

**JULIANA BORTOLATTO**

**TOLL LIKE- RECEPTOR 4 (TLR4) NA  
MODULAÇÃO DA IMUNIDADE DO TIPO 2**

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO  
DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS  
(IMUNOLOGIA).

**SÃO PAULO  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**JULIANA BORTOLATTO**

**TOLL LIKE- RECEPTOR 4 (TLR4) NA  
MODULAÇÃO DA IMUNIDADE DO TIPO 2**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:  
Imunologia

Orientador:  
Dr. Momtchilo Russo

**São Paulo  
2008**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Bortolatto, Juliana.

Toll-like Receptor 4 (TLR4) na modulação da imunidade do tipo 2 /  
Juliana Bortolatto. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Momtchilo Russo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:  
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia Celular.

Versão do título para o inglês: Toll-like Receptor4 (TLR4) and  
modulation of Th2 immunity.

Descritores: 1. Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) 2. Toll-like  
receptor-4 (TLR-4) 3. OVA 4. Asma experimental 5. Toxóide  
Tetânico (TT) 6. Adjuvante de hidróxido de alumínio (Alum) I. Russo,  
Momtchilo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências  
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB157/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Juliana Bortolatto.

Título da Tese: Toll-like Receptor 4 (TLR4) na modulação da imunidade do tipo 2 .

Orientador(a): Momtchilo Russo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

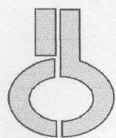
Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **77** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Momtchilo Russo** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Modulação de asma experimental por lipopolissacarídeo bacteriano: Participação de TLR4 e MyD88, quimiocinas, óxido nítrico e células T CD4+**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Juliana Bortolatto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **03.09.2007**.

São Paulo, 03 de setembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

*Dedico este trabalho ao meu orientador Momtchilo,  
responsável pela minha formação científica.*

*A meu marido Gabriel, meu companheiro e amigo, por todo  
amor, carinho, cuidado e dedicação, sempre me fortalecendo e  
tornado cada vez mais agradável nossa convivência .*

*A minha filha Cecília , que ilumina minha vida e me enche  
de orgulho todos os dias.*

*Aos meus pais e aos meus queridos irmãos, pela dedicação,  
incentivo, carinho e apoio em todos os momentos, tornando possível à  
realização de mais uma etapa na minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Momtchilo Russo pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Durante estes anos muito me ensinou, contribuindo para a minha formação profissional, crescimento científico e intelectual.

À Eliane Aparecida Gomes de Mello (Liloca's!) pela amizade e pela inestimável contribuição técnica para a realização deste trabalho.

À Dra. Dunia Del Carmen Rodríguez Soto pela amizade e pela valiosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Eliana Faquim-Mauro, do Instituto Butantan pela colaboração, competência e boa vontade em me ajudar nos experimentos de PCA.

À Dra. Cristina Caldas, pela amizade, colaboração, paciência e eficiência em editar e corrigir esse trabalho.

À Camila Leintecker Stumm, pela colaboração com as fotos da tese.

Ao querido Renato Barboza, pela amizade, convívio, e paciência que contribuíram para a formatação desse trabalho.

Ao Dr. Bernhard Ryffel, do Molecular Immunology and Embryology, Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, France, pela colaboração e acolhida em seu laboratório durante os três meses de estágio.

Aos queridos doutores Alexandre Keller, Daniel Mucida e Karina Bastos, pela amizade, colaboração e pelas valiosas discussões no laboratório, sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos. Obrigada.

Aos doutores componentes da Banca de Qualificação: Niels Olsen, Orlando Ribeiro e Frederico Costa Pinto por aceitarem acompanhar o meu trabalho e pelas sugestões de grande contribuição para aprimoramento deste.

A todos os professores do departamento de Imunologia ICB-USP pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários e responsáveis pelos Biotérios de Criação e Experimentação do ICB-USP, assim como, todos os funcionários do departamento, os seus trabalhos tornaram possível a realização desse estudo.

Aos colegas e queridos amigos do Laboratório de Imunologia Celular do ICB IV, Erikinha, Aninha, Estherzita, Juciane (Creide), Lucas, Paulo (PCC), Carininha e Alexandra. Agradeço pelo carinho, paciência (!), amizade, pela convivência, horas de bancada e por tudo que aprendi com vocês todos esses anos! Muito obrigada!



Aos funcionários da Biblioteca ICB-USP, por todo auxílio na catalogação e elaboração das referências.

À FAPESP pelo apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento deste projeto.

Finalmente, agradeço a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo deste trabalho proporcionando conhecimento, apoio e carinho. Obrigado a todos!

*A vida sem desafios não vale a pena ser vivida.  
Sócrates*

*Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final.  
Se insistirmos em permanecer nela mais do que tempo necessário,  
perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver.  
Encerrando ciclos, fechando portas, terminando capítulos.  
Não importa o nome que damos, o que importa é deixar no  
passado os momentos da vida que já acabaram.*

*Fernando Pessoa*

**Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo N° 05/57136-5, projeto de doutorado) e pela CAPES/CNPq.**

## RESUMO

Bortolatto J. Toll-like Receptor 4 (TLR4) na modulação da Imunidade do tipo 2. [Tese; Doutorado em Imunologia]; São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Lipopolissacarídeos (LPS), pode tanto proteger quanto exacerbar o desenvolvimento da asma. LPS inicia a ativação da resposta imune via ligação da molécula Toll-like receptor 4 (TLR4) que sinaliza por duas vias distintas, as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF. LPS é um adjuvante que induz resposta do tipo Th1, enquanto que o hidróxido de alumínio (Alum) desperta respostas Th2, porém, a mistura de ambos adjuvantes na indução da resposta alérgica pulmonar ainda não foi investigada. No presente estudo, nós determinamos o efeito de dois agonistas de TLR4, um natural (LPS) e outro sintético (ER-803022) adsorvidos ao Alum sobre o desenvolvimento de doença alérgica pulmonar. Os animais foram sensibilizados pela via subcutânea com os antígenos, Ovoalbumina (OVA) ou Toxóide Tetânico (TT) na presença ou ausência de agonistas de TLR4 co-adsorvidos ao Alum e desafiados com os respectivos antígenos pela via intranasal. Nossos resultados mostraram que a sensibilização com OVA ou TT e LPS co-adsorvidos ao Alum, impede o estabelecimento da resposta alérgica mediada por linfócitos Th2, tais como, influxo de eosinófilos, produção de citocinas do tipo 2, hiperreatividade brônquica, secreção de muco, e produção de IgE ou IgG1 anafilática. Apesar dos níveis de IgG2a, isotipo associado com as respostas Th1 estarem aumentados, análise da histopatologia pulmonar não revelou um desvio para o padrão Th1 de inflamação. Verificamos que a presença das moléculas TLR4, MyD88, IL-12/IFN- $\gamma$  mas não TRIF foram necessários para LPS exercer seu efeito inibitório. O agonista sintético de TLR4, menos tóxico que LPS, também protegeu contra o desenvolvimento de inflamação alérgica pulmonar. Em conclusão, nosso trabalho esclarece o efeito da sinalização do TLR4 na sensibilização alérgica e indica que agonista sintético de TLR4 com baixa toxicidade, pode ser utilizado para modular a capacidade adjuvante do Alum e conseqüentemente diminuir a indução de alergias.

Palavras-chave: Asma alérgica; LPS; Alum, Ovoalbumina, Toxóide Tetânico, TLR4.

## ABSTRACT

Bortolatto J. Toll-like Receptor4 (TLR4) and modulation of Th2 immunity. [Thesis; PhD programme in Immunology]; São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Epidemiological and experimental data suggest that bacterial lipopolysaccharides (LPS) can either protect from or exacerbate allergic asthma. LPS triggers immune responses through Toll-like receptor (TLR) 4 that in turn activates two major signaling pathways via either MyD88 or TRIF adaptor proteins. LPS is a pro-Th1 adjuvant while aluminum hydroxide (Alum) is a strong Th2 adjuvant, but the effect of mixing both adjuvants on development of lung allergy has not been investigated. We determined whether natural (LPS) or synthetic (ER-803022) TLR4 agonists adsorbed onto alum adjuvant affect allergen sensitization and development of airway allergic disease. To dissect LPS-induced molecular pathways we used TLR4, MyD88, TRIF, or IL-12/IFN- $\gamma$  deficient mice. Mice were sensitized subcutaneously to allergens such as ovalbumin (OVA) or tetanus toxoid (TT) with or without TLR4 agonists co-adsorbed onto Alum and challenged twice via intranasal route with the same allergens. The development of type 2 immunity was evaluated 24 h after last allergen challenge. We found that sensitization with OVA or TT plus LPS co-adsorbed onto Alum impaired allergen-induced Th2-mediated responses such as airway eosinophilia, type 2 cytokines secretion, airway hyperreactivity, mucus hyper production and serum levels of IgE or IgG1 anaphylactic antibodies. Although the levels of IgG2a, a Th1 affiliated isotype increased, investigation into the lung-specific effects revealed that LPS did not induce a Th1 pattern of inflammation. LPS impaired the development of Th2 immunity, signaling via TLR4 and MyD88 molecules via the IL-12/IFN- $\gamma$  axis, but not through TRIF pathway. Moreover, the synthetic TLR4 agonists that proved to have a less systemic inflammatory response than LPS also protected against allergic asthma development. TLR4 agonists co-adsorbed with allergen onto Alum down modulate Th2 immunity and prevent the development of polarized T cell-mediated airway inflammation. Thus, our work clarifies the effect of TLR4 signaling in allergic sensitization and indicates that TLR4 agonists with low toxicity might be useful for down regulating the pro-Th2 adjuvant activity of alum and consequently decrease the induction of allergy.

Key word: Allergic Asthma; LPS; Alum, Ovalbumina, Tetanic Toxoid, TLR4

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata de sinalização da molécula Toll-like Receptor 4 (TLR4)

Figura 2: Ativação do inflamassoma por diferentes estímulos.

Figura 3: O background genético mas não a expressão de TLR4 determina a magnitude da inflamação pulmonar. Desenvolvimento da HRB em animais da linhagem C57BL/10 (A e B), C3H (C e D) e C57BL/6 (E e F). Os animais foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 4: O background genético mas não a expressão de TLR4 determina a magnitude da inflamação pulmonar. Número de células totais (A e C) Número de eosinófilos (B e D). Os animais foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 5: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Total de células (A) contagem diferencial (B) HRB (C) produção de citocinas (D) índice de muco (E) e histologia (F). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA, Ø P< 0,05 em relação ao grupo LPS 0,001.

Figura 6: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total (A) IgE por ACP (B) IgG1 anafilática (C) e IgG2a (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 0,01 ou 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (APC) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.

Figura 7: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. HRB (A) contagem total e diferencial das células (B) Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS no dia 0 ou nos dias 0 e 7, em seguida os animais foram desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA, Ø P< 0,05 em relação ao grupo LPS IX.

- Figura 8: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. Produção de citocinas no LBA, IL-5 (A) IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (C). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 ou nos dias 0 e 7, em seguida os animais foram desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. A produção de citocinas no LBA foi determinada pelo método de ELISA. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.
- Figura 9: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total (A) IgG2a (B) IgE por ACP (C) e IgG1 (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 ou nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (APC) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.
- Figura 10: Efeitos do LPS na imunização com OVA em animais deficientes das moléculas TLR4, MyD88 e TRIF. Número de células (total e eosinófilos): TLR4<sup>-/-</sup> (A) MyD88<sup>-/-</sup> (B) TRIF<sup>-/-</sup> (C). Os animais foram imunizados com 4  $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Os resultados são média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.
- Figura 11: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total, TLR4 (A) MyD88 (B) TRIF (C). Os animais foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24h após o segundo desafio. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.
- Figura 12: Efeitos do LPS na imunização com OVA em animais deficientes das moléculas IL-12/IFN- $\gamma$ . Número de células (A) produção de anticorpos IgE por ACP (B). Animais da linhagem C57BL/6 foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (APC) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.
- Figura 13: Comparação da biodiversidade local e sistêmica do LPS ou ER. Reatividade brônquica (A), número total de neutrófilos (B), produção de TNF- $\alpha$  (C) e produção de NO (D): Para a determinação da reatividade brônquica os animais receberam 10  $\mu$ g de LPS ou ER e o Penh foi determinado no BUXCO. 24h após, o LBA foi retirado para contagem de células e neutrófilos. No experimento em que se determinou à produção de TNF e NO, os animais receberam 10  $\mu$ g LPS ou ER pela via i.v. e sangrados após 90 min para quantificação de TNF- $\alpha$  (C) e após 24 h para a dosagem de NO (D) no soro. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo LPS.

- Figura 14: Efeitos do LPS ou ER na imunização com OVA. HRB (A) Número de células (B) produção de citocinas (C) IgE anti-OVA (D) IgG2a (E) e IgG1 (F). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS ou ER nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA, Ø P< 0,05 em relação ao grupo LPS.
- Figura 15: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. HRB (A) contagem total e diferencial das células(B) produção de citocinas IL-5 (C) e IL-13 (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25µg de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10 µg de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo TT/Alum.
- Figura 16: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. Produção de anticorpos IgE total (A) IgG2a (B) IgG1 (C). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25µg de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10 µg de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA/TT.
- Figura 17: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. Análise dos cortes histológicos (A) Controle (B) TT/Alum (C) TT/Alum/LPS. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25µg de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10 µg de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os cortes histológicos dos pulmões foram corados com reagente de Schiff (“Periodic Acid Schiff”, PAS), o qual cora polissacarídeos e mucina básica. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>OVA</b>	“Ovalbumin” (Ovoalbumina)
<b>Alum</b>	“Aluminum hydroxide” (Hidróxido de alumínio)
<b>LPS</b>	“Lipopolysaccharide” (Lipopolissacarídeo)
<b>TLR</b>	“Toll-like receptor”
<b>MyD88</b>	“Myeloid differentiation factor 88”
<b>TRIF</b>	“TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ”
<b>NLR</b>	“NOD-like receptors”
<b>Nalp3</b>	“ <i>NATCH- LRR-and pyrin-domain-containing proteins</i> ”
<b>Ag</b>	“Antigen” (Antígeno)
<b>DC</b>	“Dendritic cell” (Célula dendrítica)
<b>LBA</b>	“Bronchoalveolar lavage (Lavado brocoalveolar)
<b>PCA</b>	“Passive cutaneous anaphylaxis” (Anafilaxia cutânea passiva)
<b>HRB</b>	“Airway hyperreactivity” (Hiperreatividade brônquica)
<b>Penh</b>	“Enhanced pause” (Aumento da pausa respiratória)
<b>MCh</b>	“Metacholine” (Metacolina)
<b>ELISA</b>	“Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay” (Ensaio imuno enzimático)
<b>E.U</b>	“Endotoxi units” (Unidades endotóxicas)
<b>LAL</b>	“Limulus Amebocyte Lysate”
<b>TT</b>	“Tetânic Toxoid” (Toxóide Tetânico)
<b>Th</b>	“T-helper”
<b>Treg</b>	“Células T reguladoras”
<b>Ig</b>	“Imunoglobulina”
<b>IL</b>	“Interleucina”
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	“Interferon gamma”
<b>CD</b>	“Cluster of Differentiation”
<b>i.n.</b>	“intranasal”
<b>i.v.</b>	“intravenoso”
<b>s.c.</b>	“subcutâneo”
<b>T-bet</b>	“T-box expressed in T cells”
<b>GATA3</b>	“GATA binding protein-3”
<b>KO</b>	“Knockout”

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Remoção de LPS da OVA comercial</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3 Determinação da concentração de LPS na solução de OVA comercial ou OVA após purificação</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4 Imunização e desafio antigênico</b> .....	<b>41</b>
<b>3.5 Determinação da hiperreatividade brônquica</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)</b> .....	<b>43</b>
<b>3.7 Contagem total e diferencial de células do LBA</b> .....	<b>44</b>
<b>3.8 Determinação de Citocinas no LBA</b> .....	<b>44</b>
<b>3.9 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA</b> .....	<b>45</b>
<b>3.10 Determinação da produção de IgE anti-OVA</b> .....	<b>47</b>
<b>3.11 Determinação da concentração total de IgE</b> .....	<b>48</b>
<b>3.12 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Toxóide</b> .....	<b>49</b>
<b>3.13 Reação de anafilaxia cutânea passiva (ACP)</b> .....	<b>50</b>
<b>3.14 Determinação da produção de TNF in vivo, pelo ensaio de citotoxicidade sobre células L929</b> .....	<b>51</b>
<b>3.15 Determinação da produção de NO in vivo</b> .....	<b>52</b>
<b>3.16 Índice de secreção de muco</b> .....	<b>52</b>
<b>3.17 Análise Estatística</b> .....	<b>53</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1 O background genético, mas não a expressão de TLR4, determina a magnitude da inflamação alérgica pulmonar</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2 LPS durante a sensibilização com OVA/Alum suprime as respostas alérgicas pulmonares de maneira dose-dependente</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3 LPS durante a sensibilização com OVA/Alum suprime a produção de anticorpos anafiláticos e aumenta os níveis de IgG2a OVA-específica</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4 Efeitos do LPS administrado na primeira sensibilização com OVA/Alum sobre o desenvolvimento da hiperreatividade brônquica, inflamação pulmonar e produção de citocinas</b> .....	<b>63</b>
<b>4.5 Efeitos do LPS administrado na primeira sensibilização com OVA/Alum sobre a produção de anticorpos</b> .....	<b>66</b>
<b>4.6 As moléculas TLR4 e MyD88, mas não TRIF são cruciais para inibição das respostas alérgicas pulmonares induzidas pelo LPS</b> .....	<b>68</b>
<b>4.7 O eixo IL-12/IFN-<math>\gamma</math> é responsável pela inibição das respostas alérgicas pulmonares induzidas pelo LPS</b> .....	<b>70</b>
<b>4.8 Comparação da bioatividade local e sistêmica induzida pelo LPS versus ER-80302271</b>	
<b>4.9 LPS ou ER durante a sensibilização com OVA/Alum suprimem as respostas alérgicas pulmonares</b> .....	<b>75</b>
<b>4.10 Toxóide tetânico induz reação alérgica pulmonar que é inibida por LPS</b> .....	<b>77</b>

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>101</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### *Asma*

As doenças alérgicas, incluindo rinite alérgica, dermatite atópica e asma brônquica são desordens inflamatórias complexas que dependem tanto de fatores genéticos quanto ambientais para seu desenvolvimento <sup>[1]</sup>. A incidência e a prevalência dessas doenças têm aumentado substancialmente nas últimas décadas, sendo que os países desenvolvidos e em desenvolvimento são os mais afetados <sup>[1]</sup>. Mudanças ambientais, e, conseqüentemente, as complexas interações genético-ambientais são consideradas responsáveis pelo aumento da prevalência das desordens alérgicas <sup>[2]</sup>.

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica das vias aéreas associada com a presença de células ativadas, em particular linfócitos T, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e células epiteliais. Em indivíduos susceptíveis, estas células liberam mediadores que amplificam a inflamação, aumentam a hiperreatividade brônquica (HRB) e estimulam a secreção de muco, fatores que em conjunto contribuem para a obstrução das vias aéreas. Como resultado deste processo inflamatório crônico, o tecido pulmonar pode sofrer profunda mudança estrutural e funcional denominada “remodelamento” pulmonar <sup>[3]</sup>.

A reação alérgica pulmonar pode apresentar duas fases: uma inicial com broncoconstrição e aumento de permeabilidade vascular logo após a inalação do alérgeno e uma segunda fase, denominada de resposta asmática tardia, que se inicia 2 ou 3 horas após a exposição ao alérgeno e pode se estender por mais de 24 horas.

### *Fase Imediata*

Esta fase envolve a produção de imunoglobulinas anafiláticas, representadas no homem pela IgE e em camundongos pelos isotipos IgE e IgG1 <sup>[4, 5]</sup>. A IgE é encontrada em

baixos níveis na circulação <sup>[6]</sup> e sua produção é induzida sobretudo pelas citocinas IL-4 e IL-13 <sup>[7, 8]</sup>. Linfócitos Th2 CD4+ são os principais produtores destas citocinas, no entanto outras células como eosinófilos, mastócitos e basófilos, também podem produzi-las <sup>[6]</sup>. Além disso, recentemente foi atribuída relevância às células NKT (*natural-killer T cell*), responsáveis pela liberação de altas quantidades de IL-4, para a gravidade da inflamação alérgica e da hiperreatividade brônquica em modelo murino de asma <sup>[9]</sup>. Outra característica da fase inicial é a ativação de mastócitos presentes no parênquima pulmonar seguida de broncoconstrição.

A IgE produzida liga-se aos receptores FcεRI encontrados nos mastócitos e, após o subsequente contato com o alérgeno, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela fase imediata <sup>[10, 11]</sup>, mas que também podem influenciar a fase tardia da doença. Tais mediadores são: citocinas, substâncias pré-formadas – por exemplo, a histamina - e os mediadores lipídicos, como o fator ativador de plaquetas (PAF - *platelet activating factor*), leucotrieno B4 (LTB4), LTC4 e a prostaglandina E2 (PGE2), produzidos não só pelos mastócitos mas também por macrófagos e neutrófilos <sup>[12-14]</sup>.

### ***Fase tardia***

Nessa fase, também chamada de reação inflamatória pulmonar tardia, ocorre uma grande migração de células inflamatórias (principalmente eosinófilos) para o tecido pulmonar. Dano tecidual, hiperreatividade brônquica e produção de muco são outros atributos da fase tardia. Mais uma vez, a produção de citocinas pelas células TCD4+ tem influência direta no perfil inflamatório observado. A presença de células TCD4+ e TCD8+ relaciona-se com o infiltrado eosinofílico na fase tardia da doença, assim como com sua severidade <sup>[15]</sup>. Robinson e colaboradores mostraram que as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF são produzidas em concentrações elevadas em pacientes asmáticos, comparado aos níveis

encontrados em indivíduos hígidos. Além disso, observaram também um aumento das células T expressando marcadores de ativação (CD25) nos mesmos pacientes <sup>[16, 17]</sup>.

Com o início da fase tardia, um micro-ambiente inflamatório é formado, permitindo uma intensa migração de células para o espaço bronco-alveolar. Este micro-ambiente é formado pelas citocinas listadas acima, juntamente com diversos outros fatores induzidos, como quimiocinas <sup>[18]</sup> (eotaxina, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , IL-6 e outras), moléculas de adesão e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, $\alpha$ 4 $\beta$ 7, ICAM-1, VCAM-1) <sup>[14, 19]</sup>, mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>) <sup>[12-14]</sup>. Presentes em grande quantidade no tecido inflamado, os eosinófilos são capazes de produzir diversas substâncias como a proteína básica principal (MBP - *major basic protein*), a proteína catiônica eosinofílica (ECP - *eosinophilic cationic protein*), o ânion superóxido e o PAF, que contribuem para os danos teciduais observados e para o quadro inflamatório <sup>[20-24]</sup>.

Além disso, nesta fase verifica-se um aumento na reatividade brônquica a uma variedade de estímulos tais como histamina, metacolina, entre outros <sup>[25]</sup>. Dado que a produção de IgE e a infiltração de eosinófilos são dependentes de células Th2 e seus produtos, fica evidente que as fases imediata e tardia fazem parte do mesmo processo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) <sup>[26]</sup>, em 2005 foram estimados 300 milhões de casos de asma no mundo inteiro, sendo que 255 mil pessoas morreram por complicações desta doença neste período. Ainda segundo o mesmo relatório da OMS, estima-se que nos próximos 10 anos haverá um acréscimo de 20% na ocorrência de asma na população mundial. O aumento da prevalência da asma no mundo inteiro tem sido explicado em parte pela “hipótese da higiene”.

### ***Hipótese da higiene***

A hipótese da higiene foi proposta como uma tentativa de explicar o aumento da prevalência de doenças alérgicas nas últimas décadas. De acordo esta hipótese, indivíduos que contraíram poucas infecções bacterianas durante a infância apresentam uma insuficiente estimulação de linfócitos T do tipo Th1, resultando num desequilíbrio e conseqüente expansão de linfócitos T do tipo Th2. Tal polarização predisporia o indivíduo às doenças alérgicas <sup>[27]</sup>. Entretanto, existem dados indicando que esta primeira interpretação da “hipótese da higiene” pode ser incorreta ou incompleta, pois paralelamente ao aumento de atopia houve também um aumento de doenças autoimunes (AID - *autoimmune diseases*) do tipo Th1, como a diabetes tipo 1 <sup>[28]</sup> (revisado por Mucida e cols. (2003) <sup>[29]</sup>). Mais ainda, não há correlação entre a ocorrência de infecções por helmintos e doenças alérgicas, apesar de ambas estarem associadas ao padrão Th2. Na verdade, algumas infecções por helmintos, como a esquistossomose crônica, podem suprimir a atopia em crianças, provavelmente pela indução de IL-10 <sup>[30, 31]</sup>. Finalmente, resultados conflitantes tem sido descritos, como por Bager *et al.*, que mostraram que indivíduos com um maior número de infecções durante os primeiros anos de idade apresentam maiores índices de atopia<sup>[32]</sup>. Esses achados não se encaixam na clássica hipótese da higiene<sup>[27, 29, 33]</sup>. Uma explicação alternativa para a correlação inversa entre alergias e infecções na infância é que infecções na verdade são necessárias para a emergência das células T reguladoras (Treg - de *regulatory T cells*), ou ainda, para a emergência de células que completem o repertório maduro do sistema imune.

Outros fatores também podem estar envolvidos no desenvolvimento de asma experimental, como a predisposição genética. Inúmeros estudos de polimorfismos no genoma humano identificaram proteínas em diferentes cromossomos que estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de asma, atopia e hiperreatividade brônquica. Os genes



responsáveis ou que estão diretamente ligados com as respostas do tipo Th2 podem ser divididos em 4 grupos: No primeiro grupo, estão os genes associados com a resposta imune inata e de imunoregulação, esses genes estão localizados na interface entre o início da resposta imune e sua regulação. Sabe-se que a inflamação alérgica e a regulação da síntese de IgE são fortemente influenciados pelo polimorfismo em genes que codificam receptores que reconhecem padrões moleculares, sejam eles extracelulares, como CD14, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR10, ou intracelulares do tipo NLR <sup>[34]</sup>. Como esperado um segundo grupo de genes candidatos à susceptibilidade ao desenvolvimento de asma são os envolvidos na diferenciação das células Th2 polarizadas como por exemplo GATA-3, um fator de transcrição central responsável pelo desenvolvimento de células Th2 <sup>[35]</sup>. Este fator é induzido pela ativação de STAT6 após a ligação da IL-4 com IL4 $\alpha$ R <sup>[35]</sup>. Por sua vez, a ativação de GATA3 parece inibir a transcrição do fator T-bet, outro fator de transcrição central para a polarização de células TCD4+ em células Th1. Além do mais, outros genes como que codificam TBX21, IL12B, IL-13, IL-4, STAT6, FCER1B, IL5, IL5RA e IL4RA parecem contribuir para a patogênese da asma (revisto em *Nature Immunol* <sup>[34]</sup>).

O terceiro grupo de genes associados com as respostas alérgicas são aqueles expressos em células epiteliais e que também fazem um elo entre a imunidade inata e adaptativa como os que codificam quimiocinas (CCL5, CCL11, CCL24 e CC16) envolvidas na migração de células inflamatórias <sup>[36]</sup>. Finalmente, o último grupo de genes associados com a asma são mais heterogêneos e estão associados com a função pulmonar, remodelamento das vias aéreas e severidade da doença, e dentre estes destacamos os genes que codificam adrenoceptores  $\beta$ -2 e receptores de glicocorticóides <sup>[37]</sup> ou fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) <sup>[38]</sup> e citocinas pró-inflamatórias <sup>[39]</sup>. Recentemente, foi detectado o polimorfismo no ADAM33, gene que está

localizado no cromossomo 20 e que tem sido identificado como um dos genes de susceptibilidade ao desenvolvimento de asma<sup>[40]</sup>. O gene ADAM33 codifica a proteína ADAM que origina as metaloproteinases ancoradas na membrana das células.

Embora pareça existir uma correlação direta entre o polimorfismo desses genes e o desenvolvimento de doenças alérgicas, os detalhes desta correlação ainda não estão totalmente elucidados.

### *Asma experimental*

Existem inúmeros modelos experimentais de asma largamente utilizados por diferentes grupos de pesquisa e que usam protocolos distintos de imunização<sup>[41, 42]</sup>. Resultados controversos são comuns nas pesquisas que utilizam tais modelos. As controvérsias podem ser atribuídas tanto aos protocolos de imunização como ao fundo genético ou “*genetic background*” dos animais<sup>[43, 44]</sup>. Certas linhagens de camundongos, como A/J, BALB/c e C57BL/6 comportam-se como susceptíveis, enquanto que outras linhagens como C3H/HeJ (TLR4-deficiente) e C3H/HePas (TLR4-normal) são resistentes ao desenvolvimento de asma<sup>[45]</sup>. Na linhagem C3H, esta resistência parece estar associada com a produção de IL-12 durante a sensibilização dos animais e também da produção de citocinas intrapulmonares<sup>[45]</sup>.

Doses, vias, adjuvantes e intervalos distintos de imunização alteram significativamente o desenvolvimento da asma, o que de certa forma contribui também para as controvérsias observadas nesta área do conhecimento.

A sinalização via molécula Toll-like Receptor-4 (TLR4) também gera muita polêmica na literatura<sup>[46-48]</sup>. Por exemplo, Kim e cols, mostraram que o TLR4 e o MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*) são essenciais para o desenvolvimento das respostas do tipo Th2 a antígenos inalados. Por outro lado, quando se utilizam adjuvantes durante as

imunizações, as moléculas TLR4 ou MyD88 são dispensáveis para a indução das respostas alérgicas pulmonares <sup>[46]</sup>.

