

**CYRO ALVES DE BRITO**

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO  
OLIGODEOXINUCLEOTÍDEO CpG NA IMUNIZAÇÃO  
COM OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS NAS FASES  
NEONATAL E ADULTA**

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

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CYRO ALVES DE BRITO**

**EFEITO IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO  
OLIGODEOXINUCLEOTÍDEO CpG NA IMUNIZAÇÃO  
COM OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS NAS FASES  
NEONATAL E ADULTA**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora:  
Profa. Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo  
2009

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

© reprodução total

De Brito, Cyro Alves.

Efeito imunomodulatório *in vivo* e *in vitro* do oligodeoxinucleotídeo CpG na imunização com ovalbumina em camundongos nas fases neonatal e adulta / Cyro Alves de Brito. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Maria Notomi Sato.

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

Versão do título para o inglês: *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory effect of CpG-containing oligodeoxynucleotide in ovalbumin immunization of newborn and adult mice .

Descritores: 1. Imunomoduladores 2. Neonatologia 3. Alergia 4. Adjuvantes imunológicos 5. Receptores imunológicos I. Sato, Maria Notomi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0181/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                   Cyro Alves de Brito.

Título da Tese:                   Efeito imunomodulatório *in vivo* e *in vitro* do  
oligodeoxinucleotídeo CpG na imunização com ovalbumina  
em camundongos nas fases neonatal e adulta .

Orientador(a):                   Maria Notomi Sato.

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: .....

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



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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 06508-000 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 **91** nas fls. **5** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Notomi Sato, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Efeito modulatório da co-administração de oligodeoxinucleotídeos CpG na imunização neonatal e adulta de camundongos com o ácaro *Blomia tropicalis* e o antígeno ovalbumina**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Cyro Alves de Brito** 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 **19.10.2004**.

São Paulo, 20 de outubro de 2004

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender  
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira  
Secretário da CEEA



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](mailto:cep@icb.usp.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **007** nas fls. **53** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Maria Natomi Sata, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Efeito modulatório da co-administração de oligodeoxinucleotídeos CpG na imunização neonatal e adulta de camundongos com o ácaro blomia tropicalis e o antígeno ovalbumina**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Cyro Alves de Brito** 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 **24.03.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 25 de março de 2008.

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

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

Aos meus pais, Rene Alves de Brito e Magali Dosi de Brito,  
que foram meus primeiros mestres e forneceram a estrutura  
e o modelo para minha formação intelectual e moral.

Essa conquista é nossa!

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pela oportunidade e estrutura concedidas para o desenvolvimento deste estudo no LIM-56.

À Profa. Dra. Maria Notomi Sato, por ter me aceitado como aluno, pela confiança depositada em mim e pela sua paciência e incentivo maternos nestes anos de orientação.

Às professoras Ises Abrahamsohn, Mahasti de Macedo, Wafa Cabrera, Maria Fernanda Soares, Hiro Goto e Maria Regina D'Império Lima pelas críticas e sugestões apontadas nos exames de qualificação.

Meu sincero e especial agradecimento à amiga Célia Regina de Oliveira, pois sem ela eu não estaria neste grupo de pesquisa.

Às amigas Noêmia Mie Orii e Rosângela Araújo, pelos ensinamentos e suporte em citometria.

Aos amigos do “pequeno” grupo experimental: Ana Elisa Fusaro, Adriana Goldoni, Bruno Muniz, Eliana Futata, Elaine Cardoso, Francinelson Lourenço, Isabela Damante, Jefferson Victor, Juliana dos Santos, Mayce Azor, Orlando Piubelli e Paula Rigato. Também aos mais novos alunos do grupo: Carolina, Josenilson, Natalli e Shinai. Agradeço pela agradável convivência e pelas muitas risadas ao longo destes anos. Meu sincero obrigado pela colaboração e ajuda nos experimentos e discussões científicas, tenho aprendido muito com vocês.

A Rachel Guedes e Vilma dos Anjos, pelo estimável cuidado com os animais do biotério. Ao Rômulo Esteves, pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

Aos demais pesquisadores, pós-graduandos e técnicos do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) pelo auxílio no desenvolvimento deste estudo.

Aos amigos que, mesmo na distância e correria do dia-a-dia, me incentivaram e torceram por mim.

Aos meus pais, pela paciência e estímulo às minhas perguntas e curiosidades da infância, vocês cultivaram a semente da ciência em mim. Por todo apoio financeiro, afetivo e emocional, incentivando-me em todo o percurso até aqui.

Aos meus irmãos e, acima de tudo, amigos, Renan e Thiago, e meus familiares por compartilharem tantos momentos de alegrias, tristezas, lutas e conquistas. À Rafaelle, pela companhia e carinho nesta caminhada.

Agradeço a Deus, por ter me dado forças e ânimo para a realização desta importante etapa, e por ter colocado em minha vida todas estas pessoas a quem agradeço, pois sem elas este trabalho seria muito mais difícil.

À Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao LIM-56 pelo suporte financeiro.

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”*

*Leonardo da Vinci*

*"Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento."*

*Isaac Newton*

## RESUMO

De BRITO C. A. **Efeito imunomodulatório *in vivo* e *in vitro* do oligodeoxinucleotídeo CpG na imunização com ovalbumina em camundongos nas fases neonatal e adulta.** 2009. 82 f. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O desenvolvimento da alergia pode ter início precoce, durante os primeiros meses de vida ou ainda durante a gestação. Em camundongos, é descrita uma predisposição ao desenvolvimento de resposta Th2 no período neonatal, contribuindo para o desenvolvimento da resposta alérgica. A maturação das funções relacionadas à resposta Th1 pelo uso de adjuvantes imunológicos no período pós-natal pode contribuir na profilaxia da asma e outras doenças alérgicas. Neste trabalho, investigamos o efeito dos oligodeoxinucleotídeos CpG na imunização com ovalbumina (OVA) e extrato do ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) em camundongos nos períodos neonatal e adulto. Os resultados obtidos mostram que o ODN-CpG é capaz de diminuir a produção de anticorpos IgE, um isótipo dependente de citocinas Th2, e aumentar os níveis de anticorpos IgG2a nas imunizações com OVA e Bt, inclusive na imunização com os dois alérgenos associados. Além disso, a associação do ODN-CpG na imunização neonatal com OVA promove um aumento da produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  e diminuiu a produção de IL-10. Ao compararmos a eficiência modulatória do CpG nas imunizações com OVA em camundongos adultos e neonatos, observamos um maior efeito modulatório na produção de anticorpos em adultos. Os resultados mostraram que linfócitos B de camundongos jovens não aumentam a expressão do TLR-9 mesmo após 72 horas de estímulo com CpG, enquanto nos linfócitos de adultos já é possível observar um aumento em 48 horas. Além da menor ativação dos linfócitos B, evidenciamos uma produção de IL-10 e MCP-1 significativamente aumentada na cultura de células de neonatos após estímulo *in vitro* com CpG. Ao avaliarmos a influência do CpG na ativação antígeno específica dos linfócitos T CD4+, mostramos que linfócitos T CD4+ de neonatos expressam mais intensamente moléculas B7 do que células de adultos após estímulo antigênico *in vitro*, o que sugere uma característica supressora nestas células. Esse aumento foi inibido pela adição de CpG na cultura. A indução de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) *in vitro* também foi suprimida pela adição de CpG. Nossos resultados mostram um potencial modulatório do CpG no período neonatal e adulto nas respostas a OVA e Bt. Evidenciamos, também, diferenças qualitativas e quantitativas no efeito do CpG em relação às imunizações neonatal e adulta. Considerando a suscetibilidade dos neonatos às infecções e ao desenvolvimento de alergia, torna-se importante estabelecer estratégias imunomodulatórias que potencializem as respostas inata e adaptativa e possam ser profiláticas no desenvolvimento de doenças alérgicas.

Palavras-chave: Imunomodulação; Neonatos; CpG; Alergia; Receptores toll-like.

## ABSTRACT

De BRITO C. A. ***In vivo and in vitro immunomodulatory effect of CpG-containing oligodeoxynucleotide in ovalbumin immunization of newborn and adult mice.*** 2009. 82 p. [Thesis]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The allergy development may occur in the early life, during the pregnancy or postnatally at the first months of life. In mice, it is described a predisposition to Th2 biased response in the neonatal period, favoring the development of allergic response. The maturation of functions related to Th1 response by the use of immune adjuvants may be beneficial to the allergy prophylaxis. In this work, we evaluated the effect of CpG-containing oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in the neonatal and adult immunization with ovalbumin (OVA) or the extract of house dust mite *Blomia tropicalis* (Bt). The results show CpG-ODN is able to decrease IgE antibody production, an isotype related to Th2 response, and increase IgG2a antibody levels in OVA or Bt immunization of A/Sn mice, even when mice were co-immunized with both allergens. Moreover, CpG-ODN association in neonate immunization with OVA increases *in vitro* IFN- $\gamma$  production and decreases IL-10. Comparing the modulatory efficiency of CpG in OVA immunization of neonate and adult mice, we observed a stronger effect on antibody production in adults. Results show that B cells from young mice do not increase the TLR-9 expression upon CpG stimulation for 72 hours whereas the increase of TLR-9 in adult B cells occurs within 48 hours. Besides the lower B cell activation, we found a significant increase of IL-10 and MCP-1 secretion levels by the neonatal cells stimulated by CpG. When we evaluated the influence of CpG on CD4<sup>+</sup> T cell activation upon antigenic stimulation, we verified an upregulation of B7 molecules expression on neonate cells than adult cells. This high expression was inhibited by the addition of CpG in the culture. The induction of regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) *in vitro* was also suppressed by CpG. Our results show a modulatory potential of CpG in the immune response to OVA and Bt in both neonatal and adult periods. We also evidenced qualitative and quantitative differences in the CpG effect between neonates and adults. Considering the susceptibility to infections and allergy development in newborns, it becomes important to establish immunomodulatory strategies that enhance innate and adaptive responses and are prophylactic to the development of allergic disorders.

