da prevalência da doença (-0,07%). Num contexto mundial geral, a prevalência de asma (sibilos nos últimos 12 meses) aumentou ligeiramente, passando de 11,1% para 11,6% em crianças e de 13,2% para 13,7% em adolescentes, (ASHER et al., 2006 apud CHONG NETO et al., 2012). Além da asma, a rinite alérgica (RA) é um grave problema de saúde global, apresentando uma prevalência entre 9-42% na população mundial (SETTIPANE & CHARNOCK, 2007 apud DÁVILA et al., 2009). Na América do Sul, a prevalência de sintomas de rinoconjuntivite é alta, com a taxa de 18,5% entre os adolescentes e 12,7% entre as crianças de 6-7anos de idade; destaque para o Paraguai, terceiro país mais prevalente do mundo, apresentando variação de 34,5% para 45,1% entre os adolescentes de acordo com trabalhos do ISAAC, das Fases 1 e 3 respectivamente (CHONG NETO et al., 2012).

No Brasil, os dados de prevalência da asma seguem a tendência dos países industrializados e desenvolvidos. De acordo, com os dados ISAAC, a prevalência de sintomas de asma em crianças em idade escolar no Brasil no período de 1995 a 2002 cresceu de 21,3% para 24,4% (ISAAC Fase 1 e Fase 3) e entre os adolescentes, houve redução na prevalência dos sintomas de asma (27,7 versus 19,9%), mas não observada nos dados de diagnóstico clínico de asma (que alternou de 14,9% para 14,7%) (SOLÉ et al, 2007). A figura 1 apresenta o mapa mundial de prevalência da asma clínica, e o Brasil configura entre os países mais prevalentes do mundo, com percentual superior a 10%, ao lado de Reino Unido, Austrália, Canadá, Estados Unidos, alguns países da América Central (Costa Rica e Trinidad & Tobago) e Peru (GINA, 2014).

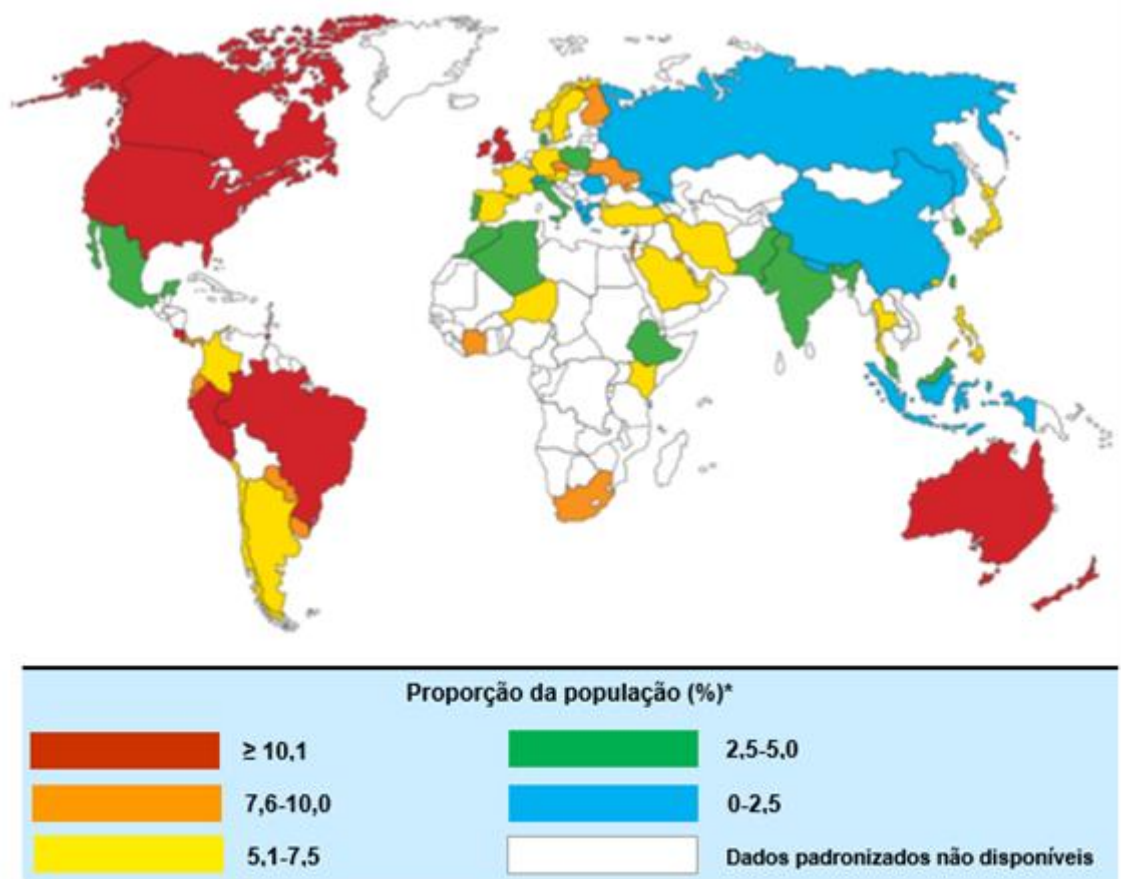


Figura 1: Mapa mundial da prevalência de asma clínica. **Fonte:** Adaptado de GLOBAL Initiative for Asthma (GINA). Global Burden of Asthma, 2014.

Corroborando com esses dados, no estudo do SCAALA (Social Change in Asthma and Allergy in Latin America) em Salvador encontrou-se uma prevalência de asma em crianças de 4 -11 anos de 22,6% (SOUZA DA CUNHA et al., 2010). Baqueiro et al. (2007) ao estudar a prevalência das doenças alérgicas respiratórias, observaram diferenças entre as classes socioeconômicas, sendo de 44 % nos indivíduos das classes A e B, e de 32,4 % em indivíduos das classes C, D e E.

Os novos dados de prevalência de sintomas de asma no Brasil foram apresentados pelo PeNSE, em 2012 e incluíram questões relacionadas no ISAAC (fases 1 e 3). O estudo revelou alta prevalência dos sintomas de asma (23,2%) e um percentual de 12,4% de diagnóstico de asma no passado em adolescentes na faixa de 13 a 15 anos de idade. Das cinco capitais brasileiras que participaram das fases 1 e 3 do ISAAC e também do PeNSE, Salvador foi a única que apresentou redução na prevalência dos sintomas de asma, variando de 27% na Fase 1 do ISAAC para

18,8% no PeNSE (BARRETO et al, 2014). Os autores associaram a redução da prevalência dos sintomas de asma em Salvador aos progressos conquistados pelo programa público e multidisciplinar de controle da asma (ProAr), instalado há mais de 10 anos, que oferece capacitação aos profissionais de saúde e para a comunidade, acompanhamento multiprofissional especializado e medicação gratuita. A implementação e atuação do Proar contribuiu para a redução do número de hospitalizações e mortalidade relacionada a asma em Salvador (SOUSA-MACHADO et al., 2010; BARRETO et al, 2014).

2.2 Fisiopatologia das doenças alérgicas respiratórias

Os mecanismos fisiopatogênicos da asma e da rinite alérgica são altamente complexos, com interação de múltiplos fatores, com forte associação entre predisposição genética e fatores ambientais (BOUSQUET J et al, 2008; VON MUTIUS, et al., 2009; SCHOLTENS et al., 2014). A presença de atopia é o fator chave para o desenvolvimento das doenças alérgicas respiratórias (VON MUTIUS, et al., 2009). Atopia é a susceptibilidade, determinada pelo *background* genético do indivíduo, de se sensibilizar e produzir anticorpos do isotipo IgE em resposta a antígenos comuns, inócuos para os indivíduos não-atópicos. Estes antígenos são reconhecidos como alérgenos (JOHASSON et al., 2004).

A figura 2 a seguir apresenta os mecanismos imunopatológicos envolvidos nas respostas alérgicas das vias aéreas respiratórias. As doenças alérgicas são desencadeadas inicialmente, por meio de sensibilização da resposta imune mediante o contato com o alérgeno específico. Durante o processo de sensibilização, os alérgenos são processados pelas células dendríticas e apresentados/ expostos às células T, seguido de diferenciação e polarização destas células para o perfil Th2. Estas células irão produzir as citocinas IL-4 e IL-13 que atuarão sob as células B, estimulando a sua diferenciação em plasmócitos que produzirão imunoglobulinas do isotipo E específicas para os alérgenos. A IL-5 será importante na atração, ativação e aumento da sobrevivência do eosinófilo. Em posterior contato do indivíduo sensibilizado com o alérgenos, as IgEs se ligam de forma

cruzada com os alérgenos e os seus receptores de alta afinidade (FceRI) presentes nos basófilos e mastócitos principalmente, o que induz a degranulação destas células e a liberação de mediadores químicos e moléculas pro-inflamatórias, como: histamina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, óxido nítrico e citocinas (BARNES, 2008; FINKELMANN et al., 2010; DIAMANT et al., 2010; HOLGATE, 2012). Estas moléculas, a destacar a eotaxina, quando liberadas atraem outras células do sistema imune, principalmente eosinófilos, desencadeando uma lesão tecidual, que culminam com o estreitamento das vias aéreas e o remodelamento brônquico (BARNES, 2008; FINKELMANN et al., 2010). Estudos têm demonstrado a participação do epitélio brônquico neste mecanismo com a produção do TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) que age na ativação de células dendríticas e indução da resposta Th2, além da diferenciação das células T no perfil Th17 (TANAKA et al, 2009; ZIEGLER & ARTIS, 2010). O mecanismo estaria relacionado à similaridade funcional do TSLP à IL-7 e a homologia do complexo receptor do TSLP (TSLPR), heterodímero constituído TSLPR e IL-7R α , que através das vias STAT5 e Jak quinases induziriam o desenvolvimento e proliferação de células T e B (ZIEGLER & ARTIS, 2010). Além disso, na presença de vírus (agonista de TLR3), o TSLP + RNA viral induziriam a produção de IL-23 e diferenciação de células T virgens no perfil Th17, sem, no entanto, interferir no desenvolvimento da resposta Th2 (TANAKA et al, 2009). A IL-33, é uma citocina da família da IL-1 expressa em vários órgãos, como pele, pulmão e sistema nervoso, e produzida pelas células endoteliais, epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas; cuja produção e ação estariam relacionados com o agravamento dos quadros de asma (NABE, 2014).

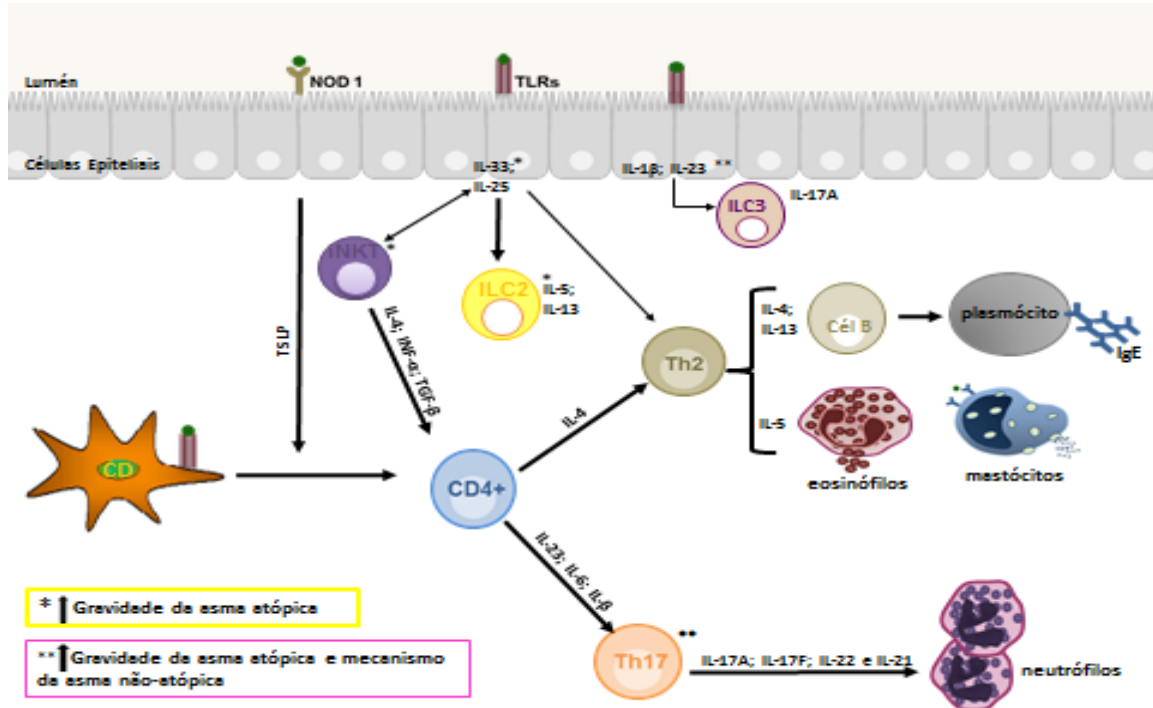


Figura 2: Resposta alérgica das vias aéreas. Células e mediadores envolvidos na asma e na rinite alérgica. A fisiopatologia da asma, parece envolver três mecanismos: 1. A polarização de resposta imune para o perfil Th2, produção de citocinas IL-4; IL-5 e IL-13, participação de IgE específica (asma atópica clássica); 2. Participação predominante de resposta Th17, com a produção de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 e a presença de neutrófilos (provável mecanismo da asma não-atópica e também associado com o aumento da gravidade da asma atópica); 3. A ação da imunidade inata em evidência através de liberação de citocinas pelas células epiteliais (TSLP, IL-33, IL-1β, IL-25 e IL-23); e a ativação e interação entre as células iNKTs e ILCs.

A asma brônquica é uma doença crônica caracterizada pela intensa inflamação das células epiteliais, metaplasia das células mucosas, disfunção do músculo liso, e contínuo processo de remodelamento das vias aéreas. O remodelamento é descrito pela alta proliferação celular, aumento da deposição de matriz extracelular, angiogênese e espessamento da membrana basal. A contínua exposição ao alérgeno induz a persistência da doença, com aumento da hiperreatividade brônquica, persistência do processo de remodelamento das vias aéreas com fibrose do tecido pulmonar e aumento da suscetibilidade do indivíduo às exacerbações (NEWCOMB & PEEBLES JR., 2013; FRIERI, 2014). Clinicamente a doença se manifesta com sibilância, falta de ar, aperto no peito e tosse seca. (BARNES, 2008; NEWCOMB & PEEBLES JR., 2013). Esta doença apresenta vários

fenótipos clínicos que diferem em gravidade, história natural e resposta à terapêutica (WAGENER et al., 2014).

Estudos mostraram a variedade de parâmetros utilizados para caracterizar a asma, tais como, os níveis elevados de IgE total, de sIgE (IgE específicas a determinados alérgenos), a inflamação das vias aéreas, a mensuração dos volumes pulmonares e a limitação de fluxo nas vias aéreas (VON MUTIUS & BRAUN-FRAHRLANDER, 2002). Atualmente, têm-se utilizado como marcadores importantes para predição e monitoramento da asma, em especial o fenótipo eosinofílico, a contagem de eosinófilos no esputo pela técnica do esputo induzido e a determinação da quantidade de óxido nítrico liberado pelas vias aéreas inflamadas, o FEno (Fração Exalada de Óxido Nítrico) (DIAMANT et al., 2010; WAGENER et al., 2014). Dentre os fenótipos, numa classificação simplista a asma pode ser classificada como alérgica/atópica ou asma não alérgica/não atópica (BEASLEY, 2000), mais recentemente classificada como asma Th2 alto (atópica) e asma Th2 baixo (não atópica) (STERK & LUTTER, 2014).

A asma atópica apresenta o mecanismo característico das doenças alérgicas com ativação de células T CD4+ do tipo Th2 e promoção das respostas mediadas por anticorpos IgE e ativação dos mastócitos, e eosinófilos teciduais (que liberam um conjunto de moléculas inflamatórias, entre elas histamina, prostaglandinas, leucotriênios, proteína básica de eosinófilos, peroxidase, eotaxina, quimiocinas e citocinas) e hiper-reatividade brônquica. Com a exposição ao alérgeno e as subsequentes sensibilizações, ocorre à liberação de um grupo de citocinas, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF, produzidas principalmente por células de perfil Th2. A produção de citocinas promoverá a ativação e proliferação de células do sistema imunológico (linfócitos, mastócitos, eosinófilos) bem como o recrutamento e direcionamento destas para as vias aéreas (BARNES, 2008; FINKELMANN et al., 2010).

Na asma não-atópica, os testes cutâneos são negativos para alérgenos específicos e os níveis séricos da IgE total apresentam resultado normal ou baixos. Também chamada de asma intrínseca, a asma não-atópica a princípio era considerada como asma de adultos; entretanto alguns estudos, inclusive de nosso grupo, têm demonstrado que este fenótipo de asma também ocorre em crianças (PEREIRA et al, 2007; SOUSA DA CUNHA et al., 2010). Os sintomas da asma não

atópica são induzidos por gatilhos inespecíficos e os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram bem definidos e parecem múltiplos. Dentre os fatores desencadeantes da asma não atópica/alérgica estão a poluição do ar (ozônio, fumaça de cigarro e as partículas do diesel) asma associada ao exercício, infecção viral, estresse e obesidade (KIM HY, DEKRUYFF RH, UMETSU DT, 2010). Na população de estudo do SCAALA, Barreto e colaboradores (2010) observaram que a asma não atópica estava associada a asma parental e ao baixo nível socioeconômico, como pobreza, sujeira, precárias condições sanitárias, reduzido nível de escolaridade materna e ter frequentado a creche, marcador de contato para exposições infecciosas durante a infância.

Com as recentes pesquisas em imunidade inata, a ação das células endoteliais e epiteliais, e a descoberta das células iNKTs e das células linfóides inatas (ILCs), tem-se questionado sobre a participação destas células tanto no processo de aumento da gravidade da asma atópica (BARNING, 2013; SANHONG YU et al., 2014), quanto como possível mecanismo da asma não-atópica (SANHONG YU et al., 2014). Além disso, os fenótipos mais graves de asma, menos respondedores aos broncodilatadores e corticosteroides estariam associados com a presença de células Th17 e a produção de citocinas deste perfil (IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21) que induziriam aumento da inflamação das vias aéreas com padrão celular predominante de neutrófilos, do remodelamento brônquico, em virtude do número crescente de fibroblastos e aumento da mobilidade, proliferação e sobrevivência do músculo liso das vias aéreas (NEWCOMB & PEEBLES JR., 2013). A figura 3 apresenta um diagrama mostrando a produção e função das principais citocinas do perfil Th17 envolvidas no mecanismo da patogênese e agravamento da asma brônquica.

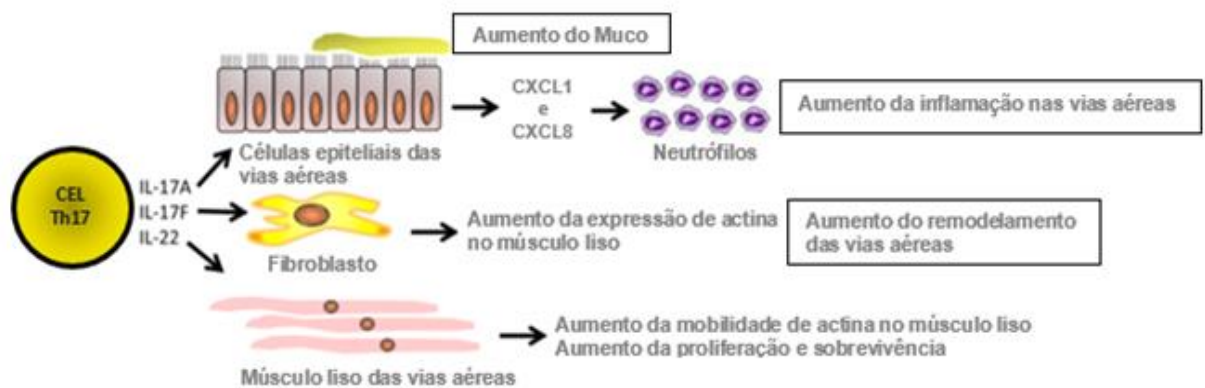


Figura 3: Diagrama da ação de Th17 na mediação da inflamação asmática. **Fonte:** Adaptado de NEWCOMB & PEEBLES JR. Th17-mediated inflammation in asthma, 2013).

Assim, as recentes descobertas parecem sugerir a existência de três perfis de pacientes asmáticos: o perfil atópico clássico, agora chamado de Th2 alto, com alta produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, secreção de IgE e predomínio de eosinófilos; o perfil não atópico, recentemente denominado Th2 baixo, com predomínio de IL-17A e presença aumentada de neutrófilos e ainda um perfil de caráter misto, apresentando tanto o perfil Th17 quanto a inflamação mediada por Th2 (NEWCOMB & PEEBLES JR., 2013; STERK & LUTTER, 2013). As células Th17 não são uma linhagem estável, tendo por base os mecanismos de epigenética, a interação entre os fatores de transcrição e o microambiente de citocinas, estas células podem expressar citocinas encontradas nos perfis celulares Th1 ou Th2 (MURANSKI & RESTIFO, 2013).

2.3 Da hipótese da higiene à teoria dos velhos amigos

Em 1989, Strachan publicou o artigo “Hay fever, hygiene, and household size” onde propôs que o aumento do risco da febre do feno e doenças atópicas devia-se à redução do tamanho da família, ordem de nascimento e redução das infecções da infância e, melhoria das condições sanitárias (STRACHAN, 1989), postulando a hipótese da higiene. Outros estudos epidemiológicos corroboraram com esta hipótese. Von Mutius e colaboradores (1994) encontraram associação

entre o aumento do risco para atopia com o número reduzido de irmãos. Krämer e colaboradores (1999) estudaram a influência do período de entrada na creche e observaram que o contato com outras crianças mais cedo na creche estava associado com maior proteção para atopia, corroborando com a hipótese de que a presença de infecções precoces na infância atuava como fator protetor contra alergias mais tarde na vida. Além disso, a compreensão de que a alta prevalência das doenças alérgicas não se tratava apenas de diferenças étnicas e genéticas, fortalecida por trabalhos que mostravam diferenças geográficas na prevalência da asma reforçavam a compreensão que mudanças ambientais possuíam um papel modulador no mecanismo de desenvolvimento de alergias (MARCKS, 2006).

Estudos experimentais foram realizados com o intuito de compreender o mecanismo e constituir de plausibilidade biológica, as associações entre fatores de risco encontrados para o aumento da prevalência das doenças alérgicas (STRACHAN, 2000). Durante a década de 1990, os trabalhos desenvolvidos em camundongos ajudaram a esclarecer os mecanismos envolvidos com o processo alérgico. As infecções virais e por bactérias intracelulares produziam uma resposta de perfil Th1, com alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4, contrapondo a resposta alérgica associada a uma polarização da resposta imunológica para o perfil Th2 com produção de IL-4 e redução de IFN- γ (ROMAGNANI, 1992).

Pesquisas posteriores observaram que regiões endêmicas para determinadas helmintíases apresentavam menor prevalência de doenças alérgicas, sugerindo que a infecção parasitária promoveria proteção de alergias e/ou seus marcadores (ARAÚJO et al., 2000; COOPER, 2009; FEARY et al., 2011). Corroborando com este dado, Alcântara-Neves e colaboradores (2014) observaram que co-infecções helmínticas estavam associadas à maior proteção para atopia. Como na atopia, o mecanismo imunológico envolvido nas infecções helmínticas está associado ao perfil Th2, com produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, acompanhada de eosinofilia e produção abundante de anticorpos do isotipo IgE (YAZDANBAKHSI et al., 2001). No entanto, os helmintos, por terem co-evoluído com os mamíferos durante milhões de anos, desenvolveram mecanismos para modular a resposta imunológica dos hospedeiros de forma a reduzir a resposta anti-helmíntica (FALLON & MANGAN, 2007). O que caracteriza esta resposta diferenciada (Th2-modificada) é a presença das citocinas IL-10 e TGF- β , produzidas pelas células T regulatórias,

capazes de reduzirem a atividade anti-helmíntica e, indiretamente, atuar sobre as respostas alérgicas e autoimunes (YAZDANBAKHSI et al., 2001).

Apesar da hipótese da higiene responder de forma coerente o crescimento da prevalência das doenças alérgicas em países industrializados e desenvolvidos, o crescimento da asma e atopia em países com infecção helmíntica prevalente, além do aumento de outras doenças inflamatórias crônicas como as doenças autoimunes, fizeram questionar a “hipótese da higiene”, ou renomear a mesma, chamando de “hipótese da biodiversidade” (VON HERTZEN et al., 2011) ou “teoria dos velhos amigos” (ROOK, 2010).