Um dos objetivos do nosso estudo foi investigar o papel da expressão do TLR4 assim como a influência do *background* genético no desenvolvimento de asma experimental.

### ***Asma e LPS***

Dados da literatura sugerem que os componentes microbianos tais com lipopolissacarídeos (LPS) estão envolvidos na modulação do sistema imunológico, e são os principais mediadores ambientais de proteção contra as atopias. Além disso, tais estudos sugerem/mostram que o tempo e o período de exposição aos componentes bacterianos são cruciais no efeito protetor contra as alergias, uma vez que quanto mais cedo o sistema imune é exposto a estes agentes, mais eficazes são os efeitos anti-alérgicos.

A endotoxina faz parte da parede celular de bactérias Gram-negativas e seu principal componente é o lipopolissacarídeo (LPS), constituído por uma porção polissacarídea (antígeno O) extremamente variável, e uma porção lipídica (lipídeo A) bastante conservada e responsável pela maioria dos efeitos biológicos do LPS <sup>[49]</sup>.

Até o final da década de 90, o receptor para LPS não era ainda conhecido. Porém, sabia-se que macrófagos de animais da linhagem C3H/HeJ não respondiam ao LPS <sup>[50-53]</sup> e que linfócitos B de animais C57BL10/ScCr também não eram ativados por LPS <sup>[53, 54]</sup>. Ficou estabelecido que esta deficiência ocorria devido a um gene denominado *Lps*, que se localizava no cromossomo 4 <sup>[53, 55]</sup>. Em 1997, Medzhitov e cols. <sup>[56]</sup> clonaram um gene humano homólogo ao gene Toll da *Drosophila*, o *Toll-like receptor* (TLR)-4 e verificaram que em células transfectadas ocorria a ativação do fator de transcrição NF-κB e a expressão de citocinas inflamatórias. Em 1998, Rock e cols. <sup>[57]</sup> mostraram que o receptor tipo TLR4 fazia

parte de uma família de receptores do tipo *Toll* (TLRs), encontrados nas drosófilas. Finalmente, na mesma época, Poltorak e cols. <sup>[55]</sup> demonstraram, por clonagem pontual em camundongos, que o locus *Lps* era um gene homólogo ao TLR4 humano estabelecendo que o receptor de LPS no camundongo era o TLR4 <sup>[55]</sup>.

Atualmente, sabe-se que após o reconhecimento do LPS pelo TLR4 (assim como nas demais interações TLRs e respectivos ligantes) ocorrem mudanças conformacionais no receptor que levam à aproximação de dois domínios TIR (toll/interleukin-1 receptor, Toll/IL-1R) que é homólogo ao domínio intracelular do receptor para a citocina IL-1), criando uma plataforma que permite o recrutamento de moléculas adaptadoras <sup>[58]</sup>.

Os receptores do tipo TLR fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina, particular para cada TLR <sup>[59]</sup>. Foram identificadas 11 proteínas em mamíferos, sendo que para os humanos foram descritos 10 destes receptores até o momento <sup>[60]</sup>. Dentre as estruturas reconhecidas pelos TLRs além do LPS, estão peptídioglicanas (PGN), âncoras de glicofosfatidil inositol (GPIs) (presente em protozoários), zimozan (presente em fungos), RNA de dupla fita (comuns em vírus), flagelina (presente em bactérias flagelares), e seqüências de DNA ricas em CpG não metilados (presente em vírus e bactérias) <sup>[60, 61]</sup>.

Após o reconhecimento de estruturas microbianas pelos TLR, estes receptores sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP (TIR-domain-containing adaptor molecule), também conhecida como MAL (MyD88-adaptor-like), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) e SARM – sterile  $\alpha$ - and armadillo-motifcontaining protein <sup>[58, 62-66]</sup>. O tipo de sinalização depende do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras. As ativações dependentes da molécula

MyD88 – uma molécula compartilhada por quase todos os TLRs – é iniciada com a facilitação da associação da MyD88 com a IRAK4. Isto favorece a fosforilação de IRAK1. A fosforilação da IRAK1 permite a ligação da molécula TRAF6 ao complexo. A ligação da TRAF6, por sua vez, ativa TAK1 que faz um complexo com TAB1 e TAB2. Após a formação do complexo, TAK1 ativa o complexo IKK que leva a ativação de NF- $\kappa$ B. Simultaneamente, TAK1 ativa dois membros da família das MAP quinases que subsequentemente ativam JUN N-terminal quinase (JNK) e p38, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. No caso dos receptores TLR7, TLR8 e TLR9 a via MyD88-IRAK4 também leva, pela ativação de TRAF3 e TRAF6, à sinalização via IRF7, que por sua vez, regula a produção de IFN do tipo 1. Os TLR2 e TLR4 necessitam, além da MyD88, da molécula adaptadora TIRAP<sup>[58, 66]</sup>. (Figura1)

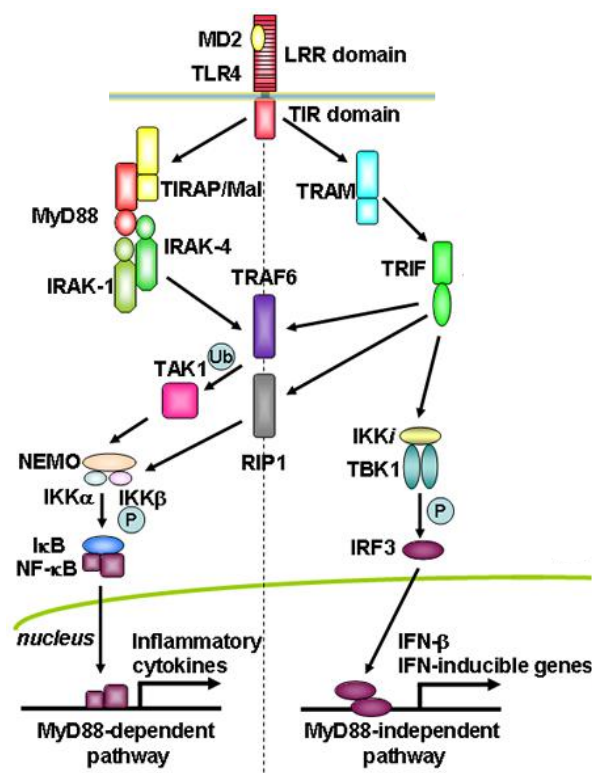


Figura 1: Cascata de sinalização da molécula Toll-like Receptor 4 (TLR4)

Fonte: Modificado de Shizuo Akira (Department of host defense), 2006

Os TLR3 e TLR4 são capazes de ativar o NF- $\kappa$ B por uma via independente de MyD88 e dependente de TRIF<sup>[58]</sup>. A molécula adaptadora TRIF tem diferentes regiões de interações que permitem o recrutamento de diferentes moléculas efetoras como TBK1, TRAF6 e RIP1. A interação entre TRIF, TRAF6 e TBK1 faz com que TRAF6 ative NF- $\kappa$ B, além de promover a fosforilação de IRF3, levando a produção de IFN do tipo I. A interação de TRIF com TLR3 ocorre diretamente, já os TLR4 necessitam da participação da molécula TRAM.

Os TLRs podem atuar em sinergia, favorecendo a ativação celular<sup>[60]</sup>. Por exemplo, TLR4 e TLR9 podem exercer efeitos similares, utilizando vias distintas<sup>[61]</sup>. Ambos podem ativar vias dependentes de MyD88, que essencialmente ativam IRAK e TRAF6 e levam à ativação de NF- $\kappa$ B e MAPK. Da mesma forma, ambos induzem a regulação positiva de moléculas co-ativadoras e moléculas co-estimulatórias de linfócitos. O interessante neste caso é que enquanto a indução feita por TLR4 é independente de MyD88, a indução por TLR9 se dá por uma via dependente de MyD88.

Nos últimos anos tem crescido substancialmente a compreensão sobre as vias de ativação utilizadas pelos TLR, porém os mecanismos ainda não foram completamente decifrados. Por exemplo, só recentemente foi mostrado que o CD14 é necessário para a sinalização do NF- $\kappa$ B dependente de MyD88 dos TLR2, TLR4 e TLR6<sup>[67]</sup>. No caso do TLR4, a participação do CD14 está relacionada ao subtipo de LPS (liso ou rugoso). Atualmente sabe-se que a associação do LPS à LBP (do inglês, *LPS-binding protein*) na circulação e sua transferência ao CD14 celular é necessária para uma ativação ótima de macrófagos<sup>[68]</sup>, além da presença do TLR4. Além disso, o recrutamento de MyD88 pode ser de alguma forma dependente da interação do TLR4 com outras moléculas.

### ***Asma LPS e TLR4***

Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a exposição à endotoxina pode tanto proteger quanto exacerbar o quadro asmático [69]. Os LPS é ubíquos no meio ambiente e presentes em altas concentrações na poeira orgânica, assim como na poluição do ar e na poeira doméstica. Raymond e cols. [70] mostraram que as endotoxinas estão presentes na poeira doméstica, assim como nas cavidades oral e nasal dos seres humanos [71]. Estudos realizados por Rylander e cols (1989) apontaram que a inalação de endotoxinas causa uma inflamação e deterioração da função pulmonar [72]. Estes autores mostraram também que indivíduos asmáticos são mais sensíveis à inalação de LPS do que indivíduos não asmáticos. A inalação de doses baixas de LPS induz em pessoas asmáticas uma reação inflamatória pulmonar que se caracteriza pela presença de neutrófilos [73]. No entanto, em indivíduos não asmáticos são necessárias altas doses de LPS para induzir a mesma reação [72]. Por outro lado, Gereda e cols. (2000), investigaram o efeito protetor da exposição crônica a endotoxinas presentes na poeira doméstica, em crianças atópicas com idades entre 9 e 24 meses. Este trabalho mostrou que existe uma correlação entre a concentração de endotoxina e o número de células Th1 presentes na circulação. Assim, os pesquisadores sugeriram que a indução de células do tipo Th1 ocorreu devido à exposição crônica à endotoxina e que a indução destas células nos primeiros meses de vida poderia inibir o desenvolvimento de células do tipo Th2 prevenindo a atopia e possivelmente a asma [74]. Da mesma forma, Von Mutius e cols. (2000), mostraram a importância da exposição crônica das endotoxinas como efeito protetor no desenvolvimento de doenças atópicas em crianças que nasceram e vivem em fazendas, onde a concentração de endotoxina é maior que em centros urbanos [69].

Um trabalho desenvolvido em nosso laboratório indicou outra possibilidade para a inibição da reação alérgica induzida por LPS [75]. Neste trabalho foram utilizadas altas doses

de LPS e os mesmos foram administrados somente no desafio, mas não na imunização com OVA. Foi verificada que tanto a injeção intranasal quanto endovenosa de LPS inibiu completamente a reação eosinofílica pulmonar, a HRB, citocinas do tipo 2, formação de muco e anafilaxia cutânea passiva <sup>[75]</sup>. Surpreendentemente, a inibição das reações alérgicas pelos LPS administrados i.v. não ocorreu em função da produção de IL-12 ou IFN- $\gamma$ , uma vez que o LPS também inibiu as reações alérgicas em animais deficientes para estas citocinas. Porém, o LPS não inibiu a alergia em animais deficientes para a enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2). Desta forma, o LPS também pode inibir reações alérgicas sinalizando via TLR4 e induzindo a produção de NO dependente da enzima NOS2.

A maioria dos modelos experimentais em asma utiliza a OVA como alérgeno e o hidróxido de alumínio (Alum) como adjuvante. Porém, alguns modelos experimentais utilizam apenas a OVA i.n. para a sensibilização dos animais <sup>[76]</sup>. Usando a OVA como alérgeno, Dabbagh e cols. (2002) mostraram que o TLR4 é essencial para o desenvolvimento das respostas do tipo Th2 <sup>[46]</sup>. Por outro lado, Piggott e cols (2005) mostraram que quando se utilizam adjuvantes durante as imunizações, as moléculas TLR4 ou MyD88 são dispensáveis para a indução das respostas alérgicas pulmonares <sup>[77]</sup>.

O trabalho recente de Eisenbarth et al. abriu uma nova possibilidade de interpretação de como o LPS poderia atuar na alergia <sup>[41]</sup>. Estes autores mostraram que baixas doses de LPS associados à OVA durante a sensibilização, feita pela via i.n., induzem uma ativação de linfócitos Th2, com conseqüente eosinofilia pulmonar e produção de IgE. Por outro lado, a inalação de altas doses de LPS associados com a OVA resulta na supressão do quadro alérgico. Em resumo, a concentração de LPS durante a exposição do alérgeno, determina se o tipo de reação imunológica será predominantemente Th2 ou Th1.



Atualmente, as controvérsias no campo LPS/asma começam a ser desvendadas<sup>[41, 42, 78, 79]</sup> e a explicação é que o efeito do LPS na alergia depende da dose, via de administração e tempo de exposição.

Outra variável nos modelos de OVA é que a OVA comercial está contaminada com LPS. Watanabe e cols (2003) mostraram que animais imunizados com OVA comercial e alum não desenvolviam HRB enquanto que animais imunizados com OVA purificada e alum desenvolviam<sup>[79]</sup>. No sentido de excluir essa variável, no presente trabalho utilizamos OVA livre de LPS.

Na década de 80, estudos com agonistas sintéticos de TLR4 apontaram que estruturas análogos do lipídio A podem manter as propriedades biológicas do Lipídeo A do LPS e ao mesmo tempo exibir baixa toxicidade<sup>[80]</sup>. O nosso laboratório tem utilizado um agonista sintético de TLR4, o ER-803022 (ER), para determinar seu efeito modulatório na asma experimental e este produto também foi testado em nossos experimentos.

### ***Adjuvantes***

Adjuvante ("adjuvare", do latim = auxiliar) é o nome genérico que se aplica a substâncias usadas em associação a antígenos, com o objetivo específico de auxiliar ou potencializar a resposta imunológica que seria de menor intensidade, se o antígeno tivesse sido administrado isoladamente.

A natureza química dos adjuvantes utilizados até o momento é bastante variada e alguns dos adjuvantes mais utilizados são: **a)** sais de alumínio, tais como fosfato e hidróxido de alumínio que são os únicos adjuvantes aprovados para uso clínico; **b)** combinação de sais de alumínio com monofosforil lipídio A (MPL); **c)** combinação de monofosforil lipídio A (MPL) com QS-21 (uma fração purificada de extrato de saponina de Quillarja saponina) e uma emulsão de óleo e água; **d)** bacterianos como LPS e MDP; **e)** óleos minerais; **f)** óleos vegetais.

Na categoria dos óleos minerais, vale uma referência especial ao adjuvante mais antigo e mais conhecido, o adjuvante de Freund, quer na forma “incompleta” que consiste em um óleo mineral livre de compostos aromáticos policíclicos quer em sua forma “completa” onde foi adicionada à sua fórmula original, uma bactéria inativada (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*). A importância do conhecimento de novos adjuvantes e de seu mecanismo de ação é posta em evidência quando se sabe que, atualmente, a nova geração de vacinas, incluindo aquelas nas quais são usadas subunidades de antígenos virais, produzidas por técnica de DNA recombinante, somente dará bons resultados se administradas com adjuvante seguro, adequado e eficaz.

De um modo geral, os adjuvantes podem ser divididos em dois tipos: tipo 1 que polarizam a as células para o padrão Th1 ou tipo 2, que despertam respostas Th2. Os adjuvantes do tipo 1, são formulados com microorganismos (BCG) – adjuvante completo de Freund - ou produtos microbianos como LPS enquanto que os do tipo 2 não contêm produtos microbianos – adjuvante incompleto de Freund ou Alum <sup>[81]</sup>.

Alum vem sendo utilizado a mais de 60 anos em vacinas humanas contra difteria, tétano e coqueluche <sup>[82]</sup>. Assim sendo, a vacinação de humanos com Alum pode desencadear respostas alérgicas. Realmente, em alguns indivíduos, a vacinação com Alum contendo toxóide tetânico (TT) induziu uma reação anafilática intensa <sup>[83]</sup>.

O mecanismo de ação dos adjuvantes foi inicialmente explicado pela propriedade que os mesmos teriam de reter os antígenos no sítio de inoculação (é o caso dos adjuvantes em gel ou oleosos, por exemplo). Posteriormente, o mecanismo de ação dos adjuvantes passou a ser relacionado com o processo inflamatório inespecífico, acompanhado do recrutamento de fagócitos mononucleares para o local da imunização e outra explicação ainda é a de que os

adjuvantes seriam imunorreguladores do equilíbrio entre a resposta imunológica protetora, a tolerância e a supressão.

Uma proposta recente para o funcionamento dos adjuvantes é que adjuvantes atuam aumentando a sobrevivência das células-T ativadas, devido ao aumento da expressão da proteína Bcl-3 nestas células. Dessa forma, Bcl-3 seria um componente essencial pelo qual os adjuvantes, a inflamação e a imunidade inata controlam a resposta imune adaptativa [84].

Sabe-se que certos adjuvantes podem despertar respostas do tipo Th1 devido a sinalização via TLRs, como LPS (TLR4), PGN (TLR2), Flagelina (TLR5) e CpG (TLR9). De modo oposto, o mecanismo adjuvante do Alum que não sinaliza via TLRs somente agora começa a ser desvendado. Tem sido mostrado recentemente que Alum é capaz de ativar caspase-1 e induzir a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 via receptores NALP3<sup>[85, 86]</sup>. NALP3 pertence a uma família de receptores do tipo NOD-LRR (*Nucleotide-binding oligomerization domain – Leucin rich repeats*) ou NLR têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas Nods (*nucleotide-binding oligomerization domain-1*), Nalps (*NATCH- LRR-and pyrin-domain-containing proteins*), Naips (*neuronal apoptosis inhibitor factors*), Apaf e Ipaf (*ICE-protease activating factor*)<sup>[87, 88]</sup>.

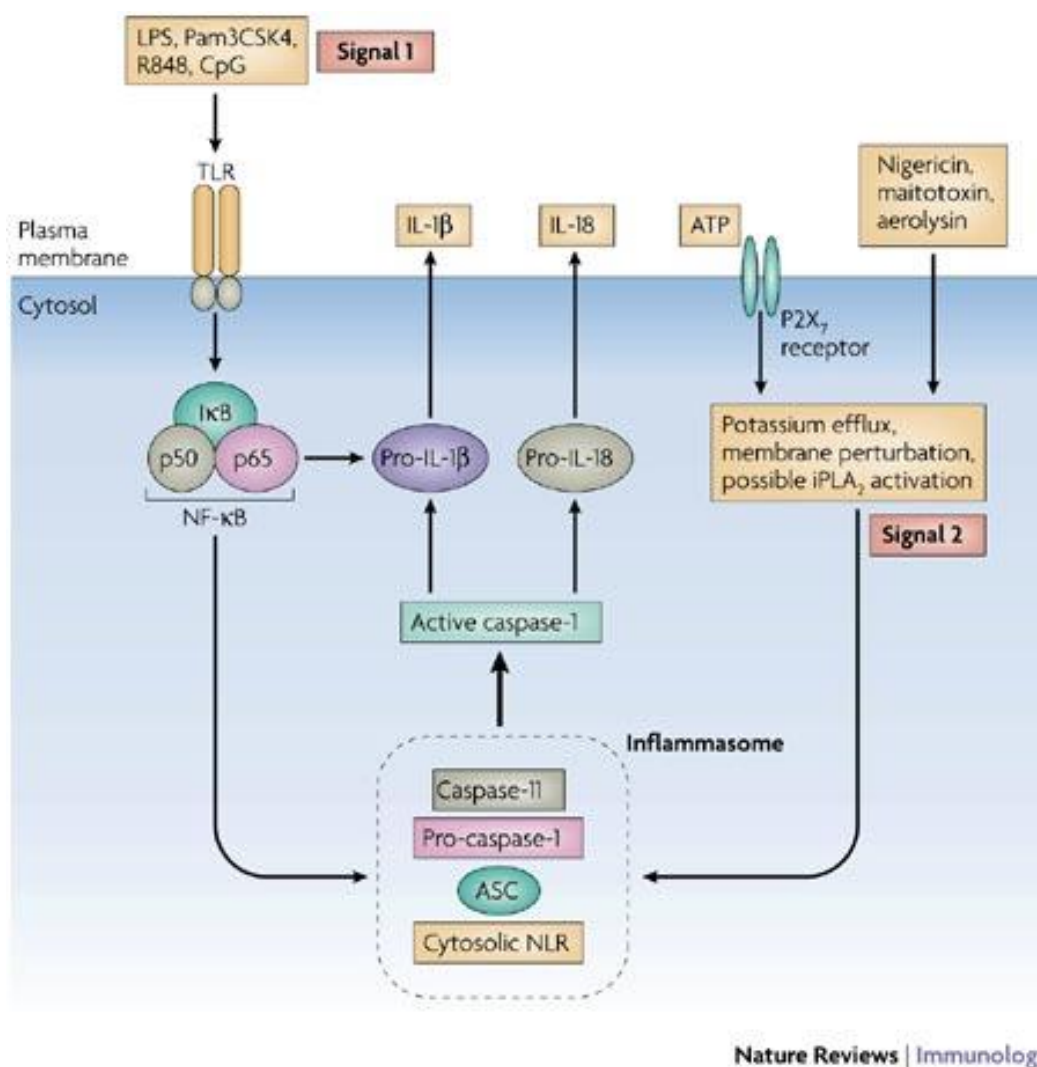


Figura 2: Ativação do inflamassoma por diferentes estímulos.

**Fonte:** Modificado de *Denise M. Monack* [89]

Outros membros da família dos receptores NLR são chamados de inflamassoma, um complexo multi-protéico que compreende a proteína adaptadora intracelular ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) e um receptor NLR que funciona como um “gatilho” para ativação da caspase-1. Nalp3 parece reconhecer múltiplos agonistas de origem microbiana e de hospedeiro, incluindo RNA bacteriano, RNA dupla fita, presente em vírus, ácido úrico e efluxo celular de potássio. O fato dos receptores Nalp3 serem ativados em

resposta ao ácido úrico e efluxo de potássio sugere que esses NLR detectam sinais de desequilíbrio homeostático <sup>[85]</sup> <sup>[90]</sup>. Além de ativar NALP3, Alum também induz a produção de de IL-4 por células Gr1+ ainda não ,muito bem definidas.<sup>[91]</sup>. Em resumo, Alum ativa Nalp3, com conseqüente ativação de caspase 1 e produção de IL-1 e IL-18 e também induz a produção de IL-4 que, em conjunto, parecem favorecer a diferenciação de células Th2

Por outro lado, está bem estabelecido que o efeito adjuvante do LPS é devido a ativação do TLR4 que resulta no aumento da expressão de moléculas MHC II e de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86) em células dendríticas e na secreção de IL-12 e outras citocinas que inibem o funcionamento das células T reguladoras e ao mesmo tempo geram um contexto propício para a expansão de células Th1 (revisto por Pasare e Medzhitov (2004) <sup>[92]</sup>).

No presente trabalho duas questões fundamentais foram endereçadas:

1. Qual seria a conseqüência da deficiência na expressão funcional da molécula TLR4 sobre o desenvolvimento de resposta alérgica induzida pela sensibilização com antígeno adsorvido ao Alum?
2. Qual seria o tipo de resposta imunológica induzida por uma sensibilização com o antígeno feita com uma mistura de dois adjuvantes (LPS e Alum) de ações opostas?

## **OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

O principal objetivo do trabalho foi investigar se a expressão ou a sinalização via TLR4 durante a sensibilização a ovoalbumina (OVA) ou toxóide tetânico (TT) adsorvidos ao Alum, um adjuvante do tipo 2, afetam o desenvolvimento de imunidade do tipo 2.

### **2.1 Objetivos Específicos**

1-Determinar se a expressão da molécula de TLR4 interfere no desenvolvimento de doença alérgica pulmonar.

2-Avaliar o efeito da co-adsorção de agonistas de TLR4, natural (LPS) ou sintético (ER-803022), e OVA ao Alum sobre o desenvolvimento da HRB; inflamação pulmonar, produção de citocinas e a produção de anticorpos anafiláticos e não anafiláticos.

3-Averiguar se o TT desperta reações alérgicas.

4-Determinar os efeitos da co-adsorção de TT e LPS ao Alum sobre o desenvolvimento da doença alérgica pulmonar.

# **MATERIAL E MÉTODOS**



## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, C57BL/6, C57BL/10.A e C3H/HePas (“wild type” WT). Também foram utilizados camundongos deficiente (“knockout” KO) para citocinas IL-12/IFN- $\gamma$  e para as moléculas de sinalização TLR-4, MyD88, e TRIF. Os camundongos foram utilizados com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Biotério de camundongos Isogênicos e mantidos pelo Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### **3.2 Remoção de LPS da OVA comercial**

Para a purificação da OVA comercial e obtenção de OVA-livre de LPS foi utilizado o método descrito por Aida e Pabst (1990) <sup>[93]</sup> com algumas modificações, como descrito abaixo: Triton X-114 (1%) foi adicionado à solução de OVA e ao PBS (como controle). Os tubos foram incubados no gelo por pelo menos 30 minutos, com agitação em vortex em intervalos de 5 a 10 minutos. A seguir os tubos foram incubados a 37 °C por 5 minutos para permitir a formação de duas fases. A seguir, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se uma fase de detergente no fundo do tubo e a fase aquosa foi removida cuidadosamente para não misturar com a fase oleosa. Nós verificamos que após a repetição de dois ciclos de purificação a solução de OVA estava livre de LPS conforme revelado pelo ensaio do Limulus Amebocyte Lisate (LAL).

### 3.3 Determinação da concentração de LPS na solução de OVA comercial ou OVA após purificação

A determinação da contaminação de LPS na OVA foi feita pelo teste to Limulus Amebocyte Lysate (Kits comprados das empresas Biowhittaker ou Cambrex). Resumidamente, as amostras foram diluídas em água apirogênica e 50 µL da amostra, em duplicata, foram adicionadas à placa de 96 poços e incubadas em atmosfera úmida a 37 °C. A seguir, 50 µL do reagente LAL foram adicionados aos poços e as placas incubadas por 10 min. Após a incubação, 100 µL do substrato cromogênico foi adicionado aos poços e as placas incubadas por mais 6 min. A reação foi interrompida com 100 µL da solução de ácido acético e a absorbância determinada em 405-410 nm em leitor de placa. A concentração da endotoxina na amostra foi calculada considerando a linearidade dos valores de absorbância a 405-410 nm, na faixa de concentração 0,1 a 1 unidade endotóxica (EU/mL) (amostra padrão).

#### Teste da OVA após purificação

Os resultados da Tabela 1 mostram que a OVA comercial, na concentração de 1 mg/mL apresentou mais de 1.050 unidades endotóxicas (E.U). Após constatar a presença de LPS na OVA e com o intuito de eliminar a influência do LPS em nossos experimentos, resolvemos purificar a OVA utilizando o método descrito por Aida & Pabst (1990) <sup>[93]</sup>. Este método consiste em separar a proteína dos lipídeos por meio de um detergente (Triton X-114). A ausência de LPS pode ser notada após dois ciclos de purificação (Tabela 1).

**Tabela 1:** Teste LAL da OVA comercial ou OVA após purificação

Amostras	EU/mL
OVA comercial (1.000 µg/mL)	>1.050

---

OVA (1.000 µg/mL) após 2 ciclos de purificação	< 0.03
OVA (1.000 µg/mL) após 4 ciclos de purificação	< 0.03

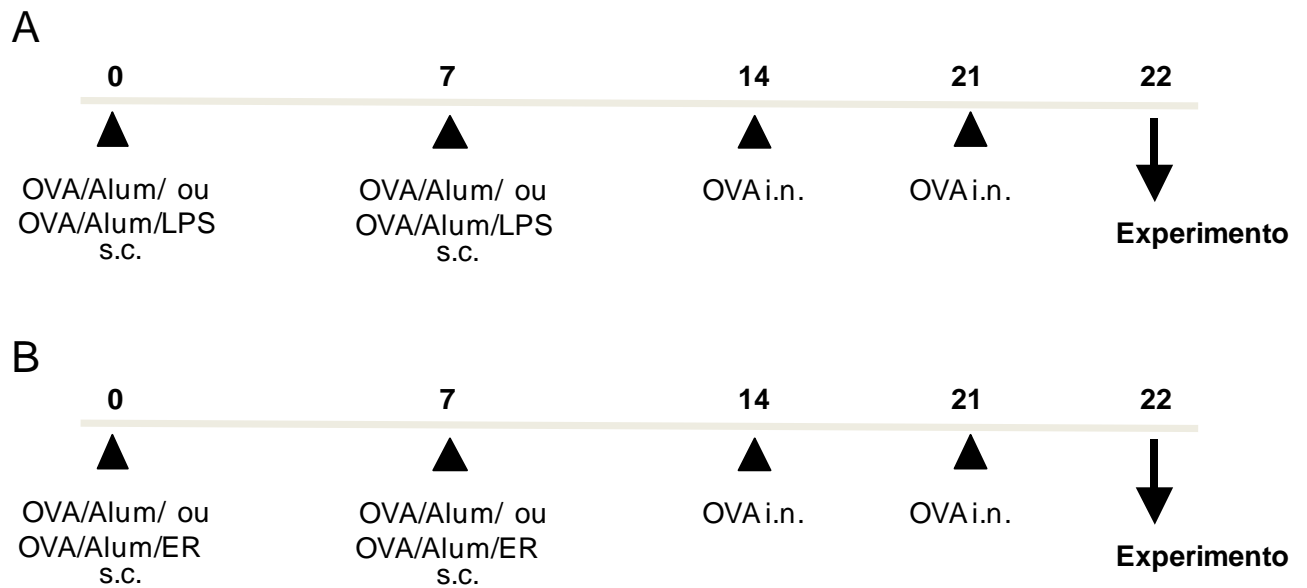
---

### 3.4 Imunização e desafio antigênico

Os animais foram imunizados pela via subcutânea (s.c.) nos dias 0 e 7 com 4 µg de OVA (Grau II - Sigma Co, St Louis, MO) diluída em PBS e adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de Alumínio (Alum) pela via s.c.. Nos experimentos em que se estudou o efeito do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), o LPS (*E. coli.*, Sigma-L4524) foi adicionado à OVA durante as imunizações nas concentrações de 0,001 µg, 0,01 µg, 0,1 µg, 1 µg ou 10 µg. Já nos experimentos em que se estudou o efeito do agonista sintético (ER-803022), foi adicionado à solução de OVA durante as imunizações 10 µg do ER.