Keywords: Immunomodulation; Newborn; CpG; Allergy; Toll-like receptors.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACP** = Anafilaxia cutânea passiva

**APC** = célula apresentadora de antígeno

**Al(OH)<sub>3</sub>** = Hidróxido de alumínio

**Bt** = extrato do ácaro *Blomia tropicalis*

**CpG** = dinucleotídeo citosina-guanina ligado por ponte de fósforo

**dpi** = Dias pós-imunização

**ELISA** = Ensaio imunoenzimático

**Ig** = Imunoglobulina

**IL** = Interleucina

**ip** = Intraperitoneal

**MCP-1** = proteína quimioatraente de monócitos-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)

**ODN** = oligodeoxinucleotídeo

**OVA** = ovalbumina

**PAMP** = padrão molecular associado a patógenos

**PBS** = Tampão fosfatado

**SAB** = soro albumina bovina

**sc** = subcutâneo

**SFB** = soro fetal bovino

**TA** = temperatura ambiente

**TGF-β** = Fator de crescimento tumoral beta

**Th** = Linfócito T auxiliar

**TLR** = receptor semelhante ao *Toll* (*Toll-like receptor*)

**Treg** = Linfócito T regulador

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivos Gerais .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 Animais .....	23
3.2 Antígenos e oligodeoxinucleotídeos .....	23
3.3 Protocolos de imunização com ovalbumina ou extrato de <i>Blomia tropicalis</i> e co-administração de oligodeoxinucleotídeos .....	24
3.4 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva .....	26
3.5 Análise de anticorpos anti-OVA, anti-Bt e dosagem de IgE .....	27
3.6 Obtenção de células mononucleares esplênicas dos animais .....	27
3.7 Purificação e cultura de linfócitos B .....	28
3.8 Cultura celular .....	28
3.9 Cultura celular para obtenção de sobrenadante .....	28
3.10 Avaliação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e MCP-1 .....	29
3.11 Citometria de fluxo .....	30
3.12 Reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real .....	30
3.13 Análise estatística .....	31
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Associação de ODN-CpG na imunização com ovalbumina de camundongos neonatos e adultos diminui a produção de anticorpos IgE .....	32
4.2 Associação do ODN-CpG na imunização com OVA diminui a produção de anticorpos IgE e aumenta IgG2a na resposta secundária em camundongos adultos	35

4.3	Produção de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ e IL-12 de camundongos neonatos imunizados com OVA associada ao ODN-CpG ou ODN-controle .....	37
4.4	Associação do ODN-CpG diminui os níveis de IgE e aumenta IgG2a na imunização de camundongos com extrato de ácaro <i>Blomia tropicalis</i> .....	41
4.5	Efeito do ODN-CpG na imunização de camundongos adultos com OVA e Bt na produção de anticorpos .....	45
4.6	Linfócitos T de camundongos neonatos apresentam maior expressão de moléculas B7 após estímulo antigênico do que células de camundongos adultos ..	48
4.7	Análise de expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T de camundongos neonatos e adultos após estímulo policlonal .....	52
4.8	Efeito <i>in vitro</i> do CpG associado ao estímulo antigênico na produção de citocinas .....	55
4.9	Efeito <i>in vitro</i> do ODN-CpG na indução de células T regulatórias após estímulo antigênico .....	57
4.10	Avaliação da influência do ODN-CpG na expressão de TLR-9 em linfócitos B de camundongos neonatos e adultos .....	59
4.11	Avaliação da expressão de t-bet e IFN- $\gamma$ em linfócitos B purificados .....	61
4.12	Análise da ativação de linfócitos B de camundongos neonatos e adultos pela expressão de moléculas coestimulatórias após estímulo <i>in vitro</i> com CpG .....	64
5	DISCUSSÃO .....	66
6	CONCLUSÃO .....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

# 1 INTRODUÇÃO

A compreensão do papel da imunização e de adjuvantes no período de imaturidade imunológica e o balanço entre as funções Th1 e Th2 de neonatos pode contribuir no estudo da regulação da resposta alérgica. Nos últimos anos têm surgido evidências de que o comprometimento para o desenvolvimento de alergia tem início precoce, durante os primeiros meses de vida, ou ainda, durante a gestação. Além disto, as alterações no estilo de vida e na dieta alimentar da criança podem influenciar para o desenvolvimento de doenças alérgicas (BJÖRKSTÉN, 1999). As reações alérgicas são caracterizadas por elevados níveis séricos de anticorpos IgE e pelo desenvolvimento de sintomas como a asma, rinite e dermatite, que acometem aproximadamente 30% da população mundial. A prevalência e o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade tipo 1 estão amplamente correlacionados com o caráter genético para atopia e aos fatores ambientais que são responsáveis pela intensidade de exposição aos alérgenos ambientais (WAHN, 2000). O estudo de medidas estratégicas utilizando novos adjuvantes na imunização de modelos experimentais é fator fundamental para modular as respostas imunes exacerbadas, como a encontrada na hipersensibilidade tipo I.

O período neonatal é geralmente caracterizado pela incapacidade do sistema imune gerar respostas vigorosas o que acaba levando a uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de infecções virais e bacterianas. Os neonatos são relativamente imaturos ao nascimento em relação a vários componentes da resposta inflamatória, à capacidade de exibirem respostas imunológicas inata e adaptativas, à secreção de citocinas e à produção de imunoglobulinas (HOLT; JONES, 2000). Em humanos, a produção de IgG de alótipo distinto ao do materno, ou seja, de origem fetal, pode ser detectada em torno de 12-16 semanas de gestação (NAHMIAS; KOURTIS, 1997). A secreção de IgE pode ser observada no fígado e pulmão fetal em torno de 11 semanas de gestação e no baço em 21 semanas de gestação (MILLER et al., 1973). Após o nascimento, as crianças de 2 anos ou mais apresentam baixa produção de anticorpos, preferencialmente da subclasse IgG2. Este isótipo está relacionado com a resposta a antígenos T independentes, como os polissacarídeos da parede bacteriana (NAHMIAS; KOURTIS, 1997). Esta deficiente produção de anticorpos para lipopolissacárides pode resultar em infecções persistentes e recorrentes em infantis, caracterizando a hipogamaglobulinemia transitória na infância.

A deficiência da resposta neonatal a antígenos T dependentes pode ser resultante de várias razões, seja pela falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação de células T-B, pela diminuída capacidade das células T em regular a expressão de CD40L, ou pela baixa expressão de receptores de moléculas de adesão como LFA-1, LFA-3 e CD2 e moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP). Fatores estes que restringem a apropriada interação entre as células apresentadoras de antígeno e as células T e B (ADKINS, 1999; BONA; BOT, 1997; MARSHALL-CHARKE et al., 2000).

Duas principais subpopulações de linfócitos T foram caracterizadas pelo seu padrão de secreção de citocinas. Os linfócitos Th1 (*T helper 1*) que secretam IL-2 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e os linfócitos Th2 (*T helper 2*) secretores de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (MOSMANN et al., 1986) e IL-13 (McKENZIE et al., 1993; MINTY et al., 1993). Posteriormente, clones preferencialmente secretores de fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-17 ou, mais recentemente, IL-22 foram identificados e denominados por alguns autores como Th3 (WEINER, 1997), Th17 (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006) e Th22 (NOGRALES et al., 2009; DUHEN et al., 2009; TRIFARI et al., 2009), respectivamente. As interleucinas Th1 conduzem a uma resposta mediada por células, ativando macrófagos e aumentando a síntese de IgM, IgG2a e IgG2b. As interleucinas secretadas pelos linfócitos Th2 estimulam a síntese de anticorpos IgG1 e IgE e aumento local e/ou sistêmico de eosinófilos. A troca de imunoglobulinas (*switch*) para IgA é principalmente promovida pelo TGF- $\beta$  (KRAMER et al., 1995). Um fator limitante à resposta imune primária neonatal ao antígeno é a imaturidade das células dendríticas foliculares, as quais são incapazes de formar centros germinativos nos órgãos linfóides secundários e promover a ativação e proliferação dos linfócitos B (PIHLGREN, 2003). Outra explicação para a suscetibilidade a infecções durante o período neonatal é que nesta fase de desenvolvimento os neonatos murinos desenvolvem respostas predominantemente Th2 às imunizações com vírus vivos ou atenuados, em contraste aos adultos que desenvolvem principalmente respostas Th1 (BOT et al., 1997; BOT et al., 1998).

Em camundongos, a predominante resposta Th2 do neonato parece ser decorrente da incapacidade de secreção de citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$ . A deficiente resposta Th1 do neonato pode ser decorrente, dentre outros fatores, da baixa expressão das moléculas CD40L em linfócitos T (MIN et al., 2001), o que causaria uma interação inadequada entre o linfócito e a célula apresentadora de antígeno (APC) não ocorrendo a produção de IL-12

e IFN- $\gamma$  pela APC e linfócito T, respectivamente. Células esplênicas de neonatos, co-cultivadas na presença ou não de células de adultos, produzem baixos níveis de IFN- $\gamma$  após estímulo antígeno específico (ADKINS et al., 2000), seja em linhagens de camundongos suscetíveis para desenvolver uma resposta Th2 (BALB/c) quanto para a resposta Th1 (C57BL/6). Li et al. (2004) demonstraram, utilizando modelo de transferência de células DO11.10 em camundongos, que linfócitos Th1 de neonatos, por apresentarem uma alta expressão antigênica do receptor IL-13R1, são suscetíveis à apoptose induzida por da IL-4. Este mecanismo pode ser um grande obstáculo para o estabelecimento de uma resposta Th1 após exposição no período neonatal. Contudo, foi evidenciado que os neonatos murinos apresentam uma capacidade preservada em desenvolver resposta antígeno-específica do tipo Th1 em determinados sítios imunológicos, tais como os linfonodos (ADKINS et al., 2000). Em contraste, a resposta Th1 de neonatos humanos parece estar preservada, pois a vacinação de neonatos com o bacilo Calmette-Guérin (BCG) não mostra aumento de resposta Th2 e apresenta uma produção predominante de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos CD4+ (VEKEMANS, 2001).

Linfócitos de camundongos com 7 dias de idade, após estímulo antigênico ou independente de TCR, entram mais rapidamente em ciclo celular do que linfócitos de adultos (ADKINS, 2004). Esta proliferação precoce é acompanhada por uma rápida produção de IFN- $\gamma$  e, principalmente, IL-4. Estas observações sugerem um mecanismo compensatório à imaturidade imunológica e ausência de linfócitos de memória no neonato. Na alergia é possível que a tentativa de vacinação em período precoce de vida não seja protetora e desencadeie a sensibilização/exacerbação de futuras respostas alérgicas. Os reconhecidos aeroalérgenos capazes de sensibilizar e provocar reações alérgicas em indivíduos atópicos são os fungos, pólenes, epitélios de cães e gato e os ácaros. Destes últimos podemos destacar o ácaro *Blomia tropicalis* (Bt), de grande importância nas manifestações atópicas na população das regiões tropicais e subtropicais (PIRES et al., 2002; THOMAS et al., 2003). Em estudos brasileiros foi observada uma prevalência de cerca de 80% de positividade em teste cutâneo para Bt em pacientes com dermatite atópica (PIRES et al., 2002; RIZZO et al., 1997). Entretanto, apesar da sua relevância clínica, não existem muitos estudos sobre Bt em modelos experimentais, os quais poderiam contribuir para o esclarecimento de mecanismos e desenvolvimento de medidas profiláticas para as doenças alérgicas.