Durante a evolução do homem, o seu organismo co-evoluiu com categorias de microorganismos (microbiota comensal, microbiota ambiental e infecções) chamados de “velhos amigos”, capazes de induzirem a produção e resposta de células T regulatórias e conseqüentemente, modular as respostas inflamatórias crônicas. Os microorganismos *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, helmintos intestinais, além do vírus da hepatite A (HAV) co-evoluíram e se espalharam pelo mundo com a população e criaram mecanismos para serem tolerados, atuando como imunoreguladores. No entanto, estas infecções foram tratadas e controladas, e estão sendo substituídas pelas chamadas “infecções de aglomeração”, tais como sarampo, a gripe aviária, que segundo estudos epidemiológicos não induzem a produção de resposta T regulatória, mas induz ou a morte do hospedeiro ou a uma resposta imunológica eficiente com a eliminação do agente infeccioso (ROOK, 2010; ROOK et al., 2013; ROOK et al., 2014).

De acordo com a “teoria dos velhos amigos” o mecanismo que estaria envolvido na mudança de perfil imunológico e alta prevalência de doenças crônicas, não seria a higiene, mas sim, as grandes mudanças no estilo de vida e no ambiente, com a crescente ocidentalização e urbanização, aquisição das medidas sanitárias, alimentação pobre em antioxidantes, a modernização da medicina com o advento dos antibióticos, vacinas, o parto cesariano e a redução da amamentação, além da redução do contato com os espaços verdes e contato com os animais (ROOK et al., 2014). E em países subdesenvolvidos, o baixo nível socioeconômico, que aumenta a exposição às infecções de aglomeração, a dieta pobre em anti-oxidantes e ao contínuo estresse psicossocial (ALVES et al., 2012; ROOK et al., 2014). Na revisão sistemática conduzida por Strina e colaboradores (2014), foi observado que a

história familiar de doenças alérgicas, a presença de umidade ou mofo nas residências e infecções respiratórias na infância eram os fatores de risco mais fortes encontrados para asma não atópica, entretanto, outras associações foram consideradas consistentes, como ausência ou reduzido tempo de amamentação, obesidade, violência psicológica e fatores sociais. Nas crianças acompanhadas pelo SCAALA, a associação entre problemas comportamentais e a prevalência de asma concorda com a linha vigente da literatura mundial, que refere uma maior prevalência de problemas comportamentais em crianças asmáticas quando comparados com grupos de crianças não asmáticas. Segundo dados do grupo, as crianças que apresentaram problemas comportamentais possuíam 40% a mais de ocorrência de asma em relação as crianças que não tinham problemas comportamentais (FEITOSA et al., 2011).

2.4 A Resposta imune inata na atopia e asma

2.4.1 Os Receptores *toll like*

A resposta imunológica se dá a partir da interação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida e, as células dendríticas possuem um papel central nesta interface. As células dendríticas são células acessórias imunes derivadas da medula óssea e encontradas em tecidos epiteliais e linfóides. São classificadas em células dendríticas mielóides (mDC) e células dendríticas plasmocitóides (pDC) e consideradas as principais células apresentadoras de antígenos responsáveis pela ativação de linfócitos T *naïves* (virgens) (KUCUKSEZER, 2012). As células dendríticas possuem uma plasticidade funcional quando diferenciadas, podendo tanto promover o desenvolvimento de uma resposta Th1, Th2 ou Th17; o que direciona o perfil da resposta é o tipo do antígeno, a dose e o microambiente na ocasião da apresentação antigênica (FLATOW & BARBUTO, 2012).

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos em células imunes, tais como mastócitos, células NK, células B, células T, neutrófilos, macrófagos e em especial nas células dendríticas, identificam e respondem aos

componentes microbianos específicos chamados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) (KAWAI & AKIRA, 2009, BEZEMER et al., 2011). Prosseguindo ao reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, uma reação imune é desencadeada com o intuito de proteger os hospedeiros contra a infecção ou ao dano dos tecidos (KUMAGAI & AKIRA, 2010).

Até o presente momento são conhecidos 13 TLRs entre os mamíferos, sendo 10 TLRs presentes nos humanos e 12 TLRs encontrados nos camundongos. Nas duas espécies são comuns 9 TLRs (TLR1-TLR9). No entanto, enquanto o TLR10 não é funcional nos camundongos, os TLR11, TLR12 e TLR13 não existem no genoma humano (PANDEY et al., 2015). Dependendo das moléculas que são capazes de reconhecer, os TLRs podem estar localizados na membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) reconhecendo antígenos livres no ambiente extracelular, ou localizados no ambiente intracelular, nos compartimentos endossomais, lisossomais e no retículo endoplasmático (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) identificando os ácidos nucléicos que foram internalizados, ou em condições especiais, como em doenças autoimunes, reconhecem ácidos nucléicos próprios (KAWAI & AKIRA, 2009; PANDEY et al., 2015). A tabela 1 apresenta um resumo sobre TLRs e os seus ligantes principais (fisiológicos e sintéticos).

Tabela 1 – Os TLRs e seus principais ligantes fisiológicos e sintéticos

TLRs	Ligantes fisiológicos	Ligantes sintéticos
TRL1-2	Lipopetídeos triacilados (bactéria e micobactéria)	Pam3CSK4
TLR2	Pepdoglicanos (bactérica gram-positiva), fosfolipomanana (<i>Candida albicans</i>), tGPI-mucinas (Trypanosoma), hemaglutinina (vírus do sarampo), porinas (<i>Neisseria</i>), lipoarabinomanana (micobactéria), glucuronoxilomanana (<i>Cryptococcus neoformans</i>), HMGB1 (proteína do grupo de alta mobilidade, proteína não-histona mais abundante no núcleo celular, hospedeiro)	
TLR2-6	Lipopeptídeos diacilados (Mycoplasma), LTA (Grupo Estreptococos B), zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	FSL1, MALP-2, Pam2CSK4
TRL3	dsRNA (vírus)	Poly I:C
TLR4	LPS (bactérias gram-negativas), VSV glicoproteína G, a proteína de fusão RSV, a proteína de envelope do MMTV, a manana (<i>Cândida albicans</i>), glucuronoxilomanana (<i>Cryptococcus neoformans</i>), glicosil inositol fosfolipídeos (<i>Tripanosoma</i>), HSP60, HSP70	
TLR5	Flagelina (bactérias flageladas)	
TLR7	ssRNA (vírus de RNA)	Compostos de imidazoquinolina: imiquimod, resiquimod, loxoribine, R848
TLR8	ssRNA (vírus de RNA)	Resiquimod
TLR9	CpG-DNA (bactérias e micobactérias), de DNA (vírus) e Hemozoína (<i>Plasmodium</i>)	CpG-A, CpG-B e CpG-C ODNs
TLR10	Não possui especificidade do ligante conhecida	

Fonte: Adaptado de SANDIG & BULFONE-PAUS. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in Immunology*, 2012. OOSTING M, CHENG SC, BOLSCHER JM, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor, 2014.

Os TLRs funcionam principalmente como homodímeros, excetuando a subfamília do TLR2, constituído pelo TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10 (SANDIG & BULFONE-PAPUS, 2012), que formam heterodímeros e atuam como co-receptores no reconhecimento de lipoproteínas e lipopeptídeos. Não está claro se o TLR10 atua como co-receptor juntamente com os receptores TLR1, TLR2 e TLR6 (MIKACENIC et al., 2013; KOPONEN et al., 2014). Entretanto apesar do TLR10 não possuir especificidade do ligante e função biológica conhecida, os últimos resultados sugerem tratar-se de um receptor com capacidade imunomodulatória (OOSTING et

al., 2014). Dentre outros ligantes, o TLR4 é ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular externa de bactérias Gram-negativas (SUKKAR et al., 2006). TLR5 reconhece principalmente a proteína flagelina, que é um componente estrutural do flagelo das bactérias gram-negativas e gram-positivas. O TLR3 pode ser ativado pelo Poli I:C, análogo sintético da dupla fita viral de RNA (dsRNA). TLR7 e TLR8 mediam respostas para ssRNA viral, tendo como correspondente sintético as substâncias imiquimod (R-837) e resiquimod (R-848). TLR9 responde a DNAs bacteriano e viral contendo motivos CpG não metilados (SANDIG & BULFONE-PAPUS, 2012; KVARNHAMMAR, 2013).

Os TLRs estruturalmente são constituídos por glicoproteínas de membrana que possuem repetições ricas em leucinas e flanqueadas por motivos ricos em cisteína, nas regiões extracelulares, região de ligação com os patógenos, e internamente, possuem um domínio de homologia com o *Toll* receptor de IL-1 (TIR) em suas caudas citoplasmáticas (KAWAI & AKIRA, 2009; MAHEASWARI et al., 2014; PANDEY et al., 2015). Para a realização da cascata sinalizadora e ativação dos genes envolvidos na resposta imune, são necessários a presença dos domínios intracelulares do tipo TIR contendo as proteínas adaptadoras (**MyD88**, fator de diferenciação mielóide 88; **TIRAP**, receptor *Toll*/interleucina-1 contendo proteína adaptadora; **TRIF**, adaptador indutor de interferon β ; e **TRAM**, molécula adaptadora TRIF relacionado) e fatores de transcrição (NF- κ B, fator nuclear κ B; AP-1, proteína ativadora 1, IRFs 3 e 7, fatores de regulação ao interferon 3 e 7) (KAWAI & AKIRA, 2009; MAHEASWARI et al., 2014). A Figura 4, apresenta a cascata de sinalização envolvida na ativação dos TLRs. Na maioria dos TLRs, o início da sinalização é dependente de MyD88, que promove o recrutamento das quinases 1, 2 e 4. Estas enzimas ativam o receptor de IL-1 [IRAK 1,2 e 4; associado com a família do receptor do fator de necrose tumoral 6 (TRAF-6)] promovendo como desfecho final, a ativação de NF- κ B e AP-1, com a consequente produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial. Nos TLRs 7, 8 e 9 é ativado um outro fator de transcrição, além do NF- κ B, o IRF-7, indutor da produção do IFN do tipo I e III, citocinas responsáveis pelo desenvolvimento de respostas imunes inatas antivirais. O TLR3, é um receptor independente de MyD88, sua sinalização é iniciada pelo TRIF e são ativados os fatores de transcrição NF- κ B e os IRF3 que promoverão a produção de citocinas inflamatórias, interferon do tipo I e III

respectivamente. O mecanismo de sinalização do TLR4 ocorre através dos dois mecanismos: por via independente de MyD88 e por via dependente de MyD88, sendo capaz de produzir respostas de acordo com ativação dos fatores de transcrição IRF3 e NF- κ B, respectivamente (KAWAI & AKIRA, 2009; MAHEASWARI et al., 2014; PANDEY et al., 2015).

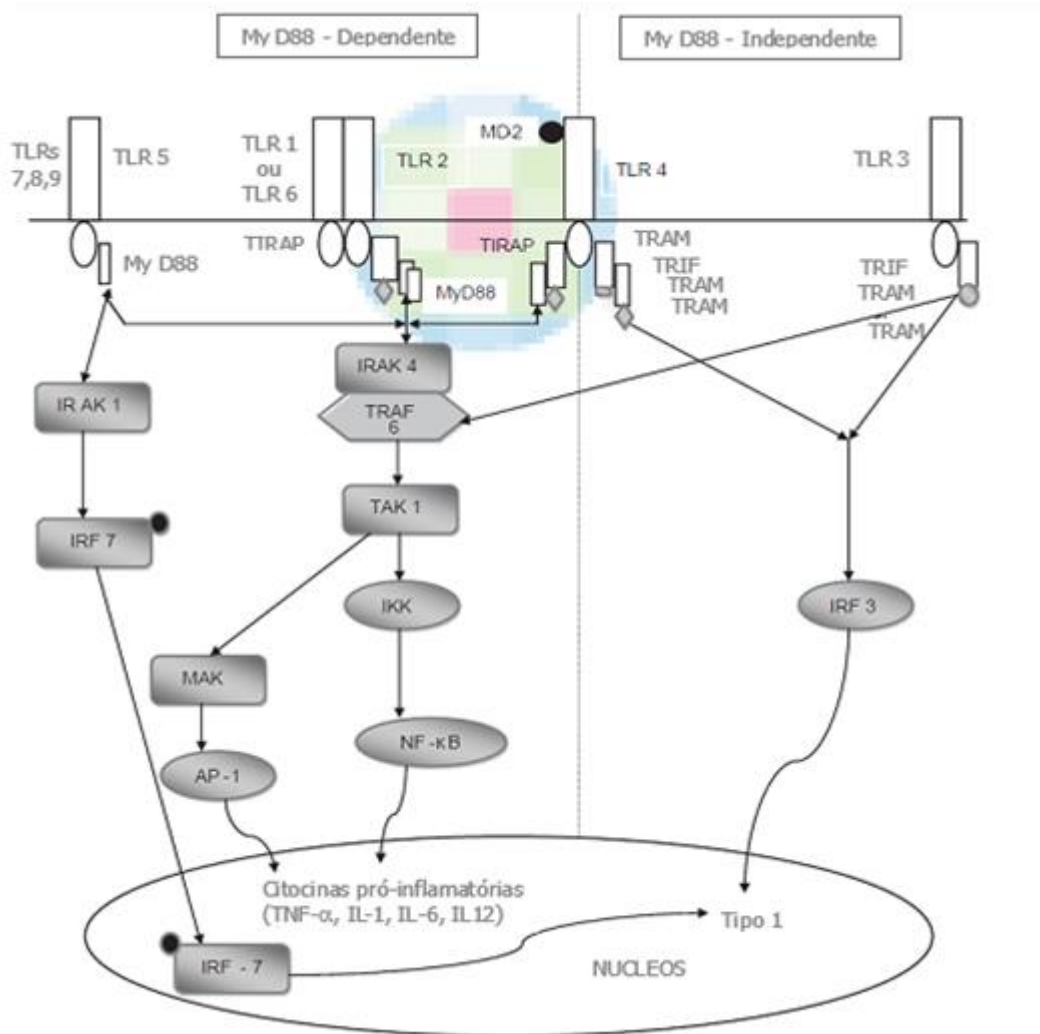


Figura 4 – Figura representativa da cascata de sinalização dos TLRs. **Fonte:** Adaptado de MAHEASWARI et al. Toll gates: An emerging therapeuticTarget, 2014.

2.4.2 Mecanismos de atuação dos TLRs na atopia e asma

A ativação dos TLRs tem sido associada à fisiopatologia das doenças respiratórias, dentre elas a asma. Além disso, as respostas respiratórias desencadeadas por bactérias ou vírus por via destes receptores podem promover tanto a prevenção como a exacerbação da doença (KVARNHAMMAR et al, 2013).

Os TLR2 /1 e TLR2/6, são heterodímeros capazes de impedir o equilíbrio Th1/Th2 e desviar o sistema imune para uma resposta Th1 (KORMANN, 2008). Em estudos experimentais foi observado que ao realizar tratamento intratraqueal de camundongos asmáticos, sensibilizados com OVA, utilizando o agonista do TLR2/6 em combinação com a citocina do perfil Th1, o IFN- γ , resultou na redução da hiperresponsividade, da eosinofilia, e do perfil de citocinas Th2 (IL- 5 e IL-13) no lavado bronquioalveolar (BAL); além disto, quando o tratamento era realizado utilizando o agonista sintético de TLR2/1, os resultados eram semelhantes ao uso do TLR2/6, apresentando redução da hiperresponsividade das vias aéreas, das citocinas de perfil Th2 (IL-4; IL-5) e dos eosinófilos (WEIGT et al., 2005; PATEL et al., 2005 apud FUCHS & BRAUN, 2008). Coerente com este achado, um agonista do TLR2/6 reduziu a infiltração eosinofílica em um modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas crônica, no qual ratos foram sensibilizados de forma intranasal com os antígenos de pólen de gramíneas (FUCHS et al., 2010).

A ativação de mastócitos e a secreção subsequente de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas está diretamente induzida por agonistas de TLRs (SANDIG & BULFONE-PAUS, 2012). Em mastócitos de camundongos estimulados com LPS (agonista de TLR4) e peptidoglicano (PGN – ligante de TLR2) observaram diferenças significativas quanto a produção de resposta; a ativação de TLR4 estimulou a produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, e IL-13, estando associada à proteção contra infecção de bactérias gram-negativas; enquanto a ativação de TLR2 induziu à degranulação de mastócitos e produção das citocinas TNF, IL-6, IL-4, IL-5 e IL-13, associando à reações agudas e tardias de hipersensibilidade tipo I, pela aplicação de PGN, o que pode exacerbar as lesões inflamatórias causadas por dermatite atópica, quando infectadas por *Staphylococcus aureus* (SUPAJATURA et al. 2002).

O papel do agonista de TLR4 tem sido continuamente estudado na asma alérgica e é proposto que a dose de LPS determina qual o tipo da resposta imune (Th1 ou Th2) que será induzida. Em estudo conduzido em camundongos, a combinação do alérgeno ovalbumina (OVA) com uma baixa dose de LPS reforçou a inflamação pulmonar eosinofílica e neutrofílica acompanhada por níveis elevados de citocinas Th2, tais como: IL-4, IL-5 e IL-13, além de hipersecreção de muco em camundongos asmáticos. A dose elevada de LPS, em contrapartida, induziu resposta do tipo Th1, com o recrutamento dos neutrófilos para o tecido pulmonar, ausência de secreção de muco das vias aéreas e aumento dos níveis de IFN- γ no LBA (DONG et al., 2009). Ao se comparar o modelo de asma induzido por *Blomia tropicalis* (Bt) e OVA com posterior exposição ao LPS e ao agonista de TLR2 (Pam3CSK4), observou-se alteração no perfil celular da inflamação, com diminuição do influxo de eosinófilos e aumento do influxo de neutrófilos para as vias respiratórias no modelo sensibilizado com os alérgenos de Bt, mais característico do perfil de inflamação Th17, e redução da inflamação no modelo induzido por OVA. Além disso, os resultados sugeriram uma dupla sinalização, via TLR4 e TLR2, principalmente através do alérgeno *B. tropicalis*, implicando numa complexa interação entre produtos bacterianos, os alérgenos de ácaros e a via de sinalização TLR (BARBOZA et al., 2013). A produção *ex vivo* de TNF, IL-10 e IL-1 β por PBMCs estimuladas por LPS também foi significativamente menor em pacientes com asma, ao mesmo tempo que nesta mesma população, a expressão de TLR4 foi significativamente reduzida em monócitos, linfócitos e células dendríticas em pacientes asmáticos quando comparado com controles saudáveis. A redução da expressão e ativação de TLR4 e consequente redução da liberação de citocinas IL-1 β e da citocina IL-10, poderiam contribuir para explicar os mecanismos patogênicos envolvidos no processo asmático, como a manutenção de uma resposta com predomínio do perfil Th2 (LUN et al., 2009).

Existem fortes evidências sobre o papel funcional do TLR3 na patogênese da asma grave. Foi demonstrado que o TSLP e o ligante de TLR3 – Poly (I:C) ativam as células dendríticas (CD11⁺) a produzirem mais IL-23 e, com isso, maior diferenciação das células T CD4⁺ *naives* em células Th17. E também a combinação entre de TSLP e ligantes de TLR3 não interferem no desenvolvimento das células Th2, mesmo na condição polarizante. Sugerindo que na ativação das

células dendríticas, TSLP e ligantes de TLR3 podem atuar como facilitador entre os mecanismos de diferenciação e maturação das células T virgens, células de memória e células T efectoras durante a inflamação crônica das doenças alérgicas (TANAKA et al, 2009). As células Th17 são um subconjunto único de células CD4 produtoras de citocinas inflamatórias (IL-17 e IL-25); estas citocinas estariam envolvidas em desordens patológicas, dentre elas, a asma. Além disso, pesquisas demonstraram que a ativação de TLR3 por dsRNA aumentou a expressão de TLR3 e provocou intensa expressão de CXCL8/IL-8 e CCL20 (quimiocina 3- α pró-inflamatória de macrófagos) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF). CCL20 e GM-CSF podem desempenhar papel no recrutamento e maturação de células dendríticas imaturas (BEZEMER et al.,2012). Corroborando com a evidência de que o TSLP associado aos TLRs atua no mecanismo fisiopatológico da asma grave. Ferreira et al. (2012) mostraram que os TLRs 2, 3, 4 e o TSLP estavam aumentados nas vias aéreas de pacientes asmáticos que sofreram exacerbação fatal da doença.

Em cultivo de queratinócitos estimulados com a flagelina, ligante do TLR5, ocorreu indução da produção de TSLP e das citocinas inflamatórias TNF, IL-6, GM-CSF e as quimiocinas CCL2, CCL5/RANTES, CCL20, CCL27, IL-8 e CXCL10. A flagelina está presente em bactérias gram-negativas, e possivelmente está presente na poeira doméstica, como ocorre com o LPS. Assim, a disfunção da barreira epitelial em crianças com dermatite atópica, decorrente de disfunção genética ou exposição ambiental, quando expostas as bactérias gram-negativas e flagelina poderiam iniciar ou exacerbar as respostas Th2, através da produção de TSLP (LE et al., 2011). Como contraponto, Lun et al. (2009) observou que pacientes asmáticos em comparação aos controles saudáveis apresentavam menor expressão de TLR5 e menor produção de IL-10 e citocinas Th1, o que contribuiria para o desequilíbrio na balança Th1/Th2 e o predomínio da resposta alérgica.

O TLR9 é um dos TLRs mais extensivamente estudados no contexto da asma. Ligantes de TLR9 (CpG ODN) foram mostrados serem benéficos em roedores, em modelos de asma em primatas não humanos (KLINE et al., 2002; KLINE, 2007) e em alguns ensaios pré-clínicos (KLINE, 2007; MAHEASWARI et al., 2014). Os motivos de CpG ODN ativam as células *natural killer* (NK) através de estimulação das células dendríticas e com isso, induzem uma resposta Th1. Esta

resposta é caracterizada pela produção de IFN- γ , bem como IL - 10 e IL - 12, e pela inibição de Th2 – alérgica. Além disso, o CPG DNA é capaz de induzir a atividade das células T regulatórias (Treg) na produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , promovendo a regulação da atividade imunológica, com a redução da atividade das células Th2 (KLINE, 2007). Além disso, sabe-se que as exacerbações da asma podem estar associadas às viroses. Os vírus são indutores da produção de INF tipo I e IFN tipo III que promovem um estado antiviral. Estudos demonstraram que os indivíduos asmáticos possuem uma produção defeituosa e incipiente de IFNs indutores do estado antiviral, no entanto, o mecanismo desta deficiência de produção desta citocina ainda não está esclarecido (CONTOLI et al., 2006; SYKES et al. 2012; SYKES et al. 2013). Os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 têm sido associados às respostas à infecção aos vírus em modelos animais, através da indução da produção de IFN tipo I e IFN tipo III (ZHANG et al., 2007). No entanto, em um estudo realizado para se investigar o papel dos TLRs 3, 4 e 7-9 na produção de IFN do tipo I e do tipo III, não foram encontradas diferenças na produção destas citocinas entre asmáticos e não-asmáticos após estimulação dos TLRs (SYKES et al. 2013).

2.5 Polimorfismos nos genes de receptores *toll like* e doenças alérgicas

Os polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA observados em mais de 1% da população, e dentre estes, os polimorfismos que resultam de uma única mudança de base, são denominados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os SNPs são os responsáveis pela maioria das variações genéticas que contribuem para o surgimento de doenças. Quanto à localização, os SNPs podem estar localizados em regiões codificadoras, alterando a estrutura proteica; regiões promotoras, interferindo na expressão da proteína e, ainda, ocorrer de forma silenciosa, em que a troca de um par de nucleotídeo não modifica o aminoácido codificado; entretanto mesmo em modificações silenciosas, pode ocorrer modificação no produto final através de mecanismos que ainda não foram completamente explicados (GAO & HUANG, 2004 apud DÁVILA et al., 2009).

Em estudo de mapeamento genético com intuito de identificar genes candidatos à suscetibilidade genética para as doenças alérgicas, Haagerup e colaboradores (2004) identificaram nos cromossomos 3q, 4q and Xp, genes com provável papel na herança genética das doenças alérgicas. As regiões encontradas correspondiam as regiões onde estão localizados os genes da maioria dos receptores do tipo *toll*, sendo exceções, o *TLR4*, localizado no cromossomo 9 (9q33.1), e o *TLR5*, localizado no cromossomo 1 (1q41) (SKEVAKI et al., 2014). Inúmeros estudos têm associado os polimorfismos nos *TLRs* na patogênese da asma e atopia (EDER et al, 2004; TANTSIRA et al., 2004; HOFFJAN et al., 2005; KORMANN et al.,2008; KANAGARATHAM et al., 2011; RODUIT et al., 2011; KOPONEN et al., 2014; TIZAOUI et al., 2015). Na figura 5 é representando o gene do *TLR6*, subfamília do *TLR2*, localizado no cromossomo 4 (4p14). É notório a proximidade com os genes do *TLR1* e *TLR10*, também pertencentes a subfamília *TLR2*, receptores que constituem heterodímeros para o reconhecimento de lipoproteínas e lipopeptídeos (SKEVAKI et al. 2014).



Figura 5 – Representação da localização do gene do *TLR6* (seta vermelha) no cromossomo 4.