Nos dias 14 e 21, os animais imunizados e os controles foram desafiados pela via i.n. com OVA 10 µg/animal como descrito a seguir: Os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina (Agener União) e rompum (Bayer) em PBS 200 µL/animal pela via intra-muscular. Com o auxílio de uma micropipeta Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), 50 µL da solução de OVA (10 µg OVA/50 µL de PBS estéril) foram gotejados nas narinas até sua aspiração completa. Os animais foram sacrificados 24 horas após o segundo desafio antigênico. Os protocolos abaixo sumarizam o esquema de imunização e desafio com OVA.

Protocolos A e B:



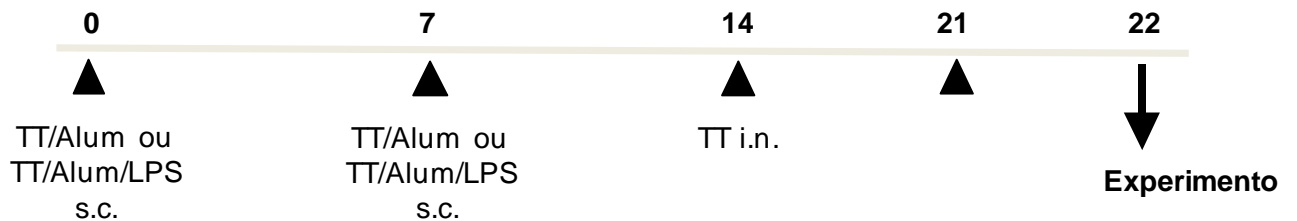
### Imunização com Toxóide tetânico

Nesse protocolo, incluímos a adição de toxóide tetânico (TT) ao Alum durante as imunizações. O TT foi fornecido pela Prof. Luciana Leite do Instituto Butantan-Biotecnologia.

Para tanto, os animais foram imunizados pela via subcutânea (s.c.) nos dias 0 e 7 com 0,25 µg de TT/1,6 mg de Alum. Nos experimentos em que se estudou o efeito do LPS, foi adicionado durante as imunizações 10 µg de LPS. Nos dias 14 e 21, os animais imunizados e os controles foram desafiados pela via i.n. com OVA 10 µg/animal como descrito a seguir

Nos dia 14 e 21, os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina (Agener União) e rompum (Bayer) em PBS 200 µL/animal pela via intra-muscular. Com o auxílio de uma micropipeta Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France), 50 µL da solução de TT (10 µg TT/50 µL de PBS estéril) foram gotejados nas narinas até sua aspiração completa.

Os animais foram sacrificados 24 horas após o segundo desafio antigênico. Os protocolo abaixo sumariza o esquema de imunização e desafio com TT:



### 3.5 Determinação da hiperreatividade brônquica

Os animais conscientes e livres, foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Electronics, USA) e os parâmetros respiratórios foram medidos por 5 minutos antes e após a nebulização, por 2.5 minutos de 3, 6, 12 e 25 mg de metacolina (Sigma, St Louis, USA). A resistência respiratória é expressa como aumento na pausa respiratória (Penh), calculada como:

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{Tr}-1) \times \text{Pef}/\text{Pif}$$

Onde, **Penh**; "enhanced pause"; **Te**: tempo expiratório (segundos); **Tr**: tempo de relaxamento (segundos); **Pef**: pico de fluxo expiratório e **Pif**: pico de fluxo inspiratório (segundo instruções do fabricante).

### 3.6 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Os experimentos foram realizados 24 horas após o segundo desafio. A traquéia dos animais foi exposta, canulada e com o uso de uma seringa, 0,5 mL de PBS gelado foi injetado

no espaço broncoalveolar. Após aspiração do LBA, mais 1 mL de PBS foi injetado e aspirado por no mínimo 3 vezes. As células obtidas foram colocadas em tubos de polipropileno de fundo cônico e mantidas em banho de gelo.

### **3.7 Contagem total e diferencial de células do LBA**

Para determinar o número total de células no LBA 9 partes da suspensão celular foram fixadas e coradas com 1 parte de uma solução de cristal violeta a 0,5 % em ácido acético a 30 % em tubo de ensaio. As células foram contadas por microscopia em câmara de Neubauer.

Para a contagem diferencial, 200  $\mu$ L do LBA contendo  $4 \times 10^5$  células foram colocados em câmaras e citocentrifugados (Citocentrífuga BIO research) a 600 rpm por 4 min. A seguir as lâminas foram coradas com o "Kit" Instant Prov (Newprov, PR, Brasil), segundo as instruções do fabricante. Macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos foram identificados segundo coloração e características morfológicas. Foram contadas 200 células por lâmina com auxílio de microscópio ótico.

### **3.8 Determinação de Citocinas no LBA**

A determinação de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  no LBA foram quantificadas pelo método de ELISA-sanduíche segundo as especificações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

O ensaio foi realizado da seguinte maneira:

As placas de 96 poços Maxi-Sorb (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura para IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  (11B11, TRFK5, JES052A5, 38213.11, e R4-6A2, respectivamente), numa concentração de 2  $\mu$ g/mL em tampão carbonato pH 9.6, 50  $\mu$ L/poço "overnight" a 4 °C. Após lavagens com PBS contendo 0,05 % de Tween

20 (PBS T20), o ensaio foi bloqueado com PBS contendo 4 % de leite desnatado, (100 µL/poço) por duas horas a 37 °C. Após a incubação as placas foram lavadas com PBS T20 e depois foram colocadas as amostras do LBA (200 µL/poço) e incubadas "overnight" a 4 °C.

Após novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foram incubados por duas horas à 37°C os anticorpos de detecção biotinizados, numa concentração de 1 µg/mL (BVD6-2462, TRFK-4, anticorpo policlonal de cabra anti-IL-13, e XMG1.2) diluídos em PBS contendo 2 % de leite desnatado, 100 µL/poço. Após lavagens com PBS-T20 foi adicionada a extrAvidin conjugada com peroxidase (Sigma, 1:600 para IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e 1:2000 para IFN-γ), diluída em PBS contendo 2 % de leite desnatado 100 µl/poço por uma hora a 37 °C.

Após incubação, e novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foi adicionado o substrato contendo: 2.4 mM de o- orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), 6.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio, Merck S.A.) 0.1 M, pH 5.0, 100 µl/poço. As placas então foram mantidas em ambiente escuro até a revelação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N e a absorbância determinada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiscan) com comprimento de onda 492 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em pg/mL ou ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes.

### **3.9 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA**

Isotipos IgG1 e IgG2a OVA-específicos foram quantificados pela técnica do ELISA-sanduíche com descrito por Russo e cols (1998) [94]. O ensaio para isotipos foi realizado da

seguinte maneira: As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 2 µg OVA em tampão carbonato pH 9.6 (100 µL/poço) “overnight” a 4 °C. Após lavagens com PBS-T20, o ensaio foi bloqueado com 0,25% de leite desnatado em PBS (100 µL/poço) por uma hora. Após lavagens, as amostras de soro foram adicionadas num volume de 100 µL/poço nas concentrações de 1:1000 para IgG1, e 1:100 para IgG2a diluídas em PBS, e incubadas por 1h à temperatura ambiente.

Após novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foram adicionados os anticorpos de cabra anti-IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) de camundongo diluídos em PBS, por uma hora à temperatura ambiente numa concentração de 100 ng/mL, 100 µL /poço. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-T20 e foi adicionado o anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (H+L, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) diluído em PBS, 100 µL/poço numa concentração de 100 ng/mL e incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Após as lavagens a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 µl/poço de uma solução de substrato contendo 2.4 mM de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), e 6.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato 0,1 M (ácido cítrico/citrato de sódio, Merck S.A), pH 5,0. As placas então foram mantidas em ambiente escuro até a revelação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N e, a absorbância determinada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiscan) com comprimento de onda 492 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em µg/mL baseando-se em diferentes concentrações de IgG1 e de IgG2a padrões.



### **3.10 Determinação da produção de IgE anti-OVA**

A quantificação da IgE anti-OVA foi feita pelo método de ELISA-sanduíche. Para a determinação da produção de IgE anti-OVA, foi realizada uma reação da seguinte forma:

As placas de 96 poços (Maxi-Sorb) foram sensibilizadas "overnight" com 2 µg/mL de anticorpos de cabra anti-IgE de camundongo (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), em tampão carbonato pH 9.6, 100 µL/poço. Após lavagens com PBS-T20, o ensaio foi bloqueado com 0,25% de leite desnatado em PBS (100 µL/poço) por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagens com PBS-T20, as amostras de soro numa diluição de 1:10 em PBS, foram adicionadas (100 µL/poço) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente.

Após ciclos de lavagens com PBS-T20, a OVA marcada com biotina e diluída em PBS, foi adicionada aos poços por uma hora à temperatura ambiente numa concentração de 10 µg/mL, 100 µL/poço,. As placas foram lavadas com PBS-T20 e adicionada a extrAvidin conjugada com Peroxidase (Sigma Co, St Louis, MO, 1:1000), 100 µL/poço, e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Após novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foi adicionada uma solução substrato contendo 2.4 mM de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), 6.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio Merck S.A.M), 0.1 M, pH 5.0. As placas foram então mantidas em ambiente escuro por 15 min à temperatura ambiente.

A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N e, a absorbância determinada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiscan) com comprimento de onda 492 nm. As absorbâncias foram convertidas em unidades arbitrárias (U.A.) baseada em uma curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de um

soro padrão do laboratório. Este soro padrão foi obtido de um "pool" de soros de animais BALB/c hiperimunes a OVA, ao qual foi atribuído o valor arbitrário de 10.000 unidades (U.A.).

### 3.11 Determinação da concentração total de IgE

Para a determinação da concentração total de IgE no soro dos animais, o ensaio foi realizado da seguinte forma:

Placas de 96 poços (MaxiSorb) foram sensibilizadas *overnight* com 2 µg/mL de anticorpo de rato anti-IgE de camundongo não marcado UNLB (Southern Biotechnology, Birmingham, AL), 100 µL/poço em tampão carbonato pH 9.6. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T20 e bloqueadas com 0,25 % de leite desnatado diluído em PBS (100µL/poço) por meia hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T20, as amostras de soro foram adicionadas numa diluição de 1:100 em PBS (100 µL/poço) e incubadas por duas horas à 37 °C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T20 e o anticorpo IgE de rato anti-camundongo marcado com biotina e diluído em PBS numa diluição de 1:1000, foi adicionado aos poços por uma hora 100 µL/poço, à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T20 e adicionada a avidina conjugada com Peroxidase (Sigma Co, St Louis, MO, 1:500) nas placas, diluída 1:1000, 100 µL/poço, e incubadas por quinze minutos, à 37 °C. Após seis lavagens com PBS-T20, foi adicionada uma solução substrato contendo 2,4 mM de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato (ácido cítrico/citrato de sódio Merck S.A.M), 0.1 M, pH 5,0., por quinze minutos à temperatura ambiente. A reação foi

bloqueada pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N e, a absorvância determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiscan) com filtro de 492 nm.

### **3.12 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Toxóide**

Isotipos IgG1 e IgG2a Toxóide - específico foram quantificados pela técnica do ELISA-sanduíche com descrito por Russo e cols (1998) <sup>[94]</sup>. O ensaio para isotipos foi realizado da seguinte maneira: As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1 µg Toxóide em tampão carbonato pH 9.6 (100 µL/poço) “overnight” a 4 °C. Após lavagens com PBS-T20, o ensaio foi bloqueado com 0,25 % de leite desnatado em PBS (100 µL/poço) por uma hora. Após lavagens, as amostras de soro foram adicionadas num volume de 100 µL/poço nas concentrações de 1:4000 para IgG1 e 1:50 para IgG2a diluídas em PBS, e incubadas por 1h à temperatura ambiente.

Após novos ciclos de lavagens com PBS-T20, foram adicionados os anticorpos de cabra anti-IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) de camundongo diluídos em PBS, por uma hora à temperatura ambiente numa concentração de 100 ng/mL, 100 µL /poço. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-T20 e foi adicionado o anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (H+L, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) diluído em PBS, 100 µL/poço numa concentração de 100 ng/mL e incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Após as lavagens a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100 µl/poço de uma solução de substrato contendo 2.4 mM de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO), e 6.6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato 0,1 M (ácido cítrico/citrato

de sódio, Merck S.A), pH 5,0. As placas então foram mantidas em ambiente escuro até a revelação por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 50  $\mu$ L/poço de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 4 N e a absorbância determinada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiscan) com comprimento de onda 492 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em  $\mu$ g/mL baseando-se em diferentes concentrações de IgG1 e de IgG2a padrões.

### **3.13 Reação de anafilaxia cutânea passiva (ACP)**

A reação de anafilaxia cutânea passiva (ACP), segundo Mota e Wong (1985) <sup>[95]</sup>, foi utilizada na detecção de anticorpos da classe IgE. Ratos previamente depilados no dorso foram injetados intradermicamente com 100  $\mu$ L de diluições seriadas de amostras de soro obtidas de camundongos imunes. Após um período de sensibilização de 18-24 horas, os animais foram desafiados por via intravenosa com 1,0 mL de uma solução contendo 500  $\mu$ g de OVA ou Toxóide e azul de Evans a 0,25 %. A leitura da reação foi feita 30 minutos após o desafio, sacrificando os animais e observando o diâmetro da reação na pele invertida.

A determinação do título de anticorpos IgG1 presentes nos soros dos camundongos foi feita segundo a técnica descrita por Ovary e cols (1958) <sup>[96]</sup>. Para isto, camundongos depilados 24 horas antes, foram injetados intradermicamente, no dorso com 50  $\mu$ L de diluições seriadas de plasmas dos camundongos previamente imunizados e inativados a 56 °C por 1 hora. Após 2 horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados intravenosamente com 0.5 mL de uma mistura de azul de Evans a 0,25% e 250  $\mu$ L de OVA (Sigma) ou Toxóide (Instituto Butantan). Passados 30 minutos do desafio, os camundongos foram sacrificados e a leitura feita na pele invertida dos animais. Os títulos de anticorpos IgE e IgG1 foram expressos como a

recíproca da maior diluição dos soros que resultou em uma reação positiva com mais de 5 mm de diâmetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e a variação dos títulos de ACP foi igual ou menor do que 2 vezes, sendo que somente diferenças acima destes valores foram consideradas significantes.

### **3.14 Determinação da produção de TNF *in vivo*, pelo ensaio de citotoxicidade sobre células L929**

A detecção da atividade de TNF no soro dos animais injetados com LPS ou ER803022, foi feita pelo ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre células L929 descrito por Flick e cols (1984)<sup>[97]</sup>. No período de 90 minutos após a injeção intravenosa (i.v) de 20 µg de LPS de *S. abortus* ou de ER-803022, os animais foram levemente anestesiados e o sangue dos animais coletado pelo plexo ocular. Para realização do ensaio, foram adicionados 100 µl/poço de meio 5% de soro contendo  $3.5 \times 10^4$  células L929, em placa plástica de 96 poços de fundo chato (Costar). A placa foi incubada por 20 horas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida, até a formação de monocamada celular homogênea. Após esse período, diluições seriadas das amostras de soro a serem tituladas foram adicionadas à placa em um volume de 100 µl, em meio contendo actinomicina D (concentração final por poço de 2 µg/mL, Sigma). As placas foram novamente incubadas e após 20h a porcentagem de lise determinada. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas apenas em meio com soro. Como controle positivo utilizamos diluições de TNF humano recombinante ou de soro de camundongo rico em TNF. Adicionamos as placas 10 µl/poço de uma solução de ácido acético à 30% e cristal violeta à 0.5%. Após 15 minutos as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. O cristal violeta remanescente nas células não lisadas foi solubilizado com 100 µL de metanol e a quantificação da absorbância feita no leitor de

ELISA (Titertek Multiscan), utilizando o comprimento de onda 620 nm. A porcentagem de lise foi calculada através da fórmula: **% de lise = [1-(Absorbância amostra/ Absorbância controle)] x 100**. O título de TNF em U/mL foi definido como a recíproca da diluição onde se observa 50 % de lise celular.

### **3.15 Determinação da produção de NO in vivo**

Para determinarmos a produção *in vivo* de NO, animais foram sacrificados 24 h após a administração i.v. de 20 µL de LPS ou de ER-803022, o sangue coletado e o soro congelado. Em seguida, as concentrações de nitrito foram determinadas pelo método de Griess. Primeiramente, o nitrato foi convertido em nitrito pela incubação das amostras com 50 µL/poço de uma solução de redução (500 µL de NADPH-β 5 mg/mL (Sigma), 500 µL de tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 µL H<sub>2</sub>O e 50 µL de nitrato redutase (Sigma) diluída em 450 µL H<sub>2</sub>O). As placas foram mantidas a 37 °C “overnight”. Em seguida as amostras foram incubadas v/v com o reagente de Griess (1 % de Sulfanilamida / 0.1 % de dihidroclorato de naftileno diamina / 2.5 % de ácido orto-fosfórico – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à temperatura ambiente por 10 minutos.

A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiscan), com filtro de 550 nm, contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess v/v. Os resultados foram expressos em micromoles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de nitrato de sódio em H<sub>2</sub>O (5, 10, 30 e 60 µM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

### **3.16 Índice de secreção de muco**

Para determinar o índice de secreção de muco pelas células do epitélio brônquico definimos um índice de secreção de muco. Para tanto, os cortes histológicos dos pulmões foram corados com reagente de Schiff (“Periodic Acid Schiff”, PAS), o qual cora

polissacarídeos e mucina básica. Em cada corte histológico foram analisados em média dez brônquios, escolhidos ao acaso. A área total dos brônquios selecionados não ultrapassou o valor de 0,15 mm<sup>2</sup> que foi determinada com auxílio do software Metamorph (Universal Imaging Corporation®, USA). O índice de muco foi calculado como a área do muco marcada pelo ácido periódico de Schiff dividida pela área total do brônquio.

### **3.17 Análise Estatística**

Os grupos experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), variando-se o número de critérios de acordo com o experimento considerado. Em seguida os grupos foram submetidos ao teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, sugerido pelo software estatístico GraphPad Prism 4.0, aceitando como diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**



## 4 RESULTADOS

### 4.1 O background genético, mas não a expressão de TLR4, determina a magnitude da inflamação alérgica pulmonar

Para avaliar a influência da expressão do TLR4 sobre o desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar induzida pela OVA, utilizamos camundongos nocautes ou com mutação na molécula de TLR4. Além do mais, utilizamos animais nocautes para MyD88, uma molécula adaptadora central que medeia a ativação do NF- $\kappa$ B e produção de citocinas tipo 1 após estimulação do TLR4<sup>[98]</sup>.

Os animais com deficiências na expressão de TLR4 foram C3H/HeJ e C57BL10/ScCr e para comparação foram utilizados animais com background genético semelhante (C3H/HePas e C57BL10/A) mas com expressão funcional do TLR4. Para o estudo da molécula MyD88, foram utilizados animais C57BL/6 selvagens ou nocautes para MyD88. Os animais foram imunizados pela via subcutânea com OVA/Alum nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os animais foram sacrificados 24h após o segundo desafio.

O primeiro parâmetro analisado foi em relação a hiperreatividade brônquica (HRB). Os nossos resultados mostram que animais das linhagens TLR4 deficientes ou TLR4 normais sensibilizados e desafiados com OVA não desenvolveram HRB (Fig. 3A, B, C e D). No entanto, animais da linhagem C57BL/6 selvagens desenvolveram HRB em relação ao grupo controle. (Fig. 3E). Os mesmos resultados foram obtidos na linhagem MyD88 (Fig. 1F). Esses resultados indicam que o background genético, mas não, a expressão das moléculas de sinalização TLR4 ou MyD88 não influenciam sobre o desenvolvimento de HRB.

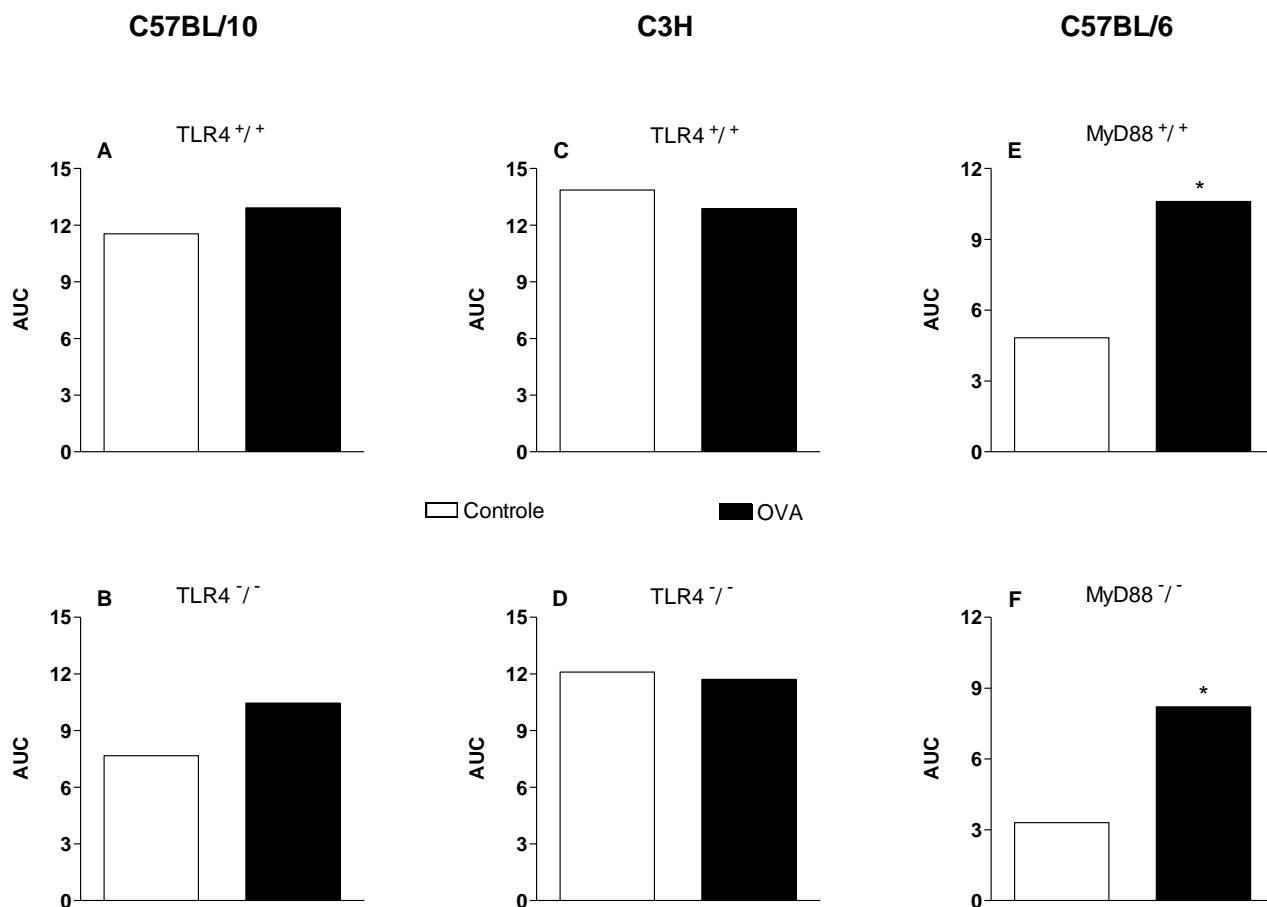


Figura 3: O background genético mas não a expressão de TLR4 determina a magnitude da inflamação pulmonar. Desenvolvimento da HRB em animais da linhagem C57BL/10 (A e B), C3H (C e D) e C57BL/6 (E e F). Os animais foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.

O próximo parâmetro avaliado foi em relação à inflamação pulmonar. Para tanto, quantificamos o número total de células e de eosinófilos presentes no lavado bronco alveolar (LBA). Em relação ao número total de células ou de eosinófilos, verificamos que em animais da linhagem B10 ou C3H, a expressão ou não da molécula de TLR4, não influenciou a reação inflamatória alérgica pulmonar (Fig. 4A e B). No entanto, fica claro que inflamação alérgica na linhagem B10A foi muito mais intensa que a obtida na linhagem C3H (Fig. 4A e B). Em

relação a animais B6, da mesma forma que a expressão de TLR4, a expressão da molécula MyD88, também não influenciou o influxo total ou diferencial de células presentes no LBA (Fig. 4C e D). Em conjunto, esses resultados mostram claramente que o background genético, mas, não a expressão das moléculas TLR4 ou MyD88 é que determinam a intensidade da inflamação alérgica pulmonar.

Como a expressão das moléculas TLR4 ou Myd88 não influenciou a resposta alérgica, nosso próximo passo, foi investigar se a ativação da molécula de TLR4 por LPS, (agonista natural) ou por ER-803022 (agonista sintético) poderia influenciar o desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar.

#### **4.2 LPS durante a sensibilização com OVA/Alum suprime as respostas alérgicas pulmonares de maneira dose-dependente**

Primeiramente, para analisar o efeito da adição de diferentes doses de LPS durante a sensibilização com OVA/Alum sobre o desenvolvimento de asma experimental, os animais foram imunizados com OVA/Alum contendo concentrações de LPS variando entre 0,001 e 10  $\mu\text{g}$  nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu\text{g}$  de OVA nos dias 14 e 21. Após 24 h os animais foram sacrificados e foi feita a contagem diferencial das células do LBA (Fig. 5A).

Em relação ao número total de células no LBA, os resultados mostraram que os animais imunizados com OVA/Alum apresentaram um aumento significativo no influxo celular quando comparado com os animais do grupo controle (Fig. 5A). Do mesmo modo, os animais que receberam 0,001  $\mu\text{g}$  de LPS durante as imunizações, também apresentaram um influxo de células inflamatórias similar aos animais do grupo OVA e 10 vezes maior em relação ao grupo controle (Fig. 5A). Entretanto, aumentando a dose de LPS (0,01-10  $\mu\text{g}$ ), todos os grupos imunizados apresentaram uma significativa diminuição no influxo de células total para o LBA

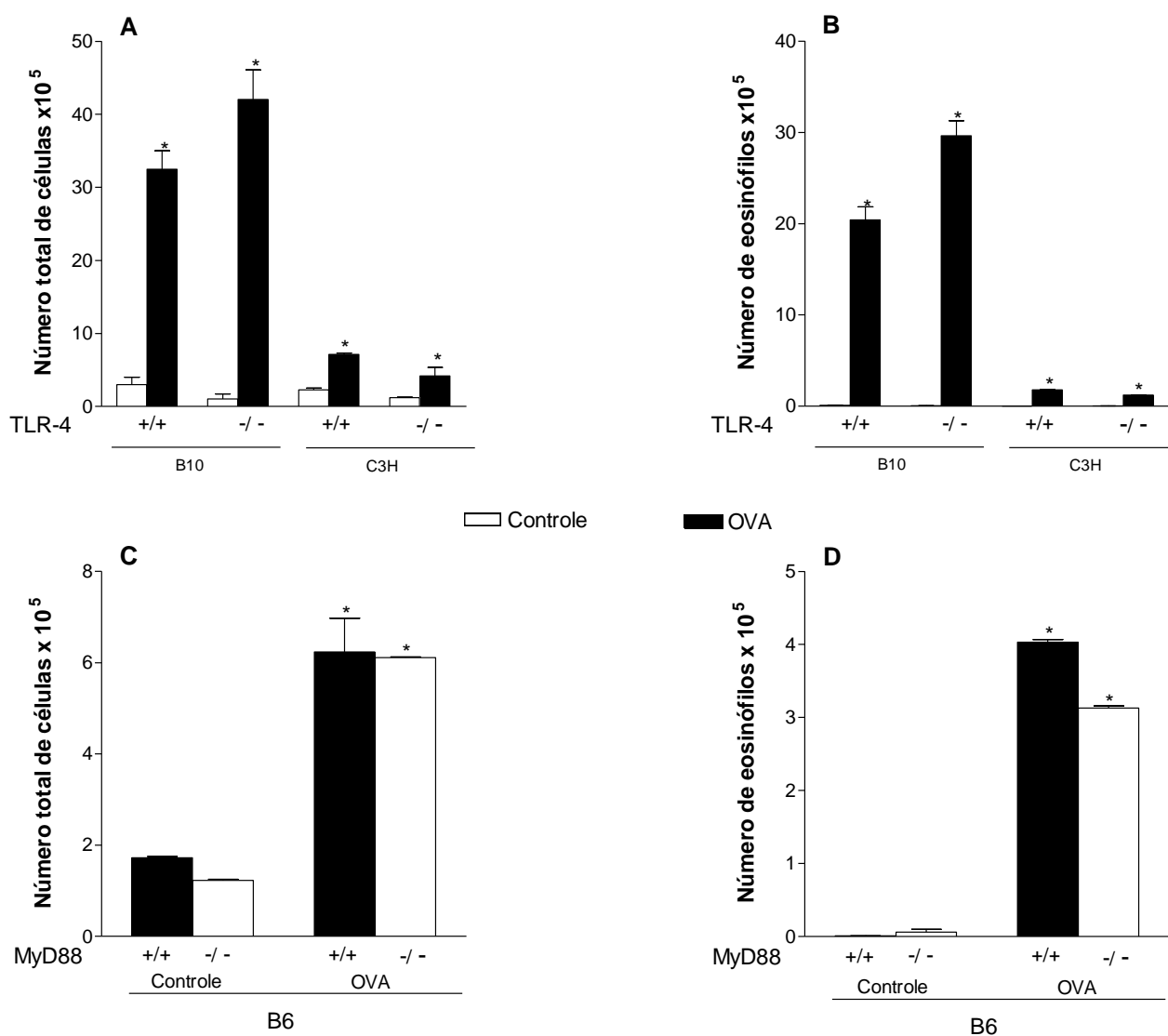


Figura 4: O background genético mas não a expressão de TLR4 determina a magnitude da inflamação pulmonar. Número total de células (A e C) Número de eosinófilos (B e D). Os animais foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.