Nas últimas décadas, tem sido verificado um aumento da prevalência das manifestações atópicas em países industrializados, sobretudo durante a infância, considerando que os neonatos e as crianças são mais suscetíveis aos efeitos de poluentes ambientais do que os adultos (HOLGATE, 1999). Este fato vem despertando grande interesse no estudo de medidas de prevenção do desenvolvimento das reações alérgicas precoces, ou seja, em crianças e adolescentes.

Na asma alérgica e em modelos animais de hipersensibilidade, as evidências sugerem que as citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13, produzidos pelas células T CD4+, exercem um papel central na patogênese da doença alérgica (ROMAGNANI, 2000; WILLS-KARP, 1999). Protocolos experimentais envolvendo potentes adjuvantes de respostas do tipo Th 1, que podem intervir na produção de citocinas do tipo Th2, podem ser vantajosos para o tratamento de alergia. Neste sentido, tem sido descrito que o DNA bacteriano e os oligodeoxinucleotídeos (ODN) contendo a seqüência CpG podem potencializar a produção de citocinas Th1 e exercer um efeito profilático na alergia experimental (KLINE et al., 1998; SEREBRISKY et al., 2000; SUR et al., 1999).

O CpG, um dinucleotídeo citosina-guanina (CG) ligado através de uma ponte de fósforo, está presente no DNA de bactérias, vírus e retrovírus na forma não metilada em proporção vinte vezes maior do que nos vertebrados (HORNER et al., 2001). A estimulação do sistema imune pelo CpG inicia-se pela captura do DNA pela célula. Este processo é independente da presença de seqüências CpG no DNA. Após a maturação endossomal ocorre o reconhecimento do CpG através de um receptor da família *Toll-like*, o TLR9, o qual é recrutado do retículo endoplasmático (TAKEDA; AKIRA, 2005). A ativação do TLR-9 induz uma cascata de sinalização que envolve as moléculas MyD88, IRAK, TRAF-6 e resulta na ativação de MAP quinases e NFκB (BAUER; WAGNER, 2002; HEMMI et al., 2000).

Apesar do TLR-9 ser expresso em apenas algumas populações celulares, como linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides, o CpG-DNA é capaz de influenciar respostas imunes tanto de forma direta como indireta, através das citocinas secretadas. O CpG-DNA, ao ativar células apresentadoras de antígeno (APCs), induz o aumento da atividade microbicida, a expressão de moléculas coestimulatórias e promove a secreção de citocinas IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-12 (STACEY et al., 1996).

O CpG também exerce ação direta sobre os linfócitos B de camundongos adultos, prevenindo a apoptose, estimulando a proliferação policlonal e a secreção de

imunoglobulinas e citocinas, como IL-6, IL-10 e IL-12 (WILD; SUR, 2001). Em camundongos neonatos os linfócitos B são imaturos, mas, apesar da baixa produção de IL-6, o ODN-CpG pode auxiliar na secreção de IgM, possibilitando uma resposta TI-2 (CHELVARAJAN et al., 1999). Os linfócitos B1 CD5<sup>+</sup> desempenham um papel regulatório após a sinalização pelo CpG (ODN-1826) através do TLR-9 (SUN et al., 2005). Esta sinalização induz uma grande produção de IL-10, principalmente no período neonatal, fase em que a quantidade de linfócitos B1 é mais abundante, que pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1.

Liu et al. (2003) mostraram a indução da expressão de RNAm do fator de transcrição T-bet em linfócitos B purificados, em camundongos e humanos, quando estimulados *in vitro* pelo ODN-CpG. O T-bet é um fator de transcrição intimamente ligado à resposta Th1. A expressão de T-bet tem sido descrita em monócitos/macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B. Ele é ativado principalmente pela sinalização de IFN- $\gamma$  e também pelo TLR-9, via sinais de transdução e ativação da transcrição-1 (STAT-1) (LIGHVANI et al., 2001; LIU et al., 2003). Nos linfócitos T induz maior secreção de IFN- $\gamma$  e expressão de receptores para IL-12 (WEIGMANN; NEURATH, 2002), e nos linfócitos B o T-bet é capaz de regular a troca de classes de imunoglobulinas, inibindo a secreção de IgE e IgG1 e aumentando IgG2a, um isótipo relacionado com respostas do padrão Th1 (LIU et al., 2003; PENG et al., 2002).

O CpG influencia os linfócitos T e as células NK são influenciadas indiretamente pela ativação das APCs. O aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e o perfil de secreção de citocinas das APCs induzidos pelo CpG contribuem para uma vigorosa resposta Th1, bem como para respostas citotóxicas. Além disso, linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados expressam RNAm do *Tlr9* e o CpG pode agir diretamente nestas células, promovendo a sobrevivência dos linfócitos T e tornando os linfócitos T efetores refratários à supressão mediada pelas Treg (GELMAN et al., 2004; LaROSA et al., 2007). Ainda não está claro o quanto a supressão de linfócitos Treg pelo CpG poderia favorecer o desenvolvimento de auto-imunidade. De fato, tem sido mostrado que agonistas de TLR podem tanto promover como proteger da auto-imunidade. A sinalização via MyD88 em linfócitos T parece ser importante na geração de linfócitos Th17, os quais desempenham importante papel na auto-imunidade, como mostrado em modelo experimental de doença inflamatória intestinal (FUKATA et al., 2008). Além disso, alguns ligantes de TLR aumentam a produção de auto-anticorpos em modelo murino de auto-imunidade

(FISCHER; EHLERS, 2008). Entretanto, a estimulação de linfócitos B por ligantes de TLR, principalmente via TLR-9, tem um papel protetor em modelo de encefalomielite auto-imune experimental e lúpus eritematoso sistêmico pela produção de IL-10.

Modelos experimentais em neonatos têm sido descritos utilizando agonistas de TLR associados à imunização com toxóide tetânico, vírus do sarampo e hepatite (KOVARIK et al., 1999; JEGERLEHNER et al., 2007). A associação do CpG na imunização de camundongos neonatos parece ser eficiente na indução de resposta Th1, promovendo aumento da secreção de IFN- $\gamma$  e anticorpos IgG2a (BRITO; GOLDONI; SATO, 2009). Em modelo de infecção com *Tacaribe arenavirus*, um patógeno neurotrópico letal em camundongos neonatos, o tratamento com CpG no momento da infecção reduziu a carga viral e a mortalidade dos animais (PEDRAS-VASCONCELOS et al., 2006). Tanto a administração oral e intraperitoneal de CpG promove o controle da infecção com *Cryptosporidium parvum* em camundongos neonatos, aumentando a produção de citocinas e reduzindo a carga parasitária intestinal (BARRIER et al., 2006).

O CpG, pela característica polarização da resposta imune para o tipo Th1, torna-se uma alternativa promissora na regulação de reações alérgicas, considerando que os métodos convencionais de imunoterapia no tratamento de doenças alérgicas e asma requerem um período longo e não são totalmente eficazes em pacientes sensíveis a diversos alérgenos. A administração de múltiplas injeções subcutâneas de alérgenos é difícil e traumática, principalmente na população pediátrica a qual mais se beneficia da imunomodulação (CAMPBELL; DEKRUYFF; UMETSU, 2000). Alguns estudos epidemiológicos indicam que crianças que foram infectadas por vírus ou bactérias apresentam um risco reduzido ao desenvolvimento de doenças atópicas (WILD; SUR, 2001). Isto pode estar relacionado com o DNA-CpG, modulador primário deste efeito, ou por componentes da parede celular do microrganismo.

Tulic et al. (2004) estudaram o efeito da imunoterapia de pacientes com rinite alérgica utilizando o alérgeno conjugado a ODN-CpG. Após 5 meses de tratamento com o alérgeno conjugado ao CpG apresentaram, os indivíduos apresentaram número significativamente menor de eosinófilos e de células positivas para RNAm de *Il4* na mucosa nasal em relação aos indivíduos que receberam placebo. Além disso, os indivíduos tratados tiveram uma redução dos sintomas nasais e pulmonares.

A adição *in vitro* de ODNs em cultura de células de humanos atópicos altera o padrão de secreção de citocinas dos linfócitos T e das células NK para o tipo Th-1 (IL-12 e

IFN- $\gamma$ ) e diminui a síntese de IgE (FUJIEDA et al., 2000). Entretanto, a adição de anticorpos anti-IL-12 e anti-IFN- $\gamma$  nas culturas de células humanas foi capaz de bloquear parcialmente a inibição da produção de IgE induzida pelos ODNs, sugerindo uma via distinta daquelas relacionadas com a secreção destas citocinas. Tem sido reportado que o tratamento com ODN-CpG antes, durante ou no período inicial da sensibilização com conalbumina em camundongos, tem um efeito profilático sobre a inflamação eosinofílica pulmonar (SEREBRISKY et al., 2000). Shirota et al. (2000) demonstraram que o ODN-CpG conjugado com o antígeno através de uma ligação covalente é 100 vezes mais eficaz na prevenção de eosinofilia pulmonar de camundongos do que a co-administração de ODN-CpG com o alérgeno. Esta conjugação aumenta a imunogenicidade, mas diminui a alergenicidade do antígeno por aumentar a eficiência na prevenção de respostas de hipersensibilidade. Em camundongos BALB/c neonatos, apesar da predisposição ao desenvolvimento de respostas Th2, a associação do CpG à imunização sublingual com OVA desnaturada é eficiente na supressão de IgE (HUANG et al., 2008).

A modulação experimental da resposta imune do neonato para o tipo Th1 na imunização a alérgenos pode representar uma importante estratégia no tratamento da hipersensibilidade do tipo I. Diante do potencial modulatório do ODN-CpG, torna-se interessante avaliar sua utilização como adjuvante no desenvolvimento da resposta alérgica em camundongos, bem como avaliar as peculiaridades imunológicas no período neonatal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da associação de oligodeoxinucleotídeos contendo a seqüência CpG na imunização de camundongos neonatos e adultos com ovalbumina (OVA) ou extrato de ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) e avaliar o potencial imunomodulatório *in vitro* do CpG.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) avaliar o efeito do CpG Na imunização de camundongos A/Sn neonatos e adultos com OVA, Bt ou ambos os antígenos na produção de anticorpos e citocinas;
- b) efeito do CpG *in vitro* na ativação e produção de citocinas de linfócitos B;
- c) avaliar a influência do CpG *in vitro* na expressão de moléculas coestimulatórias e produção de citocinas por linfócitos T e na geração de linfócitos Treg após estímulo antigênico.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

#### 3.1.1 *Camundongos*

Camundongos isogênicos A/Sn fêmeas e machos foram utilizados com aproximadamente 8-10 semanas de idade sendo fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A primeira geração das proles, de ambos os sexos, obtida dos acasalamentos realizados entre os animais mencionados acima, foi utilizada com 3 dias. Foram também utilizados camundongos BALB/c transgênicos com TCR específico para OVA (DO11.10) mantidos em situação livre de patógeno específico (SPF) fornecidos pelo Biotério de Instituto Ciências Biomédicas. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### 3.1.2 *Ratos*

Ratos isogênicos Wistar Furth de ambos os sexos, com 3-4 meses de idade foram utilizados para as reações de anafilaxia cutânea passiva.