Fonte: National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA. Acesso em: 14 mar. 2015.

2.5.1 Polimorfismos nos genes da Subfamília do *TLR2*

Dentre os polimorfismos dos *TLRs* associados com asma e atopia, os polimorfismos mais frequentemente associados foram os relacionados à subfamília do *TLR2* (EDER et al, 2004; TANTSIRA et al., 2004; HOFFJAN et al., 2005; KORMANN et al.,2008; REIJMERINK et al., 2011; QIAN et al, 2010; KOPONEN et al.,2014).

2.5.1.1 *TLR2*

No estudo ALEX (The Allergies and Endotoxin Study), realizado nas áreas rurais da Áustria e Alemanha, filhos de agricultores que apresentavam o alelo T em *TLR2*/₁₆₉₃₄ tinham reduzida prevalência de atopia, rinite e asma; e menos sintomas atuais de asma (EDER et al., 2004). No entanto, um trabalho realizado no Japão, com 137 famílias asmáticas, mostrou que os polimorfismos no gene do *TLR2* não estavam associados com asma ou níveis de IgE total (NOGUCHI et al., 2004).

Bjørnvold et al., (2009), em estudo realizado na Noruega, encontraram no *TLR2*, o alelo T do SNP rs3804100 foi associado positivamente tanto com diabetes tipo 1 (P = 0.016, odds ratio (OR) = 1.45, 95% confidence interval (CI) = 1.07–1.96), quanto com a asma alérgica (P= 0.005, OR= 3.5, 95% CI= 1.4 – 8.7), e que o alelo C atuava como fator protetor para ambas as doenças.

2.5.1.2 Heterodímeros *TLR1/2* e *TLR2/6*

Em estudo realizado por Tantisira e colaboradores (2004), foi encontrado um SNP não sinônimo numa região codificadora do gene do TLR6, resultando em variação de aminoácido na posição 249 no domínio extracelular da proteína TLR6 (S249P). Este SNP foi significativamente associado com proteção à asma em afro-americanos e mostrou semelhante tendência em americanos de origem europeia; porém não se repetiu nos americanos de origem hispânica. Hoffjan e colaboradores (2005) em estudo posterior, encontrou associação positiva fraca do alelo T (249Ser) e asma na infância, contudo, a associação foi perdida após a correção de Bonferroni.

Kormann e colaboradores (2008) em estudo na população alemã, encontraram que os polimorfismos no *TLR1* [o rs5743595 (alelo raro C) e o rs4833095 (alelo raro C)] e em *TLR6* [o rs5743789 (alelo raro A)] e *TLR10*, [o rs4129009 (alelo raro G)] estavam associados à proteção para asma atópica, e ainda observaram que ao estimular as células de portadores do alelo raro com Pam₃CSK₄ (agonista de TLR2/1) e zymosan (agonista de TLR2/6), havia aumento na expressão do RNAm para TLRs, aumento das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-12 e TNF) e redução da produção de IL-4 (citocina associada ao perfil Th2). Ainda

neste trabalho, o alelo raro T do SNP rs5743810 (*TLR6*) foi associado ao aumento do risco para asma atópica. Koponen e colaboradores (2014), em estudo finlandês, demonstraram que o rs5743618 (*TLR1*) foi associado com asma e eczema atópico e rs5743810 (*TLR6*) foi associado com atopia, durante os primeiros seis anos de vida após bronquiolite no primeiro ano de vida.

2.5.2 Polimorfismos no *TLR3*

Em estudo realizado na Finlândia, realizado em dois períodos, os autores observaram que o polimorfismo do gene *TLR3*, L412F (rs3775291) foi associado à bronquiolite necessitando hospitalização precoce na infância e chiado no peito pós-bronquiolite (NUOLIVIRTA et al., 2012).

2.5.3 Polimorfismos no *TLR4*

O polimorfismo do gene *TLR4*, rs4986790 (Asp299Gly) promove alteração do domínio extracelular da proteína. Estudos mostraram associação entre o SNP Asp299Gly e o risco para infecções por bactérias gram-negativas, risco para sépsis restritas as infecções de origem de bactérias gram-negativas, além de associação com bronquiolite grave por vírus sincicial respiratório (SCHWARTZ & COOK, 2005; KANAGARATHAM et al., 2011). Em estudo sueco, este SNP Asp299Gly foi associado ao aumento em quatro vezes da prevalência da asma e em sete vezes ao aumento da prevalência da asma atópica. O mesmo SNP também foi associado à redução da produção das citocinas IL-12(p70) e IL-10 e ao LPS, o que justifica o desequilíbrio da balança entre as respostas Th1 e Th2 encontrada em indivíduos asmáticos (BOTTCHEER et al., 2004).

2.5.4 Polimorfismos no *TLR5*

Estudos têm associado os polimorfismos no *TLR5* à susceptibilidade às infecções (ZHANG et al., 2013), doenças autoimunes (SHERIDAN et al., 2013; XIAO et al., 2014) e câncer (KLIMOSCH et al., 2013). No entanto, apesar de SNPs no gene do *TLR5* terem sido incluídos em estudos de associação de polimorfismos com

doenças alérgicas, os trabalhos até a presente data não demonstram associação significativa entre polimorfismos no *TLR5* e doenças alérgicas (KORMANN et al., 2008; RODUIT et al., 2011). Entretanto, quando analisado sob a ótica do mecanismo de interação gênica nos polimorfismos rs5744168 e rs5744174 (*TLR5*), foi encontrado associação protetora significativa para a dermatite atópica sob efeito modificador do contato de animais da fazenda e contato com gatos, respectivamente. Os genótipos envolvidos na associação protetora foram CC homocigoto selvagem para o rs5744168 e genótipo CT para rs5744174 (RODUIT et al., 2011). Estudos têm demonstrado reduzida expressão de *TLR5* em indivíduos asmáticos (LUN et al., 2009; SHIKHAGAIE et al., 2014).

2.5.5 Polimorfismos nos *TLR7* e *TLR8*

O cromossomo Xp22 abriga os receptores *TLR7* e *TLR8*. Estudos evidenciaram, após varredura do genoma, associação entre o cromossomo Xp22 aos fenótipos atópicos, incluindo asma, dermatite atópica e rinite (HAAGERUP et al., 2004; MOLLER-LARSEN et al., 2008). Em estudo de base familiar realizado em duas amostras familiares dinamarquesas foram apuradas independentemente (A e B). A amostra A foi composta por 135 famílias com pares de irmãos asmáticos; a amostra B foi constituída por 100 famílias atópicas dinamarquesas; Foram identificados nos genes de *TLR7* e *TLR8*, genes de risco nos fenótipos alérgicos investigados, asma, rinite e dermatite atópica. O SNP rs179008, não sinônimo, provavelmente alterando o processamento do retículo endoplasmático do *TLR7* e o SNP sinônimo rs5741883 afetando o *splicing* do domínio *enhancer* do *TLR8* (MOLLER-LARSEN et al., 2008). Corroborando com os achados encontrados na população dinamarquesa, Nilsson e colaboradores (2012) encontraram haplótipos na região do gene de *TLR7-TLR8* associados com rinite alérgica nas populações sueca e chinesa. Os haplótipos apresentaram associação diferente entre os sexos; na Suécia ocorreu principalmente em mulheres, enquanto na população chinesa foi entre os homens.

2.5.6 Polimorfismos no *TLR9*

Em estudo realizado nos Estados Unidos, com 71 americanos de três origens étnicas diferentes (africana, européia e hispânica), Lazarus et al. (2003) encontraram 20 SNPs, dos quais, quatro eram comuns nos três grupos étnicos. Utilizando esses quatro SNPs, foi possível inferir estatisticamente sete haplótipos, dos quais quatro haplótipos foram responsáveis por aproximadamente 75% dos cromossomos. Dois SNPs (C-1237T e A2848G) do *TLR9* foram representativos dos haplótipos nas três etnias. O alelo C do SNP C-1237T foi associado significativamente com o aumento do risco de asma (OR: 1.85, CI: 1.05 - 3.25) em euro-americanos. Contudo, em japoneses, o resultado não foi observado em crianças asmáticas ao se analisar este SNP (NOGUCHI et al., 2004). A revisão sistemática e meta-análise realizado por Tizaoui et al. (2015) mostrou que este polimorfismo (C-1237T - rs5743836) não apresentou associação com a asma sob a forma recessiva, entretanto o alelo mais frequente T apresentou uma associação *boderline* com asma, sugerindo que o alelo possa atuar como fator de proteção.

3 HIPÓTESE

Polimorfismos nos genes dos TLRs estão envolvidos nos mecanismos desencadeadores de atopia e asma na população de Salvador, Bahia.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos nos genes de receptores *toll like* (TLRs) com atopia e fenótipos de asma em crianças residentes na cidade de Salvador, Bahia.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Descrever a frequência de polimorfismos nos genes dos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e TLR9 na população estudada.

4.2.2 Avaliar a associação entre a frequência dos alelos de polimorfismos nos genes do TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 e do TLR9 com soropositividade para IgE anti-alérgenos, hipersensibilidade cutânea, presença de sibilância/asma e fenótipos de asma na população estudada.

4.2.3 Analisar a interação gene-ambiente, investigando o efeito modificador induzido pela presença das infecções (por vírus da Herpes Simples -VHS, vírus da Hepatite A, *Toxoplasma gondii* e *Helicobacter pilory*) na associação entre polimorfismos dos TLRs com soropositividade para IgE antialérgicos, hipersensibilidade cutânea e sibilância/asma.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização da população de estudo

O Programa SCAALA (Social Change in Asthma and Allergy in Latin America) (ver descrição detalhada sobre a população de estudo em Barreto et al., 2006) investiga os fatores de risco para asma e doenças alérgicas em crianças da cidade de Salvador - BA, numa coorte de 1445 crianças. Os dados analisados para marcadores de atopia e sintomas de asma e genéticos foram coletados em um único momento em 2005. Em virtude do trabalho ser realizado numa população amplamente miscigenada, torna o estudo diferenciado em relação ao eixo Europa-EUA. Para esta análise a população foi composta por 1.247 crianças com faixa etária entre 4-11 anos, residentes em micro áreas da periferia da cidade de Salvador -BA. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA (CEP: 003-05/CEP-ISC) e Comitê Nacional de Pesquisa (CONEP, resolução número 15.895/2011). O termo de consentimento livre e esclarecido foi apropriadamente obtido do responsável legal de cada criança para a realização do inquérito. Na figura seis é apresentado o fluxograma dos métodos do estudo.

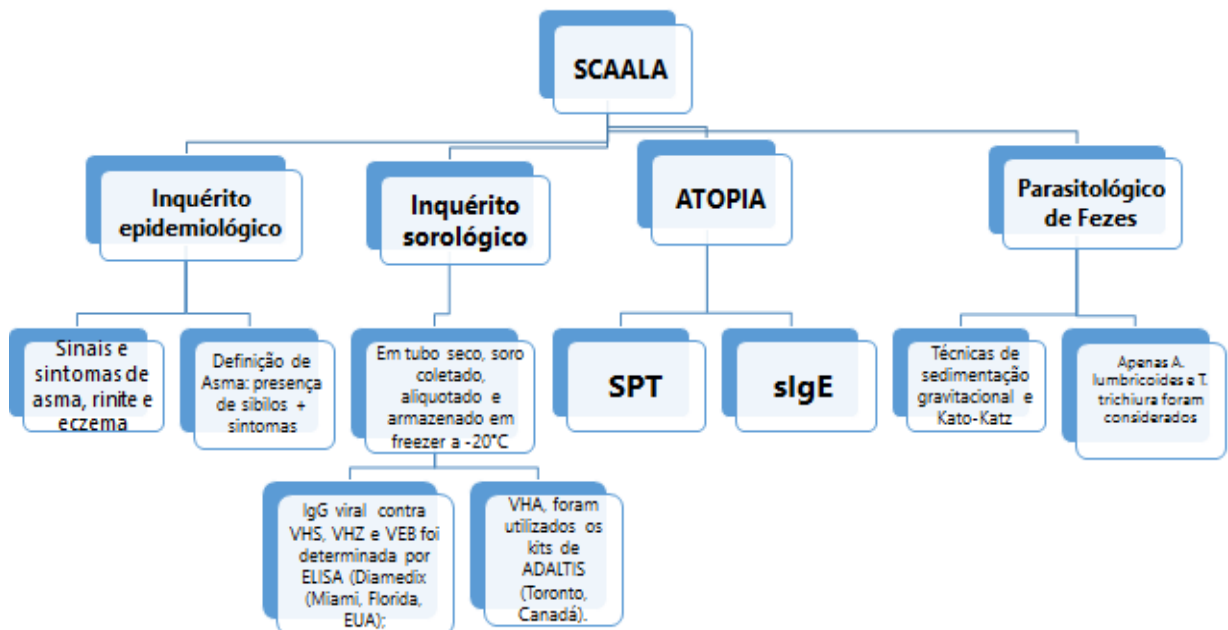


Figura 6: Fluxograma apresentando os métodos empregados no estudo.

5.2 Inquérito epidemiológico

Os questionários do ISAAC, fase II, foram aplicados em 1.445 crianças para determinar a prevalência de asma. O questionário, traduzido para o português, foi aplicado por pesquisadores treinados aos pais ou cuidadores sobre os prováveis sinais e sintomas de asma, rinite e eczema atópico e fatores de risco relacionados. A morbidade de asma foi determinada com o uso do questionário GINA. Os critérios utilizados para a classificação dos indivíduos em asmáticos foram baseados naqueles indivíduos cujos pais ou responsáveis responderam afirmativamente às seguintes questões: presença de chiado ou piado no peito nos últimos doze meses; e pelo menos, uma das alternativas relacionadas com asma: presença de tosse seca à noite, desde que não tenha sido ocasionado por gripe ou resfriado; ter observado chiado ou piado no peito ao respirar durante ou depois de realizar exercícios; ter apresentado pelo menos quatro crises de chiado no peito no último ano; ter despertado à noite por causa de chiado ou piado no peito no período de doze meses; ter asma diagnosticada por médicos.

5.3 Inquérito sorológico/hematológico

A coleta de sangue para obtenção de soro foi realizada em tubo seco. Após a coagulação do sangue, os tubos foram centrifugados e os soros coletados e, em seguida, aliquotados e armazenados em freezer a -20°C até o momento dos ensaios sorológicos.

A detecção de IgG anti-viral em soros de crianças, contra o vírus do herpes simples (VHS), vírus herpes-zóster (VHZ) e vírus de Epstein-Barr (VEB) e contra o *H.pilory* foi realizada por ELISA utilizando kits de Diamedix (Miami, Florida, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para o vírus da hepatite A (VHA), foram utilizados os kits de ADALTIS (Toronto, Canadá). Os pontos de corte foram determinados pelo índice obtido pela relação: absorvância da amostra / absorvância do calibrador (solução contendo soro ou plasma humano desfibrinado, fracamente reagente para anticorpos contra o vírus respectivo e 0,1% de azida sódica). Índices superiores a 1,1 foram considerados positivos, inferior a 0,9 foram considerados

negativos e entre 1,1 e 0,9 foram consideradas indeterminadas, e essas amostras foram excluídos da análise.

5.4 Teste de puntura cutâneo, dosagem de IgE e definição de atopia

Os SPTs (*Skin prick tests*), testes de puntura cutâneo foram realizados no antebraço direito de cada criança utilizando extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, fungos, epitélios de cães e gatos (todos do ALK-Abello, São Paulo, Brasil). Foram utilizadas solução salina e solução de 10 mg/ml de histamina como controles negativos e positivos, respectivamente. As reações foram lidas depois de 15 minutos e foram consideradas positivas, as reações que possuíam o tamanho do diâmetro médio da pápula pelo menos 3 mm maior do que o controle negativo. A frequência das reações positivas para os testes com epitélios de cão e gato e com uma mistura de alérgenos fúngicos foram baixos (<4%) e, com isso, foram excluídos das análises.

A concentração de IgE específica foi determinada usando o ensaio de ImmunoCAP, para os seguintes aerolérgenos: *Blomia tropicalis* (d201), *Dermatophagoides pteronissinus* (d1), *Blatella germanica* (i6) e *Periplaneta americana* (i206) (Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden). Os resultados foram expressos em kU/L (1 KU/L corresponde a 2,4 ng/ml) obtidos de uma curva padrão produzida com o uso de diluições seriadas de IgE humano contra um soro padrão para IgE da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Uma vez que a prevalência de IgE específica para cada um dos alérgenos estudados era maior do que a prevalência de SPT e as frequências de positividade do SPT entre aqueles alérgenos sem sIgE apresentaram prevalência muito baixos [fungos (0,5%), epitélio cão (1,1%) e epitélio de gato (0,9%)], a atopia foi definida como a presença de, pelo menos, um resultado de IgE específica ≥ 0.70 kU / L, independentemente dos resultados SPT.

5.5 Parasitológico de fezes

Duas amostras de fezes foram coletadas de cada criança em dois dias alternados e analisados utilizando as técnicas de sedimentação gravitacional e de

Kato-Katz (KATZ et al., 1972) para detectar ovos de helmintos. Como os percentuais de ancilostomídeos (0,1%), *Enterobius vermiculares* (1,4%), *Strongyloides stercoralis* (0%) e *S. mansoni* (0%), foram raros ou ausentes na população em estudo, estas helmintíases foram excluídas da análise e só *A. lumbricoides* e *T. trichiura* foram considerados na análise presente.

5.6 Genotipagem e associação entre polimorfismos nos TLRs com atopia/asma

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico utilizando protocolo da Gentra® Puregene® Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para a genotipagem foi utilizado um painel comercial da Illumina HumanOmni2.5-8 Kit BeadChip (www.illumina.com) do Consórcio EPIGEN-Brasil. Para o controle de qualidade foi aplicado os seguintes filtros: taxa de chamada da genotipagem (call rate) inferior a 0,98; desequilíbrio de Hardy-Weinberg com valor de p inferior a 10^{-4} e valor de p para o alelo de menor frequência (Minor Allele Frequency – MAF – Alelo de Menor Frequência) inferior a 1% (LAURIE et al., 2010).

5.7 Análises estatísticas

Associações entre os SNPs com marcadores de atopia e presença de sibilância/asma: As análises das associações entre os polimorfismos para TLRs com positividade ao SPT, sIgE e presença de sibilância/asma, foram realizadas utilizando regressão logística bivariada (não ajustada) e multivariada (ajustada por sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual). As permutações adaptativas foram utilizadas na análise bivariada e multivariadas. Esses valores têm como propriedades desejáveis, relaxar suposições sobre normalidade de fenótipos contínuos e o equilíbrio Hardy-Weinberg, tratando de alelos raros e tamanho pequeno da amostra, fornecendo um quadro que permite a correção de teste múltiplo e o controle para relações familiares por permutado dentro do *cluster*. Além disso, as permutações adaptativas são mais adequadas do que os métodos tradicionais de correção para múltiplos testes, pois leva-se em consideração a relação de dependência entre os SNPs em desequilíbrio de ligação (LD). Foi considerado como associações significativas quando o valor de p, foi

menor ou igual a 0,01. Empregou um valor de p mais conservador com o intuito de reduzir as chances de resultados falso-positivos.

Para a construção da variável ancestralidade genética individual: As análises foram baseadas em 370.539 SNPs compartilhados por amostras do Projeto HapMap, o *Human Genome Diversity Project* - Projeto Diversidade do Genoma Humano (HGDP) e da população do estudo Epigen-Brasil. Como painéis externos, foram utilizadas as seguintes amostras HapMap: 266 africanos, 262 europeus, 77 miscigenadas mexicanos-americanos e 83 afro-americanos, e 93 americanos nativos do HGDP. Para estimar a contribuição dos africanos, europeus e americanos nativos para os indivíduos do SCAALA foi utilizado o software ADMIXTURE (ALEXANDER et al., 2009). Foram assumidos três grupos para imitar os três principais componentes de ascendência brasileira, e foi utilizado um modo sem supervisão, a fim de permitir que o programa identificasse agrupamentos correspondendo às populações ancestrais unicamente a partir da estrutura genética do nosso conjunto de dados. ADMIXTURE realiza uma máxima estimativa de verossimilhança baseada no modelo de proporções de ascendência individuais, usando um algoritmo de maximização da expectativa.

Associações entre os SNPs e fenótipos de asma: Após a análise multivariada, foi realizada regressão logística multinomial ajustada para sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual. Tendo o modelo genético aditivo adotado em todas as análises. Foi considerado significativo associações com valor de $p \leq 0,05$.

Interação gene-ambiente: Os testes de associação genética com os sintomas de asma, SPT e slgE foram analisados avaliando se a presença das infecções (vírus da Herpes Simples -VHS, vírus da Hepatite A, *T.gondii* e *H. pilory*) possuía um efeito modificador utilizando como recurso a regressão logística ajustada por sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual. Foi considerado significativo análises com $p < 0,05$. A condição de vacinação da Hepatite A não foi considerada neste estudo, pois esta vacina não é fornecida pelos programas

públicos de vacinação e a amostra componente deste estudo é pertencente a classe social baixa, o que inviabiliza a sua administração.

6 RESULTADOS

A tabela 2 apresenta as características demográficas e clínicas da população estudada. O percentual de crianças do masculino (54%) foi superior ao gênero feminino (46%), com predomínio de crianças na faixa etária entre 6 e 7 anos (40,2%). O percentual de escolaridade materna mais encontrado foi o de ensino fundamental incompleto ou completo (47,7%). Em relação às características clínicas: 30,6% apresentaram SPT positivo e 38,3% tiveram $\text{slgE} \geq 0,70\text{KU/L}$ para pelo menos um dos aerolérgenos investigados; o parasitológico positivo para infecções helmínticas (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*) foi detectada em 23% das crianças e as prevalências de atopia e dos fenótipos de asma, foram: crianças saudáveis (não asmáticas e não atópicas: 46,6%); asmáticas atópicas (13,6%); asmáticas não atópicas (15,2%) e atópicas não asmáticas (24,6%).

Tabela 2 – Frequência das variáveis utilizadas em 1247/crianças estudadas

Variáveis	Nº Absoluto	Nº (%)
Gênero da criança	1247	100
- Feminino	573	46
- Masculino	674	54
Idade		
- 4 e 5 anos	334	26,8
- 6 e 7 anos	502	40,2
- 8 a 12 anos	411	33
Educação Materna		
- Ensino fundamental I	272	22,1
- Ensino fundamental II completo ou incompleto	587	47,7
- Ensino médio ou mais	371	30,2
SPT ($\geq 3\text{mm}$)		
- Sim	382	30,6
- Não	865	69,4
$\text{slgE} \geq 0,70\text{KU/L}$	477	38,3
$\text{slgE} < 0,70\text{KU/L}$	770	61,7
Fenótipos de Atopia/Asma		
- Saudável	581	46,6
- Asma atópica	170	13,6
- Asma não atópica	189	15,2
- Atópicos	307	24,6
Infecção Helmíntica	1218	100
- Sim	280	23
- Não	938	77

A Tabela 3 sumariza os SNPs significativamente associados com atopia e asma. Foram analisados 160 SNPs e 12 polimorfismos foram significantes na população do estudo. Os SNPs estão localizados em regiões funcionais bem como intrônicas. O MAF (Alelo de Menor Frequência) foi calculado para a população em estudo para cada SNP avaliado. Informações adicionais sobre os SNPs e o desequilíbrio de ligação entre os SNPs avaliados em genes dos TLRs estão localizadas no apêndice I.

Tabela 3. SNPs nos genes dos TLRs significativamente associados com atopia e asma em 1.247 crianças estudadas

SNP	CRO	Gene	Função	A1	A2	MAF
rs4833095	4	<i>TLR1</i>	Missense	T	C	0,3461
rs5743567	4	<i>TLR1</i>	Intron -2KB	T	C	0,1534
rs4072548	4	<i>TLR1</i>	Intron	C	A	0,1574
rs5744165	1	<i>TLR5</i>	Coding synonymous	A	G	0,01299
rs2241097	1	<i>TLR5</i>	Intron	G	T	0,1842
rs5744139	1	<i>TLR5</i>	Intron	T	G	0,02446
rs5743810	4	<i>TLR6</i>	Missense	T	C	0,1567
rs1039559	4	<i>TLR6</i>	Intron	C	T	0,2693
rs5743805	4	<i>TLR6</i>	Intron	A	G	0,1944
rs7669329	4	<i>TLR6</i>	Intron -2KB	C	T	0,3877
rs6531673	4	<i>TLR6</i>	Intron -2KB	T	C	0,2925
rs3853839	X	<i>TLR7</i>	3' UTR	G	C	0,2157

Legenda: SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; CRO: Cromossomo; A1: Alelo mutante; risco; A2: Alelo selvagem/referência.

A tabela Tabela 4, apresenta detalhes das associações encontradas entre os SNPs nos genes dos nove Receptores *Toll Like* (TLR1-TLR9) estudados. Os resultados apresentados são apenas para os SNPs que tiveram associações significativas considerando $p < 0,01$ e utilizando o modelo genético aditivo.