(Fig. 5A). Nos próximos experimentos, selecionamos a maior e a menor dose de LPS que inibia a migração de células para as vias aéreas (0,01  $\mu$ g e 10  $\mu$ g) para caracterizar as células do LBA, o desenvolvimento de HRB e produção de citocinas. A figura 5B, mostra que a

adição de 0,01  $\mu$ g ou 10  $\mu$ g de LPS durante a imunização com OVA/Alum inibiu o desenvolvimento da inflamação eosinofílica pulmonar. Vale ressaltar que não detectamos o aumento de nenhum outro tipo celular analisado nos grupos que receberam LPS. Em relação ao desenvolvimento de HRB, os animais imunizados com OVA/Alum desenvolveram hiperreatividade ao estímulo de metacolina de maneira dose dependente quando comparado com o grupo controle (Fig. 5C). Já os animais que receberam LPS durante a imunização com OVA/Alum não desenvolveram HRB em resposta a metacolina, e os valores de Penh foram semelhantes ao grupo controle (Fig. 5C). Em seguida, determinamos no LBA, os níveis de citocinas associadas às respostas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) ou Th2 (IL-5 e IL-13). A IL-5 e IL-13 foram determinadas devido ao seu envolvimento na mobilização de eosinófilos e produção de muco ou IgE, respectivamente, enquanto que o IFN- $\gamma$  é a citocina característica das respostas Th1. Como mostra a figura 5D, uma significativa produção de IL-5 e IL-13 foram detectadas no grupo OVA quando comparado com o grupo controle. Os animais que receberam LPS durante a imunização com OVA/Alum apresentaram uma significativa redução nos níveis das citocinas do tipo 2 quando comparado com o grupo OVA (Fig. 5D). A produção de IFN- $\gamma$  em todos os grupos estudados, incluindo os animais que receberam a dose alta de LPS foi semelhante a do grupo controle (Fig. 5D). A adição de LPS durante as sensibilizações, também inibiu de forma dose-dependente a hipersecreção de muco (Fig. 5E) e a inflamação peribroncovascular no pulmão (Fig. 5F). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a administração de LPS durante a sensibilização com OVA/Alum inibe as respostas alérgicas pulmonares Th2 sem induzir o desvio imunológico para o padrão Th1.

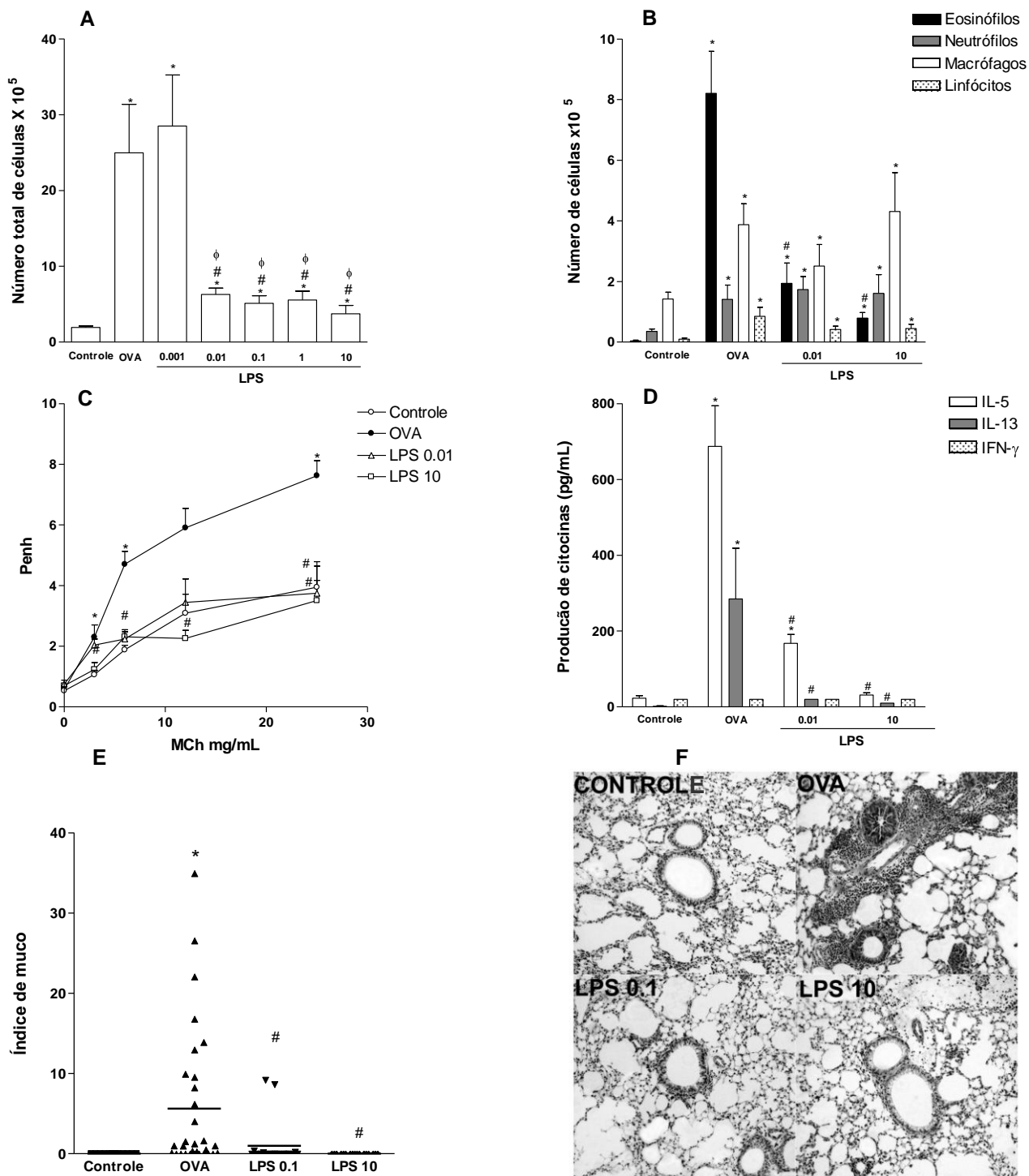


Figura 5: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Total de células (A) contagem diferencial (B) HRB (C) produção de citocinas (D) índice de muco (E) e histologia (F). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 0,001, 0,01, 0,1, 0,1, 1 ou 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA, φ P<0,05 em relação ao grupo LPS 0,001.

### **4.3 LPS durante a sensibilização com OVA/Alum suprime a produção de anticorpos anafiláticos e aumenta os níveis de IgG2a OVA-específica**

Como não detectamos uma resposta inflamatória típica do tipo Th1 (infiltrado de neutrófilos e células mononucleares no LBA, resolvemos analisar o efeito do LPS na produção de anticorpos associados com os padrões Th2 e Th1. Para isso, medimos no soro os níveis dos anticorpos IgE e IgG1 anafilática como parâmetro de resposta Th2 e a produção de IgG2a como resposta do tipo Th1. Como esperado, os animais do grupo OVA mostraram um aumento significativo na produção de IgE total e dos anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 quando comparado com os animais do grupo controle (Fig. 6A-C). Além disso, detectamos no grupo OVA, um discreto porém significativo aumento na produção de IgG2a, anticorpo esse associado à resposta Th1, quando comparado com os animais do grupo controle (Fig. 6D). Enquanto as doses de 0,01 µg ou 10 µg de LPS foram capazes de inibir a produção de IgG1 anafilática (Fig. 6C), a produção de IgE total e IgE OVA-específico somente foi inibida quando utilizamos a dose de 10 µg de LPS (Fig. 6A e B). Por outro lado, a sensibilização com LPS aumentou de maneira dose-dependente a produção de IgG2a OVA-específica (Fig. 6D). Esses resultados indicam que o LPS inibe a produção de anticorpos associados às respostas do tipo Th2 e ao mesmo tempo aumenta a resposta humoral dependente de células Th1.

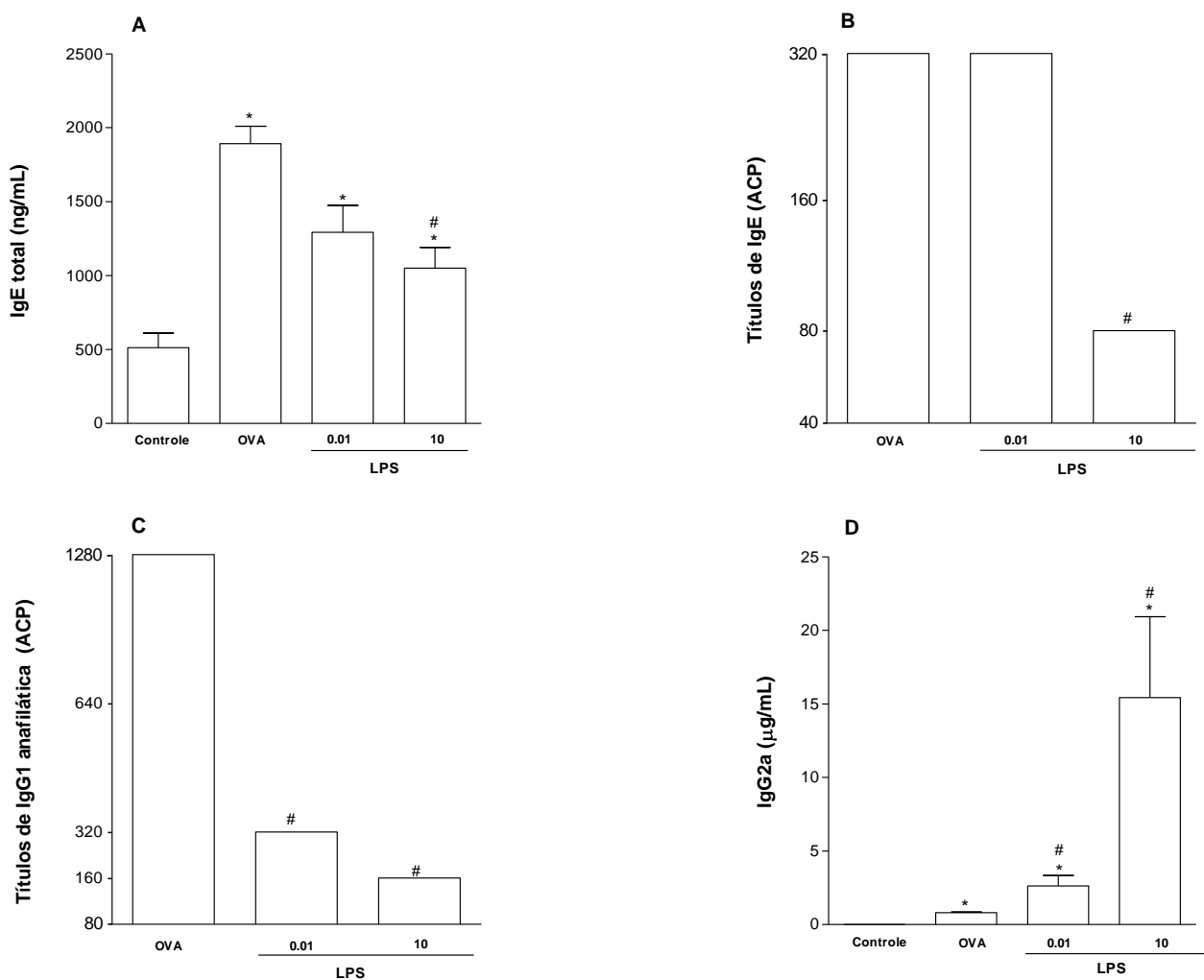


Figura 6: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total (A) IgE por ACP (B) IgG1 anafilática (C) e IgG2a (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 0,01 ou 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (APC) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.



#### **4.4 Efeitos do LPS administrado na primeira sensibilização com OVA/Alum sobre o desenvolvimento da hiperreatividade brônquica, inflamação pulmonar e produção de citocinas**

Após verificarmos que a administração de 10 µg de LPS durante as duas sensibilizações foi capaz de inibir todas as respostas alérgicas pulmonares induzidas após desafio i.n. com OVA. Nosso próximo passo foi verificar se a administração do LPS apenas na primeira imunização com OVA/Alum seria suficiente em inibir as respostas alérgicas pulmonares.

O primeiro parâmetro analisado foi o desenvolvimento da HRB. Os animais que receberam LPS apenas uma vez durante a imunização com OVA/Alum, apresentaram valores de Penh semelhantes aos animais do grupo OVA, porém maiores em relação ao grupo controle (Fig. 7A). Já os animais que receberam LPS nas duas imunizações com OVA/Alum, apresentaram uma inibição significativa em relação ao grupo alérgico, sendo os valores de Penh semelhantes aos do grupo controle (Fig. 7A).

O próximo parâmetro analisado foi à inflamação alérgica pulmonar, como esperado, os animais do grupo OVA/Alum, apresentaram um aumento significativo no número total de células no LBA em relação ao grupo controle (Fig. 7B). O mesmo foi verificado em relação ao influxo de eosinófilos (Fig. 7B). Já, os animais que receberam LPS na primeira imunização, assim como os animais que receberam LPS nas duas imunizações, apresentaram uma inibição semelhante no número de células totais e eosinófilos quando comparada ao grupo OVA (Fig. 7B).

Esses resultados mostram que a administração de LPS apenas na primeira imunização com OVA/Alum, não foi suficiente em inibir o desenvolvimento da HRB, porém foi eficaz em inibir a inflamação eosinofílica pulmonar induzida pela OVA.

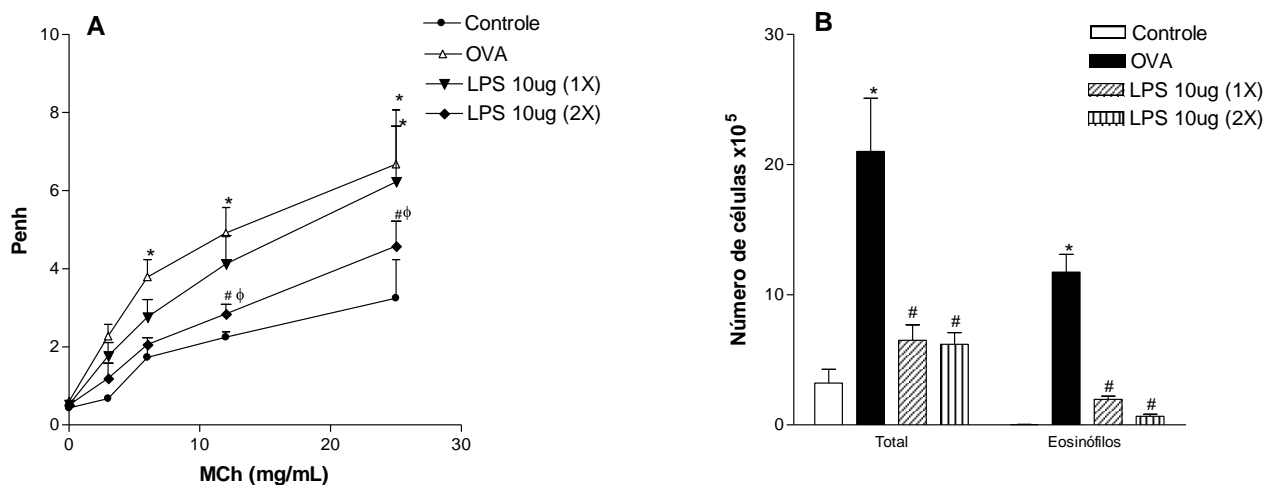


Figura 7: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. HRB (A) contagem total e diferencial das células (B) Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS no dia 0 ou nos dias 0 e 7, em seguida os animais foram desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA,  $\emptyset$  P< 0,05 em relação ao grupo LPS 1X.

Analizamos no LBA o perfil de citocinas do tipo Th1 ou Th2. Os resultados mostram que em relação as citocinas do tipo Th2, os animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo na produção de IL-5 e IL-10 em comparação aos animais do grupo controle. (Fig. 8A e B). Os animais que receberam LPS apenas na primeira imunização, tiveram uma inibição significativa na produção de IL-5 e IL-10 (Fig. 8A e B), assim como os animais que receberam LPS nas duas imunizações (Fig. 8A e B).

Em relação à produção da citocina de perfil Th1. A detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  no LBA dos grupos imunizados, apresentou valores iguais ou menores que os detectados em animais controles (Fig. 8C).

Nossos resultados mostram que o LPS administrado apenas na primeira imunização é capaz de induzir a inibição das citocinas do tipo 2. No entanto, o LPS não induziu o aumento de IFN- $\gamma$  no LBA.

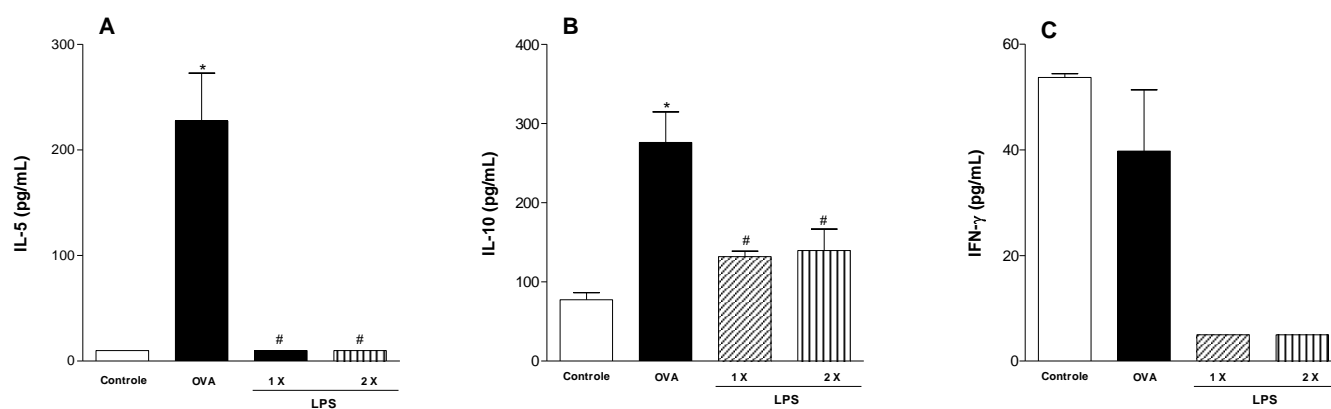


Figura 8: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. Produção de citocinas no LBA, IL-5 (A) IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (C). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 ou nos dias 0 e 7, em seguida os animais foram desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. A produção de citocinas no LBA foi determinada pelo método de ELISA. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.

#### **4.5 Efeitos do LPS administrado na primeira sensibilização com OVA/Alum sobre a produção de anticorpos**

Após avaliarmos a HRB, a inflamação pulmonar e a produção de citocinas, nosso próximo passo foi analisar a produção de anticorpos anti-OVA. Além disso, resolvemos analisar o efeito do LPS sobre a produção de anticorpos associados com os padrões de respostas Th2 e Th1. Nossos resultados mostram que a adição de LPS apenas na primeira imunização com OVA/Alum, foi eficaz em inibir a produção de IgE total e IgE por ACP quando comparada ao grupo OVA (Fig. 9A e C). Do mesmo modo, os animais que receberam LPS durante as duas imunizações apresentaram inibição da produção de IgE total e IgE por ACP (Fig. 9A e C).

Em relação à produção de IgG2a, um anticorpo relacionado com a resposta do tipo 1, nossos resultados mostraram que os animais do grupo OVA apresentaram um discreto aumento na produção de IgG2a em relação ao grupo controle (Fig. 9B). Os animais do grupo que recebeu LPS apenas uma vez e o grupo que recebeu duas vezes apresentaram níveis mais altos de IgG2a quando comparado ao grupo OVA (Fig. 9B). A produção de IgG1 foi semelhante em todos os grupos imunizados, porém, foram maiores em relação ao grupo controle (Fig. 9D).

Em conjunto, nossos resultados mostram que a administração de LPS apenas na primeira imunização com OVA/Alum, é capaz de inibir a maioria dos parâmetros alérgicos analisados.

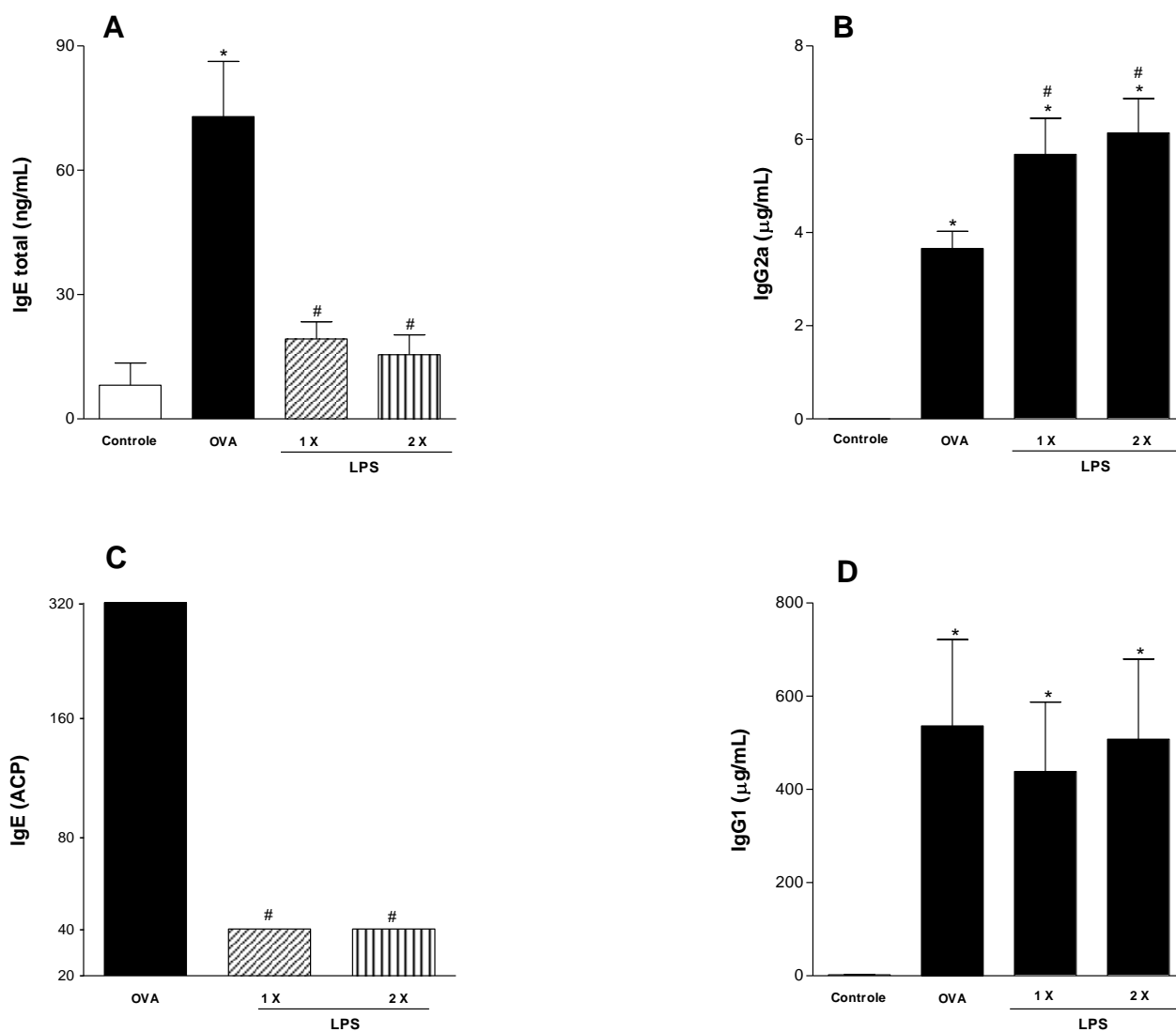


Figura 9: Efeitos do LPS na primeira sensibilização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total (A) IgG2a (B) IgE por ACP (C) e IgG1 (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 ou nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (ACP) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.

#### **4.6 As moléculas TLR4 e MyD88, mas não TRIF são cruciais para inibição das respostas alérgicas pulmonares induzidas pelo LPS**

Para determinar a especificidade e as vias moleculares utilizadas na sinalização do TLR4 responsáveis pela inibição das respostas alérgicas pulmonares, foram feitos experimentos em animais geneticamente deficientes. Para tanto, utilizamos animais da linhagem BALB/c deficientes das moléculas TLR4 e MyD88 e camundongos C57BL/6 deficiente da molécula de sinalização intracelular TRIF, que contém o domínio intracelular Toll/IL-1R responsável por induzir a produção de IFN- $\beta$ . Nossos resultados mostram que o TLR4 é essencial para inibição da resposta alérgica causada pelo LPS, pois a administração de LPS durante as imunizações com OVA/Alum em animais deficientes de TLR4, não foi capaz de suprimir o influxo de células total e eosinófilos (Fig. 10A). Do mesmo modo, nossos resultados mostram que a molécula MyD88 também é essencial para a inibição da inflamação alérgica pulmonar causada pelo LPS, pois a resposta alérgica não foi inibida em animais deficiente na molécula MyD88 (Fig. 10B). No entanto, a molécula TRIF que é outra via de sinalização do TLR4 e que induz a produção de IFN- $\beta$  e óxido nítrico, ambos produtos que podem potencialmente inibir a asma <sup>[75]</sup>, parece ser dispensável, pois em animais deficientes de TRIF, ocorreu a inibição da inflamação pulmonar (Fig. 10C). Em conclusão, a inibição da inflamação alérgica pulmonar induzida por LPS é dependente de TLR4 e MyD88, mas não TRIF.

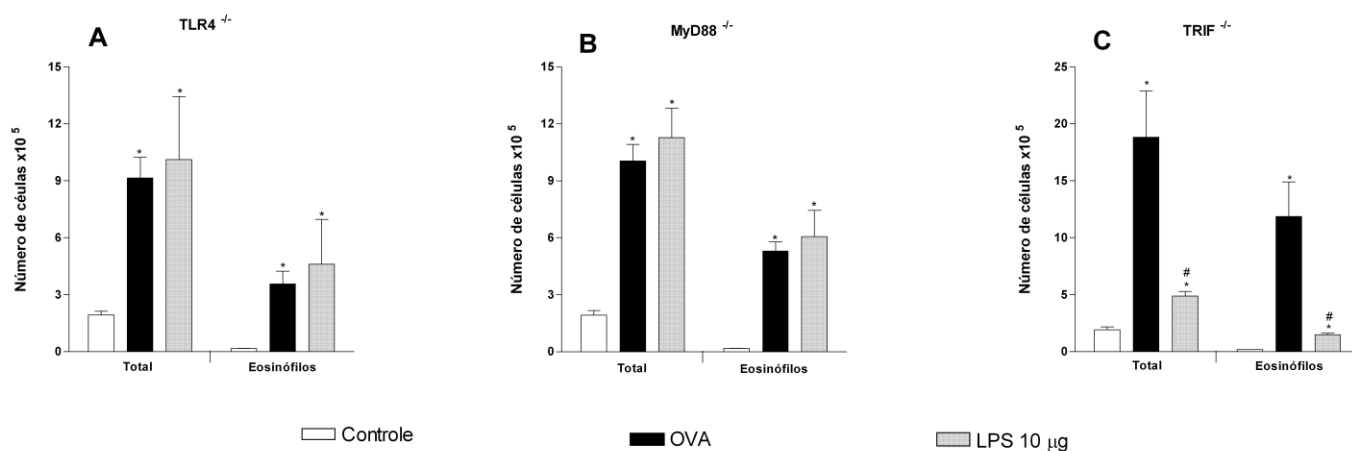


Figura 10: Efeitos do LPS na imunização com OVA em animais deficientes das moléculas TLR4, MyD88 e TRIF. Número de células (total e eosinófilos): TLR4<sup>-/-</sup> (A) MyD88<sup>-/-</sup> (B) TRIF<sup>-/-</sup> (C). Os animais foram imunizados com 4 µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Os resultados são média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.

O próximo parâmetro analisado foi em relação à produção de anticorpos. Medimos no soro os níveis de IgE total como parâmetro de resposta Th2. Como esperado, os animais TLR4, MyD88 e TRIF imunizados com OVA/Alum mostraram um aumento significativo na produção de IgE total quando comparado com os animais do grupo controle (Fig. 11A-C). Por outro lado, a sensibilização com LPS não alterou a produção de IgE total nos animais TLR4 e MyD88 deficientes em relação ao grupo OVA. (Fig. 11A e B). Entretanto, inibiu a produção de IgE total apenas nos animais TRIF deficientes (Fig. 11C). Esses resultados indicam que as moléculas TLR4 e MyD88, mas não TRIF são cruciais para que o LPS exerça seus efeitos anti-alérgicos.