### 3.2 Antígenos e oligodeoxinucleotídeos

Extrato bruto de ácaro *Blomia tropicalis* (Bt) com 37.650 unidades biológicas por mL (IPI/ASAC, Brasil) e ovalbumina (OVA, fração 5, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para imunização dos animais.

Oligodeoxinucleotídeos (ODN) CpG com fosforotioato, como descrito por Krieg e colaboradores (1995), Shirota e colaboradores (2000) e Chu e colaboradores (1997), sintetizados pela Eurogentec (Herstal, Bélgica) foram inoculados nos animais. Os oligodeoxinucleotídeos utilizados possuem 20 bases contendo 2 seqüências CpG:

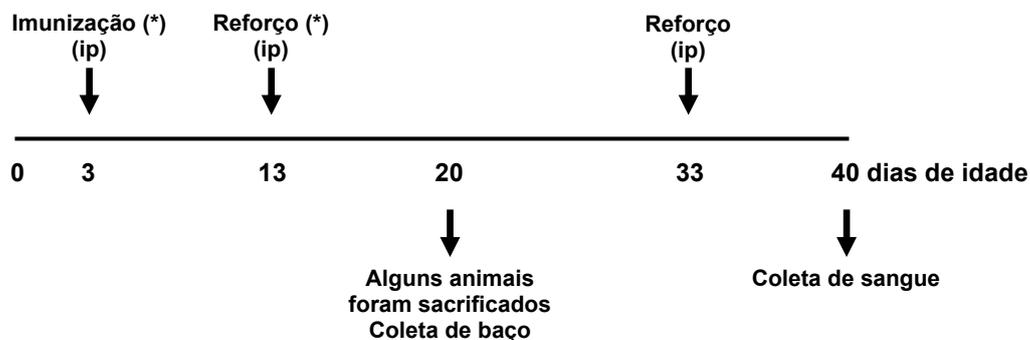
- a) ODN-CpG 1826: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT - 3';
- b) ODN-Controle 1745: 5' - TCC ATG AGC TTC CTG AGT CT - 3' (o sublinhado indica a modificação da seqüência ativa).

### 3.3 Protocolos de imunização com ovalbumina (OVA) ou extrato de *Blomia tropicalis* (Bt) e co-administração de oligodeoxinucleotídeos

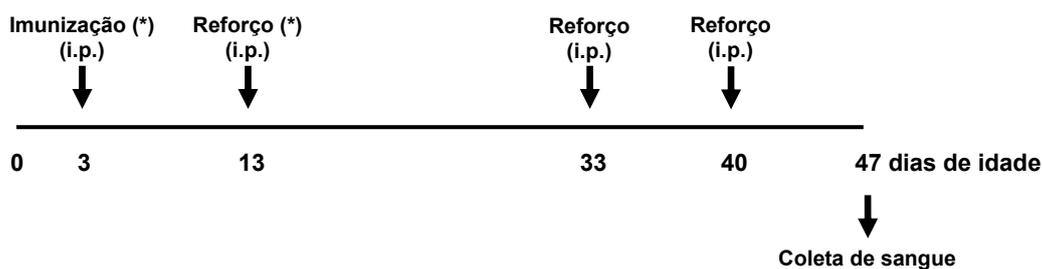
#### 3.3.1 Imunização neonatal

Os camundongos da linhagem AS/n foram imunizados pela via intraperitoneal (ip) aos 3 dias de idade com 10 µg de OVA ou 60 µg de Bt e 0,6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 20 µL de solução salina estéril e reforçados no 10<sup>o</sup> dia pós-imunização (dpi), pela via ip. Alguns animais imunizados com OVA foram sacrificados aos 20 dias de idade para coleta do baço, outros animais receberam o reforço no 30<sup>o</sup> dpi com 100 µg de OVA. Os animais imunizados com Bt foram novamente reforçados no 30<sup>o</sup>, 37<sup>o</sup> dpi com 150 µg de Bt em 200 µL de solução salina estéril. Alguns animais foram reforçados três meses após a imunização. Os camundongos foram sangrados 7 dias depois do último reforço. Grupos de camundongos imunizados com OVA ou Bt receberam 4 µg de CpG (ODN 1826) ou de ODN controle (1745) aos 3 e aos 13 dias de idade.

#### *Protocolo neonatal com OVA*



#### *Protocolo neonatal com Bt*



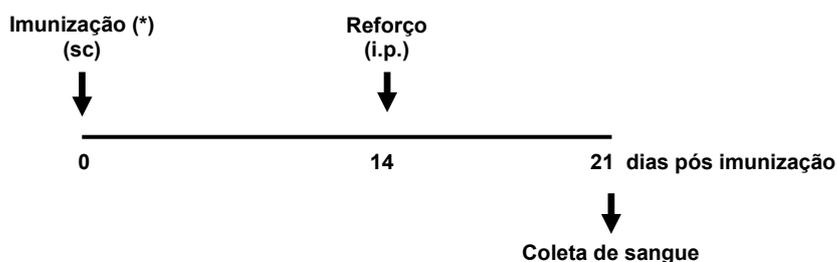
(\*) – associação de ODN-CpG ou ODN-controle em alguns grupos.

### 3.3.2 Imunização de adultos

Camundongos A/Sn fêmeas de 8 a 10 semanas foram imunizados pela via subcutânea com 20 µg do antígeno (Bt ou OVA) e 6,0 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 200 µL de solução salina estéril. Os animais foram reforçados no 14<sup>o</sup> dpi, pela via intraperitoneal, com o respectivo antígeno (20 µg de Bt ou OVA) em 200 µL de solução salina estéril. Grupos de camundongos imunizados que receberam 50 µg de CpG (ODN 1826) ou de ODN controle (1745) no dia zero e no 14<sup>o</sup> dpi foram realizados. Os animais imunizados com OVA foram sangrados no 21<sup>o</sup> dpi enquanto os animais imunizados com Bt receberam um segundo reforço de 100 µg no 21<sup>o</sup> dpi e foram sangrados no 28<sup>o</sup> dpi. O soro foi coletado e estocado a -70 °C. Alguns grupos de camundongos imunizados com OVA receberam um segundo reforço três meses após a imunização e sangrados 7 dias depois.

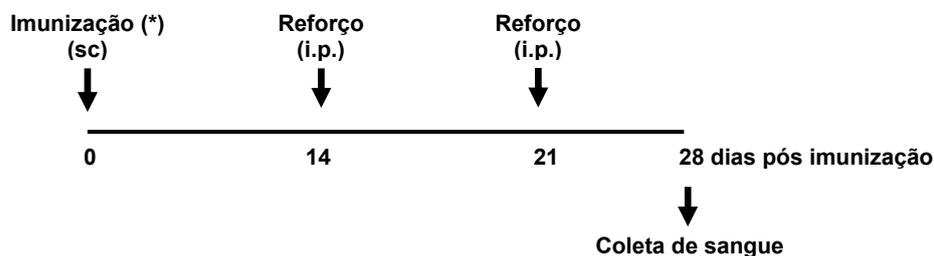
Também foram realizados protocolos de imunização com OVA e Bt associados. Nestes protocolos camundongos A/Sn fêmeas de 8 a 10 semanas foram imunizados pela via subcutânea com 20 µg dos antígenos Bt e OVA e 6,0 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 200 µL de solução salina estéril. Os animais foram reforçados pela via intraperitoneal no 14<sup>o</sup> dpi com 20 µg de Bt e 20 µg OVA, e no 21<sup>o</sup> dpi com 100 µg de Bt e 100 µg de OVA. Alguns grupos de camundongos imunizados receberam 50 µg de CpG (ODN 1826) ou de ODN controle (1745) no dia zero. O soro foi coletado 7 dias depois do último reforço e estocado a -70 °C.

#### ***Protocolo adulto com OVA***



(\*) – associação de ODN-CpG ou ODN-controle em alguns grupos.

### ***Protocolo adulto com Bt ou OVA e Bt associados***



(\*) – associação de ODN-CpG ou ODN-controle em alguns grupos.

### **3.4 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)**

A estimativa de anticorpos IgE anti-OVA e anti-Bt dos soros dos animais imunizados foi realizada pela reação de anafilaxia cutânea passiva (ACP) de acordo com a técnica descrita por Mota e Wong (1969). As diluições das amostras de soros individuais foram inoculadas intradermicamente em volume de 0,1 mL no dorso de ratos, previamente tricotomizados. Após 18 horas, os ratos foram desafiados recebendo pela via intravenosa 500 µg de OVA ou Bt em 1 mL de azul de Evans a 0,5%. Uma hora depois, os ratos foram sacrificados e o título do soro foi considerado como a recíproca da maior diluição do soro apresentando reação acima de 5 mm de diâmetro.

A estimativa de anticorpos IgG1 anafiláticos dos soros dos animais imunizados foi realizada pela reação de ACP em camundongos de acordo com a técnica descrita por Ovary (1958). Alíquotas de soro foram inativadas a 56 °C por uma hora para impedir qualquer atividade anafilática de anticorpos IgE. Um dia após a tricotomia do dorso dos camundongos, diluições de *pool* de 6 animais foram inoculadas intradermicamente em volume de 0,05 mL no dorso dos camundongos. Após 2 horas, os camundongos foram desafiados recebendo pela via intravenosa 250 µg de OVA ou Bt em 0,5 mL de azul de Evans a 0,5%. Trinta minutos depois, os camundongos foram sacrificados e o título do soro foi considerado como a recíproca da maior diluição do soro apresentando reação acima de 5 mm de diâmetro.

### **3.5 Análise de anticorpos anti-OVA, anti-Bt e dosagem de IgE total por ELISA**

Anticorpos específicos a OVA e Bt e dosagem de IgE total foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os orifícios de microplacas de 96 poços (*Half area*, A2, High-binding, Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizados com 5 µg/mL de OVA, 20 µg/mL de Bt ou 3 µg/mL de anticorpos anti-IgE (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,5) e incubados por 1 hora a 37 °C e por 18 horas a 4 °C. As placas, após lavagens em tampão PBS foram bloqueadas com PBS contendo 1% de SAB (Soro Albumina Bovina - Sigma, St Louis, Mo, EUA) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com diversas diluições seriadas dos soros ou com diferentes concentrações da curva de IgE por 1 hora a 37 °C e por 18 horas a 4 °C. Após esta etapa, foram lavadas novamente em PBS-0,05% Tween 20 e incubadas com anticorpo biotinizado anti-γ1, anti-γ2a ou anti-ε (Southern Biotechnology Associates) e incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida, depois de novas lavagens, foi adicionado às placas estreptoavidina peroxidase (Sigma) e incubada por 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 40 µL de tetrametilbenzidina (TMB - Sigma) por aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente (TA). A reação foi neutralizada pela adição de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram expressos como título de anticorpos (Log) e foram obtidos pela interpolação dos valores de densidade óptica (D.O.) obtidos de um *pool* de soro de camundongos imunizados com OVA ou Bt, ou com a curva padrão de IgE.