Tabela 4. Associação entre os SNPs dos TLRs e marcadores de atopia e sibilância/asma em 1.247 crianças estudadas

Desfechos	Alelos	MAF	P valor ^a	OR ^b	IC 95%	P valor ^c
SPT para aeroalérgenos						
<i>TLR1</i>						
rs4833095	C/T	T	7.00e-06	1,42	1,17 – 1,71	0,0002
rs5743567	C/T	T	0,0021	0,67	0,51 – 0,88	0,0054
rs4072548	A/C	C	0,0012	0,67	0,51 – 0,87	0,0030
<i>TLR6</i>						
rs5743810	C/T	T	5.81e-05	1,44	1,12 – 1,84	0,003
rs1039559	T/C	C	7.15e-05	1,40	1,15 – 1,70	0,0009
rs5743805	G/A	A	0,0004	0,70	0,55 – 0,89	0,005
rs7669329	T/C	C	0,0007	0,74	0,62 – 0,90	0,002
rs6531673	C/T	T	0,0005	1,31	1,08 – 1,59	0,006
slgE para aeroalérgenos (>0,70KU/L)						
<i>TLR6 (rs5743810)</i>	C/T	T	6.11e-05	1,43	1,13 – 1,81	0,004
<i>TLR5</i>						
rs5744165	G/A	A	0,025	2,47	1,19 – 5,12	0,008
rs5744139	G/T	T	0,002	2,0	1,17 – 3,41	0,007
<i>TLR7 (rs3853839)</i>		G	0,015	1,38	1,08 – 1,76	0,009
Sibilância/asma						
<i>TLR1(rs4833095)</i>	C/T	T	0,0325	1,32	1,07 – 1,62	0,009
<i>TLR5 (rs2241097)</i>	T/G	G	0,011	1,36	1,08 – 1,73	0,009

^a Foi utilizado permutações adaptativas para análise bivariada.

^b Uso de regressão logística ajustada por sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual.

^c Utilizando permutações adaptativas para a análise de regressão.

O rs4833095 localizado no gene *TLR1* apresentou associação positiva com o SPT positivo para aeroalérgenos comuns (OR: 1,42; IC: 1,17 -1,71; p = 0,0002) e a presença de asma (OR: 1,32; IC: 1,07 – 1,62; p = 0,009). No *TLR1*, a população estudada apresentou mais dois polimorfismos, sendo os dois associados negativamente com atopia: rs5743567 (OR: 0,67; IC: 0,51 – 0,88; p = 0,0054) e rs4072548 (OR: 0,67; IC: 0,51 – 0,87; p = 0,0030). O *TLR6* apresentou cinco polimorfismos associados com SPT, sendo três associados positivamente [rs5743810 (OR: 1,44; IC: 1,12 – 1,84; p = 0,003), rs1039559 (OR: 1,40; IC: 1,15 – 1,70; p = 0,0009) e rs6531673 (OR: 1,31; IC: 1,08 – 1,59; p = 0,006)] e dois negativamente [rs5743805 (OR: 0,70; IC: 0,55 – 0,89; p = 0,005) e rs7669329 (OR: 0,74; IC: 0,62 – 0,90; p = 0,002)]. A slgE foi positivamente associada aos polimorfismos nos genes do *TLR6*, [rs5743810 (OR: 1,43; IC: 1,13 – 1,81; p = 0,004)] nos do *TLR5* [rs5744165 (OR: 2,47; IC:1,19 – 5,12; p = 0,008) e rs5744139 (OR: 2,0; IC: 1,17 – 3,41; p = 0,007)] e no gene do *TLR7* [rs3853839 (OR: 1,38; IC:

1,08 – 1,76; $p = 0,009$]. Enquanto isto, o polimorfismo rs2241097 no *TLR5* foi associado positivamente com sintomas de asma (OR: 1,36; IC: 1,08 – 1,73; $p = 0,009$). É importante ressaltar que o rs4833095 foi o único polimorfismo que apresentou associação com a presença de sibilos e de atopia, enquanto o rs5743810 (*TLR6*) foi o único significativamente associado com o SPT assim como com a sIgE para os aeroalérgenos comuns.

Tabela 5. Associação entre os SNPs em *TLRs* e fenótipos de asma tendo como grupos de referência indivíduos saudáveis ou indivíduos atópicos, não asmáticos

Marcador	Asmáticos não-atópicos (vs. saudáveis (não-asmáticos/ não-atópicos) ^b	Asmáticos atópicos (vs. saudáveis (não-atópicos/não-asmáticos) ^b	Asmáticos atópicos (vs. atópicos não-asmáticos) ^b
	OR (95% IC)	OR (95% IC)	OR (95% IC)
<i>TLR1</i>			
rs4833095	1,34 (1,03 – 1,74)*	1,34 (1,03 – 1,75)*	1,00 (0,76 – 1,34)
rs5743567	0,83 (0,59 – 1,17)	0,73 (0,50 – 1,07)	0,92 (0,61 – 1,40)
rs4072548	0,84 (0,60 – 1,17)	0,70 (0,48 – 1,02)	0,88 (0,58 – 1,34)
<i>TLR5</i>			
rs2241097	1,36 (1,02 – 1,83)*	1,16 (0,85 – 1,59)	1,10 (0,78 – 1,55)
rs5744165	2,14 (0,68 – 6,79)	4,42 (1,63 – 11,95)**	1,78 (0,70 – 4,52)
rs5744139	0,51 (0,17 – 1,51)	2,31 (1,17 – 4,55)*	1,59 (0,77 – 3,32)
<i>TLR6</i>			
rs5743810	1,40 (0,98 – 2,00)	1,60 (1,13 – 2,27)**	1,04 (0,72 – 1,51)
rs1039559	1,12 (0,84 – 1,49)	1,45 (1,10 – 1,91)**	1,18 (0,87 – 1,59)
rs5743805	0,97 (0,71 – 1,31)	0,92 (0,67 – 1,27)	1,07 (0,75 – 1,54)
rs7669329	1,02 (0,79 – 1,31)	0,91 (0,70 – 1,18)	1,08 (0,81 – 1,44)
rs6531673	1,05 (0,79 – 1,38)	1,47 (1,12 – 1,93)**	1,28 (0,96 – 1,73)
<i>TLR7</i>			
rs3853839	1,13 (0,88 – 1,44)	1,07 (0,83 – 1,37)	0,90 (0,69 – 1,17)

^b Regressão logística multinomial ajustada para sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual. Modelo genético aditivo foi adotado em todas as análises. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

Na tabela 5, estão apresentadas as associações entre os polimorfismos dos *TLRs* e os fenótipos de asma não-atópica e atópica, utilizando como recurso estatístico a regressão logística politômica e dois grupos de referência para a análise do grupo asmático atópico. Para esta análise foram considerados apenas os SNPs significativamente associados com atopia e sintomas de asma na análise multivariada. Foram encontradas as seguintes associações: o polimorfismo do gene do *TLR1*, o rs4833095 (OR: 1,34; IC: 1,03 – 1,74; $p < 0,05$) e do *TLR5*,

rs2241097 (OR: 1,36; IC: 1,02 – 1,83; $p < 0,05$) foram associados positivamente e significativamente aos asmáticos não-atópicos; o SNP rs4833095 do *TLR1*, (OR: 1,34; IC: 1,03 – 1,75; $p < 0,05$), os SNPs do *TLR5*, rs5744165 (OR: 4,42; IC: 1,63 – 11,95; $p < 0,01$) e rs5744139 (OR: 2,31; IC: 1,17 – 4,55; $p < 0,05$) e os SNPs do *TLR6*, rs5743810 (OR: 1,60; IC: 1,13 – 2,27; $p < 0,01$), rs1039559 (OR: 1,45; IC: 1,10 – 1,91; $p < 0,01$) e rs6531673 (OR: 1,47; IC: 1,12 – 1,93; $p < 0,01$) foram associados positivamente a asma atópica em relação a crianças não-asmáticas e não-atópicas. Entretanto quando a associação destes SNPs foi analisada com o grupo de referência atópicos e não asmáticos a associação desapareceu, demonstrando que de fato estes SNPs se associam apenas com atopia. Interessantemente o SNP rs4833095 (*TLR1*) apresentou associação com o fenótipo de asma não atópica e com atopia.

Nas tabelas 6 e 7 são apresentadas as análises de interação gene-ambiente entre os polimorfismos associados e o risco para asma e atopia na presença ou ausência de soro-positividade para algumas as infecções investigadas na população de estudo.

Tabela 6. Interação gene-ambiente. Efeito modificador dos patógenos sobre a associação entre polimorfismos de *TLRs* e asma

Sibilos/Asma	Soropositividade	SNPs	OR	95% IC ^a	P Valor ^b
<i>TLR2</i>	VHA				
	Sim	rs1816702	0,44	(0,25 – 0,80)	0,007
	Não	rs1816702	1,36	(1,06 – 1,73)	0,013
<i>TLR7</i>	Sim	rs5743740	2,14	(1,11 – 4,14)	0,023
	Não	rs5743740	0,82	(0,60 – 1,12)	0,220
<i>TLR8</i>	<i>H. pilory</i>				
	Sim	rs 5744068	2,29	(1,10 – 4,74)	0,025
	Não	rs5744068	0,78	(0,52 – 1,17)	0,237

^a Regressão logística ajustada por sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual.^b $p < 0,05$.

O SNP rs1816702 (*TLR2*) se associou positivamente com os sintomas de asma em indivíduos soronegativos para o vírus da Hepatite A (VHA) (OR: 1,36; IC: 1,06 – 1,73); no entanto, na presença da soropositividade o polimorfismo foi associado à proteção para asma (OR: 0,44; IC: 0,25 – 0,80). O polimorfismo rs5743740 (*TLR7*) foi associado positivamente à asma (OR: 2,14; IC: 1,11 – 4,14) nos indivíduos soropositivos para o vírus da Hepatite A (VHA). O polimorfismo

rs5744068 (*TLR8*) foi associado positivamente com asma (OR: 2,29; IC: 1,10 – 4,74) em indivíduos soropositivos para *H. pilory*.

Tabela 7. Interação gene-ambiente. Efeito modificador dos patógenos sobre a associação entre polimorfismos de *TLRs* e atopia (SPT e sIgE)

Fenótipo	Soropositividade	SNPs	OR	95% IC ^a	P Valor ^b
SPT	VHS				
<i>TLR2</i>	Sim	rs5743701	2,88	1,16 – 7,10	0,021
		rs78870609	2,44	1,08 – 5,54	0,031
	Não	rs5743701	0,29	0,08 – 1,02	0,053
		rs78870609	0,29	0,08 -1,02	0,054
	<i>T. gondii</i>				
<i>TLR3</i>	Sim	rs1879026	2,65	1,24 – 5,64	0,011
	Não	rs1879026	0,85	0,62 – 1,16	0,317
	<i>H. pilory</i>				
<i>TLR8</i>	Sim	rs1013151	0,56	0,35 – 0,89	0,015
	Não	rs1013151	1,05	0,81 – 1,35	0,708
sIgE (>0,70KU/L)	VHS				
<i>TLR2</i>	Sim	rs5743701	2,72	1,08 – 6,82	0,032
		rs78870609	3,20	1,36 – 7,56	0,007
	Não	rs5743701	0,47	0,16 – 1,30	0,147
		rs78870609	0,47	0,17 – 1,31	0,149

^a Uso de regressão logística ajustada por sexo, idade, infecção helmíntica e ancestralidade genética individual. ^b p < 0,05.

Os polimorfismos rs7870609 e rs5743701 (*TLR2*) foram associados positivamente com a atopia, usando como marcador o SPT (OR: 2,44; IC: 1,08 – 5,54 e OR: 2,88; IC: 1,16 – 7,10 respectivamente) ou a sIgE >0.70KU/L para aeroalérgenos (OR: 3,20; IC: 1,36 – 7,56 e OR: 2,72; IC: 1,08 – 6,82 respectivamente) em indivíduos soropositivos para o vírus da *Herpes simplex* (VHS). Em indivíduos soropositivos para o *T. gondii*, o rs1879026 (*TLR3*) foi associado ao SPT positivo (OR: 2,65; IC: 1,24 – 5,64). E o polimorfismo em *TLR8*, rs1013151 foi associado à redução do risco para o SPT positivo (OR: 0,56; IC: 0,35 – 0,89) em indivíduos soropositivos para *H. pilory*. É importante enfatizar que, os polimorfismos no gene do *TLR2* (rs7870609 e rs5743701) foram os únicos associados com o aumento do risco para atopia utilizando ambos os marcadores SPT e sIgE para aeroalérgenos comuns em soropositivos para o vírus da Herpes Simples (VHS). Como também enfatizar que dentre os patógenos estudados como modificador de efeito, o vírus da Herpes Simples foi o único que ao exercer a ação modificadora

sempre esteve associado ao aumento do risco para atopia, mesmo quando estudado em polimorfismos diferentes.

7 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, o estudo dos polimorfismos de genes tem mostrado associação com várias doenças humanas (SCHWARTZ & COOK, 2005; HAERYNCK et al. 2013) e os estudos dos polimorfismos nos genes dos *TLRs* realizados na população mundial, em particular na Europa tem apresentado forte associação com a atopia e a asma (KORMANN et al., 2008; REIJMERINK et al., 2011; KOPONEN et al., 2014).

Os trabalhos demonstram forte associação entre os polimorfismos da subfamília do *TLR2*, do *TLR4* e *TLR9* com as doenças alérgicas (KANAGARATHAM et al., 2011). O presente estudo replicou em uma população de crianças da América do Sul, a associação entre os polimorfismos da subfamília do *TLR2* com asma e atopia, além de encontrar outros polimorfismos no *TLR5*, ainda não associados com doenças alérgicas, e um polimorfismo no *TLR7*, associado à atopia, também nunca antes descrito associado aos marcadores aqui estudados.

Dentre os três polimorfismos no *TLR1* estudados no presente trabalho, o rs4833095 (C/T) foi associado com o aumento do risco para asma e atopia (SPT positivo), com o resultado sendo reproduzido após a análise politômica, e reforçando a associação apenas com a asma não atópica. Vale salientar ainda que na análise politômica, esta variante está intimamente ligada a atopia. O polimorfismo rs4833095 está localizado na região funcional do gene (*missense*), promovendo uma troca do resíduo de aminoácido asparagina na posição 248 pelo resíduo de aminoácido serina (Asn248Ser), o que pode desencadear modificação na ação e estrutura da proteína gerada (BROOKES, 1999; GAO & HUANG, 2004 apud DÁVILA et al., 2009). Os dados deste estudo corroboram com estudo realizado com indivíduos alérgicos em Taiwan, no qual Yang & Chiang (2015) observaram que o SNP rs4833095, em indivíduos homocigotos para o alelo C, foi associado à redução dos níveis de IgE em pacientes alérgicos. Numa coorte alemã, o rs4833095 (T/C), mediante análise dominante, foi associado à proteção para atopia e asma atópica (KORMANN et al., 2008), contudo não fica claro se associação é com a atopia ou com a asma. É importante observar que entre as populações dos dois estudos, a alemã e a soteropolitana, a frequência alélica difere para o SNP rs4833095:

enquanto na população deste estudo, o alelo C é o de referência e o alelo T é o menos frequente; na população alemã, o alelo T é o alelo de referência, enquanto o alelo C é o alelo raro. Assim, o sentido das associações entre os dois estudos são os mesmos, com o alelo T sendo associado ao risco para doenças alérgicas.

Os dois outros polimorfismos encontrados no gene do *TLR1* (rs5743567 e rs4072548) foram descritos pela primeira vez neste estudo associados como fator de proteção para atopia, utilizando como marcador clínico, o SPT. Os dois polimorfismos citados acima estão localizados em regiões não-codificadoras e em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs4833095 ($d' = 1$) (apêndices II). Outros polimorfismos no *TLR1* foram relacionados com a presença de asma e atopia, a citar: o rs5743595 associado à proteção para atopia e asma atópica (KORMANN et al., 2008) e o SNP rs5743618, em indivíduos homocigotos para o alelo G, foi associado ao risco de asma em crianças com idade entre um e seis anos (KOPONEN et al., 2014), entretanto estes polimorfismos não foram encontrados no presente estudo.

Entre os co-receptores que formam heterodímeros com o *TLR2*, o gene do *TLR6* foi o que apresentou maior número de polimorfismos com associação para atopia, na população estudada, corroborando para a replicação de estudos anteriores, que encontraram forte associação dos polimorfismos do *TLR6* com doenças alérgicas (TANTSIRA et al., 2004; HOFFJAN et al., 2005; QIAN et al., 2010; KORMANN et al., 2008; KOPONEN et al., 2014). O polimorfismo rs5743810 foi associado positivamente ao SPT e a IgE específica para aerolígenos na análise multivariada e teve a associação confirmada para o risco de atopia, mediante análise politômica. O SNP rs5743810 localiza-se em região codificadora (*missense*), o que permite alteração no aminoácido (Ser249Pro), promovendo alteração funcional (TANTISIRA et al., 2004).

A associação positiva entre rs5743810 e atopia replica estudos anteriores (KORMANN et al., 2008; KOPONEN et al., 2014). Em crianças com idade até sete anos na Finlândia, Koponen e colaboradores (2014) encontraram aumento do risco para atopia na presença do polimorfismo rs5743810 na presença do alelo mais raro T em crianças com bronquiolite antes dos seis meses de vida. Além disso, em estudo alemão, Kormann e colaboradores (2008) encontrou associação entre o rs5743810 e o risco para asma e atopia.

Ratificando a importância deste co-receptor da sub-família do TLR2, na análise multivariada, foram encontrados mais quatro polimorfismos associados à atopia (tabela 4). Destes, dois estavam associados ao aumento do risco de atopia (rs1039559 e rs6531673) e dois associadas à proteção para atopia (rs5743805, rs7669329). As associações encontradas para rs1039559 e rs6531673 com a atopia foram confirmadas na análise politômica. Os quatro polimorfismos estão localizados em região não codificante, no entanto, estão em alto desequilíbrio de ligação com o rs5743810, SNP localizado em região codificante (apêndices II). Os polimorfismos rs1039559 e rs5743805, localizados no bloco 2 estão em completo desequilíbrio de ligação com o rs5743810 ($d' = 1$) e os SNPs rs7669329 e rs6531673 localizados no bloco 4 estão em desequilíbrio de ligação com rs5743810 ($d' > 0,9$). O polimorfismo rs1039559 associado à população deste estudo ao risco de atopia (SPT positivo), já havia sido associado com o risco de IgE total aumentada e a presença de irmãos mais velhos num estudo de interação gene-ambiente realizado na Holanda (REIJMERINK et al., 2011). Kormann e colaboradores (2008) ainda encontrou o polimorfismo rs5743789 (*TLR6*) associado à proteção para asma atópica, entretanto, este polimorfismo não foi estudado em nossa população. Os nossos resultados corroboram com a literatura vigente, de que variantes nos heterodímeros *TLR1* e *TLR6* podem estar diretamente envolvidos no mecanismo da atopia e asma (KORMANN et al., 2008; KOPONEN et al., 2014). Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar o impacto destes SNPs na expressão destes genes nesta população. Na coorte alemã, os SNPs associados à proteção para doenças alérgicas, a avaliação funcional realizada através da expressão de RNAm e dosagem citocinas atestou aumento na expressão do RNAm em indivíduos homocigotos para o alelo raro nos polimorfismos no *TLR1* [o rs5743595 (alelo raro C) e o rs4833095 (alelo raro C)] e em *TLR6* [o rs5743789 (alelo raro A)] e *TLR10*, [o rs4129009 (alelo raro G)] e, ainda, revelou aumento das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-12 e TNF) e redução da produção de IL-4 (perfil Th2). (KORMANN et al., 2008).

O *TLR5* reconhece a flagelina de bactérias gram-positivas e gram-negativas (BEZEMER et al., 2012). Estudos mostram associação de polimorfismo no *TLR5* às doenças de cunho autoimune, tais como, a doença de Crohn (SHERIDAN et al., 2013) e doença de Graves (XIAO et al., 2014), no entanto, apesar de SNPs no *TLR5* já terem sido estudados em outras populações anteriormente, os

polimorfismos em *TLR5* não foram associados significativamente com asma e atopia (KORMANN et al., 2008; RODUIT et al., 2011). Entretanto, quando analisado a interação-gênica nos polimorfismos rs5744168 e rs5744174 (*TLR5*), estes apresentaram associação protetora significativa para a dermatite atópica e que o contato com animais da fazenda e com gatos, respectivamente, modifica o efeito desta associação (RODUIT et al., 2011).

Neste trabalho, foram encontrados alguns SNPs no *TLR5* associados com asma, rs2241097, e atopia, rs5744165 e rs5744139, tanto na análise multivariada como politômica, sendo assim os primeiros SNPs no *TLR5* a serem associados às doenças alérgicas. Um dos SNPs encontrado nesta população, o rs2241097, está em desequilíbrio de ligação com o rs5744174 (Phe616Leu) ($d' = 1$), descrito anteriormente em estudos de doenças autoimunes (SHERIDAN et al., 2013; XIAO et al., 2014), associado com o declínio extremo da função pulmonar (FEV1) em pacientes com fibrose cística (HAERYNCK et al., 2013) e em estudos de interação gene-ambiente, mostrou efeito protetor pré-natal para dermatite atópica quando as mães tinham contato precoce com gatos. Os outros polimorfismos associados à atopia não estão em desequilíbrio de ligação; o rs5744139 está localizado em região não-codificadora, no entanto, o rs5744165 está localizado em região codificadora sinônima, o que apesar da alteração no códon, o aminoácido é o mesmo daquele codificado pelo códon sem o SNP, entretanto mesmo em modificações silenciosas, pode ocorrer modificação no produto final através de mecanismos que ainda não foram completamente explicados (GAO & HUANG, 2004 apud DÁVILA et al., 2009). É possível inferir que as associações encontradas entre os SNPs do *TLR5* para asma e atopia estejam relacionadas à ação que é estabelecida pelo TLR5, já que o mesmo é responsável pelo reconhecimento tanto de bactérias gram-positivas, como os receptores da sub-família do TLR2, como de bactérias gram-negativas, como o receptor TLR4. Há trabalhos associando a presença de polimorfismos em *TLR4* e *TLR5* com o risco de infecções bacterianas e respostas imunes alteradas em recém-nascidos (SAMPATH et al., 2013). Estudos mostraram expressão reduzida em *TLR5* em pacientes com asma, inclusive em monócitos e macrófagos em comparação com indivíduos saudáveis e esta redução foi acompanhada de redução na produção da citocina regulatória IL-10 e de

citocinas Th1, o que contribuiria para o desequilíbrio na balança Th1/Th2 e o predomínio da resposta alérgica (LUN et al., 2009).

É importante ressaltar que, mediante a análise politômica, não há associação entre asma atópica e SNPs nos genes de TLR1 (rs4833095), TLR5 (rs5744165 e rs5744139) e TLR6 (rs5743810, rs10339559 e rs6531673) pois esta associação desaparece quando o grupo de referência é o grupo atópico não asmático, demonstrando que a associação existente é possivelmente com atopia.

Apenas um polimorfismo no *TLR7* (rs3853839), em região não codificadora intergênica (3' UTR) do cromossomo X, envolvendo o alelo mutante C, foi associado à atopia na análise multivariada, no entanto a associação desapareceu mediante análise politômica. Apesar do SNP rs3853839 ainda não ter sido associado às doenças alérgicas em outras populações, o mesmo já havia sido descrito em outros estudos associados ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) em populações asiáticas (SHEN et al., 2010; KAWASAKI et al., 2011; WANG et al., 2014) e proteção contra infecção do vírus da Hepatite C (HCV) no sexo feminino na população chinesa (YUE et al., 2014). O mecanismo imunogênico provável para explicar a associação deste SNP com doenças de origem em distúrbios imunológicos de perfis diferentes (Th1/Th17 e/ou Th2) em populações distintas seria o mesmo, e teria como suporte a teoria da higiene (STRACHAN, 1989) e a teoria dos velhos amigos (ROOK, 2010).

Os principais polimorfismos encontrados na população do presente estudo associados principalmente à atopia são em receptores responsáveis pelo reconhecimento de bactérias (TLR1, TLR6 e TLR5). Os receptores TLR1, TLR6 e TLR10 formam heterodímeros com o TLR2 (TAPPING, OUMETI, JOHNSON, 2007). O dímero TLR1-TLR2 é responsável pelo reconhecimento das bactérias gram-positivas principalmente, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico; o dímero TLR2-TLR6, é o receptor para reconhecimento de bactérias gram-positivas e fungos (AKIRA et al., 2001; KUMAR et al., 2009). O TLR5, como citado anteriormente, é reconhecedor da flagelina de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e o TLR7 é o responsável pelo reconhecimento de RNA de simples fita viral (KVARNHAMMAR, 2013).