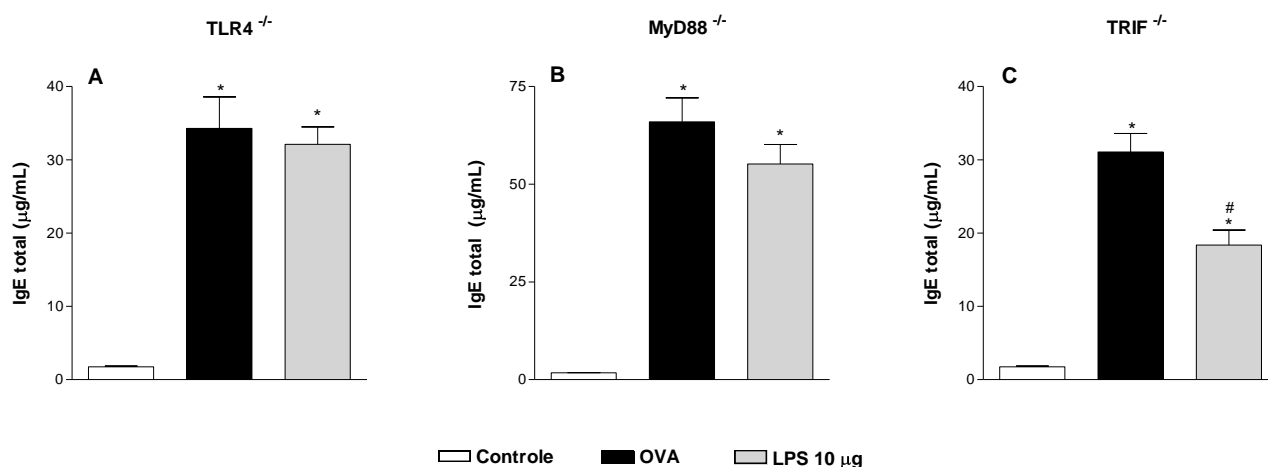


Figura 11: Efeitos do LPS na imunização com OVA. Produção de anticorpos: IgE total, TLR4 (A) MyD88 (B) TRIF (C). Os animais foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24h após o segundo desafio. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expresso por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA.

#### 4.7 O eixo IL-12/IFN- $\gamma$ é responsável pela inibição das respostas alérgicas pulmonares induzidas pelo LPS

Os resultados anteriores mostraram que as moléculas TLR4 e MyD88, mas não TRIF são cruciais para que o LPS exerça seus efeitos antialérgicos (Figuras 10 e 11). Um outro ponto relevante para entender o efeito anti-alérgico do LPS é saber se as citocinas do tipo 1 (IL-12 ou IFN- $\gamma$ ) participam deste processo. Em minha tese de mestrado, verificamos que o eixo IL-12/IFN- $\gamma$  é essencial para o LPS exercer seus efeitos anti-alérgicos, pois em animais duplamente nocauteados para IL-12 e INF- $\gamma$ , a reação alérgica pulmonar e a produção de anticorpos IgE anafiláticos não foram inibidas pelo LPS (Fig. 12 A e B).



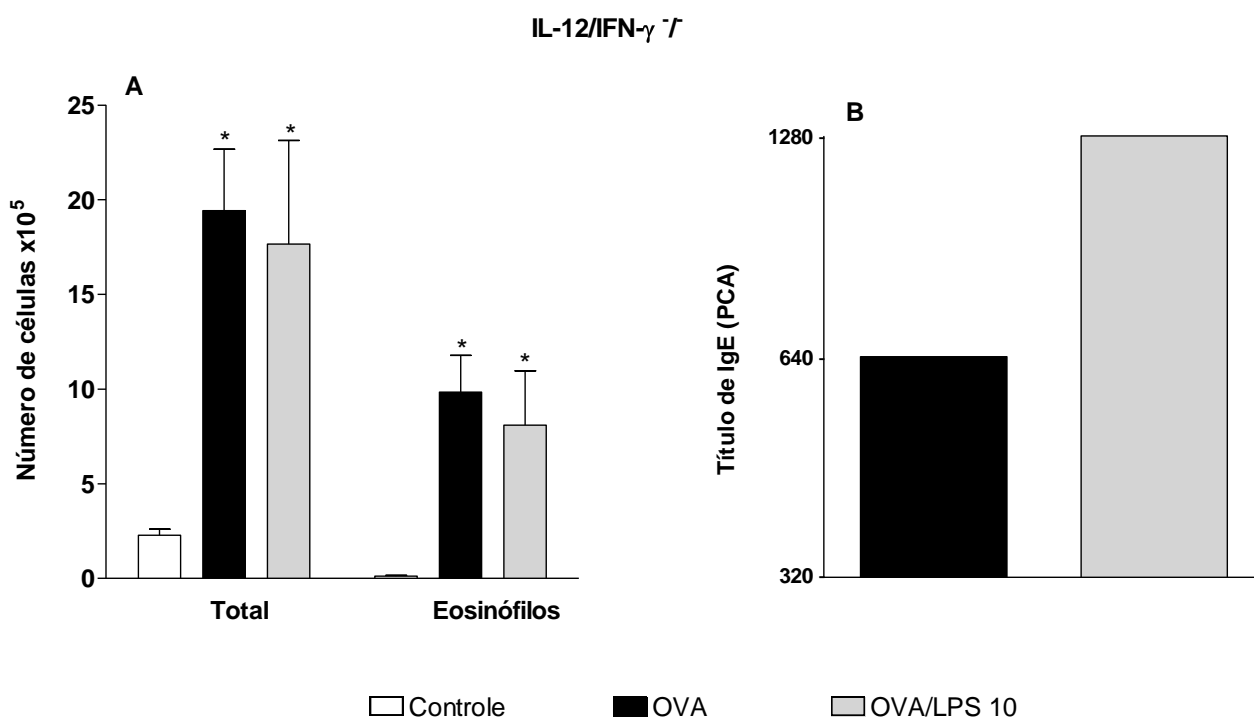


Figura 12: Efeitos do LPS na imunização com OVA em animais deficientes das moléculas IL-12/IFN- $\gamma$ . Número de células (A) produção de anticorpos IgE por ACP (B). Animais da linhagem C57BL/6 foram imunizados com 4 $\mu$ g de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10  $\mu$ g de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. A determinação dos títulos de anticorpos por anafilaxia cutânea passiva (ACP) foi feita pela recíproca da maior diluição de uma mistura de soro que induziu uma reação > 5mm de diâmetro. Os resultados foram expressos por diferenças significativas. Um experimento representativo de 1 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle.

#### 4.8 Comparação da bioatividade local e sistêmica induzida pelo LPS versus ER-803022

Como a estrutura do lipídeo A é responsável pelas atividades biológicas do LPS incluindo a toxicidade, resolvemos analisar em nosso modelo, o efeito de um produto sintético análogo ao lipídeo A (ER-803022) sobre o desenvolvimento de asma.

Primeiramente, decidimos testar se durante a preparação do produto sintético não houve contaminação com LPS. Para tanto, fizemos o ensaio do Limulus com o produto e verificamos que o ER na concentração de 2mg/mL continha menos de 0,1 E.U., ou seja, foi negativo.

Após o teste, fizemos alguns experimentos preliminares comparando as atividades biológicas do ER com as do LPS na dose de 10 µg. Como atividade local estudamos o efeito do LPS ou ER na inflamação pulmonar. Assim, administramos 10 µg de LPS ou ER pela via intranasal e determinamos a broncoconstrição aguda e o influxo de neutrófilos como descrito anteriormente por Noulin e cols (2005) em animais C57BL/6 <sup>[99]</sup>. Nossos resultados mostram que a administração intranasal de LPS ou ER induziu uma broncoconstrição que foi semelhante no intervalo de 90 a 120 minutos (Fig. 13A). No entanto, 120 minutos após a administração do agonista, observa-se uma clara diferença entre os animais que receberam LPS ou ER (Fig. 13A). Nos animais que receberam LPS a intensidade da broncoconstrição continuou a aumentar e chegou a um pico em torno de 210 minutos enquanto que nos animais que receberam ER, após 120 min, a broncoconstrição começou a diminuir de intensidade (Fig. 13A). Nossos resultados com camundongos deficientes na molécula MyD88 confirmam e estendem os resultados obtidos anteriormente por Noulin e cols. <sup>[99]</sup> ou seja, animais MyD88<sup>-/-</sup> não responderam ao LPS nem ao ER (Fig. 13A e B). Em relação à contagem do número de neutrófilos presentes no LBA, nossos resultados mostraram que o LPS é mais potente que ER em induzir inflamação pulmonar neutrofílica e que a molécula MyD88 medeia esta atividade (Fig. 13B). Para investigar os efeitos sistêmicos dos agonistas de TLR4 os animais receberam 10 µg de LPS ou ER pela via intravenosa (i.v) e dosamos os níveis de nitrato decorrente da produção de óxido nítrico (NO) e TNF-α presentes no soro. Estes dois produtos foram escolhidos pois estão associados com toxicidade induzida pelo LPS. Como esperado, a administração i.v de LPS resultou na produção

de altos níveis de NO e TNF- $\alpha$  quando comparados com os níveis encontrados no grupo controle (Fig. 13C e D). Para nossa surpresa, a administração do produto sintético, ER, não foi capaz de induzir a produção de NO ou TNF- $\alpha$  (Fig. 13C e D). Mais ainda, os animais que receberam LPS i.v., apresentaram discretos sinais de toxicidade, tais como, diarreia, pêlos ouriçados e letargia enquanto que os animais que receberam ER não apresentaram nenhum sintoma de toxicidade. Apesar da dose de LPS ou ER utilizada serem a mesma, ou seja 10  $\mu$ g, a concentração molar do ER é 250 vezes maior do que a do LPS, mostrando claramente que ER é menos tóxico que LPS. Em conjunto, esses resultados mostram que em relação a bioatividade local, LPS induz uma broncoconstrição e influxo de neutrófilos mais intensos que ER e que sistemicamente ER é menos tóxico que LPS.

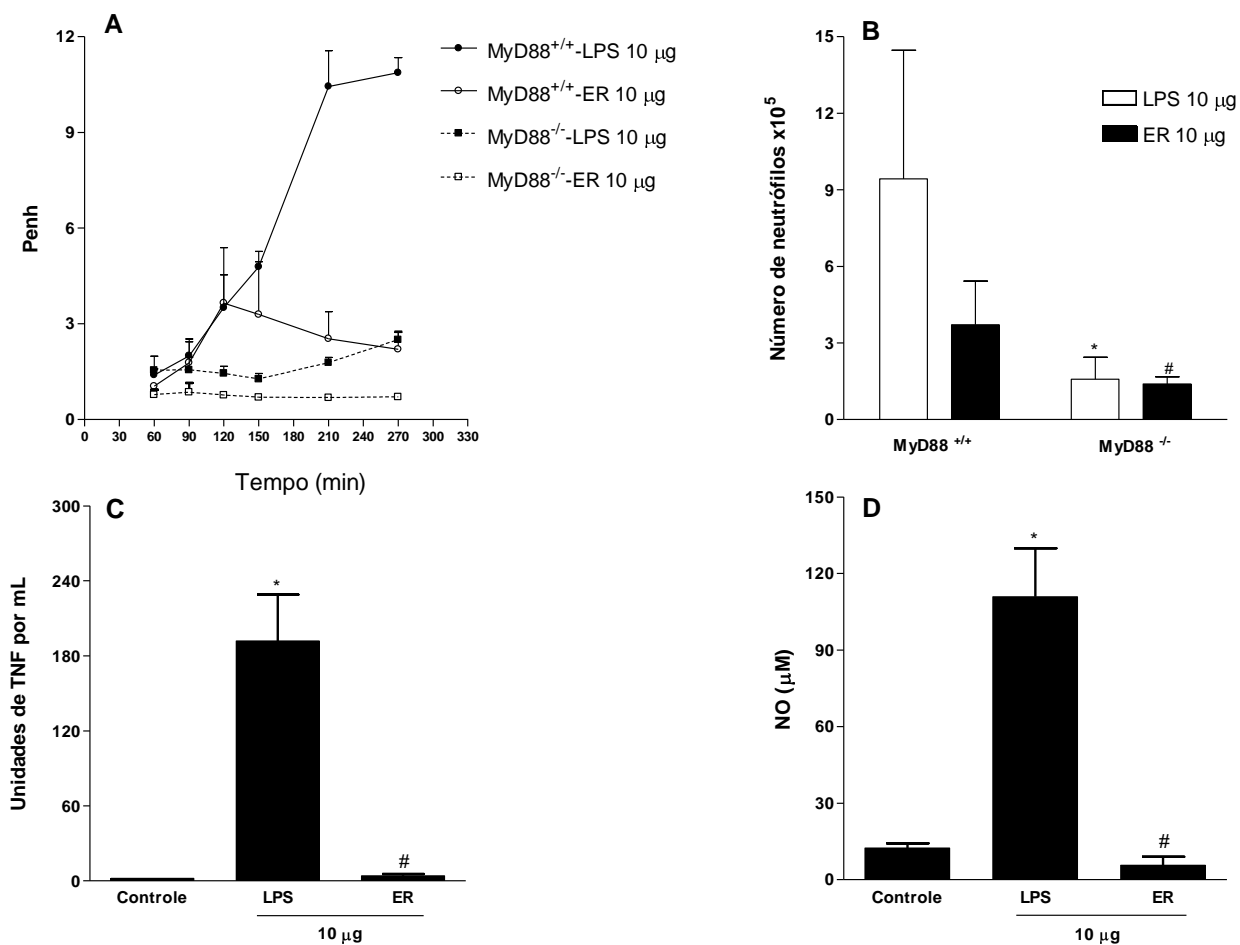


Figura 13: Comparação da biodiversidade local e sistêmica do LPS ou ER. Reatividade brônquica (A), número total de neutrófilos (B), produção de TNF- $\alpha$  (C) e produção de NO (D): Para a determinação da reatividade brônquica os animais receberam 10  $\mu$ g de LPS ou ER e o Penh foi determinado no BUXCO. 24h após, o LBA foi retirado para contagem de células e neutrófilos. No experimento em que se determinou à produção de TNF e NO, os animais receberam 10  $\mu$ g LPS ou ER pela via i.v. e sangrados após 90 min para quantificação de TNF- $\alpha$  (C) e após 24 h para a dosagem de NO (D) no soro. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo LPS.

#### **4.9 LPS ou ER durante a sensibilização com OVA/Alum suprimem as respostas alérgicas pulmonares**

Como descrito em experimentos anteriores, a bioatividade induzida pelo ER, incluindo a toxicidade, foi menos robusta em comparação com o LPS, portanto o próximo passo foi testar o quanto à administração de 10 µg de ER durante a sensibilização com OVA/Alum poderia afetar o desenvolvimento de asma experimental. Para efeito comparativo colocamos em nossos experimentos um grupo de animais que recebeu 10 µg de LPS. Primeiramente, comparamos o desenvolvimento da hiperreatividade brônquica, inflamação pulmonar e a produção de citocinas do tipo 2 no LBA dos animais que receberam LPS ou ER com o grupo OVA. Os animais que receberam LPS ou ER durante a sensibilização com OVA/Alum não desenvolveram HRB como mostra os valores de Penh (Fig. 14A), pois esses foram semelhantes aos do grupo controle e significativamente diferentes do grupo OVA (Fig. 14A). Como mostra a figura 14 B, LPS ou ER suprimiu de maneira semelhante o desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar como mostrado pela contagem do número total de células e eosinófilos. A dosagem de IL-5 ou IL-13 no LBA mostrou que, em relação ao grupo OVA, tanto LPS como ER foram eficientes em reduzir a produção destas citocinas (Fig. 14C). Em seguida, medimos no soro desses animais os níveis de IgE, IgG2a e IgG1 OVA-específicos. Nossos resultados mostraram que LPS e ER foram capazes de suprimir a produção de IgE e novamente a atividade supressiva foi semelhante para ambos os agonistas (Fig. 14D). Em relação à produção de IgG2a, os grupos que receberam LPS ou ER durante a sensibilização com OVA/Alum apresentaram aumento significativo nos níveis desse anticorpo em comparação com o grupo OVA (Fig. 14E). No entanto, os níveis de IgG2a OVA-específica foram estatisticamente maiores no grupo LPS que no grupo ER (Fig.

14E). Finalmente, a produção de IgG1 foi semelhante em todos os grupos imunizados, apresentando diferença estatística apenas em relação ao grupo controle (Fig. 14F). Concluindo, nossos experimentos indicam que ER é tão eficiente quanto LPS em inibir as respostas associadas com o padrão Th2, mas que é menos eficiente que LPS em estimular a resposta imune humoral do tipo Th1.

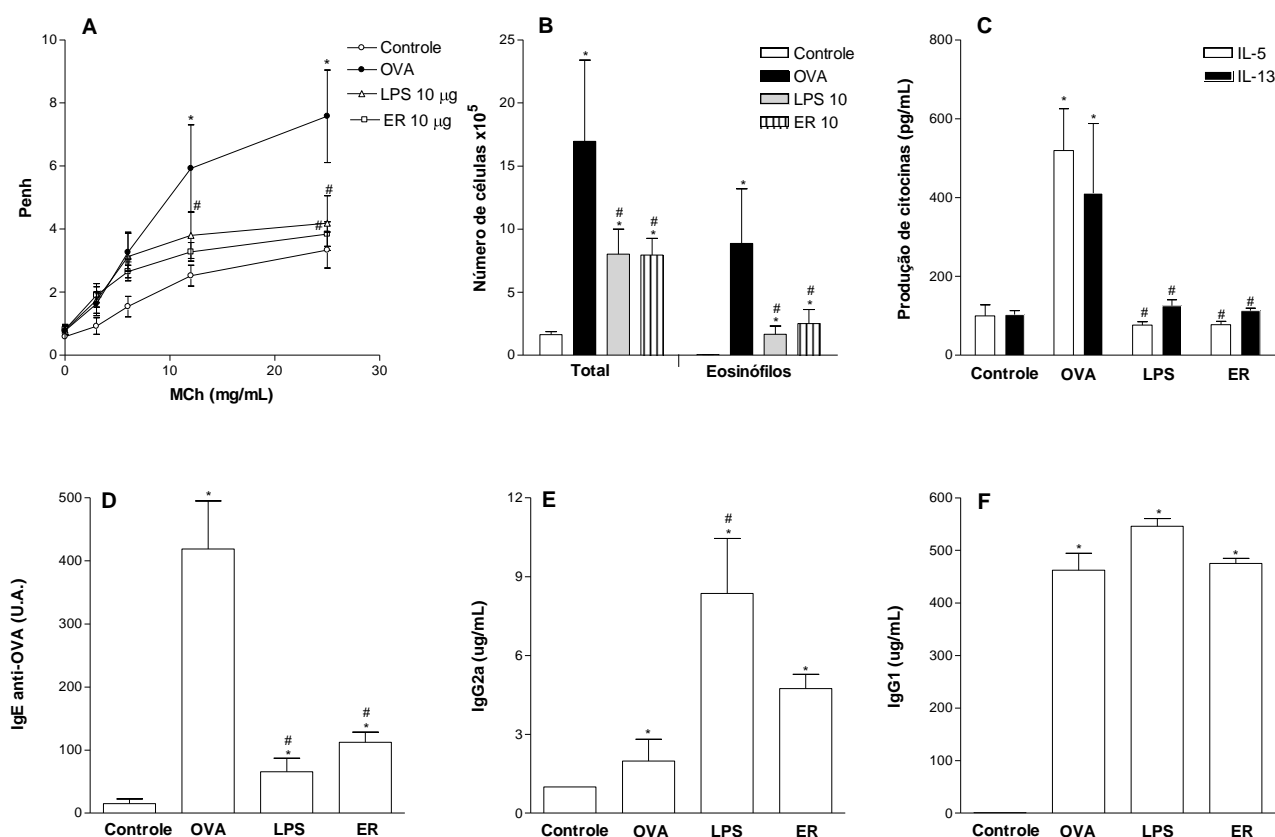


Figura 14: Efeitos do LPS ou ER na imunização com OVA. HRB (A) Número de células (B) produção de citocinas (C) IgE anti-OVA (D) IgG2a (E) e IgG1 (F). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 4µg de OVA/1,6mg Alum s.c. ou com OVA/Alum contendo 10 µg de LPS ou ER nos dias 0 e 7 e desafiados por via i.n. com 10 µg de OVA nos dias 14 e 21. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA, Ø P< 0,05 em relação ao grupo LPS.

Até agora, nós mostramos claramente que a combinação de dois tipos de adjuvantes Alum e LPS previne as reações alérgicas e não induz imunidade do tipo Th1, porém mantém a produção de anticorpos.

Atualmente está bem estabelecido que Alum é um adjuvante que induz respostas do tipo Th2 <sup>[81]</sup>. Assim sendo, a vacinação de humanos com Alum pode desencadear respostas alérgicas. Realmente, em alguns indivíduos, foi descrito que a vacinação com Alum contendo toxóide tetânico (TT) despertou reação anafilática intensa <sup>[83]</sup>.

Desta forma, resolvemos primeiramente verificar se um produto bacteriano como o toxóide tetânico poderia induzir doença alérgica pulmonar como o modelo OVA.

#### **4.10 Toxóide tetânico induz reação alérgica pulmonar que é inibida por LPS**

O primeiro parâmetro analisado foi em relação ao desenvolvimento da HRB e a inflamação alérgica pulmonar. Nossos resultados mostraram que os animais que foram imunizados com TT/Alum quando desafiados com TT apresentaram HRB à doses crescentes de metacolina quando comparados com animais do grupo controle (Fig. 15A). A adição de LPS na sensibilização com TT/Alum, resultou na inibição significativa do desenvolvimento da HRB quando comparado com o grupo TT/Alum (Fig. 15A). Em relação à inflamação pulmonar, a contagem de células totais e de eosinófilos no LBA mostrou que animais do grupo TT/Alum apresentaram um aumento significativo no número destas células quando comparado com os animais do grupo controle (Fig. 15B). A administração de LPS durante a sensibilização, foi eficaz em inibir o influxo de células totais e de eosinófilos em comparação

ao grupo TT/Alum (Fig. 15B). Da mesma forma, a produção de citocinas do tipo 2 presentes no LBA nos animais que receberam LPS foi menor do que do grupo TT/Alum (Fig. 15C e D).

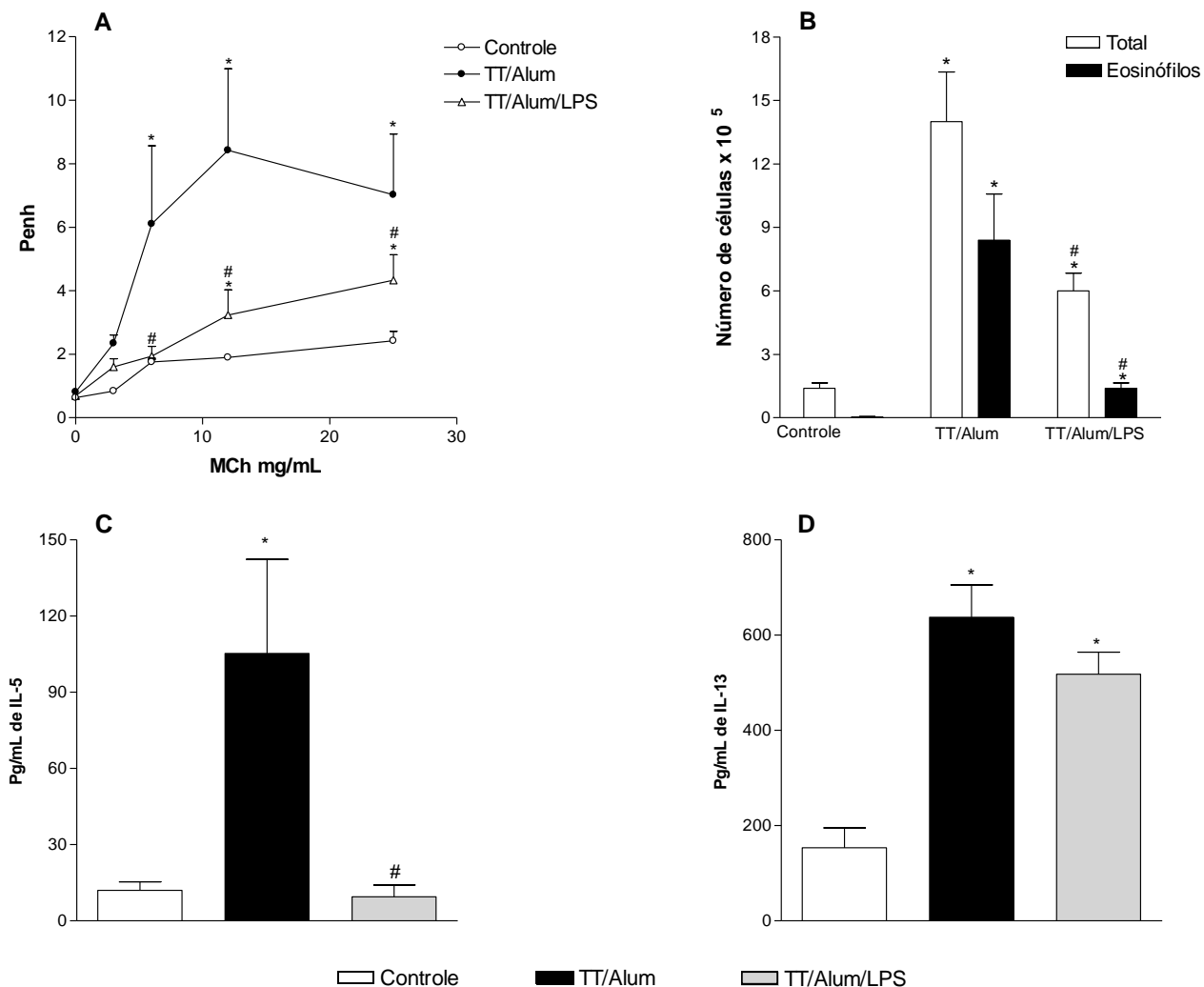


Figura 15: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. HRB (A) contagem total e diferencial das células(B) produção de citocinas IL-5 (C) e IL-13 (D). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25 $\mu$ g de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10  $\mu$ g de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Para determinar o desenvolvimento da HRB, 24 h após o segundo desafio os grupos foram submetidos à inalação de crescentes doses de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média  $\pm$  DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo TT/Alum.



Estes resultados mostram que a imunização com TT/Alum induz uma reação alérgica pulmonar intensa desencadeada após administração intranasal de TT, com desenvolvimento da HRB, eosinofilia pulmonar e produção de citocinas do tipo 2. A administração de LPS durante

Após avaliarmos a HRB, a inflamação pulmonar e a produção de citocinas, em seguida analisamos a produção de anticorpos anti-TT.

Com relação à produção de anticorpos, os resultados mostram que a sensibilização com TT/Alum induziu altos níveis de IgE total em comparação ao grupo controle (Fig. 16A). Porém, a adição de LPS durante a sensibilização com TT/Alum inibiu de maneira significativa a produção desse isotipo que é característico de respostas alérgicas (Fig. 16A).

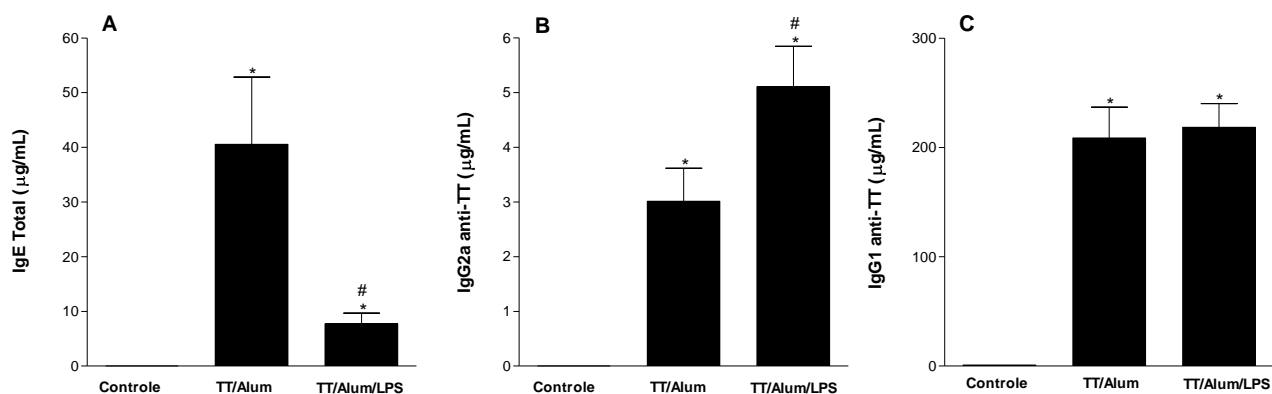


Figura 16: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. Produção de anticorpos IgE total (A) IgG2a (B) IgG1 (C). Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25µg de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10 µg de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10 µg de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo. Resultados expressos por média ± DP. \* P<0,05 em relação ao grupo controle, # P<0,05 em relação ao grupo OVA/TT.

Com relação à produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-TT, os resultados mostraram que apenas a sensibilização com TT/Alum foi capaz de induzir a produção desses dois isotipos

em relação ao grupo controle (Fig. 16B e C). A adição de LPS durante a sensibilização com TT/Alum não modificou a produção de IgG1, mantendo-se equivalente ao grupo TT/Alum (Fig. 16C). Por outro lado, induziu o aumento de IgG2a (Fig. 16B)

Em conjunto, nossos dados sugerem que o LPS modula a resposta alérgica ao TT e aumenta significativamente a produção de anticorpos IgG2a anti-TT.