### **3.6 Obtenção de células mononucleares esplênicas dos animais**

Os baços dos camundongos foram macerados em placa de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 com 40 µg/L de gentamicina. As suspensões das células mononucleares foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 2000 rpm através de gradiente de Ficoll Hypaque (densidade - 1095). As células obtidas foram contadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e a concentração foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripán.

### 3.7 Purificação e cultura de linfócitos B

Linfócitos B foram purificados a partir de *pool* de esplenócitos de camundongos por seleção negativa por microesferas magnéticas contendo anticorpos monoclonais anti-CD43, CD-4 e Ter-119 conjugados à biotina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As células marcadas foram aderidas a microesferas marcadas com anti-biotina, as quais ficaram retidas na coluna magnética. A pureza foi avaliada por citometria de fluxo, obtendo-se enriquecimento superior a 90% de linfócitos B.

### 3.8 Cultura celular

Células esplênicas ( $4 \times 10^6$  células/mL) foram diluídas em meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brasil) e distribuídas em microplacas de 48 poços (Costar) em volume de 500  $\mu$ L. Para cultura de esplenócitos de camundongos DO11.10 foram utilizados 100  $\mu$ g/mL de OVA e ODN-CpG ou ODN-controle nas concentrações de 0,1, 1 ou 10  $\mu$ g/mL. As células foram incubadas por até 72 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo.

Para os ensaios de expressão de RNAm IFN- $\gamma$  e t-bet, as células B purificadas ( $4 \times 10^6$  células/500 $\mu$ l) foram distribuídas em microplacas de 48 poços (Costar) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após diferentes períodos (30, 90 e 180 minutos) de estímulo com 10  $\mu$ g/mL de ODN-CpG e/ou anticorpos anti-IgM (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) as células foram congeladas a -20 °C em solução de *RNA later* (Sigma) para posterior análise por PCR.

### 3.9 Cultura celular para obtenção de sobrenadante

As concentrações das suspensões de células esplênicas foram ajustadas para  $8 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI enriquecido com 10% de SFB (Cultilab) e 100  $\mu$ L foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Costar) na presença de OVA (200  $\mu$ g/mL), anticorpos anti-CD3 (2  $\mu$ g/mL, Pharmingen) ou LPS (50  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37 °C e 5%

de CO<sub>2</sub>. Após incubações de 24 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos a 10 °C, aliquotados e congelados a -70 °C para posterior dosagem de citocinas.

### **3.10 Avaliação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e MCP-1**

A determinação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-12p40 nos sobrenadantes de cultura celular foi realizada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (PharMingen, OptEIA).

Resumidamente, as microplacas de 96 poços (Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4, anti-IL-10 ou anti-IL-12p40 diluídos em TCB (0,1 M, pH 9,8) e incubados por 18 horas à temperatura ambiente. Após um ciclo de 4-5 lavagens em tampão PBS-Tween 20 (PBS, 0,05% de Tween-20, pH 7.6) as placas foram bloqueadas com solução de PBS/10% SFB (Cultilab) por 1 hora à TA. Em seguida, após novas lavagens, foram adicionadas aos poços sobrenadantes de cultura e as respectivas citocinas recombinantes utilizadas como curva padrão e incubadas por um período de 2 horas à TA. Ao término deste período os respectivos anticorpos biotinizados foram incubados por 1 hora à TA. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com avidina peroxidase (Sigma) por 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 50  $\mu$ l de TMB (Calbiochem) aproximadamente por 20 minutos à TA. A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) e a leitura será realizada em leitor de microplaca de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA) em 450nm. A sensibilidade do método para IL-4 foi de 3,2 pg/mL, para IL-10 foi de 125 pg/mL, IFN- $\gamma$  foi de 7,8 pg/mL e para IL-12 p40 foi de 12,5 pg/mL.

A determinação das citocinas IL-6, IL-10 e MCP-1 no sobrenadante de cultura de linfócitos B purificados foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o kit *mouse inflammation* (BD PharMingen, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram diluídas e incubadas com esferas de captura e anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE) por duas horas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas por centrifugação a 500g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* formado ressuspensionado em tampão de lavagem para a análise no citômetro BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA

USA). Os limites de detecção do kit foram de: IL-6: 5 pg/mL; IL-10: 17,5 pg/mL e MCP-1: 52,7 pg/mL.

### 3.11 Citometria de fluxo

Anticorpos monoclonais anti-B220, anti-CD4, anti-CD44, anti-ICOS, anti-CTLA-4, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86 e anti-TLR-9 conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) serão utilizados com seus respectivos controles isotípicos (PharMingen, San Diego, CA). Células ( $5,0 \times 10^5$ ) foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com os anticorpos monoclonais marcados diluídos em PBS contendo 1,0% de SAB e 0,1% de azida sódica. Para análise da expressão de TLR-9, após a marcação com anti-B220-FITC, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma) por 10 minutos a 4 °C e lavadas com tampão PBS/1% BSA. Posteriormente, as células foram incubadas com anti-TLR-9-PE em tampão PBS/0,5% Saponina por 30 minutos a 4 °C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução isotônica e analisadas no aparelho de citometria de fluxo (Coulter- Epics XL) com aquisição de 10.000 eventos dentro da região de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou de linfócitos B (B220<sup>+</sup>).

### 3.12 Reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real (Real-Time PCR)

O RNA total de linfócitos B purificados foi extraído com kit QIAmp RNA blood (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizada a metodologia do kit *Sensiscript Reverse Transcriptase* (Qiagen).

A reação de amplificação em tempo real foi realizada com 1 a 10 µg amostra de cDNA, 25 µL da solução *Platinum SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 1 µL de *ROX Reference Dye*, 12 µL de água destilada estéril e 10 µM dos *primers*. A síntese dos *primers* para T-bet (5'- GAT CGT CCT GCA GTC TCT CC - 3'; 5'- AAC TGT GTT CCC GAG GTG TC-3') e IFN-γ (5' - CAT GGC TGT TTC TGG CTG TTA CTG 3'; 5'-GCC AGT TCC TCC AGA TAT CCA AGA - 3') e do controle interno β-actina (5'-

GCC TTC CTT CTT GGG TAT GGA ATC – 3'; 5' - ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT CAT – 3') foi realizada pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 95 °C e 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C cada, em termociclador iCycler (BioRad, EUA). Os dados obtidos foram interpretados com o programa iCycler iQ Program (BioRad). Os resultados representam a razão entre o CT (*cycle threshold*) gene de interesse (IFN- $\gamma$  e t-bet) e o CT do gene controle ( $\beta$ -actina) conforme descrito por De Lemos et al. (2005).

### **3.13 Análise estatística**

Para comparação dos grupos estudados foi utilizada análise de variância (ANOVA) com teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, sendo considerado significativo quando  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

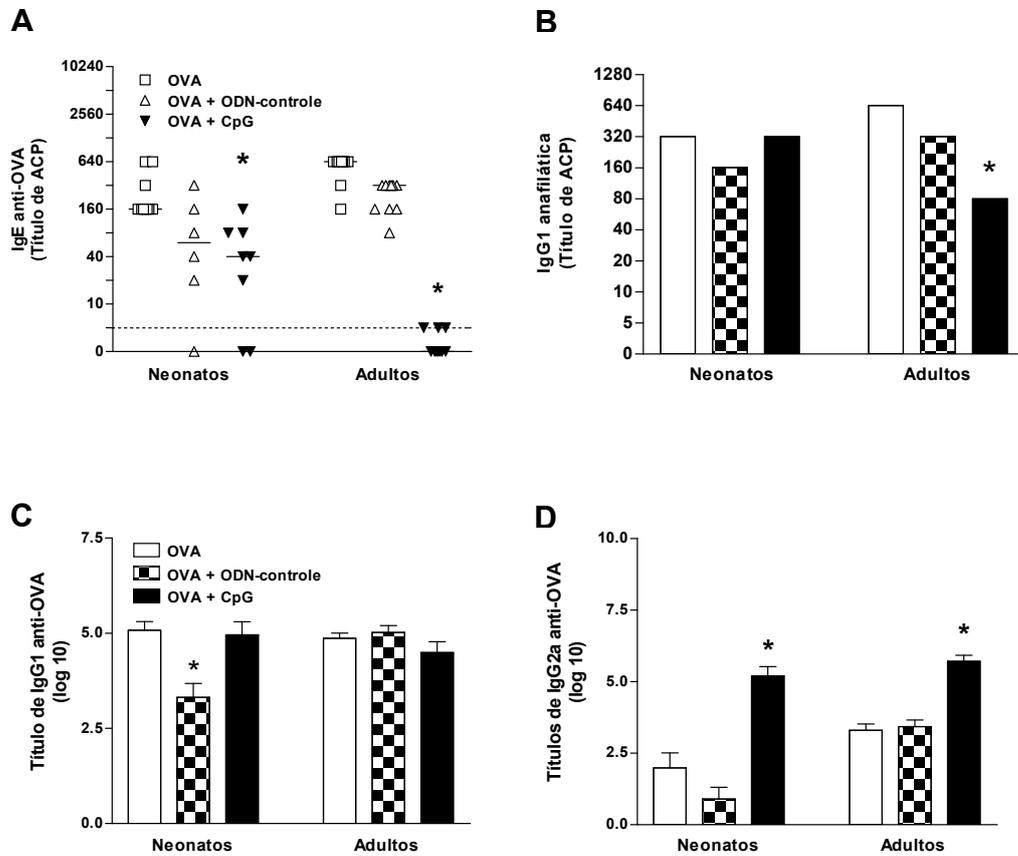
### 4.1 Associação de ODN-CpG na imunização com ovalbumina de camundongos neonatos e adultos diminui a produção de anticorpos IgE

Para avaliarmos o efeito da co-administração de ODN-CpG na imunização com OVA em camundongos A/Sn adultos, grupos de animais de 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com OVA associada ao ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN). Os animais foram reforçados aos 14 dias pós-imunização e sangrados no 21º dia pós-imunização.