Há trabalhos que relacionam a importância do contato precoce entre crianças e o ambiente rural, ou mesmo com um ambiente que favoreça o contato

maior com bactérias e fungos como forma de proteção para as doenças alérgicas, tanto para atopia quanto para asma alérgica (BRAUN-FAHRLANDER et al., 2002; EDER et al., 2004) corroborando com a teoria da higiene, apresentada por Strachan (1989) e reformulada atualmente, sendo defendida como teoria dos “velhos amigos” (ROOK, 2010). Ege e colaboradores (2006) mostraram que a exposição a animais de fazenda durante a gestação, foi associada à redução do risco para a sensibilização atópica e ao aumento da expressão dos receptores TLR2, TLR4 e CD14. As evidências sugerem que a ausência dos “velhos amigos” (infecções helmínticas, microrganismos ambientais e microbiota do indivíduo), que estão associados à indução dos mecanismos imunorregulatórios, e que as variantes genéticas antes compensadas pelos “velhos amigos”, agora estariam se acumulando e promovendo aumento da resposta inflamatória com potencial suscetibilidade para desordens Th1/Th17 ou Th2 (ROOK, 2012; ROOK et al., 2014). Neste mecanismo regulatório, as células atuantes são as T regulatórias (Treg) e B regulatórias (Breg), produtoras de IL-10 e TGF- β . Os TLRs, presentes nas células dendríticas e células T regulatórias, exercem papel fundamental, promovendo a expansão de células Treg e a consequente produção de IL-10 e TGF- β (CARAMALHO et al., 2003; EDER et al., 2004; ROOK et al., 2014). No entanto, é possível inferir que, à luz das alterações polimórficas, em regiões funcionais, associado à imaturidade dos receptores na primeira infância, e o contato com alguns microrganismos (em especial, os vírus) possam alterar a sua função de forma que determine a polarização da resposta imunológica, prevalecendo o perfil Th2 (AKIRA et al., 2001; KORMANN et al., 2008; NUOLIVIRTA et al., 2012). Segundo estudo de Koponen e colaboradores (2014) o contato com vírus sincicial nos primeiros seis meses de vida desencadeando bronquiolite grave, associado ao polimorfismo no *TLR6* aumentava o risco para a presença de atopia.

É importante ressaltar ainda como provável justificativa para associações encontradas entre os polimorfismos dos *TLRs* e às doenças alérgicas, a expressão dos receptores TLRs nos mastócitos, células atuantes na ação efetora do processo alérgico. Os camundongos, quando estimulados com ligante de TLR2, produziram citocinas de perfil Th2 (SUPAJATURA et al., 2002). E em humanos, foi observado que os mastócitos expressam os TLRs da sub-família do TLR2 (TLR1, TLR2 e TLR6) e produzem os seus mediadores químicos, os leucotrienos (LTB₄,

LTC4) e as citocinas RANTES, GM-CSF, e IL-1 β quando os TLRs são estimulados (McCURDY et al., 2003; OLYNYCH et al., 2006; KANAGARATHAM et al., 2011).

Os resultados da associação interação gene-ambiente apresentados neste trabalho demonstram que a presença da infecção atuou como efeito modificador da associação entre os polimorfismos dos genes dos TLR e a atopia e asma. Pois excetuando a condição, polimorfismo rs1816702 (*TLR2*) e a ausência de soropositividade para o vírus da Hepatite A que apresentou associação com o risco para asma, as demais associações ocorreram apenas na presença das infecções. É importante salientar que, os polimorfismos agora associados com os sintomas de asma e status de atopia, quando estudados sozinhos, sem a presença do efeito modificador do ambiente/infecção, não tinham apresentado associação significativa com nenhuma variável clínica para asma e/ou atopia. Como também, os polimorfismos que apresentaram associação com asma e atopia, ao do longo estudo, não apresentaram associação significativa sob o efeito modificador dos patógenos.

Não há até o presente momento, nenhum dado relacionando a presença de soropositividade para os agentes infecciosos, vírus do *Herpes simplex* (VHS), vírus da Hepatite A (VHA), *Toxoplasma gondii* e *H. pylori*, com polimorfismos para os TLRs e o risco para asma e atopia. Os trabalhos publicados até o momento, ao apresentar a associação entre polimorfismos de TLRs, efeito modulador do meio ambiente e risco para asma e atopia, avaliam como efeito do modificador, o estilo de vida, com destaque para a dieta, o número de irmãos, o contato com animais de fazenda e domésticos, a poluição do ar, níveis de endotoxina na poeira (FUERTES et al., 2013; REIJMERINK et al., 2011; SMIT et al., 2009; VERCELLI et al., 2010; RODUIT et al., 2011).

Quando a interação gene-ambiente foi verificada analisando o efeito modificador da presença de infecções na associação de polimorfismos da imunidade inata com os desfechos de atopia e asma, os trabalhos disponíveis até a presente data, mostram apenas associações entre a bronquiolite desencadeada pelos vírus atuantes no sistema respiratório (vírus respiratório sincicial, parainfluenza e picornavírus) presença de polimorfismos nos TLRs e o risco para asma e atopia (DALEY et al., 2012; NUOLIVIRTA et al., 2013; KOPONEN et al. 2014).

É notório observar que os resultados do estudo de associação dos polimorfismos com asma e atopia, e a avaliação do efeito modificador dos patógenos sob os polimorfismos e a associação destes com asma e atopia, sugerem que as variantes da subfamília de *TLR2* são importantes no mecanismo imunogenético e fisiopatológico das doenças alérgicas para a população do SCAALA. Pois, além das associações encontradas entre os SNPs do gene do TLR6 (rs5743810, rs1039559 e rs6531673) com a atopia e o SNP rs4833095 (*TLR1*) com a asma não atópica e atopia. Ao se analisar, o efeito modificador dos patógenos em associação com os polimorfismos nos genes de TLRs, outros três polimorfismos da subfamília do *TLR2*, agora no gene do TLR2, apresentaram associação com asma e atopia. Dos três polimorfismos encontrados no gene do TLR2, dois estão localizados em região não codificante, rs1816702 (íntron) e rs78870609 (região intergênica – 5' UTR) e um está localizado na região sinônima, rs5743701. O SNP rs1816702 em indivíduos soronegativos para o vírus da hepatite A aumentou o risco para asma e na presença da infecção reduziu o risco; E os polimorfismos rs78870609 e rs5743701 em indivíduos soropositivos para o vírus do *Herpes Simplex* (VHS) aumentaram o risco para atopia. Não há na literatura vigente associação entre os polimorfismos de *TRL2* encontrados no nosso estudo e as doenças alérgicas. Entretanto, o SNP rs1816702 foi anteriormente associado às doenças inflamatórias do intestino, doença de Cronh e colite ulcerativa (BANK et al., 2014) e à trombose arterial em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico entre afro-americanos e americanos de origem europeia (KAISER et al., 2014). Além disso, o rs1816702 está em máximo desequilíbrio de ligação com o rs3804100 ($d' = 1$), polimorfismo localizado em região codificadora sinônima que, em estudo realizado na Noruega, os indivíduos homocigotos para o alelo T, foi associado à asma e diabetes tipo 1 (BJORNVOLD et al., 2009). Os resultados corroboram com inúmeros estudos que sugerem que variantes da subfamília *TLR2* estão envolvidas no mecanismo patogênico da asma e atopia (KORMANN et al., 2008; REIJMERINK et al., 2011; KANAGARATHAM et al., 2011; KOPONEN et al., 2014; RODUIT et al., 2011). O resultado ainda apresenta outra evidência importante, a associação negativa encontrada entre o polimorfismo do *TLR2* e asma na presença da infecção do vírus da Hepatite A, único vírus considerado de ação protetora contra doenças inflamatórias crônicas, corrobora com inúmeras evidências discutidas pela “teoria dos velhos amigos” de que, este

patógeno atuaria regulando a presença de SNPs ou alelos, o que reduziria a suscetibilidade para as doenças de caráter inflamatório de perfil Th1/Th17 e/ou Th2 (ROOK, 2012).

Os SNPs rs78870609 e rs5743701 no gene do TLR2 ainda não tinham sido referidos na literatura até a presente data, como também, não estão em desequilíbrio de ligação. Contudo, o aumento do risco para a atopia (SPT e IgE) na presença da infecção do vírus *Herpes simplex* (VHS) e dos polimorfismos concordam com as publicações recentes, de que a interação entre infecção viral associado aos polimorfismos da subfamília de *TLR2* estariam associados ao aumento do risco para doenças alérgicas (DALEY et al., 2012; KOPONEN et al., 2014). É importante observar que anteriormente para essa população, o vírus do VHS tinha sido associado à redução do SPT positivo para aeroalérgenos (VEIGA et al., 2011) e agora a infecção viral na presença de polimorfismos em *TLR2* antes não associados ao risco para doenças alérgicas, produziam efeito modificador, induzindo o risco para atopia. Contrário a estes achados, Nuolivirta e colaboradores, (2013) não encontraram associação entre a presença de polimorfismos na subfamília de *TLR2* (*TLR2*, *TLR6* e *TLR1*), a gravidade de bronquiolite viral e a presença de chiado após bronquiolite viral.

O rs5743740 (*TLR7*) em soropositivos para o vírus da Hepatite A e rs5744068 (*TLR8*) em soropositivos para *H. pylori* se associaram com aumento de risco para asma. O SNP rs1879026 (*TLR3*) em soropositivos para *T. gondii* foi associado ao aumento do risco para atopia; enquanto rs1013151 (*TLR8*) em soropositivos para *H. pylori* associou-se à redução do risco de atopia. Todos os polimorfismos agora associados à atopia e asma, após o efeito modificador de patógenos estão localizados nos genes dos TLRs encontrados na região intracelular, nas vesículas endossomais, lisossomais e retículo endoplasmático, e estão envolvidos no reconhecimento de ácidos nucleicos de patógenos (KAWAI & AKIRA, 2009; PANDEY et al., 2015). Além disso, é importante ressaltar que, os genes dos receptores TLR7 e TLR8 estão localizados no mesmo cromossomo, o cromossomo X (SKEVAKI et al., 2014). Há trabalhos publicados relacionando a presença polimorfismos encontrados nos genes de *TLR3*, *TLR7* e *TLR8* ao risco de asma e atopia (HAAGERUP et al., 2004; MOLLER-LARSEN et al., 2008; NILSSON et al., 2012).

Os SNPs rs1879026 (*TLR3*), rs5743740 (*TLR7*), rs5744068 e rs1013151 (*TLR8*) estão localizados em região não codificante (ínon). O rs1879026 (*TLR3*) foi citado anteriormente, apenas associado ao risco para infecção para o vírus da hepatite B (VHB) (AL-QAHTANI et al., 2012). Num estudo de interação gene-ambiente na presença do polimorfismo no gene do *TLR3*, Nuolivirta e colaboradores (2012) encontraram associação entre a presença do polimorfismo rs3775291 (*TLR3*) e o desenvolvimento de bronquiolite de origem viral, ocasionada por inúmeras espécies de vírus, dentre elas, rinovírus, adenovírus, bocavírus, vírus da influenza A nos primeiros seis meses de vida e o chiado de repetição pós-bronquiolite e a necessidade de tratamento com corticosteróide. Os TLRs 3, 7, 8 e 9 possuem como um dos mecanismos de resposta imunológica a produção de IFN do tipo I e III indutores do estado antiviral. Estudos anteriores demonstraram que os indivíduos asmáticos possuem uma produção defeituosa e incipiente de IFNs indutores do estado antiviral, no entanto, o mecanismo desta deficiência de produção ainda não está esclarecido (CONTOLI et al., 2006; SYKES et al. 2012; SYKES et al. 2013). Beiting e colaboradores (2014) observaram que o *T. gondii* possui a capacidade suprimir a produção de interferon tipo I e III. O SNP rs5743740 (*TLR7*) não foi relacionado em nenhum estudo anterior na literatura, no entanto, está em alto desequilíbrio de ligação com os SNPs de *TLR7* (rs179010, rs179012, rs179016, rs179019 e rs179020) (ver apêndice II) associados com atopia em estudo realizado na população chinesa (NILSSON et al., 2012).

Os resultados ainda sugerem que na presença de infecção, a associação entre asma e atopia pode ser modificada. A infecção por *H. pylori* aumentou o risco de asma em indivíduos com polimorfismo no *TLR8* (rs5744068), e ao mesmo tempo reduziu o risco para atopia (rs1013151). O polimorfismo rs5744068 está em desequilíbrio de ligação com o SNP *missense* rs3764880 ($d' = 0,86$) na população deste estudo. Este polimorfismo foi implicado anteriormente com a suscetibilidade para a tuberculose (DAVILA et al., 2008) e progressão da infecção por HIV (OH DY et al., 2008). É importante ressaltar que o SNP rs3764880 pode afetar a função do *TLR8*, pela modulação da quantidade de *TLR8* traduzido. O SNP rs3764880 atua codificando as duas isoformas de *TLR8* (*TLR8v1* e *TLR8v2*) e a isoforma mais abundante *TLR8v2*, produz menor ativação de *TLR8*, com consequente redução do processo inflamatório; enquanto, a presença do alelo G

(rs3764880), atuaria por mecanismo de *feedback*, potencializando a tradução da isoforma TLR8v1 em monócitos pro-inflamatórios diferenciados, o que aumenta a ativação TLR8 desencadeando exacerbação da inflamação (GANTIER et al., 2010).

A evidência epidemiológica encontrada por Strachan (1989) de que a redução das famílias, o crescimento das medidas sanitárias e higiene, o uso das vacinas, o uso indiscriminado dos antibióticos e redução da exposição aos agentes microbianos contribuíam para o aumento da suscetibilidade das doenças alérgicas, fez com que inúmeros estudos de cunho imunológico fossem desenvolvidos para explicar o achado epidemiológico. No entanto, não se tratava apenas da interação entre o ambiente modificado pelas medidas sanitárias e de higiene e a produção de resposta imunológica, pois como justificar a alta prevalência de doenças alérgicas em países em desenvolvimento, como Brasil e países da América Central (BARRETO et al., 2104; GINA, 2014). Além disso, não se poderia atribuir apenas as variações étnicas, raciais ou genéticas, a justificativa para a prevalência e ao mesmo tempo, para a alta variabilidade geográfica da prevalência de asma em vários países do mundo (VON MUTIUS et al., 1994). Assim, de posse de que havia inúmeros fatores ambientais que interferiam no mecanismo das doenças alérgicas, e inferindo que a fisiopatologia destas doenças era afetada por associações e interações dos fatores genéticos e condições ambientais, estudos iniciaram no intuito de buscar entender como os fatores ambientais e genéticos se associavam para o desenvolvimento da atopia e asma (MARKS, 2006).

É necessário salientar que, os patógenos vírus da hepatite A, *Toxoplasma gondii* e *H. pylori* estão incluídos entre os microrganismos componentes dos “velhos amigos”, que, de acordo com a teoria que recebe o mesmo nome, estariam envolvidos, assim como os helmintos, num mecanismo compensatório e regulatório dos SNPs ou alelos que reduziram a suscetibilidade para desordens Th1/Th17 ou Th2 (ROOK, 2012), no entanto, alguns resultados encontrados foram controversos à “teoria dos velhos amigos” e o efeito modificador destes patógenos associados aos polimorfismos dos *TLRs*, induziram aumento do risco para asma e atopia. Assim, os dados de interação devem ser recebidos com cautela, pois são os primeiros a mostrar esta associação e é necessário replicá-los em outros estudos, além disso, não foi realizada avaliação funcional que corroborasse com as análises de associação. No entanto, as associações epidemiológicas encontradas

corroboram para a existência da multifatorialidade das doenças alérgicas e o efeito modificador desenvolvido pela ação do ambiente no componente genético.

8 CONCLUSÃO

Os nossos resultados corroboram com a literatura vigente, de que variantes nos *TLRs* estão associados ao mecanismo imunopatológico da atopia e asma, tendo encontrado polimorfismos nos genes de *TLR1*, *TLR5* e *TLR6* associados com atopia e asma não atópica. Além disso, os resultados mostraram que fatores ambientais podem modificar esta associação.

É importante ressaltar que a associação dos polimorfismos dos genes da subfamília de *TLR2* replicaram resultados encontrados em outras populações e os resultados inéditos encontrados para com os polimorfismos do *TLR5*, sugere como relevante a presença destes polimorfismos na população do estudo e a necessidade de replicar estes dados em outras populações.

Considerando os resultados encontrados na interação gene-ambiente para a associação asma/sibilo, fica evidente que as infecções pelo VHA e pelo *H. pilory* apresentam relevância na população estudada, o que justificaria a necessidade de ensaios *in vitro* para compreender melhor os diferentes mecanismos de atuação destes patógenos em indivíduos com asma e controles saudáveis.

REFERÊNCIAS

AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, n. 2, p. 675-80, 2001.

ALCÂNTARA-NEVES NM, BRITTO GSG, VEIGA RV, et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes*, v. 7, 2014.

ALEXANDER DH, NOVEMBRE J, LANGE K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*, v.19, n. 9, p.1655-64, 2009.

AL-QAHTANI A, AL-AHDAL M, ABDO A, et al. Toll-like receptor 3 polymorphism and its association with hepatitis B virus infection in Saudi Arabian patients. *J Med Virol.*, v. 84, n. 9, p. 1353-9, 2012.

ALVES GC, SANTOS DN, FEITOSA CA, et al. Community violence and childhood asthma prevalence in peripheral neighborhoods in Salvador, Bahia State, Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 28, n. 1, p. 86-94, 2012.

ARAÚJO MI, LOPES AA, MEDEIROS M., et al. Inverse association between skin response to aeroallergens and *S. mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy Immunol*, v.123, p. 145-8, 2000.

BANK S, SKYTT AP, BURISCH J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One*, v. 9, n. 6, 2014.

BAQUEIRO T, PONTES-DE-CARVALHO L, CARVALHO FM, SANTOS NM, ALCANTARA-NEVES NM. Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different

socioeconomic levels in a Brazilian city. *Allergy and asthma proceedings: the official journal of regional and state allergy societies*, v. 28, n. 3, p. 362-367, 2007.

BARBOZA R, CÂMARA NO, GOMES E, et al. Endotoxin Exposure during Sensitization to *Blomia tropicalis* Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e67115, 2013.

BARNES PJ, 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews. Immunology*, v. 8, p. 183-192.

BARNING C, M. CERNADAS M, DUTILE S, et al. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med*, v. 5, n. 174, 2013.

BARRETO ML et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC Pulm Med*, v. 6, n. 15, 2006.

BARRETO, ML et al. Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. *Respiratory Research* 2010, v. 11, n. 1, p.167, 2010.

BARRETO, ML et al. Prevalência de sintomas de asma entre escolares do Brasil: Pesquisa Nacional em Saúde do Escolar (PeNSE 2012). *REV BRAS EPIDEMIOL SUPPL PeNSE*, p. 106-115, 2014.

BEASLEY R, CRANE J, LAI CK, PEARCE N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, v. 105, S466–S472, 2000.

BEITING DP, PEIXOTO L, AKOPYANTS NS et al. Differential Induction of TLR3-Dependent Innate Immune Signaling by Closely Related Parasite Species. *PLOS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

BEZEMER GF, BAUER SM, OBERDORSTER G, et al. Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles in vivo. *J Innate Immun*, v. 3, p.150–166, 2011.

BEZEMER GFG, SAGAR S, BERGENHENEGOUWEN J, et al. Dual Role of Toll-Like Receptores in Asthma and Chronic Obstrutive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*, v. 64, p. 337-358, 2012.

BJORNVOLD M et al. A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes and Immunity*, 10, p. 181–187, 2009.

BOUSQUET J et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA (2) LEN and AllerGen). *Allergy*, v. 63 (Suppl. 86), p. 8-160, 2008.

BOTTCHER MF, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol*, v. 114, n. 3, 561-7, 2004.

BRAUN-FAHRLANDER C et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*, v. 347, n. 12, p. 869-77, 2002.

BROOKES, AJ. The essence of SNPs. *Gene*. v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CARAMALHO I, LOPES-CARVALHO T, OSTLER D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med.*, v.197, n. 4, p. 403-11, 2003.

CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, ARAUJO MI. Schistosoma mansoni Antigens as Modulators of the Allergic Inflammatory Response in Asthma. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, v. 12, p. 24-32, 2012.

CHONG NETO HJ, ROSÁRIO NA, SOLÉ D. Asthma and Rhinitis in South America: How Different They are From Other Parts of the World. *Allergy Asthma Immunol Res*, v. 4, n. 2, p. 62-7, 2012.

COOPER PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, v. 9, p. 29–37, 2009.

CONTOLI M, MESSAGE SD, LAZA-STANCA V, et al. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med*, v. 12, p. 1023–1026, 2006.

DALEY D, PARK JE, MATH M, et al. Associations and interactions of genetic polymorphism in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, v. 130, n. 6, 2012.

DÁVILA I, MULLOL J, FERRER M, et al. Genetic Aspects of Allergic Rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*, v. 19, Suppl. 1, p. 25-31, 2009.

DAVILA S, HIBBERD ML, RANJEETA HD, et al. Genetic Association and Expression Studies Indicate a Role of Toll-Like Receptor 8 in Pulmonary Tuberculosis. *PLoS Genetics*, v. 4, n. 10, 2008.

DIAMANT Z et al. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 23, p. 468-481, 2010.

DONG L, LI H, WANG S, LI Y. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. *J Asthma*, v. 46, p. 229–233, 2009.

EDER W, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol*, v. 113, n. 3, 482-486, 2004.

EGE MJ, STRACHAN DP, COOKSON WOCM, et al. Gene-environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 127, n. 1, 2011.

FALLON PG & MANGAN NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol.*, v. 7, n.3, p. 220-30, 2007

FEARY J, BRITTON J, LEONARDI-BEE J: Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, v. 66, n. 4, p. 569–578, 2011.

FEITOSA CA, SANTOS DN, BARRETO DO CARMO MB, et al. Behavior problems and prevalence of asthma symptoms among Brazilian children. *J Psychosom Res.*, v. 71, n. 3, p. 160-5, 2011.

FERREIRA DS, ANNONI R, SILVA LFF, et al. Toll-like receptors 2, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 42, n. 10, p. 1459–1471, 2012.

FINKELMAN FD et al. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*, v. 184, p. 1663-1674, 2010.

FLATOW EA & BARBUTO JAM, 2012. Células dendríticas: elementos integradores do sistema immune. FAPESP, 2012.

FRIERI M. Asthma linked with rhinosinusitis: An extensive review. *Allergy Rhinol.* v. 5, n. 1, p. 41–49, 2014.

FUCHS B. & BRAUN A. Modulation of asthma and allergy by addressing toll-like receptor 2. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, v. 3 (Suppl 1):S5, 2008.

FUCHS B, KNOTHE S, ROCHLITZER S, et al. A Toll-like receptor 2/6 agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitization to Timothy grass pollen antigens. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 152, p. 131–139, 2010.

FUERTES E, BRAUER M, MACLNTYRE E, et al. Childhood allergic rhinitis, traffic-related air pollution, and variability in the GSTP1, TNF, TLR2, and TLR4 genes: results from the TAG Study. *J Allergy Clin Immunol.*, v.132, n. 2, p.342-52, 2013.

GANTIER MP, IRVING AT, KAPARAKIS-LIASKOS M, et al. Genetic Modulation of TLR8 Response following Bacterial Phagocytosis. *Hum Mutat.*, v. 31, n. 9, p. 1069-79, 2010.

GLOBAL Initiative for Asthma (GINA). Global Burden of Asthma, 2014. Disponível em: < http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINABurdenReport_1.pdf>. Acesso em: 15 jan 2015.

HAAGERUP A, BORGLUM AD, BINDERUP HG, et al. Fine-scale mapping of type I allergy candidate loci suggests central susceptibility genes on chromosomes 3q, 4q and Xp. *Allergy*, v. 59, p. 88–94, 2004.

HAERYNCK F, MAHACHIE JJM, VAN STEEN K, et al. Genetic variations in toll-like receptor pathway and lung function decline in Cystic fibrosis patients. *Hum Immunol.*, v. 74, n. 12, p. 1649-55, 2013.

HOFFJAN S, STEMMLER S, PARWEZ Q, et al. Evaluation of the toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism in patients with asthma, atopic dermatitis and chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Medical Genetics*, v. 6, p. 1-6, 2005.

HOLGATE ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*, v. 18, n. 5; p. 673-83, 2012.

THE INTERNACIONAL STUDY of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma,

allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet*, v. 351, n. 9111, p. 1225-32, 1998.

JOHANSSON SG et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 113, n. 832-836, 2004.

KAISER R, TANG LF, TAYLOR KE, et al. A polymorphism in TLR2 is associated with arterial thrombosis in a multiethnic population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, v. 66, n. 7, p.1882-7, 2014.

KANAGARATHAM C et al. Polymorphisms in TOLL-Like Receptor Genes and their Roles in Allergic Asthma and Atopy. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, v. 5, n. 1, p. 45-56, 2011.

KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop, Sao Paulo*, v. 14, n. 3, p. 397–400, 1972.

KAWAI T & AKIRA S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.*, v. 21, n. 4, p. 317-37, 2009.