Finalmente, estudamos a patologia alérgica do tecido pulmonar. Os cortes histopatológicos revelaram que em comparação aos animais do grupo controle, os animais sensibilizados com TT/Alum apresentaram um intenso infiltrado celular peribroncovascular e produção aumentada de muco pelas células do epitélio brônquico (Fig.15A e B). O mesmo não foi observado no grupo de animais que receberam LPS durante a sensibilização com TT (Fig.15 C). A análise histopatológica deste grupo foi semelhante ao grupo controle indicando que a sensibilização com LPS preveniu a patologia alérgica pulmonar, mas não desviou a patologia pulmonar para um padrão Th1.

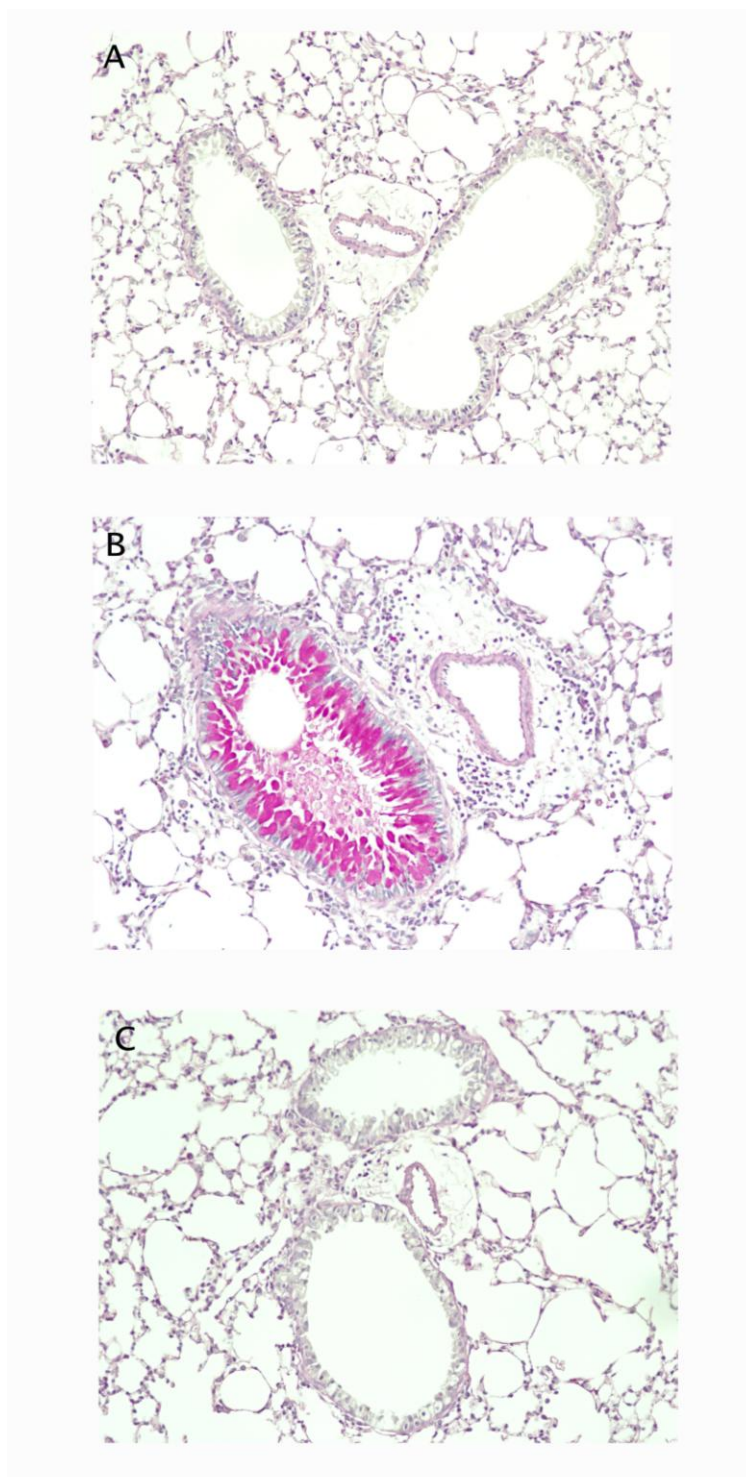


Figura 17: Efeitos do LPS durante a sensibilização com TT/Alum. Análise dos cortes histológicos (A) Controle (B) TT/Alum (C) TT/Alum/LPS. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com 0,25 $\mu$ g de TT/ 1,6mg Alum s.c. ou com TT/Alum contendo 10  $\mu$ g de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados nos dias 14 e 21 com 10  $\mu$ g de TT i.n. Os experimentos foram realizados 24 h após o segundo desafio. Os cortes histológicos dos pulmões foram corados com reagente de Schiff (“Periodic Acid Schiff”, PAS), o qual cora polissacarídeos e mucina básica e fotografado num aumento de 200X. Um experimento representativo de 2 com n = 5 por grupo.

## **DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos a relação entre a expressão ou sinalização da molécula TLR4 e desenvolvimento de imunidade do tipo 2. Primeiramente, avaliamos o desenvolvimento de doença alérgica pulmonar induzida por OVA co-adsorvida ao Alum em animais que apresentam deficiência funcional da molécula TLR4.

Para tanto, utilizamos animais deficientes na expressão de TLR4 (C3H/HeJ e C57BL10/ScCr) comparados com animais de *background* genético semelhante, porém com expressão funcional do TLR4 (C3H/HePas e C57BL10/A). Para o estudo da molécula MyD88, importante mediador da sinalização via TLR4, utilizamos animais C57BL/6 selvagens ou nocautes para MyD88.

Nossos resultados mostraram que a ausência funcional da molécula TLR4 não influenciou a reação inflamatória alérgica pulmonar, pois não houve diferenças na magnitude da inflamação pulmonar entre animais TLR-4 deficientes e TLR-4 normais. No entanto, ficou claro que inflamação alérgica na linhagem B10A foi muito mais intensa que a obtida na linhagem C3H. O mesmo foi observado em animais com deficiência na molécula MyD88, que também não apresentaram diferenças significativas no influxo total ou diferencial de células presentes no LBA quando comparados com animais B6 selvagens. Porém, foi notada uma nítida diferença entre os animais com fundo *black* quando comparados com animais com fundo C3H. Animais B10.A ou B6 desenvolveram inflamação eosinofílica mais intensa que animais C3H. Animais C3H apresentaram discreta inflamação alérgica e não desenvolveram HRB. Por outro lado, animais B6 desenvolveram HRB, mas animais B10.A não. Ou seja, não foi possível correlacionar a HRB com a reação inflamatória eosinofílica. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o *background* genético, mas não a expressão das moléculas TLR4 ou MyD88, é que determina a

intensidade da inflamação alérgica pulmonar, e também que a intensidade dessa inflamação não está associada com HRB.

Dados da literatura mostraram que pelo menos dois mecanismos distintos podem explicar o desenvolvimento de HRB. Um dependente de IL-4, IgE e mastócitos <sup>[100]</sup> e outro dependente de IL-5 e eosinófilos <sup>[101-103]</sup>, como discutido por Drazen et al. <sup>[104]</sup>. Esses dados são reforçados pelo trabalho de Kobayashi et al. <sup>[105]</sup>, o qual sugere a ação independente destes dois mecanismos no desenvolvimento da HRB. Os dados obtidos na linhagem B10 A mostraram que essa linhagem tem altos níveis de eosinófilos, mas não desenvolve HRB, sugerindo indiretamente que a IL-5 não participa desse processo.

Nossos resultados estão de acordo com trabalho de Yang *et al.* <sup>[106]</sup> que mostraram, em pacientes asmáticos, ausência de correlação entre o polimorfismo da molécula TLR4 e desenvolvimento de asma. Por outro lado, o mesmo estudo apontou que pacientes atópicos com certo polimorfismo em TLR4 - que confere uma baixa resposta à endotoxina -, apresentavam um quadro de atopia mais severa <sup>[106]</sup>. Os autores concluem que pacientes que podem desenvolver um quadro asmático, a exposição freqüente à endotoxina pode modular negativamente a severidade da resposta alérgica.

A próxima etapa do nosso trabalho foi investigar se a ativação da molécula TLR4 durante a sensibilização com adjuvante (Alum) poderia influenciar o desenvolvimento das respostas alérgicas pulmonares. Para tanto, utilizamos dois tipos de agonistas de TLR4, um natural (LPS) e outro sintético (ER-803022). Os parâmetros avaliados foram: HRB, resposta inflamatória eosinofílica pulmonar, produção de citocinas do tipo 1 e 2 no LBA e produção de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG1).

O primeiro passo foi determinar o nível de contaminação com LPS em nossa OVA comercial, uma vez que Watanabe e cols. <sup>[79]</sup> mostraram que a OVA comercial pode estar contaminada com LPS. Verificamos que a OVA comercial na concentração de 1 mg/mL continha mais de 1.050 unidades endotóxicas por mL. Após confirmar que a OVA estava contaminada, utilizamos um método para purificá-la <sup>[93]</sup> e obter uma solução de OVA livre de LPS para a realização dos nossos experimentos. Também resolvemos testar se o produto sintético ER-803022 (ER) não apresentava contaminação com LPS. Verificamos que ER na concentração de 2mg/mL não estava contaminado por LPS pois a atividade endotóxica (LAL) foi menor que 0,1 EU.

Em seguida, testamos diferentes doses de LPS durante a sensibilização com OVA/Alum sobre o desenvolvimento de asma experimental. Como esperado, a sensibilização com OVA/Alum de animais BALB/c, e posterior desafio, induziu reações alérgicas intensas como inflamação eosinofílica pulmonar, HRB, hiper secreção de muco, secreção de citocinas tipo-2, anticorpos anafiláticos. Por outro lado, a sensibilização com OVA/Alum/LPS resultou na inibição das respostas alérgicas, sendo 10 ng a menor dose de LPS que ainda apresentou efeitos anti-alérgicos e 10 µg a dose que teve efeito máximo.

O que nos chama a atenção é o fato do LPS inibir as respostas alérgicas do pulmão e ao mesmo tempo não induzir um aumento de outros tipos celulares para o LBA, tais como neutrófilos e células mononucleares. Isto sugere que LPS não induziu desvio imunológico para o padrão Th1, o que foi reforçado pelo fato de não detectarmos IFN- $\gamma$  no LBA. Nossos resultados estão parcialmente em consonância com os obtidos por Delayre-Orthez *et al.* Estes autores mostraram que LPS, administrado 1 h antes da imunização com OVA/Alum, inibe de maneira dose-dependente o desenvolvimento de eosinofilia pulmonar, a produção de IgE total ou anti-

OVA, mas não HRB <sup>[78]</sup>. No entanto, experimentos feitos com LPS administrado apenas na primeira sensibilização não inibiu o desenvolvimento da HRB, mas inibiu todos os outros parâmetros alérgicos analisados. Este resultado está de acordo com o trabalho de Delayre-Orthez, mostrando que LPS administrado 1 h antes da imunização com OVA/Alum não suprime o desenvolvimento da HRB, mas inibe a inflamação alérgica pulmonar <sup>[78]</sup>.

Em conjunto, nossos resultados mostraram claramente que a adição de LPS durante as duas sensibilizações, tanto em dose baixa (10 ng) quanto alta (10 µg), foi capaz de inibir todos os parâmetros alérgicos analisados, incluindo a HRB. Esses achados confirmam e estendem os achados de Watanabe e cols. que mostraram que baixas concentrações de LPS durante a imunização com OVA/Alum inibem o desenvolvimento de HRB <sup>[79]</sup>. Além do mais, nossos achados sugerem que a sensibilização com o LPS adsorvido a OVA/Alum não induziu uma inflamação pulmonar do tipo Th1.

Em contrapartida, verificamos que o LPS de uma maneira dose-dependente aumentou a produção de IgG2a, isotipo dependente de IFN- $\gamma$  <sup>[107]</sup>, o que indica um desvio para o padrão Th1, em relação à imunidade humoral. Porém, deve se salientar que a concentração de IgG2a detectada em nosso modelo foi 10 vezes menor que a da IgG1. Portanto, esses resultados não sugerem uma polarização para respostas Th1, como as obtidas, por exemplo, nas infecções por protozoários <sup>[108]</sup>. Utilizando um modelo experimental semelhante ao nosso, Jankovic *et al* mostraram que a sensibilização com gp120 e IL-12 co-adsorvidas ao Alum resultou em uma robusta resposta Th1 <sup>[109]</sup>. Do mesmo modo, imunização com antígenos de *Porphyromonas gingivalis* e 1µg de IL-12 co-adsorvidos ao Alum induziu resposta Th1 <sup>[110]</sup>.

Em nosso modelo, é possível que a produção de IL-12 seja bem menor da utilizada nos modelos descritos acima, uma vez que o LPS pode induzir várias citocinas, como IL-10, capazes



de impedir a polarização linfocitária. Para explicar o aumento de IgG2a sem concomitante aumento de linfócitos Th1 inflamatórios (ausência de inflamação pulmonar do tipo 1), sugerimos que linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  encontram-se nos órgãos linfóides, porém, esses linfócitos não conseguem migrar para o pulmão e causar uma inflamação pulmonar do tipo 1. Esta interpretação está de acordo com os resultados de Keller *et al* <sup>[111]</sup> que mostraram que os linfócitos TCD4 podem auxiliar na produção de anticorpos mas são incapazes de migrar para o tecido. Para que linfócitos T migrem para os tecidos inflamados, os mesmos precisam diminuir a expressão de CCR7 e CD62L e aumentar a expressão de CCR4, CCR8, LFA-1 e VLA-4 <sup>[112]</sup>. Essa é uma hipótese que, ao nosso ver, merece ser averiguada no futuro.

Atualmente as controvérsias do papel do LPS na asma estão sendo elucidadas, pois se sabe que o efeito de LPS na alergia depende da dose, via de administração e tempo de exposição. Por exemplo, Kim e cols mostraram que o TLR4, assim como MyD88, são essenciais para o desenvolvimento das respostas do tipo Th2 a antígenos inalados. Por outro lado, quando se utilizam adjuvantes durante as imunizações, as moléculas TLR4 ou MyD88 são dispensáveis para a indução das respostas alérgicas pulmonares [46], o que foi confirmado em nosso trabalho <sup>[113]</sup>. Por outro lado, mostramos que a sinalização via TLR4 inibe o desenvolvimento da alergia. Isso foi confirmado quando estudamos animais TLR4 ou MyD88 deficientes, uma vez que não o LPS foi incapaz de inibir a resposta alérgica nesses animais. Do mesmo modo, verificamos em nosso modelo que as citocinas IL-12 e/ou IFN- $\gamma$  são essenciais para que ocorra o efeito inibitório do LPS sobre a alergia, uma vez que animais deficientes nestas citocinas as respostas alérgicas não foram inibidas.

Além do MyD88, sabe-se que TRIF é outra via de sinalização importante do TLR4. Essa molécula contém um domínio intracelular Toll/IL-1R responsável por induzir a produção de IFN- $\beta$

e óxido nítrico, produtos que têm sido descritos como supressores do quadro alérgico pulmonar [75]. Porém, a administração de LPS em animais deficientes de TRIF inibiu a resposta alérgica pulmonar. Dessa forma, a supressão da alergia induzida por LPS não utiliza a via TRIF de sinalização e sim a via MyD88.

O LPS apresenta em sua estrutura uma região hidrofílica, composta por polissacarídeos ligados covalentemente a uma região hidrofóbica, constituída pelo lipídeo A. O Lipídeo A é a molécula que confere as propriedades biológicas do LPS, tais como: toxicidade, pirogenicidade, atividade necrotizante de tumores, estimulação policlonal de linfócitos B, ativação de macrófagos, ativação do sistema complemento, entre outras [114]. Nossos resultados mostraram que LPS apresenta efeitos modulatórios sobre o desenvolvimento das respostas alérgicas pulmonares, porém, devido a sua toxicidade, o LPS não pode ser utilizado para fins terapêuticos. Assim, é de interesse clínico desenvolver análogos sintéticos do lipídeo A, que possuam as mesmas atividades imunomodulatórias do LPS, mas que sejam menos tóxicos [80]. Neste contexto, resolvemos testar um agonista sintético de TLR4 (ER-803022) que, em experimentos preliminares, mostrou ser menos potente que LPS em induzir IL-12 e NO *in vitro* (dados não mostrados).

No presente trabalho, foram realizados experimentos *in vivo* comparando LPS com ER. Para avaliarmos o efeito sistêmico dos compostos, injetamos ER ou LPS *i.v.*, na dose de 10 µg, e quantificamos os níveis de TNF- $\alpha$  e NO no soro. Para nossa surpresa, ER não foi capaz de induzir níveis detectáveis de TNF- $\alpha$  e NO, enquanto que o LPS sim. Estes resultados sugerem, indiretamente, que o ER possui efeitos inflamatórios sistêmicos menores que o LPS. Outro parâmetro analisado para verificar a toxicidade foi a intensidade da broncoconstrição induzida pelo LPS em relação ao produto sintético. Novamente, o produto sintético apresentou menor

capacidade de induzir broncoconstrição em relação ao LPS. Por fim, verificamos que o produto sintético induziu um influxo de neutrófilos muito menor que LPS e confirmamos que a molécula MyD88 é essencial para o desencadeamento da broncoconstrição e da inflamação pulmonar <sup>[99]</sup>. Tendo caracterizado os efeitos imunoinflamatórios do produto sintético, resolvemos comparar se a co-adsorção do produto sintético ER e OVA ao Alum também resultaria na inibição das respostas alérgicas. Verificamos que, apesar de menos tóxico, o ER foi tão eficiente quanto o LPS em inibir reações imunológicas mediadas por linfócitos Th2.

Em conjunto, nossos resultados mostram que agonistas de TLR4 com toxicidade atenuada mantêm o efeito imunomodulatório sobre o desenvolvimento de asma. Como o Alum é um adjuvante utilizado em humanos, a utilização de alérgenos comuns, juntamente com agonistas sintéticos de TLR4, poderia abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de vacinas anti-alérgicas.

O Alum vem sendo utilizado há mais de 60 anos em vacinação humana contra difteria, tétano e coqueluche <sup>[82]</sup>. Por ser um adjuvante do tipo 2, a vacinação de humanos poderia desencadear respostas alérgicas, o que foi observado em alguns indivíduos vacinados com Alum contendo toxóide tetânico (TT). Esses apresentaram uma reação anafilática intensa <sup>[83]</sup>.

A toxina tetânica é uma neurotoxina produzida pelo *Clostridium tetani* – bactéria comumente encontrada no solo sob a forma de esporos (formas de resistência) – que causa uma doença infecciosa grave, o tétano. A vacina contra o tétano foi desenvolvida em 1924 <sup>[115]</sup> e pode ser administrada juntamente com outros produtos microbianos presentes na vacina trivalente (DTP) que confere imunidade contra difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), tétano (*C. tetani*) e coqueluche (*Bordetella pertussis*) <sup>[115]</sup>. Na formulação desta vacina tríplice, o Alum entra como adjuvante.

Nesse contexto, nossa próxima questão foi determinar se a sensibilização com TT adsorvido ao Alum poderia induzir doença inflamatória pulmonar. Em caso positivo, determinar se a sensibilização com Alum/LPS inibiria a resposta alérgica. Nossos resultados mostraram que a sensibilização com TT/Alum induziu uma resposta inflamatória pulmonar intensa, com desenvolvimento de HRB, influxo de eosinófilos, produção de citocinas do tipo 2 e produção de IgE. Ou seja, o TT é um alérgeno tão potente quanto a OVA. Quando sensibilizamos os animais com TT/Alum/LPS, verificamos que esse tipo de sensibilização foi eficaz em inibir a HRB, a inflamação pulmonar e a produção de IgE anti-TT, porém a produção de IgG2a aumentou e a produção de IgG1 foi semelhante ao do grupo que não recebeu LPS. Lynn *et al* mostraram que animais sensibilizados com o agonista sintético de TLR4 e TT, apresentaram níveis semelhantes de anticorpos anti-TT quando comparados com animais imunizados com TT adsorvido ao Alum, porém estes autores não determinaram os níveis de IgE <sup>[116]</sup>. Resta saber se o aumento de IgG2a é devido a estimulação direta dos linfócitos B pela ativação do TLR4 <sup>[117]</sup>.

O conhecimento da ação dos adjuvantes e de seus mecanismos de ação é de extrema importância para a geração de novas vacinas, ou vacinas de terceira geração incluindo aquelas produzidas por técnica de DNA recombinante.

Atualmente, um dos adjuvantes que vem sendo testado em humanos é o *monophosphoryl lipid A* (MLA), um derivado de lipopolissacarídeo purificado de *Salmonella minnesota* que apresenta toxicidade atenuada e potencial para ser utilizado como adjuvante e em imunoterapias a alérgenos [115]. Verificou-se que o MLA também ativa TLR4, mas utiliza preferencialmente a via TRIF [118].

De um modo geral, adjuvantes ou derivados de produtos microbianos sinalizam via TLRs. O Alum, ao contrário, não sinaliza via TLRs e seu mecanismo de ação somente agora

começa a ser desvendado. Dados da literatura mostraram que o Alum é capaz de ativar caspase-1 e induzir a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 via receptores NALP3<sup>[85-88]</sup>. Além do mais, os receptores NALP3 podem ser ativados em resposta ao ácido úrico e efluxo de potássio, sugerindo que a ativação do NALP3 via NLR detecta sinais de desequilíbrio homeostático. Em trabalho recente publicado pelo grupo do Latz E *et al.*, [119] sugere-se que a fagocitose de sais de alumínio (Alum) desestabiliza a membrana lisossomal induzindo o extravasamento de enzimas lisossomais, mais especificamente cathepsina B, que por sua vez ativa o inflamassoma/NALP3, e conseqüente ativa a caspase 1<sup>[119] [85] [90]</sup>. A caspase 1 cliva a IL-1 e pelo menos outras duas citocinas da família da IL-1, IL-18 e IL-33 [120, 121] (citar). Além do mais, Alum induz a produção de IL-4<sup>[91]</sup> que, em conjunto com a IL-33 e outras citocinas ou quimiocinas, favorecem a diferenciação de células Th2<sup>[91]</sup>.

Atualmente, as bases moleculares da ativação e diferenciação das diferentes sub-populações de células T começam a ser desvendadas. Cada sub-população pode ser identificada pela expressão de um fator de transcrição que é uma assinatura de uma determinada população de células T. Por exemplo, as sub-populações de células Th1, Th2, Th17 e Treg podem ser identificadas pelos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR-gt e FOXP3, respectivamente<sup>[122-124]</sup>. A expressão destes fatores é induzida pela ação de citocinas do tipo 1 e do tipo 2, no caso de células Th1 ou Th2, e IL-6 e TGF $\beta$  ou TGF $\beta$ , no caso dos linfócitos Th17 ou Treg<sup>[125]</sup>.

No nosso modelo, trazemos uma situação peculiar, pois os adjuvantes utilizados estimulam a secreção de citocinas do tipo 1 (LPS) e do tipo 2 (Alum) e este tipo de sensibilização induz células T que são eficazes no auxílio da produção de anticorpos, mas ineficazes nas funções efetoras mediadas por macrófagos, eosinófilos ou neutrófilos. Este tipo de resposta

imune pode ser muito útil em vacinações que visam somente à produção de anticorpos neutralizantes. Resta caracterizar molecularmente este tipo de células T.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS\*

- [1] Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*. 2007;212(6):441-52.
- [2] Marks GB. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Mar;33(3):285-9.
- [3] Blumenthal MN, Banks-Schlegel S, Bleecker ER, Marsh DG, Ober C. Collaborative studies on the genetics of asthma--National Heart, Lung and Blood Institute. *Clin Exp Allergy*. 1995 Nov;25 Suppl 2:29-32.
- [4] Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*. 1994 Aug 4;370(6488):367-70.
- [5] Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, et al. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Feb 18;94(4):1344-9.
- [6] Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B18-23.
- [7] Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol*. 1986 Feb 1;136(3):949-54.
- [8] Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993 Mar 18;362(6417):248-50.
- [9] Lisbonne M, Diem S, de Castro Keller A, Lefort J, Araujo LM, Hachem P, et al. Cutting edge: invariant Valpha14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol*. 2003 Aug 15;171(4):1637-41.
- [10] Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol*. 1969 Sep;42(3):647-72.
- [11] Center DM, Kornfeld H, Wu MJ, Falvo M, Theodore AC, Bernardo J, et al. Cytokine binding to CD4+ inflammatory cells: implications for asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Nov;150(5 Pt 2):S59-62.
- [12] Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest*. 1986 Dec;78(6):1701-6.
- [13] Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology*. 1990 Oct;71(2):258-65.
- [14] Anwar AR, Walsh GM, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4). *Immunology*. 1994 Jun;82(2):222-8.
- [15] Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Dec;88(6):935-42.
- [16] Hamid Q, Barkans J, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Co-expression of CD25 and CD3 in atopic allergy and asthma. *Immunology*. 1992 Apr;75(4):659-63.
- [17] Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992 Jan 30;326(5):298-304.
- [18] Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest*. 1996 Nov 15;98(10):2332-45.
- [19] Walsh GM, Symon FA, Lazarovits AL, Wardlaw AJ. Integrin alpha 4 beta 7 mediates human eosinophil interaction with MAdCAM-1, VCAM-1 and fibronectin. *Immunology*. 1996 Sep;89(1):112-9.
- [20] White SR, Ohno S, Munoz NM, Gleich GJ, Abrahams C, Solway J, et al. Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. *Am J Physiol*. 1990 Oct;259(4 Pt 1):L294-303.
- [21] Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol*. 1995 Aug 15;155(4):2211-21.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].



- [22] Lundgren JD, Davey RT, Jr., Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Mar;87(3):689-98.
- [23] Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Jan;137(1):57-61.
- [24] Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 1990 Oct 15;265(29):17381-4.
- [25] Robertson DG, Kerigan AT, Hargreave FE, Chalmers R, Dolovich J. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1974 Oct;54(4):244-54.
- [26] WHO. Asthma. 2006 [cited 2007; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>
- [27] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):490-4.
- [28] Stene LC, Nafstad P. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet.* 2001 Feb 24;357(9256):607-8.
- [29] de Sousa Mucida D, de Castro Keller A, Fernvik EC, Russo M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003 Jun;2(2):187-95.
- [30] van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet.* 2000 Nov 18;356(9243):1723-7.
- [31] Medeiros M, Jr., Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araujo MI, Cruz AA, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 May;111(5):947-51.
- [32] Bager P, Westergaard T, Rostgaard K, Hjalgrim H, Melbye M. Age at childhood infections and risk of atopy. *Thorax.* 2002 May;57(5):379-82.
- [33] Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):715-20.
- [34] Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):169-82.
- [35] Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):430-3.
- [36] Johansson S, Wennergren G, Aberg N, Rudin A. Clara cell 16-kd protein downregulates T(H)2 differentiation of human naive neonatal T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):308-14.
- [37] Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, et al. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000 Sep 12;97(19):10483-8.
- [38] Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Human molecular genetics.* 1997 Apr;6(4):551-4.
- [39] Hall IP, Sayers I. Pharmacogenetics and asthma: false hope or new dawn? *Eur Respir J.* 2007 Jun;29(6):1239-45.
- [40] Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature.* 2002 Jul 25;418(6896):426-30.
- [41] Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1645-51.
- [42] Kim YK, Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):5375-82.
- [43] Williams LK, Ownby DR, Maliarik MJ, Johnson CC. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 Mar;94(3):323-32.
- [44] Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Oct;160(4):1150-6.
- [45] Wills-Karp M, Ewart SL. The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Oct;156(4 Pt 2):S89-96.
- [46] Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4524-30.

- [47] Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 May;286(5):L887-92.
- [48] Velasco G, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RS, et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Mar;32(3):218-24.
- [49] Brunn GJ, Platt JL. The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):10-6.
- [50] Sultzer BM, Bandekar JR, Castagna R, Abu-Lawi K, Sadeghian M, Norin AJ. Suppression of C3H/HeJ cell activation by lipopolysaccharide endotoxin. *Infect Immun*. 1992 Sep;60(9):3533-8.
- [51] Sultzer BM, Castagna R, Bandekar J, Wong P. Lipopolysaccharide nonresponder cells: the C3H/HeJ defect. *Immunobiology*. 1993 Apr;187(3-5):257-71.
- [52] Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 May;24(5):518-26.
- [53] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
- [54] Coutinho A. Genetic control of B-cell responses. II. Identification of the spleen B-cell defect in C3H/HeJ mice. *Scand J Immunol*. 1976;5(1-2):129-40.
- [55] Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis*. 1998 Sep;24(3):340-55.
- [56] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- [57] Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):588-93.
- [58] O'Neill L A, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64.
- [59] Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355-6.
- [60] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):179-90.
- [61] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Feb 13;1589(1):1-13.
- [62] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1777-82.
- [63] Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):835-41.
- [64] Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 2001 Sep 6;413(6851):78-83.
- [65] Henneke P, Golenbock DT. TIRAP: how Toll receptors fraternize. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):828-30.
- [66] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.
- [67] Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):565-70.
- [68] Kalis C, Kanzler B, Lembo A, Poltorak A, Galanos C, Freudenberg MA. Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur J Immunol*. 2003 Mar;33(3):798-805.
- [69] von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy*. 2000 Sep;30(9):1230-4.
- [70] Raymond DA, Peterson MD, Wicklund PE, Good RA. Endotoxin activity of a house dust extract. *J Allergy*. 1964;35:134-42.
- [71] Nightingale JA, Rogers DF, Hart LA, Kharitonov SA, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled endotoxin on induced sputum in normal, atopic, and atopic asthmatic subjects. *Thorax*. 1998 Jul;53(7):563-71.
- [72] Rylander R, Bake B, Fischer JJ, Helander IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Oct;140(4):981-6.
- [73] Hunt LW, Gleich GJ, Ohnishi T, Weiler DA, Mansfield ES, Kita H, et al. Endotoxin contamination causes neutrophilia following pulmonary allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Jun;149(6):1471-5.
- [74] Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*. 2000 May 13;355(9216):1680-3.