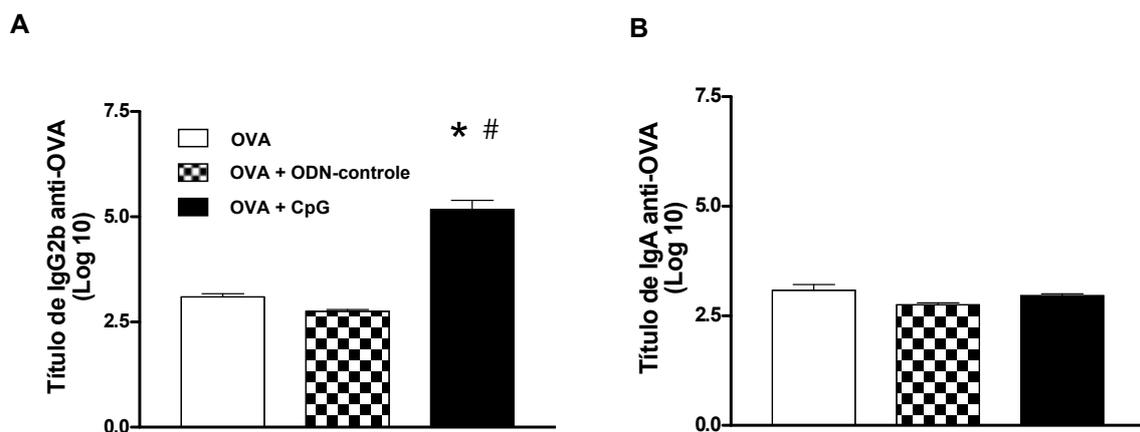
A figura 1 mostra que a administração de ODN-CpG na imunização com OVA diminuiu a produção de anticorpos IgE, de neonatos e adultos, em relação aos grupos apenas imunizados com OVA (Fig. 1A). Embora a imunização tenha proporcionado uma menor produção de IgE nos camundongos neonatos, o efeito do CpG na produção de anticorpos IgE anafiláticos de camundongos adultos foi mais acentuado, podendo observar também menores níveis de IgG1 anti-OVA anafilática (Fig. 1B), analisada por reação de anafilaxia cutânea passiva. Em camundongos, a IgG1 anafilática é positivamente regulada pela IL-4 e aumenta a eosinofilia pulmonar e hiperreatividade brônquica (FAQUIM-MAURO et al., 1999). Em contraste, anticorpos IgG1 anti-OVA detectados por ELISA não diferiu em nenhuma das idades (Fig. 1C). A associação do CpG foi capaz de aumentar a produção de IgG2a anti-OVA em camundongos neonatos em níveis comparáveis àqueles observados em camundongos adultos que receberam ODN-CpG na imunização (Fig. 1D).

Os níveis de anticorpos IgG2b dos grupos de camundongos imunizados com OVA que receberam ODN-CpG aumentaram significativamente em relação ao grupo que recebeu apenas OVA e ao grupo OVA+ODN-controle (Fig. 2A). Por outro lado, os animais imunizados com OVA que receberam ODN-controle mostraram uma diminuição nos níveis de anticorpos IgG2b (Fig. 2A).

Os resultados mostram que o ODN-CpG utilizado em associação ao antígeno é capaz de diminuir a produção de anticorpos IgE, um isótipo dependente de citocinas Th<sub>2</sub>. O aumento na produção de anticorpos IgG2a induzido pelo ODN-CpG sugere um efeito adjuvante na indução de citocinas do tipo Th1.



**Fig. 1:** Efeito dos oligodeoxinucleotídeos CpG na produção de anticorpos de animais neonatos e adultos imunizados com OVA. Camundongos com 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com OVA e  $Al(OH)_3$  e reforçados aos 14 dias pós-imunização (dpi) com OVA. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com OVA e reforçados aos 10 e 30 dias pós imunização (dpi). Grupos foram imunizados com OVA associada ao ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN) na imunização e reforço. Os animais foram sangrados 7 dias após o último reforço e os soros obtidos foram analisados individualmente por teste de anafilaxia cutânea passiva (ACP) para determinação de anticorpos IgE (A) e IgG1 anafiláticos (B), e por ELISA para determinação dos títulos de IgG1 (C) e IgG2a (D) anti-OVA. Os traços representam o valor da mediana, as barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA.



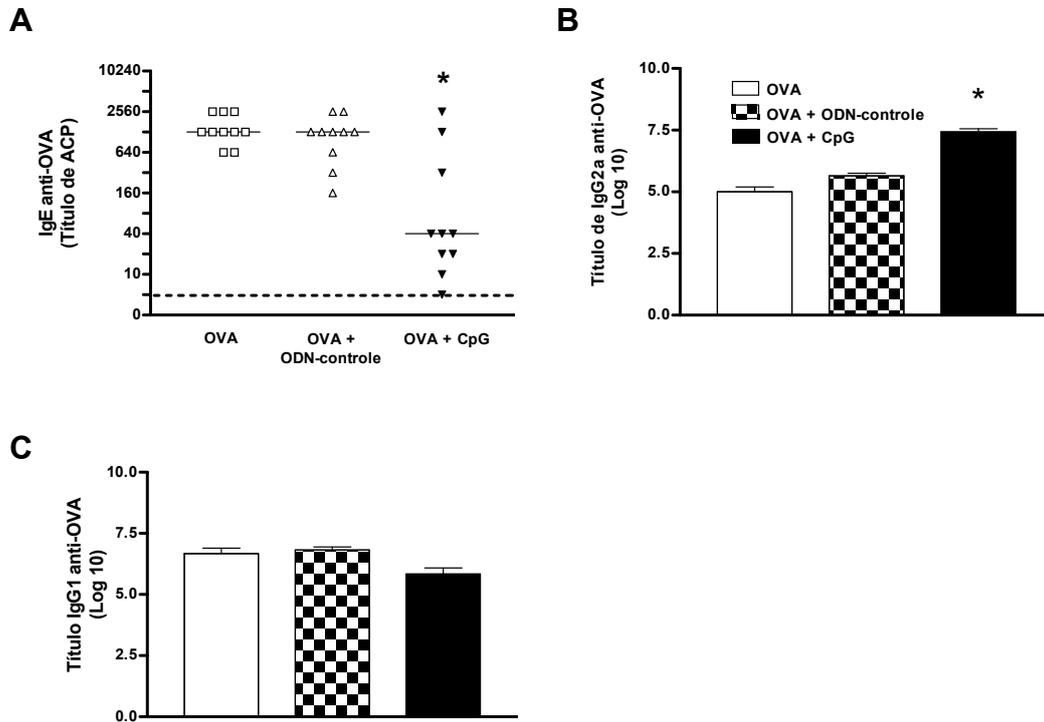
**Fig. 2:** Efeito do ODN-CpG na produção das subclasses de anticorpos IgG2b e IgA anti-OVA de animais neonatos imunizados com OVA. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com OVA e reforçados aos 10 e 30 dias pós imunização (dpi). Grupos de camundongos foram imunizados com OVA associada ao ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-control (OVA+ODN) e nos reforços. Os soros obtidos no 37<sup>o</sup> dpi foram analisados individualmente por ACP para determinação dos títulos de IgG2b (A) e IgA (B) anti-OVA. As barras representam a media e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA; # $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA+ODN.

## **4.2 Associação do ODN-CpG na imunização com OVA diminui a produção de anticorpos IgE e aumenta IgG2a na resposta secundária em camundongos adultos**

Os resultados observados sugerem uma maior eficiência do ODN-CpG na diminuição da resposta IgE na imunização de camundongos adultos em comparação com os camundongos neonatos. Grupos de camundongos de 8 a 10 semanas de idade foram inicialmente imunizados com OVA associada ao ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN) e reforçados 14 dias pós imunização (dpi). Para avaliarmos se a modulação perdura com a resposta secundária ao antígeno, após três meses, os animais receberam um segundo reforço somente com OVA e foram sangrados após 7 dias.

Os níveis de anticorpos IgE permaneceram diminuídos no grupo que recebeu ODN-CpG associado à OVA em relação aos demais grupos (Fig. 3A). Contudo, após três meses da imunização, os níveis de anticorpos IgE do grupo imunizado com OVA+CpG aumentaram significativamente em relação à resposta primária (Fig. 1A).

Similarmente aos resultados obtidos na resposta no 21<sup>o</sup> dpi, o grupo que recebeu ODN-CpG mostrou níveis aumentados de IgG2a anti-OVA em relação aos demais grupos. Além disto, foi observado um aumento dos títulos de anticorpos IgG2a no grupo que recebeu ODN-controle em relação ao grupo imunizado com OVA (Fig. 3B). Os títulos dos anticorpos IgG1 anti-OVA foram similares entre os grupos (Fig. 3C).



**Fig. 3:** Efeito do ODN-CpG após 3 meses da imunização com OVA na produção de anticorpos. Camundongos com 8 a 10 semanas de idade foram imunizados e reforçados aos 14 dias pós-imunização. Grupos receberam ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-control (OVA+ODN) na imunização e reforço. Os animais receberam novo reforço com OVA três meses após a imunização e foram sangrados 7 dias depois. Os soros obtidos foram analisados individualmente por ACP para determinação de anticorpos IgE (A) ou por ELISA para determinação dos títulos de IgG2a (B) e IgG1 (C) anti-OVA. Os traços representam o valor da mediana, as barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA.

### 4.3 Produção de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ e IL-12 de camundongos neonatos imunizados com OVA associada ao ODN-CpG ou ODN-controle

Prosseguindo com as análises do efeito do ODN-CpG na imunização neonatal com OVA, avaliamos a produção *in vitro* de citocinas induzida por vários estímulos. Os animais foram imunizados aos três dias de idade com OVA associada ao ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN). Os camundongos foram reforçados aos 10 dias pós-imunização e sacrificados 7 dias depois. Os esplenócitos foram cultivados com anticorpos anti-CD3, lipopolissacáride (LPS) ou OVA. Os sobrenadantes foram coletados após 24 (anti-CD3 e LPS) ou 72 horas (LPS e OVA) e a produção de citocinas foi avaliada por ELISA.