KAWASAKI A, FURUKAWA H, KONDO Y, et al. TLR7 single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron 2 independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study. *Arthritis Res Ther.*, v. 13, n. 2, 2011

KIM HY, DEKRUYFF RH, UMETSU DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, v.11, p. 577-84, 2010.

KLIMOSCH SN et al. Functional TLR5 genetic variants affect human colorectal cancer survival. *Cancer Res.* v. 73, n. 24, p. 7232-42, 2013.

KLINE JN, et al. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 283, n. 1, p.170-179, 2002.

KLINE JN. Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc Am Thorac Soc* v. 4, p. 283–288, 2007.

KOPONEN P, VUONONVIRTA J, NUOLIVIRTA K, et al. The association of genetic variants in toll-like receptor 2 subfamily with allergy and asthma after hospitalization for bronchiolitis in infancy. *Pediatr Infect Dis J*, v. 33, n. 5, p. 463-6, 2014.

KORMANN MS et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, v. 122, p. 86–92, 92.e1–92.e8, 2008.

KRAMER U et al. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet*. v. 353, n. 9151, p. 450-4, 1999.

KUCUKSEZER UC et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*, v. 131, n. 3, p. 875-885.e.9, 2012.

KUMAGAI Y & AKIRA S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, n. 5, p.985–992, 2010.

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 388, n.4, p. 621-5, 2009.

KVARNHAMMAR AM et al. Innate Immune Receptors in Human Airway Smooth Muscle Cells: Activation by TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and NOD1 Agonists. *Plos one*, v. 8 n. 7, 2013.

LAZARUS R, KLIMECKI WT, RABY BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): Frequencies, pairwise linkage disequilibrium,

and haplotypes in three US ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*, v. 81, n. 1, p. 85-91, 2003.

LAURIE, CC. et al. Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. *Genet Epidemiol*, v. 34, n. 6, p. 591-602, 2010.

LE TA, TAKAI T, VU AT, et al. Flagellin Induces the Expression of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Keratinocytes via Toll-Like Receptor 5. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 155, p. 31–37, 2011.

LUN SW et al. Expression and functional analysis of toll-like receptors of peripheral blood cells in asthmatic patients: Implication for immunopathological mechanism in asthma. *J Clin Immunol*, v. 29, n. 3, p. 330-42, 2009.

MARKS GB. ENVIRONMENTAL FACTORS AND GENE–ENVIRONMENT INTERACTIONS IN THE AETIOLOGY OF ASTHMA. Proceedings of the Australian Physiological Society Symposium: Environmental and Genetic Influences on Respiratory Health. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, p. 285–289, 2006.

MAHEASWARI R, SIVASANKAR K, SUBBARAYAN S. Toll gates: An emerging therapeutic target. *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 18, n. 6, 2014.

MARTINEZ FD. Trends in asthma prevalence, admission rates, and asthma deaths. *Respiratory care*, v. 53, p. 561-567, 2008.

MCCURDY JD, OLYNYCH TJ, MAHER LH, et al. Cutting edge:distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.*, v. 170, 1625–1629, 2003..

MIKACENIC C, REINER AP, HOLDEN TD, et al. Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 Locus is the Major Genetic Determinant of Inter-Individual Difference in TLR1/2-Mediated Responses. *Genes Immun.*, v. 14, n. 1, p. 52–57, 2013.

MOLLER-LARSEN S, NYEGAARD M, HAAGERUP A, et al. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax*, v. 63, n. 12, p. 1064-9, 2008.

MONERET-VAUTRIN DA. Genesis of food allergy in infancy. *Bull Acad Natl Med*, v. 196, n. 6, p. 1131-40, 2012.

MURANSKI P & RESTIFO NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *BLOOD*, v. 121, n. 13, 2013.

NABE T. Interleukin (IL)-33: New Therapeutic Target for Atopic Diseases. *J Pharmacol Sci*, v. 126, p. 85 – 91, 2014.

NATIONAL CENTER OF Biotechnology Information (NCBI), USA. Acesso em: 14 março 2015.

NEWCOMB DC & PEEBLES JR, RS. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol*, v. 25, n. 6, 2013.

NILSSON D, ANDIAPPAN AK, HALLDÉN, et al. Toll-like receptor gene polymorphisms are associated with allergic rhinitis: a case control study. *BMC Medical Genetics*, v. 13, 2012.

NOGUCHI E, NISHIMURA F, FUKAI H, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*, v. 34, n. 2, p. 177-83, 2004.

NUOLIVIRTA K, VUONONVIRTA J, VILLE PELTOLA V, et al. Toll-like receptor 2 subfamily genotypes are not associated with severity of bronchiolitis or postbronchiolitis wheezing in infants. *John Wiley & Sons Ltd*, v. 102, pp. 1160–1164, 2013.

OLYNYCH TJ, JAKEMAN DL, MARSHALL JS. Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 118, n. 4, p. 837-43, 2006.

PANDEY S, KAWAI T, AKIRA S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, v. 5, n. 1, 2015.

PEREIRA MU, SLY PD, PITREZ PM, JONES MH, ESCOUTO D, DIAS AC, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J*, v. 29, n. 6, p. 1154-60, 2007.

OH DY, TAUBE S, HAMOUDA O, et al. A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis*, v. 198, p. 701–709, 2008.

OOSTING M, CHENG SC, BOLSCHER JM, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, n. 42, E4478-84, 2014.

QIAN FH, ZHANG Q, ZHOU LF, et al. Polymorphisms in the toll-like receptor 2 subfamily and risk of asthma: a case-control analysis in a Chinese population. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, v. 20, n. 4, p. 340-6, 2010.

REIJMERINK NE, BOTTEMA RW, KERKHOF M, et al. TLR-related pathway analysis: novel gene–gene interactions in the development of asthma and atopy. *Allergy*, v. 65, p. 199–207, 2010.

REIJMERINK NE, KERKHOF M, BOTTEMA RW, et al. Toll-like receptors and microbial exposure: gene-gene and gene-environment interaction in the development of atopy. *Eur Respir J*, v. 38, n. 4, p. 833-40, 2011.

RODUIT C, WOHLGENSINGER J, FREI R, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 127, n. 1, p. 179-85, 2011,

ROMAGNANI S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of different infections have been studied, or because the entiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch timing, rather than the nature, of the infection is par. Allergy Immunol*, v. 98, p. 279–85, 1992.

ROOK, GAW. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Darwinian medicine and the ‘hygiene’ or ‘old friends’ hypothesis. *Clin. Exp. Immunol.* v. 160, 70–79, 2010.

ROOK, GWA. Hygiene Hypothesis and Autoimmune Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol*, v. 42, p. 5–15, 2012.

ROOK, GAW; LOWRY CA; RAISON CL. Microbial old friends, immunoregulation and stress resilience. *Evolution, medicine and public health. EMPH*, v. 2013, n. 1, p. 46–64, 2013.

ROOK, GAW. Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: an ecosystem service essential to health. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* v. 110, n. 46, p. 18360-7, 2013.

ROOK, GA et al. Microbial “Old Friends”, immunoregulation and socio-economic status. *Clin. Exp. Immunol*, 2014.

SAMPATH V, MULROONEY NP, GARLAND JS, et al. Toll-like receptor genetic variants are associated with Gram-negative infections in VLBW infants. *J Perinatol.*, v. 33, n. 10, p. 772-7, 2013.

SANDIG H & BULFONE-PAUS S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol.*, v. 4, n. 3, 2012.

SANHONG YU, HYE YOUNG KIM, YA-JEN CHANG. Innate lymphoid cells and asthma. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 2014.

SCHOLTENS S, POSTMA DS, MOFFATT MF et al. Novel childhood asthma genes interact with in utero and early-life tobacco smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol*, v. 133, n. 3, p. 885-8, 2014.

SCHWARTZ DA &, COOK DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis*, v. 41, Suppl 7:S403-7, 2005.

SHEN N, QIONG FU, DENG Y, et al. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *PNAS*, v. 107, n. 36, 15838–15843, 2010.

SHERIDAN J, MACK DR, AMRE DK, et al. A non-synonymous coding variant (L616F) in the TLR5 gene is potentially associated with Crohn's disease and influences responses to bacterial flagellin. *PLoS One*, v.;8, n. 4, 2013.

SHIKHAGAIE MM, ANDERSSON CK, MORI M, et al. Mapping of TLR5 and TLR7 in central and distal human airways and identification of reduced TLR expression in severe asthma. *Clin Exp Allergy*, v. 44, n. 2, p. 184-96, 2014.

SKEVAKI C, PARARAS M, KOSTELIDOU K, et al. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clin Exp Immunol.*, 2015.

SMIT LA, SIROUX V, BOUZIGON E, at al. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med.*, v. 179, n. 5, p. 363-8, 2009.

SOLÉ D et al. Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among Brazilian schoolchildren (13-14 years old): comparison between ISAAC Phases One and Three. *J Trop Pediatr*, v. 53, n.1, p.13-21, 2007.

SOUSA DA CUNHA S, BARRETO ML et al. Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. *Rev Panam Salud Publica*, v. 28, n. 6, p. 405–11, 2010.

SOUZA-MACHADO C et al. Rapid reduction in hospitalisations after an intervention to manage severe asthma. *Eur Respir J*, v. 35, n. 3, p. 515-21, 2010.

STERK PJ & LUTTER R. Asthma phenotyping: TH2-high, TH2-low, and beyond. *J Allergy Clin Immunol*, v. 133, p. 395-6, 2014.

STRACHAN DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, v. 299, p. 1259–1260, 1989.

STRACHAN DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*, v. 55 (Suppl 1), S2–S10, 2000.

STRINA A. et al. Risk factors for non-atopic asthma/wheeze in children and adolescents: a systematic review. *Emerging Themes in Epidemiology*, p. 11, 2014.

SUKKAR MB et al. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*, v. 118, p. 641–648, 2006.

SUPAJATURA V et al. Differential responses of mast cell toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.*, v. 109, n. 10, p. 1351–1359, 2002.

SVANES C et al. Early exposure to children in family and day care as related to adult asthma and hay fever: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax* v. 57, n. 11, p. 945–950, 2002.

SYKES A, EDWARDS MR, MACINTYRE J, et al. Rhinovirus 16-induced IFN-alpha and IFN-beta are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, v. 129, p. 1506–1514, 2012.

SYKES A, EDWARDS MR, MACINTYRE J, et al. TLR3, TLR4 and TLRs7–9 Induced Interferons Are Not Impaired in Airway and Blood Cells in Well Controlled Asthma. *Plos one*, v. 8, n. 6, 2013.

TANAKA J, WATANABE N, KIDO M, SAGA K, AKAMATSU T, NISHIO A, CHIBA T. Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin Exp Allergy*, v. 39, p. 89-100, 2009.

TANTISIRA K et al. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes and Immunity*, v. 5, p. 343–346, 2004.

TAPPING RI, OUMETI KO, JOHNSON CM. Genetic polymorphisms within the human Toll-like receptor 2 subfamily. *Biochem Soc Trans.*, v. 35, pt. 6, p.1445-8, 2007.

TIZAOUI K, KAABACHI W, HAMZAOUI K, HAMZAOUI A. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Toll-like Receptor Genes With Asthma Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Allergy Asthma Immunol Res*, v. 7, n. 2, p. 130-140, 2015.

VEIGA RV, CUNHA SS, DATTOLI VCC, et al. Chronic virus infections suppress atopy but not asthma in a set of children from a large latin american city: a cross-section study. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 11, 2011.

VERCELLI D. Gene-Environment Interactions in Asthma and Allergy: The End of the Beginning? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, v. 10, n. 2, p. 145–148, 2010.

VON HERTZEN L, HANSKI I, HAAHTELA T. Natural immunity - Biodiversity loss and inflammatory diseases are two global megatrends that might be related. *European Molecular Biology Organization*, v. 12, n. 11, 2011.

VON MUTIUS E et al. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ*, v. 308, n. 6930, p. 692-695, 1994.

VON MUTIUS E et al. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*. v. 351, n. 9106, p. 862-6, 1998.

VON MUTIUS E. & BRAUN-FAHRLANDER C. Environmental predictors of allergic disease and effects of air pollution in children. *Eur Respir Mon*, v. 21, p. 17–29, 2002.

VON MUTIUS E. Gene-environment interactions in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 v. 123, n. 1, p. 3-11; 2009.

YANG CA & CHIANG BL. Toll-like receptor 1 N248S polymorphism affects T helper 1 cytokine production and is associated with serum immunoglobulin E levels in Taiwanese allergic patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, p. 1-6, 2015.

YAZDANBAKHSI M, VAN DEN BIGGELAAR A, MAIZELS RM. Th2 Responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol*, v. 22, p. 372–377, 2001.

YUE M, FENG L, TANG SD, et al. Sex-specific association between X-linked Toll-like receptor 7 with the outcomes of hepatitis C virus infection. *Gene*, v. 548, n. 2, p. 244-50, 2014.

WAGENER AH, DE NIJS SB, LUTTER R et al. External validation of blood eosinophils, FENO and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*, v. 70, n.2, p. 115-20, 2015.

WANG CM, CHANG SW, JAN WU YJ et al., Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population. *SCIENTIFIC REPORTS*, v. 4, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: <http://www.who.int/en/> Acesso em: 30 nov 2013.

XIAO W, LIU Z, LIN J, et al. Association of TLR4 and TLR5 gene polymorphisms with Graves' disease in Chinese Cantonese population. *Hum Immunol*, v. 75, n. 7, p. 609-13, 2014.

ZHANG SY, JOUANGUY E, SANCHO-SHIMIZU V, et al. Human Toll-like receptor dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev.*, v. 220, p. 225-36, 2007.

ZHANG F1, GAO XD, WU WW et al. Polymorphisms in toll-like receptors 2, 4 and 5 are associated with *Legionella pneumophila* infection. *Infection*, v. 41, n. 5, p. 941-8, 2013.

ZIEGLER SF & ARTIS D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol*, v. 11, n. 4, p. 289–293, 2010.

Apêndices

Apêndice I

Tabela 1. Informações sobre os TLRs analisados

CHR	SNP	Posiç	A1	A2	MAF	Gene
1	rs1053954	223283851	C	T	0.06754	TLR5
1	rs5744174	223284528	C	T	0.2513	TLR5
1	rs5744169	223285042	A	G	0.03056	TLR5
1	rs5744168	223285200	A	G	0.02905	TLR5
1	rs74851800	223285507	G	T	0.01846	TLR5
1	rs45528236	223285833	T	G	0.0291	TLR5
1	rs5744167	223285946	G	T	0.05828	TLR5
1	rs5744165	223286191	A	G	0.01299	TLR5
1	rs851139	223289347	T	C	0.2219	TLR5
1	rs72748471	223291032	C	T	0.01529	TLR5
1	rs851193	223294851	A	G	0.2517	TLR5
1	rs2241097	223300713	G	T	0.1842	TLR5
1	rs712866	223301463	C	T	0.2822	TLR5
1	rs17163737	223303151	T	G	0.03361	TLR5
1	rs851178	223306431	G	A	0.2882	TLR5
1	rs5744139	223309628	T	G	0.02446	TLR5
1	rs2241096	223310048	T	C	0.03476	TLR5
1	rs1640827	223311607	G	A	0.2391	TLR5
1	rs2096142	223311845	A	G	0.322	TLR5
1	rs2252620	223312041	C	T	0.06303	TLR5
1	rs763389	223312089	T	C	0.1001	TLR5
3	rs5743845	52255744	T	C	0.02114	TLR9
3	rs352140	52256697	T	C	0.4049	TLR9
3	rs116310431	52257891	T	G	0.01299	TLR9
4	rs4624663	38797876	C	T	0.05844	TLR1
4	rs5743622	38797928	C	T	0.03209	TLR1
4	rs5743621	38798255	A	G	0.01795	TLR1
4	rs5743615	38798869	G	A	0.03374	TLR1
4	rs76796448	38799399	T	G	0.04813	TLR1
4	rs5743613	38799509	T	C	0.007257	TLR1
4	rs3923647	38799539	T	A	0.05662	TLR1
4	rs4833095	38799710	T	C	0.3461	TLR1
4	rs5743612	38800101	A	G	0.04851	TLR1
4	rs5743610	38800339	T	C	0.01359	TLR1
4	rs78904026	38800641	C	T	0.01378	TLR1
4	rs5743596	38802528	T	C	0.1031	TLR1
4	rs5743572	38805391	A	G	0.07148	TLR1
4	rs5743569	38805704	T	C	0.05653	TLR1
4	rs5743567	38805840	T	C	0.1534	TLR1
4	rs5743562	38806096	C	T	0.1226	TLR1
4	rs5743561	38806192	G	A	0.05526	TLR1
4	rs4072548	38806207	C	A	0.1574	TLR1

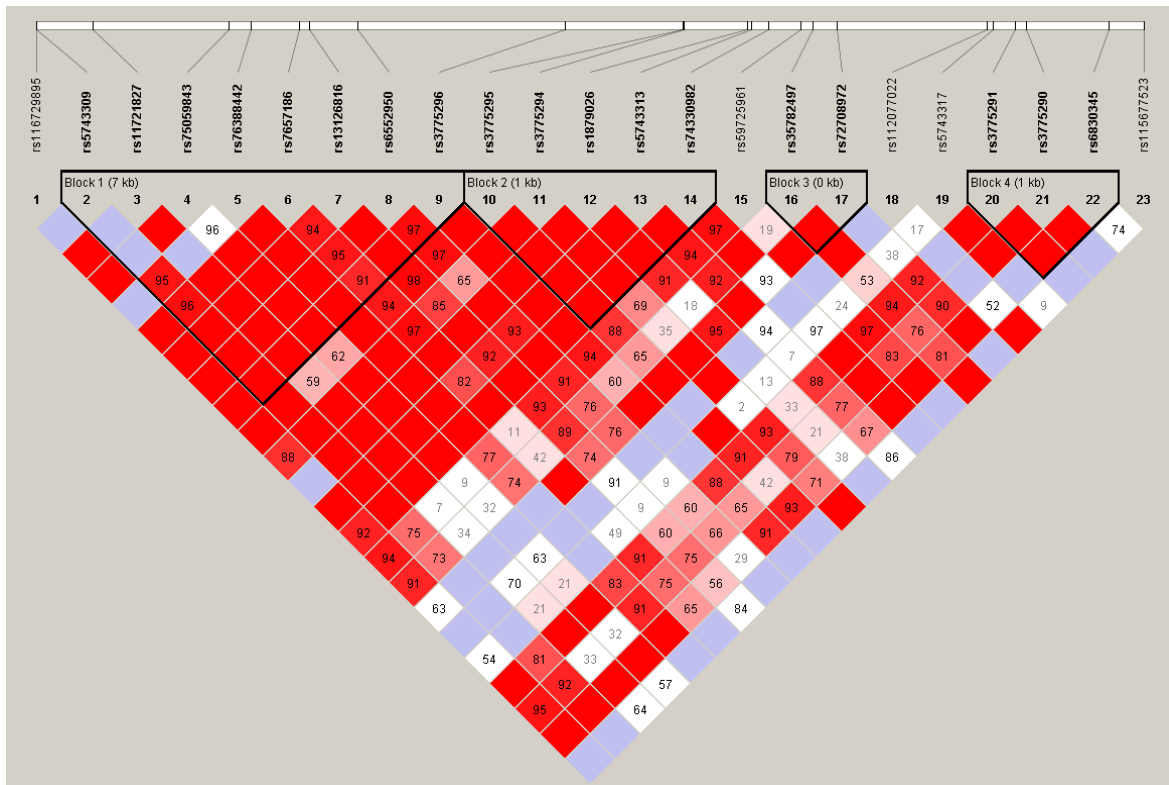
4	rs200232721	38806435	G	A	0.1231	TLR1
4	rs12645200	38826429	C	T	0.3314	TLR6
4	rs2381289	38826871	A	G	0.3697	TLR6
4	rs5743818	38829163	G	T	0.1132	TLR6
4	rs35762983	38829675	T	C	0.04093	TLR6
4	rs5743815	38829815	C	T	0.01261	TLR6
4	rs3796508	38830116	T	C	0.01604	TLR6
4	rs5743812	38830234	C	T	0.03407	TLR6
4	rs5743810	38830350	T	C	0.1567	TLR6
4	rs5743809	38830514	G	A	0.034	TLR6
4	rs5743808	38830736	C	T	0.06126	TLR6
4	rs1039559	38831596	C	T	0.2693	TLR6
4	rs5743805	38832059	A	G	0.1944	TLR6
4	rs60955767	38832928	A	G	0.01454	TLR6
4	rs5743790	38833154	C	T	0.474	TLR6
4	rs74906757	38834317	T	C	0.0615	TLR6
4	rs6833914	38840162	T	C	0.4526	TLR6
4	rs59295951	38841108	G	A	0.3083	TLR6
4	rs80166848	38841607	T	C	0.02445	TLR6
4	rs77341967	38844585	A	G	0.04507	TLR6
4	rs73146554	38845502	T	C	0.2574	TLR6
4	rs73811216	38845694	T	C	0.1058	TLR6
4	rs7669329	38846719	C	T	0.3877	TLR6
4	rs7685852	38846885	A	G	0.2574	TLR6
4	rs6531673	38847917	T	C	0.2925	TLR6
4	rs17429224	38857310	A	G	0.2193	TLR6
4	rs79820157	154608749	C	T	0.07734	TLR2
4	rs1816702	154609523	T	C	0.2895	TLR2
4	rs7694512	154617860	T	G	0.233	TLR2
4	rs78369176	154619596	C	A	0.05882	TLR2
4	rs77437382	154619609	C	T	0.02563	TLR2
4	rs13123230	154620585	G	A	0.2343	TLR2
4	rs11938228	154621946	A	C	0.2381	TLR2
4	rs4696484	154622038	T	G	0.0657	TLR2
4	rs62323856	154623149	C	T	0.07182	TLR2
4	rs78870609	154623601	T	C	0.02101	TLR2
4	rs3804099	154624656	T	C	0.4568	TLR2
4	rs3804100	154625409	C	T	0.05279	TLR2
4	rs5743700	154625682	T	C	0.01833	TLR2
4	rs5743701	154625685	G	C	0.01998	TLR2
4	rs116729895	186990344	T	C	0.04855	TLR3
4	rs5743309	186990345	A	C	0.05615	TLR3
4	rs11721827	186991137	C	A	0.057	TLR3
4	rs75059843	186993052	A	G	0.05462	TLR3
4	rs76388442	186993355	T	C	0.05462	TLR3
4	rs7657186	186994039	A	G	0.2217	TLR3

4	rs13126816	186994178	A	G	0.2026	TLR3
4	rs6552950	186994856	G	A	0.2229	TLR3
4	rs3775296	186997767	T	G	0.1673	TLR3
4	rs3775295	186999411	A	G	0.2565	TLR3
4	rs3775294	186999429	A	G	0.3738	TLR3
4	rs1879026	187000321	T	G	0.1097	TLR3
4	rs5743313	187000367	T	C	0.1861	TLR3
4	rs74330982	187000609	C	A	0.06498	TLR3
4	rs59725961	187001068	G	A	0.1536	TLR3
4	rs35782497	187001230	A	G	0.388	TLR3
4	rs72708972	187001564	T	C	0.05505	TLR3
4	rs5743317	187003759	G	T	0.02101	TLR3
4	rs3775291	187004074	A	G	0.194	TLR3
4	rs3775290	187004217	T	C	0.2246	TLR3
4	rs6830345	187005376	T	C	0.1692	TLR3
9	rs1927912	120469426	G	A	0.07569	TLR4
9	rs11536869	120469832	G	A	0.02638	TLR4
9	rs1927911	120470054	T	C	0.474	TLR4
9	rs1927910	120470148	A	G	0.09129	TLR4
9	rs11536877	120471358	G	A	0.07356	TLR4
9	rs11536878	120471553	A	C	0.06608	TLR4
9	rs5030717	120473834	G	A	0.1543	TLR4
9	rs2149356	120474199	C	A	0.4314	TLR4
9	rs5030710	120474721	C	T	0.1008	TLR4
9	rs4986790	120475302	G	A	0.06226	TLR4
9	rs4986791	120475602	T	C	0.03514	TLR4
9	rs5030718	120475826	A	G	0.03209	TLR4
9	rs7869402	120478032	T	C	0.1539	TLR4
9	rs11536891	120479337	C	T	0.1773	TLR4
X	rs5743717	12886259	G	A	0.01947	TLR7
X	rs5743720	12887318	C	T	0.09953	TLR7
X	rs179022	12888567	A	C	0.3042	TLR7
X	rs1731477	12889246	T	A	0.05471	TLR7
X	rs179020	12889857	A	G	0.1648	TLR7
X	rs179019	12889969	T	G	0.1654	TLR7
X	rs179018	12890150	C	T	0.1432	TLR7
X	rs1731479	12890453	T	C	0.2137	TLR7
X	rs5743740	12891960	G	A	0.2272	TLR7
X	rs5743742	12892648	A	C	0.06496	TLR7
X	rs179016	12894442	G	C	0.3399	TLR7
X	rs7886759	12895122	A	C	0.0696	TLR7
X	rs1638596	12896110	C	T	0.05448	TLR7
X	rs5743761	12898072	G	A	0.08703	TLR7
X	rs5743764	12898954	A	G	0.01465	TLR7
X	rs138928238	12899010	T	C	0.02145	TLR7
X	rs179013	12901471	T	C	0.1424	TLR7