- [75] Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol.* 2003 Jul 15;171(2):1001-8.
- [76] Hamelmann E, Gelfand EW. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev.* 2001 Feb;179:182-91.
- [77] Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA, et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):459-67.
- [78] Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N, Pons F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy.* 2004 Nov;34(11):1789-95.
- [79] Watanabe J, Miyazaki Y, Zimmerman GA, Albertine KH, McIntyre TM. Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):42361-8.
- [80] Persing DH, Coler RN, Lacy MJ, Johnson DA, Baldrige JR, Hershberg RM, et al. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol.* 2002;10(10 Suppl):S32-7.
- [81] Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol.* 1999 Dec 15;163(12):6448-54.
- [82] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004 Oct;82(5):488-96.
- [83] Leung AK. Anaphylaxis to DPT vaccine. *J R Soc Med.* 1985 Feb;78(2):175.
- [84] Mitchell TC, Hildeman D, Kedl RM, Teague TK, Schaefer BC, White J, et al. Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol.* 2001 May;2(5):397-402.
- [85] Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.
- [86] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):237-41.
- [87] Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):371-82.
- [88] Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:447-80.
- [89] Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jan;7(1):31-40.
- [90] Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 2005 Aug;26(8):447-54.
- [91] McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* 2007 Nov;27(5):687-90.
- [92] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol.* 2004 Feb;16(1):23-6.
- [93] Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods.* 1990 Sep 14;132(2):191-5.
- [94] Russo M, Jancar S, Siqueira ALP, Mello EAG, Mengel J, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunology Letters.* 1998;61:15-23.
- [95] Mota-Santos TA, Oliveira AF, Gerken SE, Vaz NM. Anaphylaxis with *Schistosoma mansoni* extracts in normal and infected mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1985 Jul-Aug;27(4):179-85.
- [96] Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J Immunol.* 1958 Oct;81(4):355-7.
- [97] Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods.* 1984 Mar 30;68(1-2):167-75.
- [98] Sawaki J, Tsutsui H, Hayashi N, Yasuda K, Akira S, Tanizawa T, et al. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *International immunology.* 2007 Mar;19(3):311-20.
- [99] Noulin N, Quesniaux VF, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Maillet I, Robert T, et al. Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol.* 2005 Nov 15;175(10):6861-9.
- [100] Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med.* 1996 Jan 1;183(1):109-17.

- [101] Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990 Oct 11;323(15):1033-9.
- [102] Walker C, Virchow JC, Jr., Bruijnzeel PL, Blaser K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol*. 1991 Mar 15;146(6):1829-35.
- [103] Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996 Jan 1;183(1):195-201.
- [104] Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med*. 1996 Jan 1;183(1):1-5.
- [105] Kobayashi T, Miura T, Haba T, Sato M, Serizawa I, Nagai H, et al. An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3855-61.
- [106] Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, Clough JB, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes and immunity*. 2004 Jan;5(1):41-5.
- [107] Estes DM, Brown WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 Nov;90(1-2):1-10.
- [108] Marinho CR DILM, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*. 1999;67:308-18.
- [109] Jankovic D. Adsorption to Aluminum Hydroxide Promotes the Activity of IL-12 as an Adjuvant for Antibody as well as Type 1 Cytokine Responses to HIV-1 gp120. *The American Association of Immunologist*. 1997;159:2409-7.
- [110] Stashenko P, Goncalves RB, Lipkin B, Ficarelli A, Sasaki H, Campos-Neto A. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. *The American journal of pathology*. 2007 Jan;170(1):203-13.
- [111] Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro EL, Caetano de Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(2):283-90.
- [112] Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:593-620.
- [113] Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun 25.
- [114] Manthey CL, Vogel SN. Interactions of lipopolysaccharide with macrophages. *Immunol Ser*. 1994;60:63-81.
- [115] Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;4(6):543-8.
- [116] LYNN D. HAWKINS STI, PAMELA MCGUINNESS, HUIMING ZHANG, WENDY GAVIN,, BRUCE DECOSTA ZM, HU YANG, MAUREEN MULLARKEY, DONNA W. YOUNG, HUA YANG,, DANIEL P. ROSSIGNOL AN, 1 JEFFREY ROSE, MELINDA PRZETAK, JESSE C. CHOW, and, GUSOVSKY F. A Novel Class of Endotoxin Receptor Agonists with Simplified Structure, Toll-Like Receptor 4-Dependent Immunostimulatory Action, and Adjuvant Activity. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*. 2001;300:655-11.
- [117] Jegerlehner A, Maurer P, Bessa J, Hinton HJ, Kopf M, Bachmann MF. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2415-20.
- [118] Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*. 2007 Jun 15;316(5831):1628-32.
- [119] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847-56.
- [120] Sugimoto T, Ishikawa Y, Yoshimoto T, Hayashi N, Fujimoto J, Nakanishi K. Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. *J Exp Med*. 2004 Feb 16;199(4):535-45.
- [121] Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International immunology*. 2008 Aug;20(8):1019-30.

- [122] Pykalainen M, Kinoshita R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):80-7.
- [123] Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA, Silverman ES, Lake SL, Richter BG, et al. TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Dec 28;101(52):18099-104.
- [124] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.
- [125] Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007 Jul 13;317(5835):256-60.

## **ANEXOS**

# Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon- $\gamma$ axis

J. Bortolatto\*, É. Borducchi\*, D. Rodriguez\*, A. C. Keller\*, E. Faquim-Mauro\*<sup>†</sup>, K. R. Bortoluci\*, D. Mucida\*, E. Gomes\*, A. Christ\*, S. Schnyder-Candrian<sup>‡</sup>, B. Schnyder<sup>‡</sup>, B. Ryffel<sup>‡</sup> and M. Russo\*

\*Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>†</sup>Laboratory of Immunopathology, Institute Butantan, São Paulo, Brazil and <sup>‡</sup>Molecular Immunology and Embryology, Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, France

## Clinical and Experimental Allergy

### Summary

**Background** Epidemiological and experimental data suggest that bacterial lipopolysaccharides (LPS) can either protect from or exacerbate allergic asthma. Lipopolysaccharides trigger immune responses through toll-like receptor 4 (TLR4) that in turn activates two major signalling pathways via either MyD88 or TRIF adaptor proteins. The LPS is a pro-Type 1 T helper cells (Th1) adjuvant while aluminium hydroxide (alum) is a strong Type 2 T helper cells (Th2) adjuvant, but the effect of the mixing of both adjuvants on the development of lung allergy has not been investigated.

**Objective** We determined whether natural (LPS) or synthetic (ER-803022) TLR4 agonists adsorbed onto alum adjuvant affect allergen sensitization and development of airway allergic disease. To dissect LPS-induced molecular pathways, we used TLR4-, MyD88-, TRIF-, or IL-12/IFN- $\gamma$ -deficient mice.

**Methods** Mice were sensitized with subcutaneous injections of ovalbumin (OVA) with or without TLR4 agonists co-adsorbed onto alum and challenged with intranasally with OVA. The development of allergic lung disease was evaluated 24 h after last OVA challenge.

**Results** Sensitization with OVA plus LPS co-adsorbed onto alum impaired in dose-dependent manner OVA-induced Th2-mediated allergic responses such as airway eosinophilia, type-2 cytokines secretion, airway hyper-reactivity, mucus hyper production and serum levels of IgE or IgG1 anaphylactic antibodies. Although the levels of IgG2a, Th1-affiliated isotype increased, investigation into the lung-specific effects revealed that LPS did not induce a Th1 pattern of inflammation. Lipopolysaccharides impaired the development of Th2 immunity, signaling via TLR4 and MyD88 molecules and via the IL-12/IFN- $\gamma$  axis, but not through TRIF pathway. Moreover, the synthetic TLR4 agonists that proved to have a less systemic inflammatory response than LPS also protected against allergic asthma development.

**Conclusion** Toll-like receptor 4 agonists co-adsorbed with allergen onto alum down-modulate allergic lung disease and prevent the development of polarized T cell-mediated airway inflammation.

**Keywords** airway hyper-reactivity, allergic airway inflammation, LPS, MyD88, TLR4 signaling  
Submitted 9 October 2007; revised 24 February 2008; accepted 17 April 2008

### Correspondence:

Momtchilo Russo, Departamento de Imunologia, ICB IV-USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: momrusso@usp.br

### Introduction

Allergic asthma is a chronic inflammatory lung disease mediated by Type 2 T helper cells (Th2) and is characterized by airway eosinophilia, airway hyper-reactivity (AHR), mucus hyper-secretion and elevated levels of IgE. Epidemiological evidence indicates that endotoxin lipopolysaccharide (LPS); a prototypic cell wall component of

gram-negative bacteria that activates immune cells via the transmembrane toll-like receptor 4 (TLR4) [1, 2] can influence the development of asthma [3–5].

Endotoxin LPS is ubiquitous in the environment and is often present in polluted air as well as in organic or household dusts [6]. Evidence for the role of LPS in modulating Th2 immunity is robust, but the results obtained by different groups of investigators are quite

conflicting [3]. For instance, epidemiological studies claim that endotoxin exposure during childhood could protect against the development of asthma later in life [3, 7, 8] while other studies indicate that endotoxin exposure is a risk factor for asthma [9–11]. Similarly, experimental data obtained with the murine ovalbumin (OVA) model of asthma indicated that exposure to LPS could either protect against asthma or exacerbate it [12–16].

Controversy also exists as to whether TLR4 and MyD88 molecules are required for optimal development of Th2 immunity [13, 15, 17–19]. In addition, different mechanisms have been postulated to operate in LPS-mediated protection or exacerbation of allergic lung disease [12–15].

Another variable, in studies that use OVA as allergen, is the contamination of commercial OVA with LPS [19]. It is now clear that the route, concentration, timing and duration of LPS exposure can determine whether LPS down- or up-regulates Th2-mediated allergic responses [15, 17]. We have previously shown that intravenous (*i.v.*), but not intranasal (*i.n.*), LPS administration during allergen challenge inhibits ongoing AHR, eosinophilic inflammation and pulmonary Th2-cytokine production [12]. Others studies have shown that LPS given shortly before allergen/alum sensitization down-regulates lung Th2 responses [20]. It is believed that LPS protects from the development of asthma by stimulating Th1 immunity. However, none of the studies that elicited allergic sensitization with alum have investigated whether LPS shifts the lung-specific immunity towards a Th1 pattern. This is an important point because recent studies in humans and mice clearly indicated that Th1 cells and IFN- $\gamma$  are critically involved in the development of severe type 1 asthma and AHR [21, 22].

In the present study, we used a new approach to study the effects of natural (LPS) or synthetic (ER-803022) TLR4 agonists [23] on Th2-driven allergic disease. During the sensitization phase, we co-adsorbed TLR4 agonist and allergen (OVA) to alum. Thus, we sensitized animals to OVA with a mixture of pro-Th1 (LPS) and pro-Th2 (alum) adjuvants and monitored the OVA-induced lung immune responses and inflammation.

We demonstrate that LPS suppressed asthma-like responses without shifting the lung inflammation towards a Th1 pattern. To determine the role of downstream signaling pathways of TLR4 activation, we used gene-targeted mice deficient for the adaptor molecule MyD88 or Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ -deficient (TRIF) mice. We also investigated the effect of LPS in double deficient mice lacking IL-12 and IFN- $\gamma$  molecules. We found that suppression of Th2 immunity by LPS required TLR4 and MyD88 signaling. Moreover, the TRIF pathway was dispensable, but IL-12/IFN- $\gamma$  axis was crucial for the inhibitory effect of LPS. Finally, a synthetic TLR4 agonist (ER-803022 compound) [23, 24] that was found to be without apparent systemic inflammatory

response was still as effective as LPS in preventing airway allergic disease.

## Materials and methods

### Mice

Six- to eight-week-old female mice on BALB/c background were weight-matched and used throughout this study. TLR4- and MyD88-deficient mice were on BALB/c background whereas TRIF-deficient and IL-12/IFN- $\gamma$  double knock out (KO) mice were on C57BL/6J background. IL-12/IFN- $\gamma$  double KO mice were obtained by mating IL-12p40 KO with IFN- $\gamma$  KO animals originally obtained from Jackson Laboratory. All mouse strains were kept under standard pathogen-free conditions and were bred for many generations in the Institute of Biomedical Sciences breeding unit (São Paulo, Brazil) or in the Transgenose Institute animal breeding facility (Orleans, France). TLR4-, MyD88-, or TRIF-deficient mice were originally provided by S. Akira [25]. Mice were treated according to animal welfare guidelines of both Institutes.

### Removal of lipopolysaccharides from ovalbumin

Chicken OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in phosphate buffer saline (PBS) (2 mg/mL) and depleted of the endotoxin activity [measured by Limulus amoebocyte lysate (LAL) QCL-1000 kit from BioWhittaker, Walkersville, MD, USA], using two to four cycles of Triton X-114 extractions, as described by Aida and Pabst [26]. OVA concentration was determined by BCA kit assay (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) and adjusted to 2 mg/mL. The endotoxin level of purified OVA was below the limit of detection in the LAL QCL-1000 kit ( $< 0.1$  EU).

### Alum gel preparation

Alum (Al(OH)<sub>3</sub>) gel was prepared by precipitating 0.184 M of ammonium aluminium sulphate dodecahydrate (AlH<sub>4</sub>NO<sub>8</sub>S<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O) with an excess of 1 N NaOH, roughly 2.5 v/1 v. After precipitation, Al(OH)<sub>3</sub> was suspended in water (Milli Q, Ontario, Canada) and washed five times at 3000 r.p.m. for 15 min. The final precipitate was dissolved in water and the concentration Al(OH)<sub>3</sub> was calculated by determining the dry weight of 1 mL solution. For sensitization, alum gel stock solution (50 mg/mL) was dissolved in 10 mL PBS containing OVA (10  $\mu$ g/mL) and TLR4 agonists at different concentrations that were co-adsorbed to alum in a multi-tube rotator for 30 min.

### Ovalbumin/alum sensitization with toll-like receptor 4 agonists and ovalbumin challenge

To test the effect of TLR4 agonists on OVA sensitization, we used LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-



Aldrich) as natural TLR4 ligand and as synthetic lipid A analogue we used ER-803022 (Eisai Research Institute of Boston-Andover, MA, USA), hereafter referred to as ER. We found that 1 ng/mL of LPS has 5 EU as measured by the *Limulus amoebocyte lysate* (LAL QCL-1000 kit). The endotoxin activity of our stock solution of ER (2 mg/mL) was < 0.1 EU. Mice were sensitized on days 0 and 7 by subcutaneous (s.c.) injection (0.4 mL total volume) in the nape of the neck with 4 µg OVA adsorbed to 2.0 mg of alum or with OVA mixed with different concentrations of LPS (1 ng–10 µg) or with 10 µg of ER co-adsorbed to alum. On days 14 and 21, mice were challenged i.n. with 10 µg of OVA in 50 µL of PBS. This type of protocol allows us to measure almost all allergic parameters such as AHR, eosinophils, T cells and type-2 cytokine production 24 h after second OVA challenge, because the first OVA challenge recruits memory T cells to the lung that respond promptly upon the second OVA challenge.

#### *Determination of airway responsiveness*

Airway responsiveness to increasing doses of inhaled methacholine (3, 6, 12 and 25 mg/mL) in conscious unrestrained mice was determined using a single-chamber, whole-body plethysmograph (Buxco Electronics Inc., Wilmington, NC, USA), as previously described [27, 28]. After each nebulization with methacholine, recordings were taken for 5 min. The Penh values measured during each 5 min sequence were averaged and expressed for each methacholine concentration. Although the non-invasive method is controversial, it was established that when the animals are challenged once or twice with OVA via the airway route, the Penh measurements correlate with lung resistance and compliance [29].

#### *Bronchoalveolar lavage fluid*

Mice were deeply anaesthetized by an intraperitoneal injection of 4 mg/g body weight of chloral hydrate (Labsynth, São Paulo, Brazil) and blood samples from the retro orbital plexus were collected for serum antibody determinations. The trachea was cannulated, and lungs were lavaged twice with 0.5 and 1.0 mL PBS. Total and differential cell counts of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were determined by haemocytometer and cytospin preparation stained with Instant-Prov (Newprov, Paraná, Brazil).

#### *Lung draining lymph node cultures*

Cells from mediastinal lymph node (mLN) were adjusted to  $5 \times 10^6$  cells/mL and cultured in 24-well plates in medium consisting of RPMI supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/mL penicillin/streptomycin (1 mL cell suspension per well) for 48 h with Con A (5 µg/mL) at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were assayed for cytokine content by ELISA.

#### *Cytokine measurements*

The levels of cytokines (IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ) in the BAL fluid or in supernatants were assayed by sandwich kit ELISA according to the manufacturer's suggestion (PharMingen, San Diego, CA, USA) as previously described [30]. For IL-13 determinations, the pairs were 38 213.11 and biotinylated goat polyclonal anti-IL-13 from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Values are expressed as pg/mL deduced from standards run in parallel with recombinant cytokines. The limit of detection was 10 pg/mL for IFN-γ, IL-4 and IL-5, and 31 pg/mL for IL-13.

#### *Measurement of total immunoglobulin E and ovalbumin-specific immunoglobulin G1, immunoglobulin G2a and immunoglobulin E antibodies*

Total IgE and OVA-specific antibodies were assayed by sandwich ELISA as previously described [30]. Briefly, serum samples were titrated for optimal dilutions for testing different isotypes. For total IgE, we used 1/100 dilution and for OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a, we used, respectively, 1/10, 1/10 000 and 1/100 dilutions. For total IgE determinations, plates were coated overnight at 4 °C with 0.2 µg/mL of unlabelled rat anti-mouse ε heavy chain monoclonal antibody (clone 23G3 from Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) as a capture antibody. Serum samples were added and bound IgE was revealed with biotin-labelled antibody (same clone) followed by extrAvidin Peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich). The levels of IgE were deduced from IgE standard run in parallel. For OVA-specific IgE determinations, plates were coated with anti-IgE and subsequently biotin-labelled OVA was added to the wells. The bound OVA-biotin was revealed and OVA-specific IgE levels of samples were deduced from an internal standard arbitrarily assigned as 1000 U. For OVA-specific IgG1 and IgG2a antibodies, serum samples were plated on 96-wells previously coated with OVA (2 µg/well). The bound antibodies were revealed with goat anti-mouse IgG1 or IgG2a followed by peroxidase-labelled rabbit anti-goat antibodies (all from Southern). The concentrations of each OVA-specific isotype was estimated by comparison with IgG1 and IgG2a standards run in parallel as previously described [30].

#### *Measurement of immunoglobulin G1 and immunoglobulin E anaphylactic antibodies*

The anaphylactic activity of IgG1 and IgE antibodies was evaluated by passive cutaneous anaphylactic reaction (PCA), respectively, in mice and rat as previously described [27, 31]. Briefly, for determination of anaphylactic IgG1 antibodies, the serum samples were first incubated for 1 h at 56 °C to inactivate IgE antibodies. Mice were shaved 24 h before performing the PCA reaction and injected dermally (50 µL) with three serial dilutions on each side of the dorsal skin. After 2 h, they were

challenged i.v. with 250 µg of OVA +0.25% of Evans blue solution (0.5 mL). For the IgE titration, rats were shaved and injected with 100 µL of four serial dilutions of non-inactivated serum in four sides of the dorsal skin and 24 h later the animals were injected with 250 µg of OVA +0.25% of Evans blue (1 mL) and 30 min later the PCA reaction determined. All tests were made in pooled sera and in triplicate and the PCA titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution that gave a lesion of > 5 mm in diameter. The detection threshold of the technique was established at 1 : 5 dilution.

#### *Histological analyses*

After BAL collection, lungs were perfused via the right ventricle with 10 mL of PBS to remove residual blood, immersed in 10% phosphate-buffered formalin for 24 h, and then in 70% ethanol until embedded in paraffin. Lung sections with 5 µm were stained with hematoxylin/eosin for evaluation of peribronchial and perivascular lung inflammation or with periodic acid-Schiff (PAS)/haematoxylin for the evaluation of mucus production as described earlier [27]. Briefly, a quantitative digital morphometric analysis was performed using the application program Metamorph 6.0 (Universal Images Corporation, Downingtown, PA, USA). The circumference area of bronchi and the PAS-stained area were electronically measured and the mucus index was determined by the following formula: (PAS-stained area/bronchial circumference area) × 100.

#### *Tumour necrosis factor-α and nitric oxide and determinations*

TNF-α was determined by the standard L929 cytotoxic assay as described earlier [32]. Nitric oxide production was estimated converting nitrate to nitrite with nitrate reductase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 6 h at 37 °C as described earlier [12]. Values represent sample data against standard curve.

#### *Statistical analysis*

ANOVA was used to determine the levels of difference between all groups. Comparisons of all pairs were performed by Tukey-Kramer honest significant difference test. Values for all measurements are expressed as mean ± SEMs, and the *P*-values for significance were set to 0.05.

## **Results**

#### *Co-adsorption of lipopolysaccharide and allergen to alum suppresses dose-dependently the development of airway allergic disease*

Previous studies indicated that depending on the dose, LPS can enhance or suppress Th2 immunity [13, 15]. Thus,

we first performed experiments to determine whether different doses of LPS, ranging from 1 ng to 10 µg, co-adsorbed with OVA to alum could up- or down-regulate lung allergic responses. Mice were sensitized on days 0 and 7 by s.c. injections of LPS-free OVA plus increasing concentrations of LPS co-adsorbed to alum. On days 14 and 21, mice were challenged i.n. with OVA and 24 h later, the experiments were performed. Total cell counts in BAL fluid revealed that mice sensitized with purified LPS-free OVA plus alum and challenged twice with OVA (OVA group) showed more than 10-fold increase in the number of cells (> 2 million) when compared with control group (Fig. 1a). The cellular influx with LPS at 1 ng was similar to that of OVA group, indicating that at this dose LPS (equivalent to 5 EU) did not modify the inflammatory response (Fig. 1a). However, groups of animals that received increasing doses showed a significant inhibition of total cell recruitment (Fig. 1a). Co-adsorption of 0.01 µg (low dose) or 10 µg (high dose) of LPS with OVA to alum inhibited in a dose-dependent manner the development of airway eosinophilia without increasing other cells types (Fig. 1b). Thus, it appears that LPS did not shift the airway inflammation towards a Th1 pattern as we did not find an increase in the number of macrophages, lymphocytes or neutrophils in LPS group as would be expected for Th1-mediated airway inflammation [21, 33, 34]. Next, we determined the levels of Th2- or Th1-affiliated cytokines in the BAL fluid. As shown in Fig. 1c, animals that received LPS had significant dose-related reductions in Th2-associated cytokines when compared with OVA group. IFN-γ production was very low and similar in all groups tested, including control animals and the group that received a high dose of LPS (Fig. 1c). To address this issue more specifically, we cultured lung draining mediastinal lymph nodes cells with Con A and measured IFN-γ and IL-5 production. We found that IFN-γ production was similar in the OVA/LPS groups when compared with OVA group while IL-5 production was suppressed in OVA/LPS groups (Fig. 1d). The above results indicate that the presence of LPS during OVA sensitization decreases airway Th2-allergic responses, without inducing increased IFN-γ production.

#### *Co-adsorption of lipopolysaccharide and allergen to alum prevents the development of Type 2 T helper cells-mediated lung pathology*

Because asthma pathology is associated with AHR and mucus hyper-production, we determined AHR to increasing doses of methacholine and goblet cell metaplasia in our model. We found that in contrast to animals sensitized with OVA, the OVA/LPS groups did not develop AHR (Fig. 2a). Also, exposure to LPS during sensitization inhibited in a dose-dependent manner mucus hyper production (Fig. 2b). Next, we analysed lung inflammation as assessed

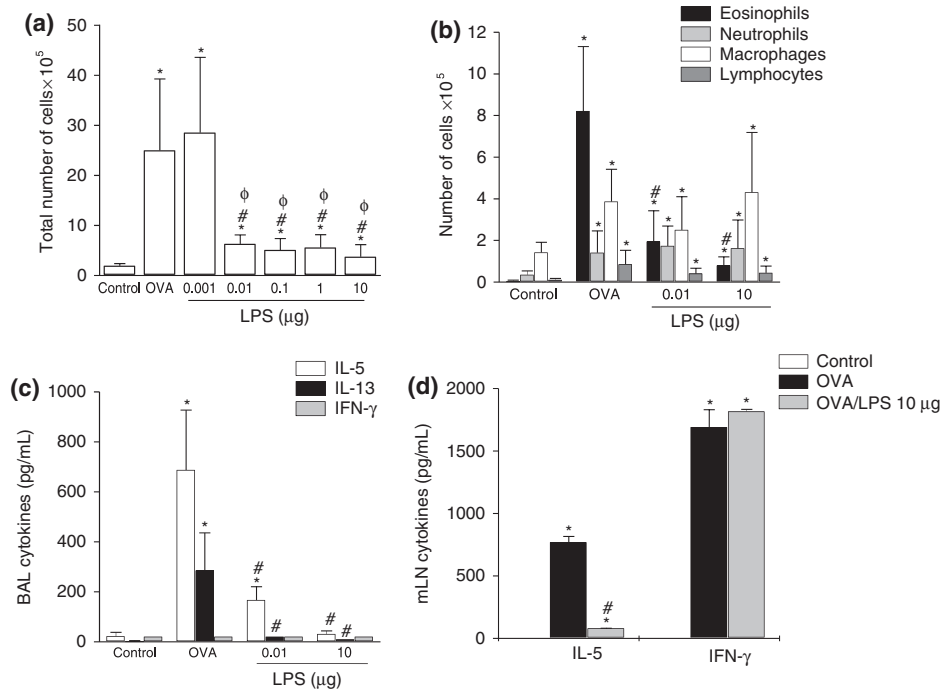


Fig. 1. Lipopolysaccharide (LPS) prevents the development of airway allergic inflammation. Groups of BALB/c mice were sensitized twice with ovalbumin (OVA) (OVA group) or OVA containing increasing concentrations of LPS (OVA/LPS groups) co-adsorbed to alum and challenged twice with LPS-free OVA. Control group consisted of non-manipulated animals. The experiments were performed 24 h after the last OVA challenge. Bronchoalveolar lavage (BAL) total cell counts (a), BAL differential cell counts (b), cytokines in BAL fluid (c). Cytokines in supernatants of Con A stimulated mediastinal lymph node cells (d). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of five mice and are representative of two experiments. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with control group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group. <sup>‡</sup>Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with LPS 0.001 group.

by cellular infiltrates around medium bronchi or vessels and we found that LPS decreased lung inflammation in a dose-dependent manner (Fig. 2c). It is important to note that the group that received LPS at a dose of 10  $\mu\text{g}$  was almost without peribronchovascular cellular infiltrates (Fig. 2c). Altogether, our results indicate that the presence of LPS during OVA/alum sensitization decreases pulmonary Th2-allergic responses without an apparent immune deviation towards Th1 asthma phenotype.

#### *Co-adsorption of lipopolysaccharide and allergen to alum suppresses dose-dependently anaphylactic antibodies but increases ovalbumin-specific immunoglobulin G2a levels*

We next determined whether sensitization to allergen in the presence of different concentrations of LPS could affect allergic isotype pattern. Therefore, we measured serum levels IgE and anaphylactic IgG1 antibodies as markers of Th2 activities. We also measured IgG2a antibodies as a marker of Th1 response [27, 35]. The OVA group showed a significant increase of total IgE as well as OVA-specific IgE and IgG1 anaphylactic antibodies when compared with control group (Figs 3a–c). The OVA group also showed a discrete but significant increase in OVA-

specific IgG2a antibodies (Fig. 3d). In the OVA/LPS groups, we found that LPS at 10  $\mu\text{g}$  but not 0.01  $\mu\text{g}$  decreased the production of total and OVA-specific IgE antibodies measured by ELISA and PCA, respectively (Figs 3a and b). The anaphylactic IgG1 production was suppressed by both doses of LPS while the production of OVA-specific IgG2a, a Th1-affiliated immunoglobulin, showed a dose-dependent increase (Figs 3c and d). We conclude that contrary to what we found in the lung, the systemic humoral response of OVA/LPS groups showed a more Th1-affiliated pattern than the OVA group.

#### *Inhibition of Type 2 T helper cells-driven airway allergic responses by lipopolysaccharide is TLR4 and MyD88 dependent*

In order to assure specificity and determine downstream signaling pathways of TLR4 activation responsible for the LPS-induced inhibition of allergic lung responses, we performed experiments in gene-targeted BALB/c mice deficient for TLR4 molecule or the adaptor molecule MyD88. As expected, LPS inhibited airway inflammation in wild type (WT) mice but not in TLR4-deficient mice as assessed by the total number of cells and the number of eosinophils present in the BAL (Figs 4a and b). We also

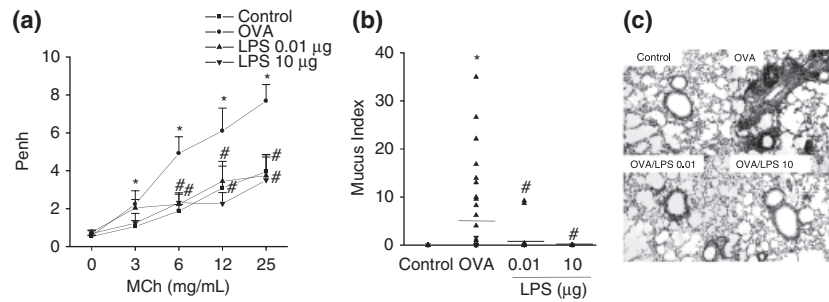


Fig. 2. Lipopolysaccharide (LPS) prevents the development of airway pathology. Groups of BALB/c mice were sensitized with ovalbumin (OVA) (OVA group) or OVA containing increasing concentrations of LPS (OVA/LPS groups) co-adsorbed to alum and challenged twice with LPS-free OVA. Control group consisted of non-manipulated animals. The experiments were performed 24 h after the last OVA challenge. Airway hyper-reactivity to increasing doses of methacholine (a). Mucus index (b) was determined by periodic acid-Schiff staining as indicated in M&M. Representative lung sections showing normal lung histology in control group (upper left) and massive cell infiltration around bronchi and vessels (c). Note: mucus plug in OVA group (upper right). Peribronchovascular inflammation in OVA/LPS 0.1 was very discrete (bottom left) and in OVA/LPS 10 group was almost absent (bottom right). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of four to five mice. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with control group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group.