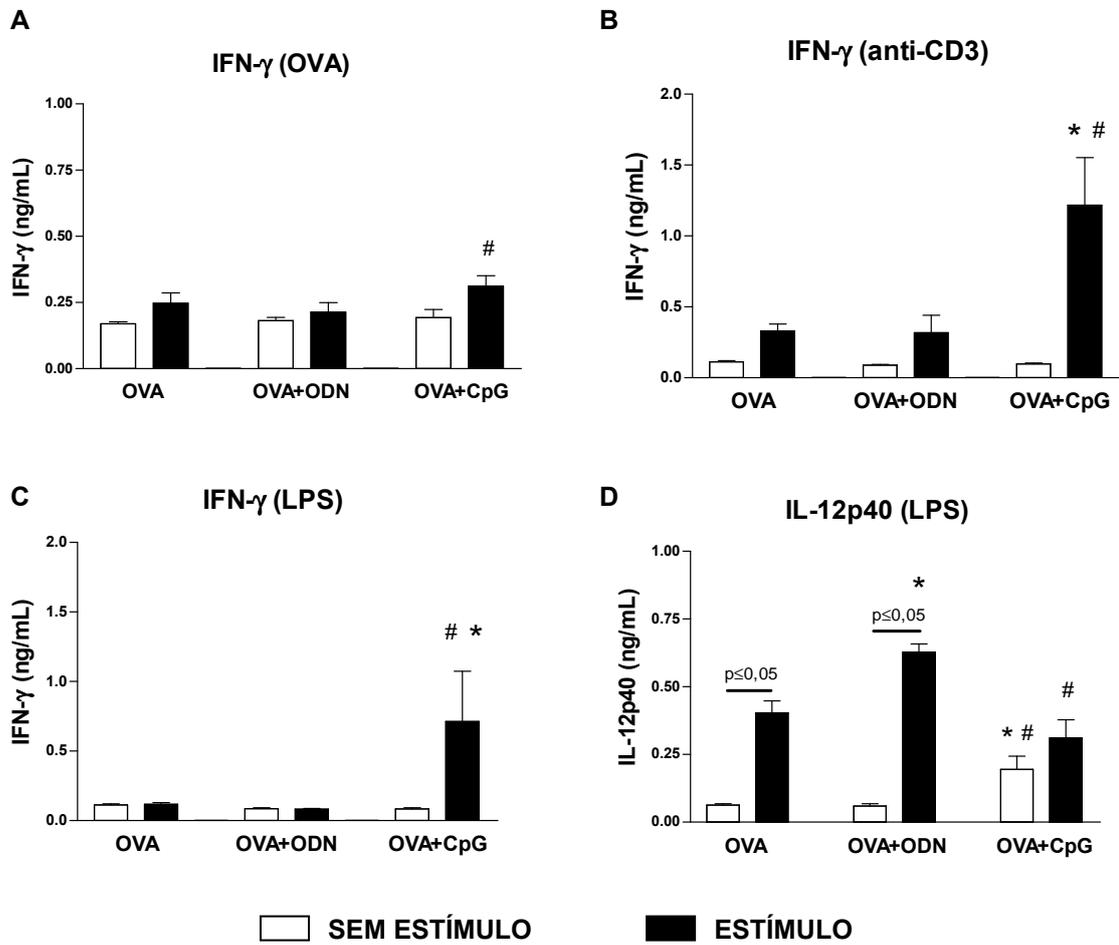
A produção de IFN- $\gamma$  nas culturas de células dos animais que receberam ODN-CpG foi mais elevada, após estímulo antígeno específico com OVA (Fig. 4A) bem como com estímulos policlonais como anti-CD3 (Fig. 4B) e LPS (Fig. 4C), quando comparados aos grupos controles.

O próximo passo foi investigar se o aumento da produção de IFN- $\gamma$  poderia ser devido a uma maior produção de IL-12. Para isso, analisamos a produção de IL-12p40 e IL-12p70 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos estimulados com LPS. O grupo que recebeu CpG teve níveis basais de IL-12p40 mais elevados em relação aos outros grupos, mas em níveis similares ao grupo OVA e inferiores ao detectado no grupo OVA+ODN após estímulo com LPS (Fig. 4D). Além disso, o grupo OVA+ODN apresentou maior produção de IL-12p40 em relação ao grupo OVA. Não foi detectável a IL-12p70 em nenhum dos sobrenadantes de cultura avaliados após 24 horas de estímulo com LPS.

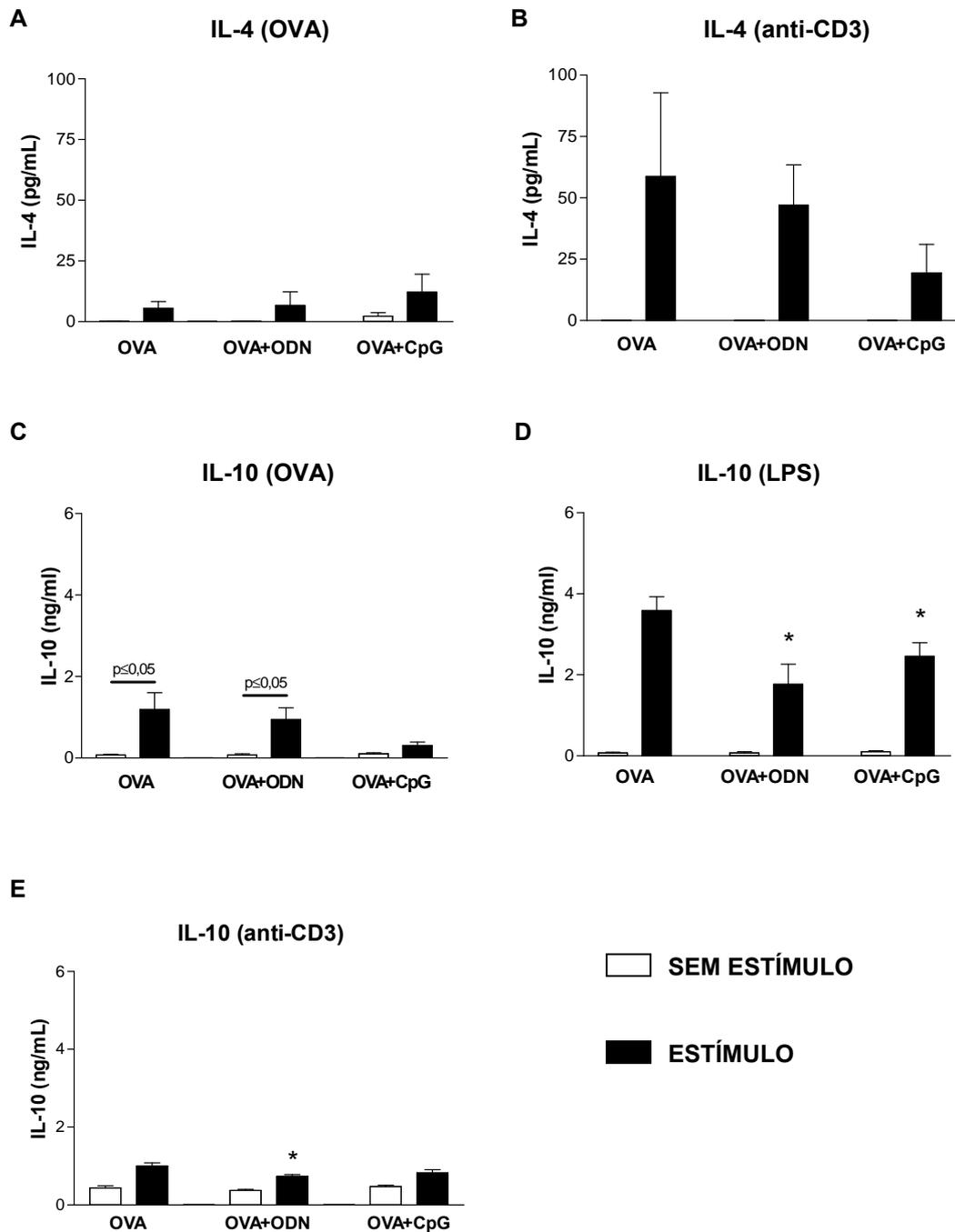
A produção de IL-4 por esplenócitos estimulados com antígeno específico (Fig. 6A) ou com anticorpos anti-CD3 (Fig. 5B) não diferiu entre os grupos de animais analisados.

No grupo que recebeu CpG, a produção de IL-10 com estímulo específico foi semelhante aos níveis basais (Fig. 5C), diferente dos outros grupos que mostram um aumento na produção de IL-10 quando estimulados com OVA. A produção de IL-10 induzida por LPS dos camundongos do grupo OVA+CpG e OVA+ODN foi significativamente diminuída em relação ao grupo OVA (Fig. 5D).

Estes resultados mostram que, em paralelo à inibição da resposta IgE, há indução de uma resposta de padrão Th1 pelo CpG na imunização neonatal com OVA, caracterizada pelo aumento da produção de IFN- $\gamma$  e IgG2a.



**Fig. 4:** Efeito do ODN-CpG na imunização neonatal com OVA na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com OVA e reforçados aos 10 dias pós imunização (dpi). Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN) na imunização e reforço com OVA. Os animais foram sacrificados aos 20 dias de idade e os esplenócitos foram cultivados com 200  $\mu$ g/mL OVA por 72 horas (A) ou com 1  $\mu$ g/mL de anticorpos anti-CD3 (B) ou 50  $\mu$ g/mL de LPS (C e D) por 24 horas para obtenção dos sobrenadantes serem analisados por ELISA (n= 5-9/grupo). As barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA; # $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA+ODN.



**Fig. 5:** Efeito do ODN-CpG na imunização neonatal com OVA na produção das citocinas IL-4 e IL-10. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com OVA e reforçados aos 10 dias pós imunização (dpi). Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN) na imunização e reforço com OVA. Os animais foram sacrificados aos 20 dias de idade e os esplenócitos foram cultivados com 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 por 24 horas (B, D) ou com 200 µg/mL de OVA (A, C) ou 50 µg/mL de LPS (D) por 72 horas para obtenção dos sobrenadantes a serem analisados por ELISA (n= 5-9/grupo). As barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA.