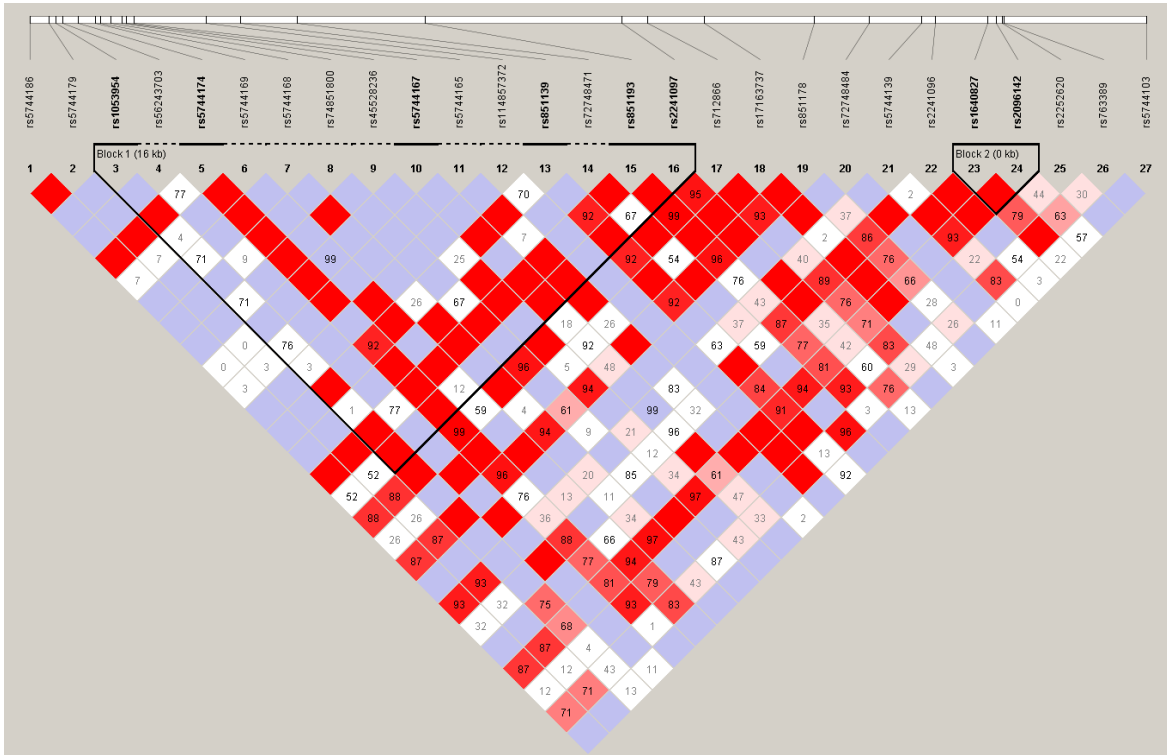
X	rs179012	12901562	C	T	0.4162	TLR7
X	rs179011	12901960	T	G	0.3237	TLR7
X	rs179010	12902885	T	C	0.1952	TLR7
X	rs864058	12906030	A	G	0.2138	TLR7
X	rs3853839	12907658	G	C	0.2157	TLR7
X	rs3764880	12924826	G	A	0.2957	TLR8
X	rs17256081	12926045	C	T	0.2988	TLR8
X	rs2109134	12927186	T	A	0.127	TLR8
X	rs4830805	12927759	A	G	0.2525	TLR8
X	rs1548731	12927947	C	T	0.4817	TLR8
X	rs5744048	12930098	T	G	0.08076	TLR8
X	rs3827469	12930303	G	A	0.1658	TLR8
X	rs4830807	12932197	A	C	0.4239	TLR8
X	rs1013151	12932531	C	T	0.3948	TLR8
X	rs5741884	12932811	G	A	0.3815	TLR8
X	rs5744067	12934973	C	T	0.1468	TLR8
X	rs5744068	12935058	T	C	0.1502	TLR8
X	rs5744078	12937237	T	C	0.1657	TLR8
X	rs2159377	12937513	T	C	0.1769	TLR8
X	rs5744080	12937804	C	T	0.3129	TLR8
X	rs5744081	12938471	A	C	0.1664	TLR8
X	rs2407992	12939112	G	C	0.2198	TLR8
X	rs3747414	12939412	A	C	0.3939	TLR8
X	rs5741889	12940344	C	A	0.1733	TLR8
X	rs12015397	12940948	T	C	0.1664	TLR8
X	rs12016191	12940952	C	T	0.1728	TLR8

*MAF (Alelo de Menor Frequência) na população estudada

TLR3



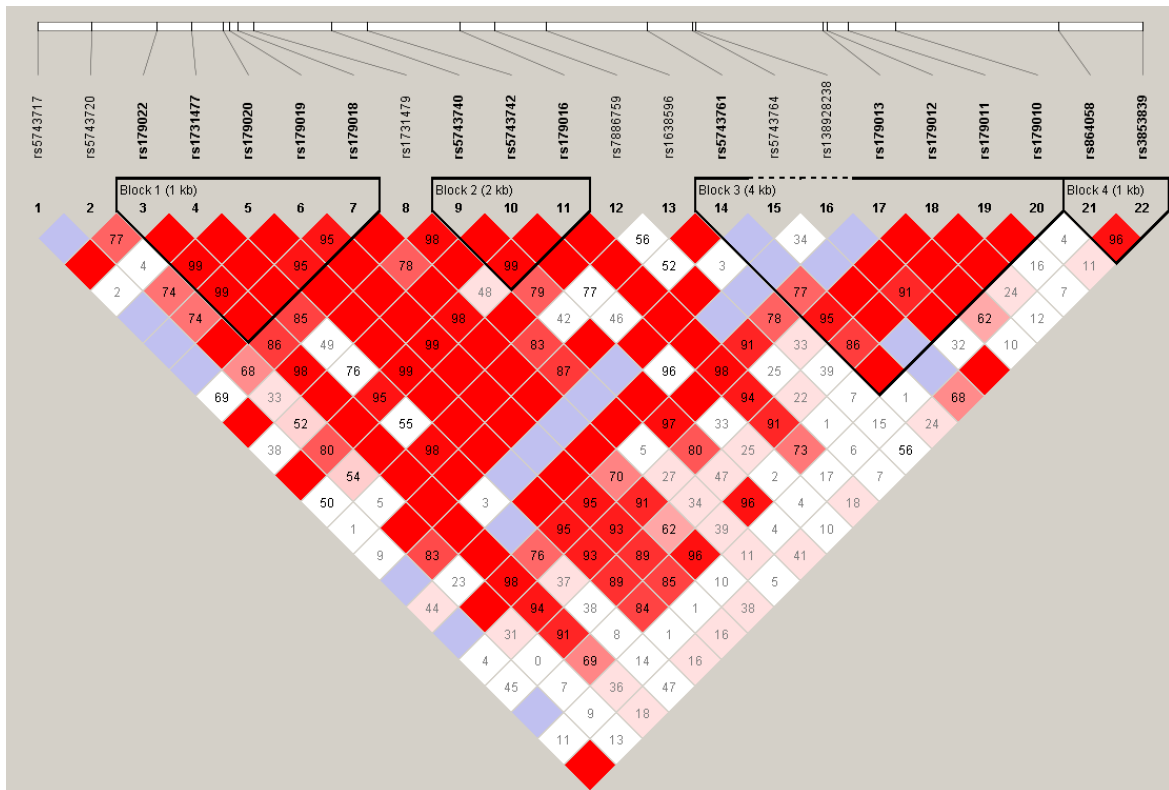
TLR5



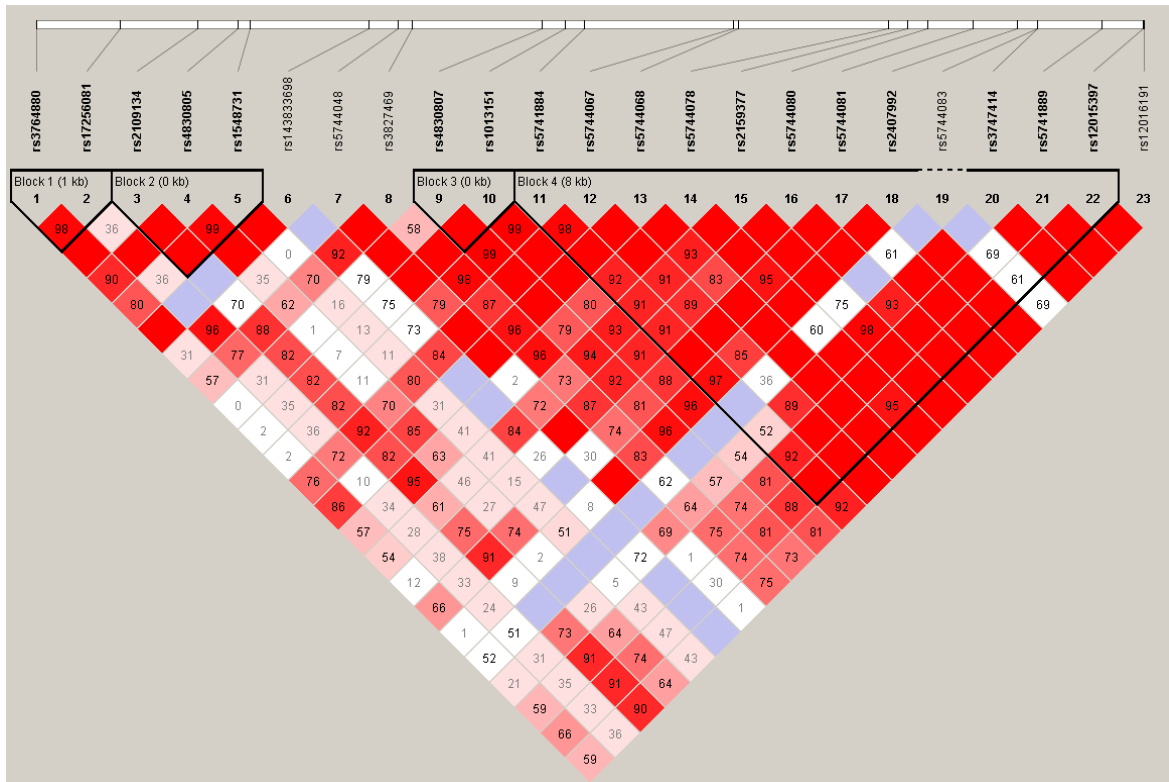
TLR6



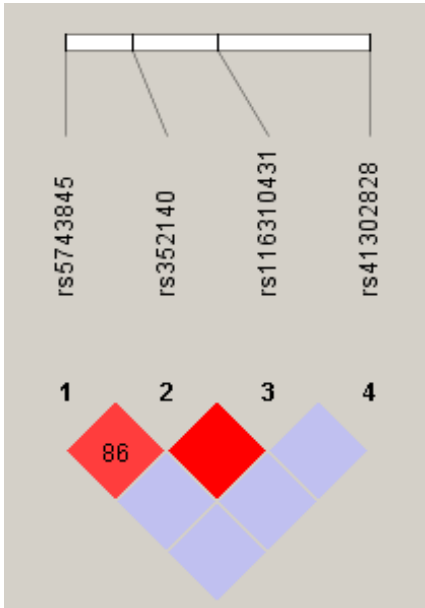
TLR7



TLR8



TLR9



ANEXOS

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE
ARTIGO CIENTÍFICO EM OBRA COLETIVA**

Pelo presente Termo de Autorização para Publicação de Artigo Científico em Obra Coletiva, eu Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo _ RG nº_2127763475_CPF nº 035.372.234-04_, autorizo a partir desta data, o uso do texto intitulado **Receptores *toll like* (TLRs) e a resposta imune na atopia e asma brônquica** para publicação pela EDUFBA- Editora da Universidade Federal da Bahia, em obra coletiva a ser organizada pelo Programa de Pós Graduação em Imunologia - PPGIm.

Salvador, __14 de _____Julho_____ de __2016_____.

Assinatura


Autor (a)

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS OF TOLL LIKE RECEPTORS (TLRS)
WITH ATOPY AND ASTHMA IN CHILDREN IN SALVADOR, BAHIA**

AUTHORS: Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo¹, Thiago Magalhães Silva^{2,3}, Cíntia Marques¹, Mauricio Lima Barreto², Neuza Maria Alcântara Neves¹, *Camila Alexandrina Viana Figueiredo¹.

¹Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil

²Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: Camila Alexandrina Viana Figueiredo, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/ no, Canela, CEP – 40110-100, Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: cavfigueiredo@gmail.com, FAX : +55 71.3283

This work was supported by The Wellcome Trust, UK, HCPC Latin America Excellence Centre Programme (072405/Z/03/Z and 088862/Z/09/Z), The National Institutes of Science and Technology Program (MCT-CNPq, Brazil), Contract n° 57386/2008-9, EPIGEN Consortium (MCT/DECIT) and Universal/CNPq, Proj. no. 477036/2012-0.

ABSTRACT

Background: Toll Like Receptors (TLRs) are the main receptors responsible for the recognition of molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) and consequently important mediator and modulator of immune response. Polymorphisms in genes located TLRs have been implicated in the physiopathological mechanism of atopy and asthma development.

Objectives: The aim of this study was to assess the association between the presence of polymorphisms on TLRs and atopy/ asthma in children in the city of Salvador, Bahia.

Methods: One hundred and sixty polymorphisms were studied in TLRs genes (TLR1-TLR9) in 1,247 children aged 4-11 years living in the urban periphery of Salvador - BA. Genotyping was performed using a commercial panel of Illumina Human Omni 2.5-8 Kit BeadChip. Bivariate analysis (unadjusted) were performed to evaluate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TLRs and the presence of wheezing, skin prick test (SPT) and specific IgE to aeroallergens (sIgE); polytomous logistic regression was performed to see the association between TLRs SNPs and asthma phenotypes; and finally, logistic regression was used to assess gene-environment interaction. The logistic regression models and polytomous analysis were adjusted for sex, age, helminth infection and individual ancestry.

Results: Polymorphisms in *TLR1* (rs4833095), *TLR5* (rs5744165 and rs5744139) and *TLR6* (rs5743810, rs1039559 and rs6531673) were associated with atopy, the SNPs rs4833095 (*TLR1*) and rs2241097 (*TLR5*) with non-atopic asthma phenotype. In the gene-environment interaction analysis, were found association with atopy for the following SNPs: rs7870609 and rs5743701 (*TLR2*) in seropositive for herpes simplex virus (HSV); rs1879026 (*TLR3*) in seropositive for *T. gondii*; rs5743740 (*TLR7*) in seropositive for hepatitis A virus (HAV) both increasing the risk; *H. pylori*: rs1013151 (*TLR8*) negatively associated with this atopy. Regarding asthma, rs1816702 (*TLR2*) in seropositive for HAV were negatively associated with asthma, while seronegative were associated with increased risk. Also in case of HAV seropositivity, rs5743740 (*TLR7*) increased the risk for asthma development. In addition, in case of seropositivity to *H. pylori*, rs5744068 (*TLR8*) increased the risk for asthma.

Conclusions: The results suggest functional significance of polymorphisms on *TLR2* subfamily, *TLR5* and endosomal receptors (*TLR3*, *TLR7* and *TLR8*) on atopy and asthma, as well as pathogens involved in gene-environment interaction which could all together underlies the pathophysiology of atopy and asthma in the study population.

Keywords: SNPs. TLRs. Atopy. Asthma. Gene-environment interaction. Pathogens.

INTRODUCTION

The prevalence of allergic diseases and asthma is increasing worldwide (VON Mutius, et al., 1998). In accordance with the GINA (2014) is estimated approximately 334 million asthmatics, with a percentage of individuals with asthma ranging from 1% to 18% of the population in the countries of the world. In Latin America, countries like Brazil and Costa Rica have data similar to the rich and industrialized countries such as the United Kingdom (UK) and Australia (SOLÉ et al., 2007). In Brazil, the prevalence of asthma varies between 10-20% of the population in major Brazilian cities (BARRETO et al., 2014). The increasing prevalence of allergic diseases, according to the hygiene hypothesis (STRACHAN, 1989; STRACHAN, 2000), was associated with reduced exposure to microbial agents in early childhood, the growing process of industrialization, improvement of health and hygiene conditions, indiscriminate use of antibiotics and access to vaccination campaigns, which contribute to the increased susceptibility and the development of allergic diseases.

The pathogenic mechanisms of allergic diseases are highly complex, with interaction of several factors, with strong association between genetic background and environmental factors (BOUSQUET J et al, 2008). The atopy, mainly responsible for the development of allergic diseases, is characterized as a genetically determined susceptibility of overproduction of IgE in response to common antigens, safe for individuals non-atopic patients (JOHASSON et al., 2004).

The atopic asthma has as principal aspect, the presence of specific IgE to allergens and an imbalance in driving the immune response, with bias for Th2 profile and the presence of inflammation with a predominance of eosinophils (Barnes, 2008;. FINKELMANN et al, 2010; DIAMANT et al, 2010). This phenotype of asthma is more studied and predominate in developed countries. However, the findings show among children in the city of Salvador - Bahia, Brazil, the fraction with asthma attributable to allergy was only 24.5% (SOUZA DA CUNHA, et al., 2010). Suggesting the presence of other mechanisms involved in the development of non-atopic asthma that can present the mixed characters response, the presence of Th2 and Th17, the absence of Th2 responses and the predominance of inflammation due to the presence of neutrophils (STERK & LUTTER, R, 2013). Several studies also have justified a strong presence of the innate component by the action of endothelial and epithelial cells, the activity of the iNKTs cells and innate lymphoid cells

(ILCs) as justification for the increased severity of asthma and as a possible mechanism of non-atopic asthma (BARNING, 2013; Sanhong YU et al, 2014).

Genetic variations in the barriers of organisms and receptors responsible for recognizing molecular patterns of microorganisms can promote an inappropriate immune response and promote the emergence of atopy and asthma (KORMANN et al., 2008). The toll like receptors (TLRs) are major recognition receptors of molecular patterns associated with pathogens (PAMPs), present in the cells presenter of antigens, such as macrophages, B cells and mainly dendritic cells, in addition T cells and epithelial cells (KUMAR et al., 2009; REIJMERINK et al, 2010). Many studies have linked the presence of polymorphisms in the TLR genes as a risk factor for atopy and asthma (TANTSIRA et al., 2004; HOFFJAN et al, 2005; Kormann et al, 2008; REIJMERINK et al 2011; QIAN et al, 2010; KANAGARATHAM et al., 2011; Koponen et al, 2014; TIZAOUI et al, 2015). However, the most of published articles are inserted into the shaft United States (TANTSIRA et al, 2004), Europe (Kormann et al, 2008; REIJMERINK et al, 2011) and Orient (Qian et al, 2010; TIZAOUI et al, 2015). Thus, this study aimed to investigate the association between the presence of polymorphisms in the TLR genes as risk factors or protection for atopy and asthma in children in the city of Salvador, Bahia.

METHODS

Characterization of study population

The SCAALA program (Social Change in Asthma and Allergy in Latin America) (see detailed description of the study population in Barreto et al., 2006) investigates the risk factors for asthma and allergic diseases in children from the city of Salvador, Bahia, in a cohort of 1445 children. For this analysis, the population was composed of 1,247 children aged 4-11 years, living in micro areas of the outskirts of the city of Salvador -BA. The present study was approved by the Ethics Committee of the UFBA Institute of Public Health (CEP: 003-05 / CEP-ISC) and the National Research Committee (CONEP, resolution number 15.895 / 2011). The informed consent and informed was properly obtained from the legal guardian of each child to the investigation.

Epidemiological inquiry

The ISAAC questionnaire, phase II, was applied to 1,445 children to determine the prevalence of asthma. The questionnaire, translated into Portuguese, was applied by trained researchers to parents or caregivers about the probable signs and symptoms of asthma, rhinitis and atopic eczema and related risk factors. Asthma morbidity was determined using the GINA questionnaire. It was considered asthmatic, the child who presented wheezing at least once in the last 12 months, plus some other characteristic symptom related in the questionnaire, among them: presence of dry cough at night, provided it has not been caused by the flu or cold; have observed wheezing or chirp in the chest when breathing during or after exercising; having been awakened at night by wheezing or wheezing in the period of twelve months; have asthma diagnosed by doctors.

Serological survey

Blood collection to obtain serum was performed in a dry tube. After blood coagulation, the tubes were centrifuged and the sera collected and then aliquoted and stored in a freezer at -20 ° C until the time of the serological tests.

The detection of anti-viral IgG in children's sera against herpes simplex virus (HSV), herpes zoster virus (VHZ) and Epstein-Barr virus (EBV) and against *H. pylori* was performed by ELISA using kits Of Diamedix (Miami, Florida, USA) following the manufacturer's instructions. For the hepatitis A virus (HAV), the ADALTIS kits (Toronto, Canada) were used. The cutoff points were determined by the ratio obtained by the ratio: sample absorbance / absorbance of the calibrator (solution containing defibrinated human serum or plasma, weakly reactive for antibodies against the respective virus and 0.1% sodium azide). Indices above 1.1 were considered positive, less than 0.9 were considered negative and between 1.1 and 0.9 were considered indeterminate, and these samples were excluded from the analysis.

Skin puncture test, sIgE and definition of atopy

Skin prick tests (SPT) were performed on the right forearm of each child using extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, fungi, dog and cat epithelia (all from ALK-Abello, São Paulo, Brazil). Saline solution and 10 mg/ml histamine solution were used as negative and positive controls, respectively. Reactions were read after 15 minutes and were considered to be positive, reactions that had the mean diameter of the papule at least 3 mm larger than the negative

control. The frequency of positive reactions for dog and cat epithelial tests and a mixture of fungal allergens were low (<4%) and, therefore, were excluded from the analyzes.

The concentration of specific IgE was determined using the ImmunoCAP assay for the following aerolergens: *Blomia tropicalis* (d201), *Dermatophagoides pteronissinus* (d1), *Blatella germanica* (i6) and *Periplaneta americana* (i206) (Phadia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

Since the prevalence of specific IgE for each of the allergens studied was higher than the prevalence of SPT and the frequencies of SPT positivity among those allergens without sIgE had a very low prevalence [fungi (0.5%), dog epithelium (1.1%) and cat epithelium (0.9%)], atopy was defined as the presence of at least one specific IgE result ≥ 0.70 kU / L, regardless of SPT results.

Parasitological stool

Two stool samples were collected from each child on two alternate days and analyzed using gravitational sedimentation techniques and Kato-Katz (KATZ et al., 1972) to detect helminth eggs. As percentages of hookworms (0.1%), *Enterobius vermicularis* (1.4%), *Strongyloides stercoralis* (0%) and *S. mansoni* (0%) were rare or absent in the study population, these helminthiases were excluded from analysis and only *A. lumbricoides* and *T. trichiura* were considered in the present analysis.

Genotyping and association between polymorphisms in TLRs with atopy/asthma

The DNA was extracted from peripheral blood samples using Gentra@ Puregene@ Blood Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany). For genotyping, it used a commercial panel of Illumina BeadChip HumanOmni2.5-8 Kit (www.illumina.com) Consortium Epigen-Brazil. For quality control was applied the following filters: call rate genotyping (call rate) of less than 0.98; disequilibrium of Hardy-Weinberg p-value less than 10^{-4} and p value for the lower frequency allele (Minor Allele Frequency - MAF - low frequency allele) of less than 1% (LAURIE et al., 2010).

Statistical analysis

Associations between SNPs with markers of atopy and presence of wheezing/asthma:

The analyzes of the associations between TLR polymorphisms with SPT positivity, sIgE and presence of wheezing/asthma, were performed using bivariate (unadjusted) and multivariate

logistic regression (adjusted for sex, age, helminth infection and individual genetic ancestry). It was considered as significant associations when the p value was less than or equal to 0.01.

Associations between SNPs and asthma phenotypes: After the multivariate analysis, multinomial logistic regression adjusted for sex, age, helminth infection and individual genetic ancestry was performed. Having the genetic additive model adopted in all analyzes. Associations with p value ≤ 0.05 were considered significant.

Gene-environment interaction: Genetic association tests with the symptoms of asthma, SPT and sIgE were analyzed by evaluating whether the presence of the infections (Herpes Simplex virus - HSV, Hepatitis A virus, *T.gondii* and *H. pilory*) had a modifying effect using as a resource logistic regression adjusted for sex, age, helminth infection and individual genetic ancestry. Analyzes with $p < 0.05$ were considered significant.