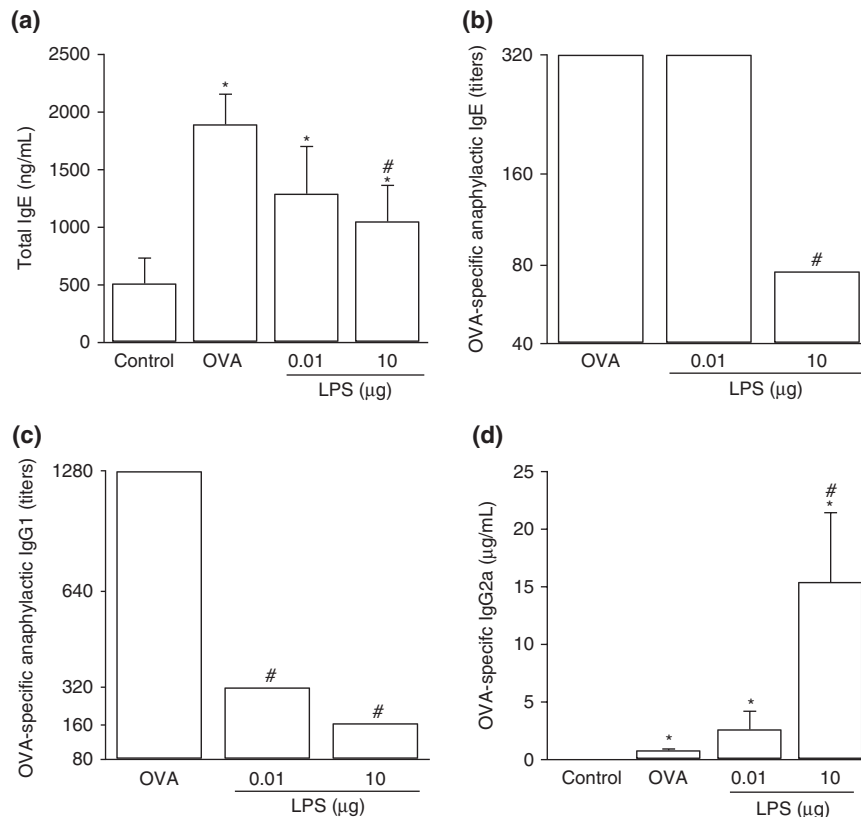


Fig. 3. Ovalbumin (OVA)-induced antibody responses in animals sensitized with OVA or OVA plus different concentrations of lipopolysaccharide (LPS). Total IgE (a) and IgG2a antibodies (d) were determined by sandwich ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of five mice and are representative of two experiments. IgE (b) and IgG1 (c) anaphylactic antibodies were determined by passive cutaneous anaphylactic reaction (PCA) and titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution that gave a lesion of  $> 5$  mm in diameter. Results are from five animals per group. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with control group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group.

found that the MyD88 pathway is essential for the inhibition of allergic inflammation because in MyD88-deficient mice, LPS did not down-modulate the eosinophilic in-

flammation when compared with OVA group (Fig. 4c). We conclude that TLR4 and MyD88 signaling are essential for down-regulation of allergic inflammation by LPS.

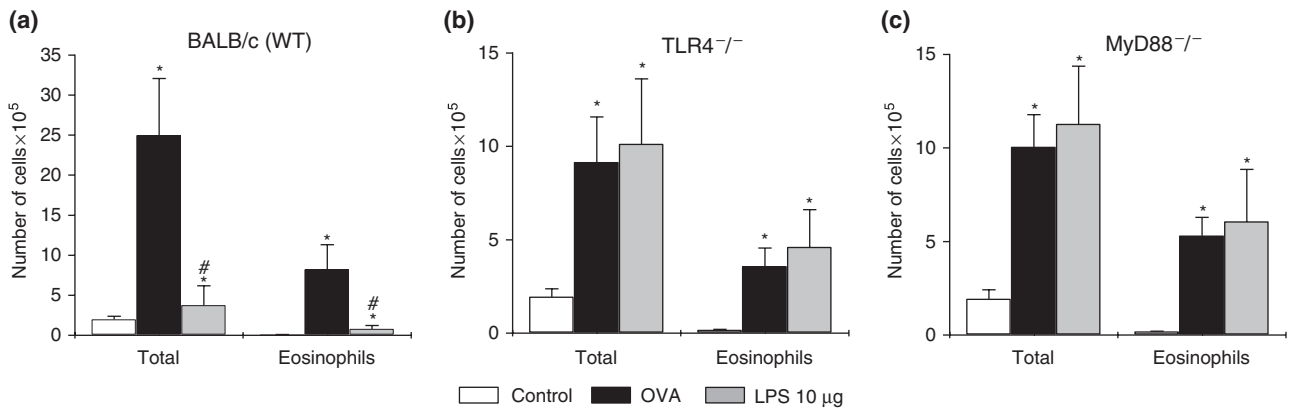


Fig. 4. Inhibition of airway allergic inflammation by lipopolysaccharide (LPS) requires toll-like receptor 4 (TLR4) and MyD88. Groups of wild type (WT), TLR4<sup>-/-</sup> or MyD88<sup>-/-</sup> mice were sensitized twice (s.c.) with ovalbumin (OVA) or with OVA containing 10  $\mu\text{g}$  of LPS adsorbed on alum and challenged twice with OVA by intranasal route. Control group consisted of non-manipulated animals. The experiments were performed 24 h after the last OVA challenge and total cell number or the number of eosinophils were determined in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of WT (a), TLR4<sup>-/-</sup> (b) or MyD88<sup>-/-</sup> (c) mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of four to five mice. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with control group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group.

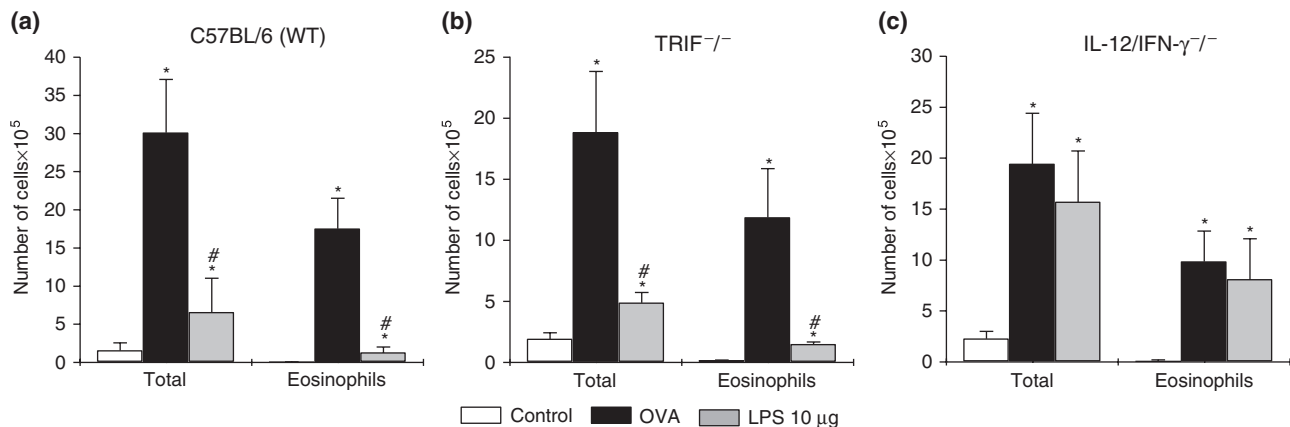


Fig. 5. Inhibition of airway allergic inflammation by lipopolysaccharides (LPS) is independent of TRIF pathway but dependent of IL-12/IFN- $\gamma$  axis. Groups of wild type (WT), TRIF<sup>-/-</sup> or IL-12/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> were sensitized twice (s.c.) with ovalbumin (OVA) or with OVA containing 10  $\mu\text{g}$  of LPS adsorbed on alum and challenged twice with OVA by i.n. route. Control group consisted of non-manipulated animals. The experiments were performed 24 h after the last OVA challenge and the total cell number or the number of eosinophils were determined in BAL fluid of WT (a), TRIF<sup>-/-</sup> (b) or IL-12/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (c) mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of four to five mice. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with the control group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group.

#### Lipopolysaccharide inhibits Type 2 T helper cells-driven airway allergic responses in TRIF-deficient but not in interleukin-12/interferon- $\gamma$ -deficient mice

Another TLR4 signaling pathway is via toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) [36]. This pathway generates IFN- $\beta$  and nitric oxide, both products that could potentially suppress asthma [12, 37, 38]. Thus, we investigated whether the TRIF pathway could also mediate the LPS effects using TRIF-deficient mice. We found that the TRIF pathway appears to be dispensable for the suppression because in TRIF-deficient animals, LPS prevented the development of allergic lung inflammation similar to WT mice (Figs 5b and a). We conclude that LPS

inhibits allergic responses signaling through MyD88 but not TRIF. As MyD88 pathway is essential for the production of IL-12, a key cytokine for IFN- $\gamma$  production [39], and because MyD88 is also involved in IFN- $\gamma$  signaling [40], and these cytokines are known to down-regulate allergic asthma [41] we studied the effect of LPS in IL-12/IFN- $\gamma$  double KO mice. We found that LPS failed to inhibit allergic lung inflammation in double KO mice (Fig. 5c). In these animals, LPS also did not inhibit AHR, type 2 cytokines and anaphylactic antibodies (data not shown). The above experiments indicate that MyD88 and IL-12/IFN- $\gamma$  molecules are critically involved in LPS-mediated down-modulation of allergic sensitization.

*Comparison of systemic bioactivities induced by lipopolysaccharides with ER-803022, a synthetic lipid A analogue with toll-like receptor 4 agonist activity*

Several molecules such as monophosphoryl lipid A, a purified LPS-derived from *Salmonella minnesota* or synthetic lipid A analogues have been developed in an attempt to maintain LPS-like bioactivities but decrease endotoxicity [42, 43]. Thus, we were interested in determining whether a synthetic lipid A analogue (ER-803022) that possesses adjuvant effects via TLR4 signaling [23] could down-modulate Th2 responses. Before testing the effect of ER on allergic sensitization, we first determined its bioactivities that are associated with systemic inflammation. Thus, we compared the systemic effects of LPS with ER after intravenous injection by measuring serum levels of TNF- $\alpha$  and NO, two products involved in LPS toxicity [1]. As expected, i.v. LPS injection resulted in the production of high levels of TNF and NO when compared with the control group (Figs 5a and b). Surprisingly, the injection of ER did not induce the production of TNF or NO and the values were similar to control group (Figs 6a and b). Moreover, animals injected with LPS showed discrete signs of toxicity such as diarrhoea, curly hair and lethargy while animals injected with ER did not show these symptoms. Although we used the same doses of TLR4 agonists in our study, it should be stressed that molar concentration ER is roughly 250-fold higher than LPS. Collectively, these results show ER is clearly less toxic than LPS and does not induce an apparent systemic inflammation at the time-point examined.

*Co-adsorption of ER to alum suppresses the development of airway allergic responses*

As ER-induced bioactivities including toxicity were less robust than LPS, we tested whether ER administration

during allergen sensitization at dose of 10  $\mu$ g could affect asthma development. For comparison, we used a group of mice that received 10  $\mu$ g of LPS. We first determined AHR, airway inflammation and Th2 cytokine in BAL fluid of animals that were sensitized with OVA or OVA co-adsorbed with LPS or ER to alum. Animals sensitized with OVA containing LPS or ER did not develop AHR as indicated by Penh values that were similar to control group and significantly different from OVA group (Fig. 7a). Allergic airway inflammation was also suppressed in animals sensitized in the presence of ER or LPS as revealed by total and eosinophils cell counts (Fig. 7b). Quantification of BAL IL-5 and IL-13 confirmed that LPS or ER were equally effective in reducing OVA-induced Th2 cytokine secretion (Fig. 7c). Next, we measured the serum levels of OVA-specific IgE, IgG2a and IgG1 antibodies. Both LPS and ER suppressed IgE production and again the suppressive activity was similar for both compounds (Fig. 7d). Regarding IgG2a antibody production, animals from OVA/LPS and OVA/ER groups showed increased level of this isotype when compared with OVA group (Fig. 7e). However, in the OVA/LPS group the levels of OVA-specific IgG2a were significantly higher than in the OVA/ER group (Fig. 7e). Finally, all groups except control animals produced similar levels of OVA-specific IgG1 antibodies (Fig. 7f). In conclusion, these experiments indicate that ER is as efficient as LPS in inhibiting allergic lung responses and OVA-specific IgE antibodies.

## Discussion

The present work provides data indicating that co-adsorption of natural or synthetic TLR4 agonist with allergen to alum impairs the development of Th2-driven allergic airway disease. We found that LPS inhibited the

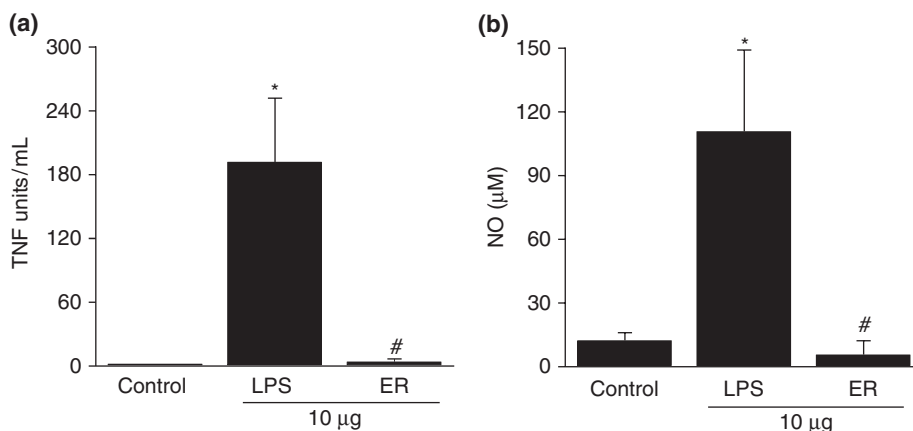
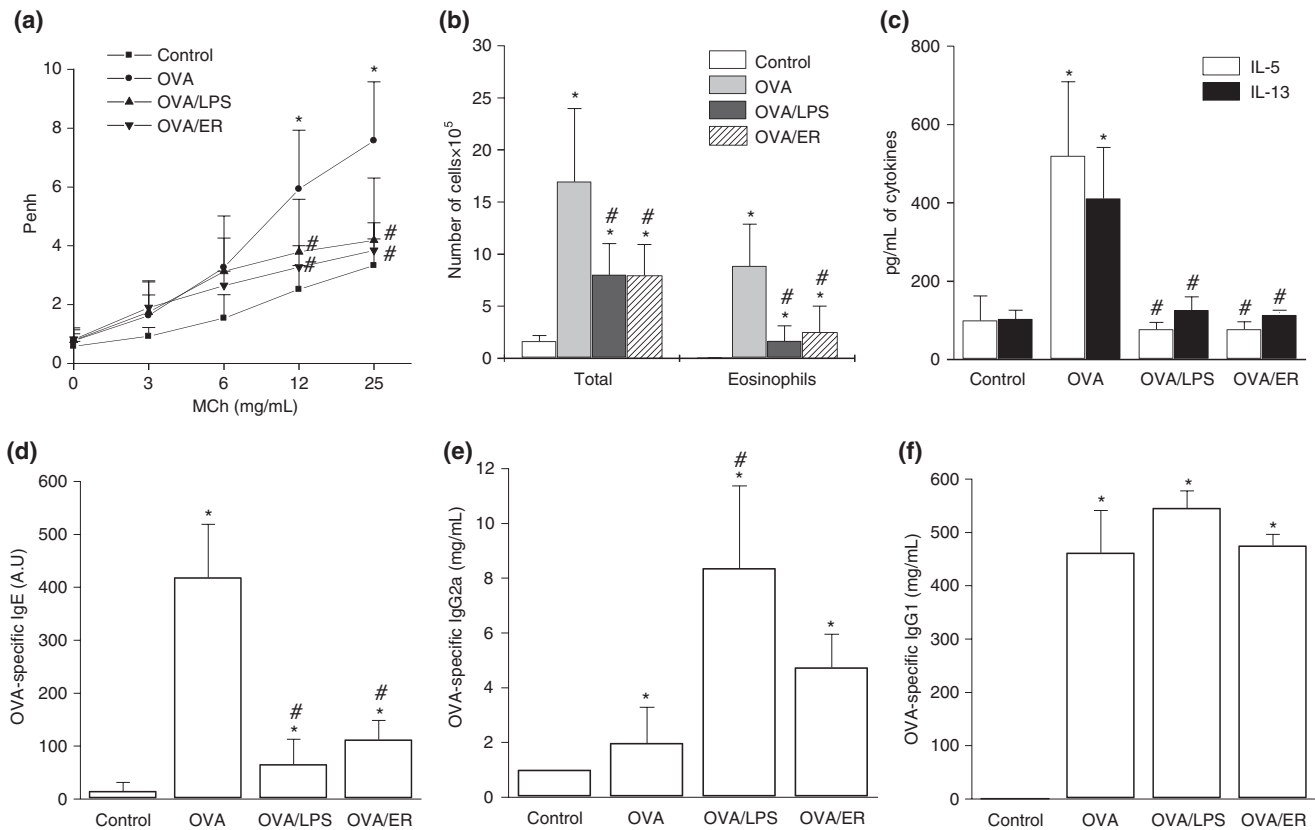


Fig. 6. Systemic effects of natural (lipopolysaccharides, LPS) or synthetic (ER803022) toll-like receptor 4 (TLR4) agonists. Groups of mice received 10  $\mu$ g of LPS or ER by intravenous route and 90 min after serum TNF- $\alpha$  levels were measured (a). Twenty-four hours after intravenous LPS or ER injections, the serum nitrate was converted to nitrite to determine nitric oxide production (b). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of five mice and are representative of two experiments. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with LPS group. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with control group.



**Fig. 7.** Allergen sensitization with lipopolysaccharides (LPS) or ER suppresses the development of Th2 immunity. Groups of BALB/c mice were sensitized twice (s.c.) with ovalbumin (OVA) (OVA group) or with 10  $\mu$ g of LPS or ER (LPS or ER groups) adsorbed on alum and challenged twice with LPS-free OVA control group consisted of non-manipulated animals. The experiments were performed 24 h after the last OVA challenge. Airway hyper-reactivity to increasing doses of methacholine (a). Total cell numbers and the number of eosinophils were determined in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (b). Cytokines in BAL fluid (c). OVA specific antibodies were measured by sandwich ELISA IgE (d), IgG2a (e) and IgG1 (f). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for groups of five mice. #Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with OVA group. \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with the control group.

development of airway eosinophilic inflammation, AHR, type 2 cytokine production and mucus hyper-secretion in a dose-dependent manner.

The minimal dose of LPS that affected lung inflammation was 10 ng and by increasing the doses up to 10  $\mu$ g, the cellular and humoral Th2-mediated responses became increasingly suppressed. Based on these results, we concluded that LPS always exerted a negative regulation on Th2 immunity. These results confirm and extend previous reports showing that LPS given during sensitization prevents allergen-induced airway inflammation [20] and that AHR is markedly suppressed when commercial OVA that is contaminated with LPS is used [19]. It has been reported that B6 TLR4-sufficient mice challenged for long periods of time with OVA containing low doses of LPS develop an attenuated allergic response when compared with B6 TLR4-deficient mice [15]. In contrast, Dabbagh et al. [18] showed that TLR4 expression is required for optimal Th2 responses. It was also reported that the expression of TLR4 and MyD88 molecules was necessary for allergic sensitization achieved by repeated intranasal administrations of OVA containing low doses of LPS [13]. However, in a

subsequent work, the authors showed that TLR4 signaling appears to be dispensable for allergic sensitization when other route is used or when sensitization is done with allergen adsorbed to alum [17].

It is reasonable to assume that TLR4 signaling is dispensable for allergic sensitization because alum is a potent Th2 adjuvant that does not contain microbial products. Indeed, we found that TLR4-deficient animals sensitized with LPS-free OVA plus alum developed allergic lung inflammation. We found that co-adsorption of natural or synthetic TLR4 agonist with allergen to alum exerted a negative regulation on allergic lung disease. Mechanistically, we found that LPS down-regulated allergic lung disease signaling through TLR4 and MyD88, but not the TRIF pathway. Moreover, the inhibitory effect of LPS was not observed in animals deficient in IL-12/IFN- $\gamma$  molecules. Thus, one possible explanation for the protective mechanism of LPS on allergic lung disease might be the development of TLR4-stimulated IL-12-dependent Th1 immune response because IFN- $\gamma$  inhibits IgE synthesis, airway eosinophilia and augments IgG2a production [44, 45]. Indeed, we found that IgE production and airway

eosinophilia were consistently inhibited in mice sensitized with OVA in the presence of LPS and the serum levels of IgG2a were increased. However, we do not favour the notion that LPS shifted the immunity to a fully polarized Th1 response because we could not detect an increased IFN- $\gamma$  production in the lungs of animals sensitized in the presence of LPS. Moreover, we could not find any evidence for Th1-mediated airway disease as the OVA/LPS groups did not develop AHR or neutrophilic inflammation that are common features of type 1 asthma phenotype [21, 22]. In addition, histological analyses showed that mucus formation and lung cellular infiltrates of animals sensitized with OVA/LPS were drastically decreased when compared with that of OVA group (Figs 2b and c).

We speculate that a polarized T cell activation towards Th2 or Th1 pattern does not occur due to two possible mechanisms: (1) TLR4 signaling antagonizes the Th2 enhancing properties of alum [46, 47] and alum, in turn, might impair the Th1-promoting activity of TLR4 signaling [13, 15, 19] and (2) induction of regulatory T cell by LPS [48] could suppress the development of Th2 or Th1 cells. We favour the first possibility because s.c. sensitization with OVA plus LPS but in the absence of alum-induced airway neutrophilia that is characteristic of Th1-mediated airway inflammation [33].

It remains to be explained why TLR4 signaling promoted an increase in the production of IgG2a antibodies without concomitant increase in inflammatory Th1 cells. One possibility is that sensitization with LPS generated IFN- $\gamma$ -producing cells in draining LN or spleen where they helped B cell to produce IgG2a antibodies and inhibited alum's ability to effectively initiate a Th2 response but these cells did not acquire the phenotype of fully polarized inflammatory Th1 cells [33] and therefore lacked the ability to migrate to lung.

Using similar methodology, Jankovic *et al.* [49] reported that adsorption to alum promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for type 1 cytokine response to HIV-1 gp120. It should be noted that in this study, 1  $\mu$ g of IL-12 was used. Although we did not determine how much IL-12 was induced *in vivo* in our protocol, it is likely, based on *in vitro* experiments with LPS and macrophages, that the amount of IL-12 generated in our study might be much lower than that required for Th1 polarization.

An important observation that emerged from our study is that OVA given with a mixture of two adjuvants with opposing effects on immune responses dampened the development of airway inflammatory responses characteristic of Th2 or Th1 cells, but spared antibody production. This type of immune modulation might be applied for the development of vaccines against microbial products or against allergy. In this line, it was shown that subcutaneous administration of a vaccine of ragweed-TLR 9 agonist appeared to offer long-term clinical efficacy in the treatment of patients with allergic rhinitis [50]. Having

this in mind, in the present study we used the s.c. route because it is less invasive than the i.p. route and as such more suitable for immune intervention in humans.

Alum is currently used as adjuvant in human vaccination and monophosphoryl lipid A, a new generation of soluble adjuvants is currently being investigated [51]; however, the association of both adjuvants have not been addressed. Here, we show that the association of ER, a synthetic lipid A analogue that did not induce a systemic inflammatory response, with alum given s.c. was as effective as LPS in the inhibiting allergic responses. When viewed in combination, our work indicates that TLR agonists plus allergens co-adsorbed to alum might represent a novel strategy for down-modulating allergic responses.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (04/14297-6, 05/57136-5 and 06/52705-4). M. R. is a fellowship recipient of Conselho Nacional de Pesquisa.

We thank Cristina Caldas for help in the procedures to remove LPS from OVA and LAL assay, Paulo Albe for expert assistance in histology, Renato Barboza for help in photomicrograph and figures and Sally Ishizaka (EISAI) for suggestions and careful revision.

### References

- 1 Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169–76.
- 2 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394–7.
- 3 Williams LK, Ownby DR, Malariak MJ, Johnson CC. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94:323–32.
- 4 Reed CE, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: a contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:157–66.
- 5 de Sousa Mucida D, de Castro Keller A, Fernvik EC, Russo M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2:187–95.
- 6 Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:322–8.
- 7 von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R *et al.* Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1230–4.
- 8 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299:1259–60.
- 9 Michel O, Kips J, Duchateau J *et al.* Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1641–6.
- 10 Thorne PS, Kulhankova K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ Jr, Zeldin DC. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national



- survey of endotoxin in United States housing. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **172**:1371–7.
- 11 Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Mimica I, Sole D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; **8**:121–6.
  - 12 Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL *et al.* Bacterial lipopolysaccharide signaling through toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol* 2003; **171**:1001–8.
  - 13 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; **196**:1645–51.
  - 14 Tulic MK, Knight DA, Holt PG, Sly PD. Lipopolysaccharide inhibits the late-phase response to allergen by altering nitric oxide synthase activity and interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **24**:640–6.
  - 15 Hollingsworth JW, Whitehead GS, Lin KL *et al.* TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J Immunol* 2006; **176**:5856–62.
  - 16 Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N, Pons F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**:1789–95.
  - 17 Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L *et al.* MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* 2005; **115**:459–67.
  - 18 Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002; **168**:4524–30.
  - 19 Watanabe J, Miyazaki Y, Zimmerman GA, Albertine KH, McIntyre TM. Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J Biol Chem* 2003; **278**:42361–8.
  - 20 Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; **138**:298–304.
  - 21 Kim YK, Oh SY, Jeon SG *et al.* Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol* 2007; **178**:5375–82.
  - 22 Sugimoto T, Ishikawa Y, Yoshimoto T, Hayashi N, Fujimoto J, Nakanishi K. Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. *J Exp Med* 2004; **199**:535–45.
  - 23 Hawkins LD, Ishizaka ST, McGuinness P *et al.* A novel class of endotoxin receptor agonists with simplified structure, toll-like receptor 4-dependent immunostimulatory action, and adjuvant activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **300**:655–61.
  - 24 Seydel U, Hawkins L, Schromm AB *et al.* The generalized endotoxic principle. *Eur J Immunol* 2003; **33**:1586–92.
  - 25 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T *et al.* Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; **162**:3749–52.
  - 26 Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 1990; **132**:191–5.
  - 27 Keller AC, Mucida D, Gomes E *et al.* Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:283–90.
  - 28 Noulin N, Quesniaux VF, Schnyder-Candrian S *et al.* Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol* 2005; **175**:6861–9.
  - 29 Albertine KH, Wang L, Watanabe S, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Physiol* 2002; **283**:L219–33.
  - 30 Russo M, Nahori MA, Lefort J *et al.* Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; **24**:518–26.
  - 31 Ovary Z, Benecerraf B, Bloch KJ. Properties of guinea pig 7S antibodies. II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. *J Exp Med* 1963; **117**:951.
  - 32 Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidiodomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 2002; **168**:4593–600.
  - 33 Sawicka E, Zuany-Amorim C, Manlius C *et al.* Inhibition of Th1- and Th2-mediated airway inflammation by the sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720. *J Immunol* 2003; **171**:6206–14.
  - 34 Stephens R, Eisenbarth SC, Chaplin DD. T helper type 1 cells in asthma: friend or foe? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; **2**:31–7.
  - 35 Faquim-Mauro EL, Coffman RL, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999; **163**:3572–6.
  - 36 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; **301**:640–3.
  - 37 Nakajima H, Nakao A, Watanabe Y, Yoshida S., Iwamoto I. IFN-alpha inhibits antigen-induced eosinophil and Cd4+T-cell recruitment into tissue. *J Immunol* 1994; **153**:1264–70.
  - 38 Maeda Y, Musoh K, Shichijo M, Tanaka H, Nagai H. Interferon-beta prevents antigen-induced bronchial inflammation and airway hyperreactivity in mice. *Pharmacology* 1997; **55**:32–43.
  - 39 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:133–46.
  - 40 Sun D, Ding A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol* 2006; **7**:375–81.
  - 41 Ashino S, Wakita D, Zhang Y, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung. *Int Immunol* 2007; **20**:259–66.
  - 42 Baldrick PRD, Elliott G, Wheeler AW. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; **35**:398–413.
  - 43 Perera PY, Manthey CL, Stutz PL, Hildebrandt J, Vogel SN. Induction of early gene expression in murine macrophages by synthetic lipid A analogs with differing endotoxic potentials. *Infect Immun* 1993; **61**:2015–23.

- 44 Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DA *et al*. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; **102**:5–28.
- 45 Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; **177**:573–6.
- 46 Jordan MB, Mills DM, Kappler J, Marrack P, Cambier JC. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science* 2004; **304**:1808–10.
- 47 Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 1999; **163**:6448–54.
- 48 Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; **197**:403–11.
- 49 Jankovic D, Caspar P, Zweig M *et al*. Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. *J Immunol* 1997; **159**:2409–17.
- 50 Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG *et al*. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006; **355**:1445–55.
- 51 Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; **4**:543–8.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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