Construction of the individual variable genetic ancestry: The analysis was based on 370,539 SNPs shared by samples from the HapMap Project, the Human Genome Diversity Project (HGDP) and the Epigen-Brazil study population. As external panels, the following HapMap samples were used: 266 African, 262 European, 77 Mexican-American mixed and 83 African American, and 93 Native American HGDP. In order to estimate the contribution of native Africans, Europeans and Native Americans to SCAALA individuals, the ADMIXTURE software was used (ALEXANDER et al., 2009).

RESULTS

Table I contains information about the SNPs significantly associated in this study with atopy/asthma. We can observe the presence of SNPs in functional and intronic region. The MAF was calculated in this study population.

The Table II shows the associations between TLRs SNPs and asthma symptoms and atopy. To these analysis were tested 160 SNPs in 9 TLRs genes (TLR1 to TLR9), but in this table are represented only the SNPs with statistically significant associations considering $p < 0.01$ and using additive genetic model. The other results are available in supplementary material. The rs4833095 located in the TLR1 gene showed a positive association with positive SPT to common aeroallergens (OR: 1.42; CI: 1.17 - 1.71; $p = 0.0002$) and the presence of asthma (OR: 1.36; CI: 0.81 - 1.73; $p = 0.009$). In TLR1, the population studied showed two polymorphisms, the two negatively associated with atopy: rs5743567 (OR: 0.67; CI: 0.51 - 0.88; $p = 0.0054$) and rs4072548 (OR: 0.67; CI: 0.51 - 0.87; $p = 0.0030$). The rs2241097 in

TLR5 was the only SNP significantly associated with asthma symptoms irrespective atopy status (OR = 1.36; 95% CI= 1.08 - 1.73). We have observed statistically significant positive association between TLR6 SNPs rs5743810 (p=0.003), rs1039559 (p=0.0009) and rs6531673 (p=0.006) and SPT response to common aeroallergens. In contrast, negative associations with SPT were observed for the SNPs rs5743805 (p=0.005) and rs7669329 (p=0.002) on TLR6 gene. Positive associations with Specific IgE to common aeroallergens (> 0.70 kU/L) was observed for the SNPs rs5743810 (p = 0.004) on TLR6, rs5744165 (p = 0.008) and rs5744139 (p = 0.007) on TLR5, and rs3853839 (p = 0.009) on TLR7 genes. Interesting the rs5743810 has statistically significant positive association with two different outcome (SPT response and Specific IgE to common aeroallergens).

Table III shows the associations between the TLR polymorphisms and the non-atopic and atopic asthma phenotypes, using as a statistical resource the polytomic logistic regression and two reference groups for the atopic asthmatic group analysis. For this analysis it considered only the SNPs significantly associated with atopy and asthma symptoms in the multivariate analysis. The following associations were found: TLR1 gene polymorphism, rs4833095 (OR: 1.34, CI: 1.03 - 1.74, p <0.05) and TLR5, rs2241097 (OR: 1.36; CI: 1.02 - 1.83; p <0.05) were positively and significantly associated with non-atopic asthmatics; rs4833095, SNP of *TLR1* (OR: 1.34; CI: 1.03 – 1.75; p < 0.05); the SNPs of *TLR5*, rs5744165 (OR: 4.42; CI: 1.63 – 11.95; p < 0.01) and rs5744139 (OR: 2.31; CI: 1.17 – 4.55; p < 0.05) and SNPs of *TLR6*, rs5743810 (OR: 1.60; CI: 1.13 – 2.27; p < 0.01), rs1039559 (OR: 1.45; IC: 1.10 – 1.91; p < 0.01) and rs6531673 (OR: 1.47; IC: 1.12 – 1.93; p < 0.01) were positively associated with atopic asthma in relation to non-asthmatic and non-atopic children. However, when the association of these SNPs was analyzed with the atopic and non-asthmatic reference groups, the association disappeared, demonstrating that in fact these SPNs are associated only with atopy. Interestingly the SNP rs4833095 (TLR1) was associated with the non-atopic asthma phenotype and with atopy.

The gene-environment interaction analyses are shown in Figure 1. Two SNPs of TLR2 gene (rs5743701 and rs78870609) were positively associated with sIgE to any aeroallergens only among individuals seropositive for HSV (OR = 2.72; 95% CI: 1.08 - 6.82 and OR = 3.20; 95% CI: 1.36 – 7.56, respectively). These same SNPs of *TLR2* were also positively associated with SPT among individuals seropositive for HSV (OR = 2.88; 95% CI: 1.16 – 7.10 for rs5743701 and OR = 2.44; 95% CI: 1.08 – 5.54 for rs78870609, respectively). The SNP rs1879026 of *TLR3*, in turn, was positively associated with SPT among seropositive for *T.*

gondii (OR: 2.65; 95% CI: 1.24 - 5.64), whereas the rs1013151 of *TLR8* was negatively associated with SPT among seropositive for *H. pylori* infection (OR = 0.56; 95% CI: 0.35 - 0.89). The SNPs rs5744068 of *TLR8* and rs5743740 of *TLR7* were positively associated with asthma symptoms only among seropositive for *H. pylori* and HAV infections, respectively. For rs5744068 the OR was 2.29 (95% CI: 1.10 - 4.74), while for rs5743740 the OR was 2.14 (95% CI: 1.11 - 4.14). Interestingly, the SNP rs1816702 of *TLR2* was positively associated with asthma symptoms among seronegative for HAV infections (OR = 1.36; 95% CI: 1.06 - 1.73) and negatively associated with asthma symptoms among seropositive for HAV (OR = 0.44; 95% CI: 0.25 - 0.80).

DISCUSSION

The studies demonstrate a strong association between *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* subfamily polymorphisms with allergic diseases (KANAGARATHAM et al., 2011). The present study replicated the association between the *TLR2* subfamily polymorphisms with asthma and atopy in a population of South American children, in addition to finding other *TLR5* polymorphisms, not associated with allergic diseases, and a *TLR7* polymorphism associated with atopy, also never before described in association with the markers studied here.

Among the three *TLR1* polymorphisms studied in the present study, rs4833095 (C/T) was associated with increased risk for asthma and atopy (positive SPT), with the result being reproduced after the polytomic analysis, and reinforcing the association only with non-atopic asthma. The polymorphism rs4833095 is located in the functional region of the gene (*missense*), promoting an exchange of the amino acid residue asparagine at position 248 by the serine amino acid residue (Asn248Ser), which can trigger modification in the action and structure of the generated protein (BROOKES, 1999; GAO & HUANG, 2004 apud DÁVILA et al., 2009). The data from this study corroborate a study conducted with allergic individuals in Taiwan, in which Yang & Chiang (2015) observed that SNP rs4833095 in individuals homozygous for the C allele was associated with a reduction in IgE levels in allergic patients. In a German cohort, rs4833095 (T/C), through dominant analysis, was associated with protection for atopy and atopic asthma (KORMANN et al., 2008). It is important to note that among the populations of the two studies, German and Brazilian, allele frequency differs for the SNP rs4833095: while in the population of this study, the C allele is the reference allele

and the T allele is the least frequent; In the German population, the T allele is the reference allele, whereas the C allele is the rare allele. Thus, the associations between the two studies are the same, with the T allele being associated with the risk for allergic diseases.

The two other polymorphisms found in the TLR1 gene (rs5743567 and rs4072548) were first described in this study as a protective factor for atopy using SPT as the clinical marker. The two polymorphisms mentioned above are located in non-coding regions and in linkage disequilibrium with polymorphism rs4833095 ($d' = 1$). Other polymorphisms in *TLR1* were related to the presence of asthma and atopy, to mention: rs5743595 associated with protection for atopy and atopic asthma (KORMANN et al., 2008) and SNP rs5743618, in individuals homozygous for the G allele, was associated to the risk of asthma in children aged between one and six years (Koponen et al., 2014).

The TLR6 gene was the one that presented the highest number of polymorphisms with association for atopy in the studied population, corroborating for the replication of previous studies, that found a strong association of the *TLR6* polymorphisms with allergic diseases (TANTSIRA et al., 2004; Kian et al., 2008). The polymorphism rs5743810 was positively associated with SPT and specific IgE for aerolergens in the multivariate analysis and had the confirmed association to the risk of atopy, through polytomic analysis. The SNP rs5743810 is located in coding region (*missense*), which allows alteration in the amino acid (Ser249Pro), promoting functional alteration (TANTISIRA et al., 2004). The positive association between rs5743810 and atopy replicates earlier studies (KORMANN et al., 2008; Koponen et al., 2014). In children up to seven years of age in Finland, Koponen et al. (2014) found an increased risk for atopy in the presence of the polymorphism rs5743810 in the presence of the rarer T allele in children with bronchiolitis before 6 months of age. In addition, in a German study, Kormann et al. (2008) found an association between rs5743810 and the risk for asthma and atopy.

Ratifying the importance of this co-receptor of the TLR2 subfamily, in the multivariate analysis, we found four other polymorphisms associated with atopy (Table II). Two were associated with increased risk of atopy (rs1039559 and rs6531673) and two associated with protection for atopy (rs5743805, rs7669329). The associations found for rs1039559 and rs6531673 with atopy were confirmed in the polytomic analysis (Table III). The four polymorphisms are located in non-coding region, however, they are in high linkage disequilibrium with rs5743810, SNP located in coding region. The polymorphisms rs1039559 and rs5743805 located in block 2 are in complete linkage disequilibrium with rs5743810 ($d' =$

1) and the SNPs rs7669329 and rs6531673 located in block 4 are in binding disequilibrium with rs5743810 ($d' > 0.9$). The polymorphism rs1039559 associated with the population of this study to the risk of atopy (SPT positive) had already been associated with the risk of increased total IgE and the presence of older siblings in a gene-environment interaction study conducted in the Netherlands (REIJMERINK et al., 2011). Our results corroborate with the current literature that variants in the *TLR1* and *TLR6* heterodimers may be directly involved in the mechanism of atopy and asthma (KORMANN et al., 2008; KOPONEN et al., 2014). However, additional studies should be performed to assess the impact of these SNPs on the expression of these genes in this population.

In this work, we found some SNPs in *TLR5* associated with asthma, rs2241097, and atopy, rs5744165 and rs5744139, both in multivariate and polytomic analysis, thus being the first SNPs in *TLR5* to be associated with allergic diseases. One of the SNPs found in this population, rs2241097, is in linkage disequilibrium with rs5744174 (Phe616Leu) ($d' = 1$). Previously described in studies of autoimmune diseases (SHERIDAN et al., 2013; XIAO et al., 2014), associated with the extreme decline of lung function (FEV1) in patients with cystic fibrosis (HAERYNCK et al., 2013) and in gene-environment interaction studies, showed a prenatal protective effect for atopic dermatitis when mothers had early contact with cats (RODUIT et al., 2011). The other polymorphisms associated with atopy are not in linkage disequilibrium; The SNP rs5744139 is located in the non-coding region. And SNP rs5744165 is located in synonymous coding region. There are studies associating the presence of polymorphisms in *TLR4* and *TLR5* with the risk of bacterial infections and altered immune responses in newborns (SAMPATH et al., 2013). Studies have shown reduced expression in *TLR5* in patients with asthma, including monocytes and macrophages compared to healthy individuals, and this reduction was accompanied by a reduction in the production of the regulatory cytokine IL-10 and Th1 cytokines, which would contribute to the imbalance in Th1/Th2 response and the predominance of the allergic disorders (LUN et al., 2009).

Only one *TLR7* polymorphism (rs3853839) (3' UTR) of the X chromosome, involving the C mutant allele, was associated with atopy in the multivariate analysis. Although SNP rs3853839 has not yet been associated with allergic diseases in other populations, it has been described in other studies associated with systemic lupus erythematosus in Asian populations (Shen et al., 2010; KAWASAKI et al., 2011; WANG et al., 2014) and protection against infection of the hepatitis C virus (HCV) in the Chinese population (YUE et al., 2014).

The results of the gene-environment interaction association presented in this study demonstrate that the presence of the infection acted as a modifying effect of the association between the TLR gene polymorphisms and atopy and asthma. Except for the condition polymorphism rs1816702 (TLR2) and absence of seropositivity for the Hepatitis A virus that was associated with the risk for asthma, the other associations occurred only in the presence of infections. It is important to note that the polymorphisms now associated with asthma symptoms and atopy status, when studied alone without the presence of the environment-modifying effect, were not significantly associated with any clinical variable for asthma and / or atopy. As well, the polymorphisms that showed association with asthma and atopy in the long study did not present a significant association under the modifying effect of the pathogens.

There is no data linking the presence of seropositivity to infectious agents, Herpes simplex virus (HSV), Hepatitis A virus (HAV), *Toxoplasma gondii* and *H. pylori*, with polymorphisms for *TLRs* and the risk for asthma and atopy. Published papers that show an association between TLR polymorphisms, environmental modulating effect and risk for asthma and atopy, evaluate lifestyle, especially diet, number of siblings, contact with farm and domestic animals, air pollution, the dust endotoxin levels (FUERTES et al, 2013;. REIJMERINK et al, 2011; SMIT et al, 2009; VERCELLI et al, 2010; Roduit et al, 2011). When the gene-environment interaction was verified by analyzing the modifying effect of the presence of infections on the association of innate immunity polymorphisms with atopy and asthma outcomes, the studies available to date show only associations between bronchiolitis triggered by the virus the respiratory system (respiratory syncytial virus, parainfluenza and picornavirus) in the presence of *TLRs* polymorphisms and the risk for atopy and asthma (DALEY et al, 2012; NUOLIVIRTA et al, 2013; 2014 Koponen et al).

Epidemiological evidence found by Strachan (1989) that reducing families, increasing sanitary measures and hygiene, using vaccines, indiscriminate use of antibiotics, and reducing exposure to microbial agents contributed to the increased susceptibility of allergic diseases , Allowed numerous immunological studies to be developed to explain the epidemiological finding. However, it was not only a question of the interaction between the environment modified by sanitary and hygienic measures and the production of immune response, since to justify the high prevalence of allergic diseases in developing countries, such as Brazil and Central American countries (BARRETO et al. Al., 2104; GINA, 2014). In addition, it was not possible to attribute only the ethnic, racial or genetic variations, the justification for the

prevalence and at the same time, to the high geographic variability of the prevalence of asthma in several countries of the world (VON MUTIUS et al., 1994).

Ege et al. (2006) showed that exposure to farm animals during pregnancy was associated with reduced risk for atopic sensitization and increased expression of TLR2, TLR4 and CD14 receptors. Evidence suggests that the absence of "old friends" (helminth infections, environmental microorganisms and the individual's microbiota), which are associated with the induction of immunoregulatory mechanisms, and that the genetic variants previously compensated by the "old friends" were now accumulating and promoting increased inflammatory response with potential susceptibility to Th1/Th17 or Th2 disorders (ROOK, 2012; ROOK et al., 2014). In this regulatory mechanism, the active cells are regulatory (Treg) and regulatory B (Breg), producing IL-10 and TGF- β . The TLRs, present in the dendritic cells and regulatory T cells, play a fundamental role, promoting the expansion of Treg cells and the consequent production of IL-10 and TGF- β (CARAMALHO et al., 2003; EDER et al., 2004; ROOK et al., 2014). However, the presence of polymorphic changes of the TLRs in functional regions associated with the immaturity of the receptors in the early childhood, and contact with some microorganisms (in particular the virus) can alter its function and determine the polarization of the immunological response, prevailing the profile Th2 (AKIRA et al., 2001; KORMANN et al., 2008; NUOLIVIRTA et al., 2012).

Our results corroborate with the current literature that variants in *TLRs* are associated with the immunopathological mechanism of atopy and asthma, and found polymorphisms in the TLR1, TLR5 and TLR6 genes associated with atopy and non-atopic asthma. In addition, the results showed that environmental factors could modify this association. It is important to note that the association of the TLR2 subfamily gene polymorphisms replicated results found in other populations. In addition, the new results found with the *TLR5* polymorphisms, suggests as relevant the presence of these polymorphisms in the study population and the need to replicate these data in other populations.

Table I. SNPs on TLRs significant associated with atopy/asthma outcomes.

SNP	CHR	Gene	Function	A1	A2	MAF
rs4833095	4	<i>TLR1</i>	Missense	T	C	0.3461
rs5743567	4	<i>TLR1</i>	Intron -2KB	T	C	0.1534
rs4072548	4	<i>TLR1</i>	Intron	C	A	0.1574
			Coding			
rs5744165	1	<i>TLR5</i>	synonymous	A	G	0.01299
rs2241097	1	<i>TLR5</i>	Intron	G	T	0.1842
rs5744139	1	<i>TLR5</i>	Intron	T	G	0.02446
rs5743810	4	<i>TLR6</i>	Missense	T	C	0.1567
rs1039559	4	<i>TLR6</i>	Intron	C	T	0.2693
rs5743805	4	<i>TLR6</i>	Intron	A	G	0.1944
rs7669329	4	<i>TLR6</i>	Intron -2KB	C	T	0.3877
rs6531673	4	<i>TLR6</i>	Intron -2KB	T	C	0.2925
rs3853839	X	<i>TLR7</i>	3' UTR	G	C	0.2157

Legend: SNP: Single nucleotide polymorphism; CRO: Chromosome; A1: Allele mutant; risk; A2: Wild allele/reference.

Table II. Association between SNPs on TLRs with wheezing symptoms/asthma and atopy in 1,247 children.

Phenotype	Alleles	MAF	P Value ^a	OR ^b	CI 95%	P Value ^c
SPT response to common aeroallergens						
<i>TLR1</i>						
rs4833095	C/T	T	7.00e-06	1.42	1.17 - 1.71	0.0002
rs5743567	C/T	T	0.0021	0.67	0.51 - 0.88	0.0054
rs4072548	A/C	C	0.0012	0.67	0.51 - 0.87	0.0030
<i>TLR6</i>						
rs5743810	C/T	T	5.81e-05	1.44	1.12 - 1.84	0.003
rs1039559	T/C	C	7.15e-05	1.40	1.15 - 1.70	0.0009
rs5743805	G/A	A	0.0004	0.70	0.55 - 0.89	0.005
rs7669329	T/C	C	0.0007	0.74	0.62 - 0.90	0.002
rs6531673	C/T	T	0.0005	1.31	1.08 - 1.59	0.006
Specific IgE to common aeroallergens (>0.70 kU/L)						
<i>TLR6</i>						
rs5743810	C/T	T	6.11e-05	1.43	1.13 - 1.81	0.004
<i>TLR5</i>						
rs5744165	G/A	A	0.025	2.47	1.19 - 5.12	0.008
rs5744139	G/T	T	0.002	2.0	1.17 - 3.41	0.007
<i>TLR7</i>						
rs3853839	C/G	G	0.0149	1.38	1.08 - 1.76	0.009
Wheezing symptoms/asthma						
<i>TLR1</i>						
rs4833095	C/T	T	0.0325	1.32	1.07 - 1.62	0.009
<i>TLR5</i>						
rs2241097	T/G	G	0.011	1.36	1.08 - 1.73	0.009

^a Using adaptive permutations for bivariate analysis;

^b Using logistic regression adjusted by sex, age, helminth infection and individual genetic ancestry;

^c Using adaptive permutations for regression analysis.

Table III. Association between SNPs in TLRs and asthma phenotypes with reference groups healthy individuals or atopic individuals, non-asthmatics

Marker	Non-atopic asthmatics [vs. healthy (non-asthmatic / non-atopic)] ^b	Atopic asthmatics [vs. healthy (non-atopic / non-asthmatic)] ^b	Atopic asthmatics (vs. non-asthmatic atopics) ^b
	OR (95% CI)	OR (95% CI)	OR (95% CI)
<i>TLR1</i>			
rs4833095	1.34 (1.03 – 1.74)*	1.34 (1.03 – 1.75)*	1.00 (0.76 – 1.34)
rs5743567	0.83 (0.59 – 1.17)	0.73 (0.50 – 1.07)	0.92 (0.61 – 1.40)
rs4072548	0.84 (0.60 – 1.17)	0.70 (0.48 – 1.02)	0.88 (0.58 – 1.34)
<i>TLR5</i>			
rs2241097	1.36 (1.02 – 1.83)*	1.16 (0.85 – 1.59)	1.10 (0.78 – 1.55)
rs5744165	2.14 (0.68 – 6.79)	4.42 (1.63 – 11.95)**	1.78 (0.70 – 4.52)
rs5744139	0.51 (0.17 – 1.51)	2.31 (1.17 – 4.55)*	1.59 (0.77 – 3.32)
<i>TLR6</i>			
rs5743810	1.40 (0.98 – 2.00)	1.60 (1.13 – 2.27)**	1.04 (0.72 – 1.51)
rs1039559	1.12 (0.84 – 1.49)	1.45 (1.10 – 1.91)**	1.18 (0.87 – 1.59)
rs5743805	0.97 (0.71 – 1.31)	0.92 (0.67 – 1.27)	1.07 (0.75 – 1.54)
rs7669329	1.02 (0.79 – 1.31)	0.91 (0.70 – 1.18)	1.08 (0.81 – 1.44)
rs6531673	1.05 (0.79 – 1.38)	1.47 (1.12 – 1.93)**	1.28 (0.96 – 1.73)
<i>TLR7</i>			
rs3853839	1.13 (0.88 – 1.44)	1.07 (0.83 – 1.37)	0.90 (0.69 – 1.17)

^b Multinomial logistic regression adjusted for sex, age, helminth infection and individual genetic ancestry. Genetic additive model was adopted in all analyzes. * p < 0,05; ** p < 0,01;

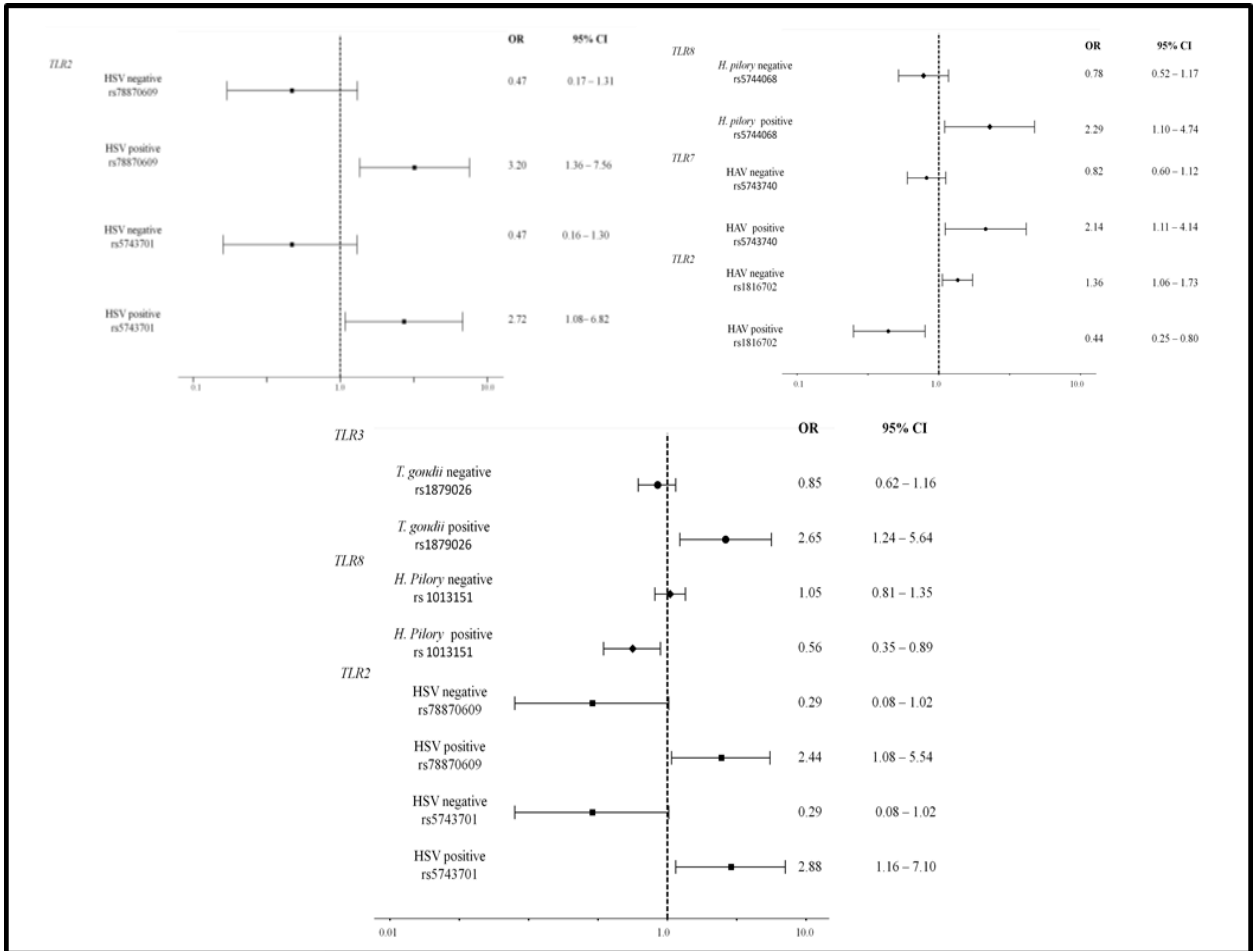


Figure 1. Gene-environment interaction