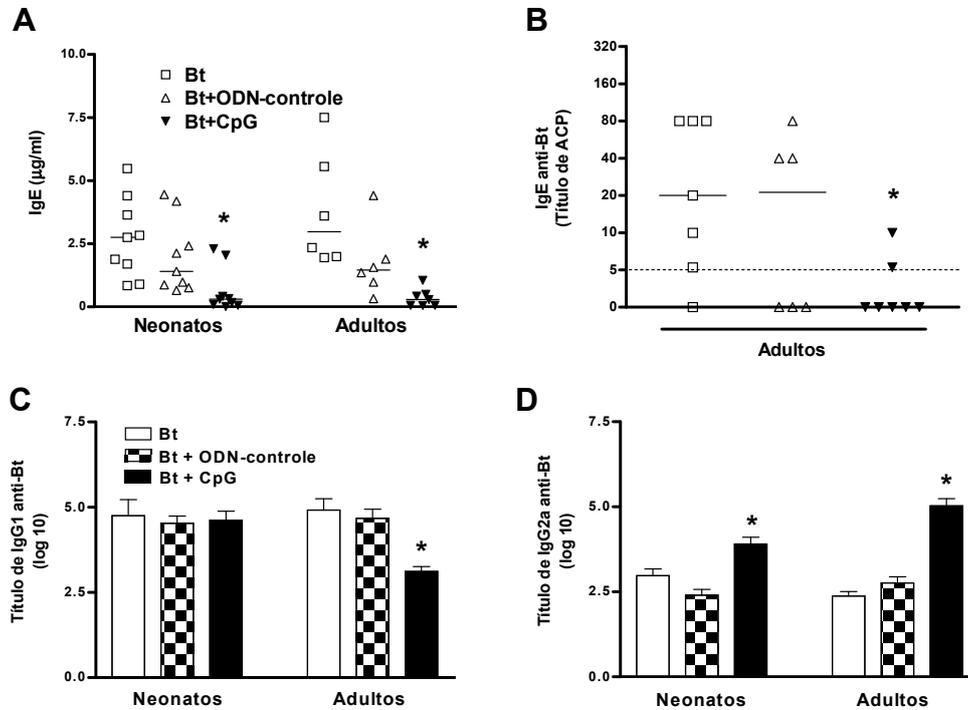
#### **4.4 Associação do ODN-CpG diminui os níveis de IgE e aumenta IgG2a na imunização de camundongos com extrato de ácaro *Blomia tropicalis***

Para avaliarmos o efeito do ODN-CpG associado à imunização com outro alérgeno, realizamos a análise com o ácaro *Blomia tropicalis* (Bt). Grupos de animais de 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com Bt e co-administrados ou não de ODN-CpG (Bt + CpG) ou ODN-controle (Bt + ODN). Os animais foram reforçados somente com Bt aos 14 e 21 dias após a imunização e sangrados no 28º dia pós-imunização. No protocolo de imunização neonatal, grupos de animais com 3 dias de idade foram imunizados com Bt associado ao ODN-CpG (Bt+CpG) ou ODN-controle (Bt+ODN). Os animais foram reforçados com Bt aos 10, 30 e 37 dias pós-imunização, recebendo ODN no primeiro reforço, e sangrados aos 47 dias de idade.

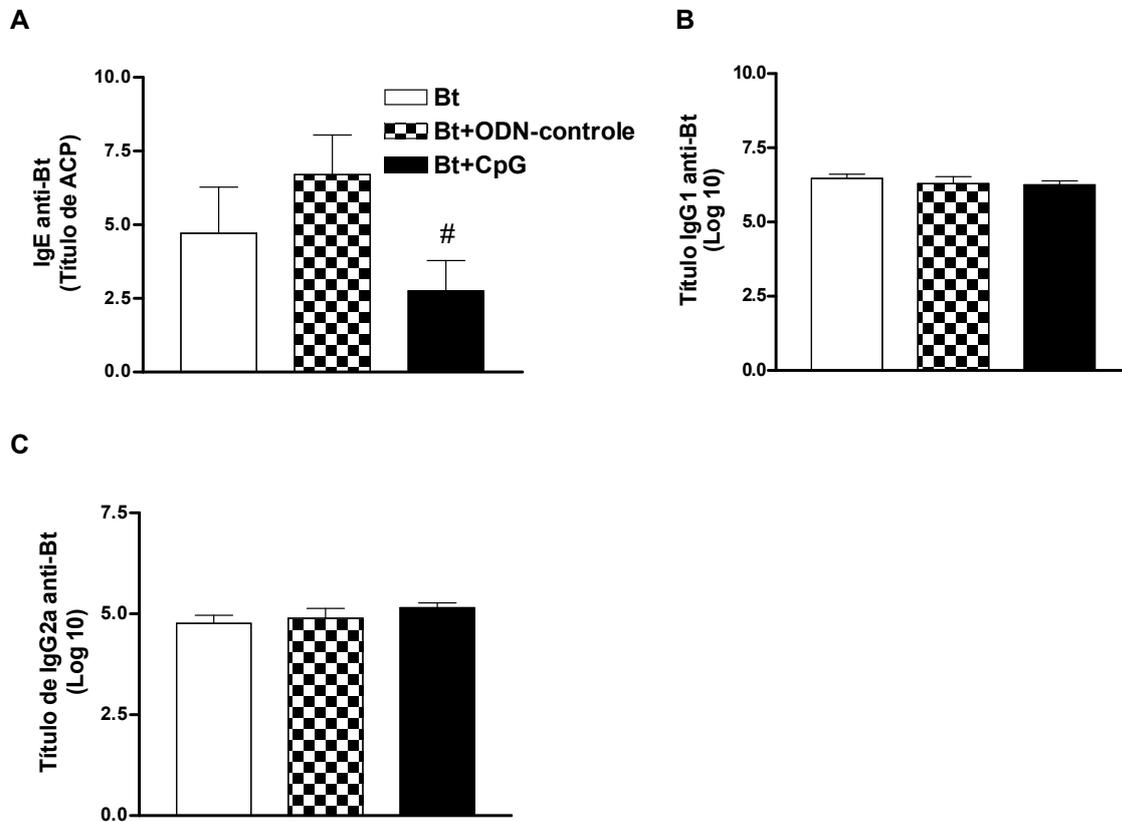
Para estabelecer o protocolo de imunização neonatal com Bt foi necessário testar variadas concentrações de antígeno para indução da resposta humoral. Foi necessário aumentar a dose de antígeno em relação ao protocolo estabelecido para os camundongos adultos. Neste protocolo de imunização não observamos produção de anticorpos IgE anti-Bt, portanto avaliamos os níveis séricos de IgE total. Como observado nos animais imunizados com OVA, houve uma significativa diminuição nos níveis de anticorpos IgE anti-Bt no grupo que recebeu ODN-CpG associado ao Bt, que foram detectáveis em menos de 30% dos animais, em relação à frequência acima de 85% no grupo imunizado apenas com Bt (Fig. 6A). Também foi observado um menor nível de IgE anafiláticas nos camundongos adultos que receberam o ODN-CpG (Fig. 6B). Além disto, diferente da imunização com OVA, os animais adultos que receberam ODN-CpG (Bt + CpG) apresentaram títulos diminuídos de IgG1 anti-Bt em relação aos animais imunizados apenas com Bt ou Bt associado ao ODN-controle (Fig. 6C). A associação de CpG promoveu um aumento significativo de anticorpos IgG2a em relação ao grupo controle (Fig. 6C).

Como não foi detectável, aos 47 dias de idade, a produção de anticorpos IgE anti-Bt, foi realizada uma avaliação após três meses da imunização. Neste período, os animais que receberam ODN-CpG no período neonatal apresentaram níveis de IgE anti-Bt significativamente diminuídos em relação ao grupo que recebeu o ODN-controle (Fig. 7A). Entretanto, a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a foi semelhante entre os três grupos (Fig. 7B e 7C).

Os resultados mostram que a utilização de ODN-CpG em associação ao extrato de *Blomia tropicalis* é capaz de diminuir a produção de anticorpos IgE e estimular a produção de IgG2a na imunização neonatal.



**Fig. 6:** Efeito do ODN-CpG na imunização com Bt de camundongos neonatos e adultos na produção de anticorpos. Camundongos com 8 a 10 semanas de idade foram imunizados e reforçados aos 14 e 21 dias pós-imunização. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com Bt e reforçados aos 10, 30 e 37 dias pós imunização (dpi) com Bt. Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (Bt + CpG) ou ODN-control (Bt + ODN) na imunização. Os animais foram sangrados 7 dias após o último reforço. Os soros obtidos foram analisados individualmente por ACP para determinação de anticorpos IgE anti-Bt (A) ou por ELISA para determinação dos títulos de IgE total (B), IgG1 (C) e IgG2a (D) anti-Bt. Os traços representam o valor da mediana. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Bt.



**Fig. 7:** Efeito do ODN-CpG imunização neonatal com Bt na produção de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a após três meses. Camundongos com 3 dias de idade foram imunizados com Bt e reforçados aos 10, 30 e 37 dias pós imunização (dpi) com Bt. Os animais receberam novo reforço com Bt 3 meses após a imunização e foram sangrados 7 dias após o último reforço. Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (Bt+CpG) ou ODN-control (Bt+ODN) na imunização e no primeiro reforço. Os soros obtidos foram analisados individualmente por ACP para determinação de anticorpos IgE (A) e por ELISA para determinação de anticorpos IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-Bt. Os traços representam o valor da mediana. # $p \leq 0,05$  em relação ao grupo Bt+ODN.

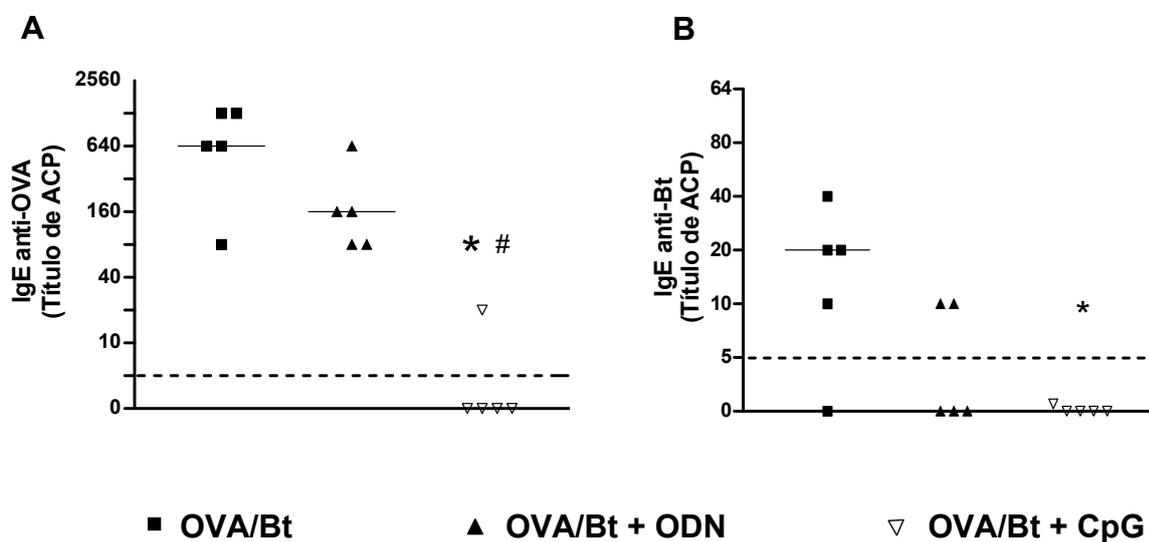
#### **4.5 Efeito do ODN-CpG na imunização de camundongos adultos com OVA e Bt na produção de anticorpos**

Nosso próximo passo foi analisar o potencial modulatório do ODN-CpG na imunização simultânea com dois alérgenos distintos. Para realizarmos esta investigação, grupos de animais de 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com OVA e Bt associados ao ODN-CpG (Bt + CpG) ou ODN-controle (Bt + ODN). Os animais foram reforçados com OVA e Bt aos 14 e 21 dias pós-imunização e sangrados no 28º dia pós-imunização.

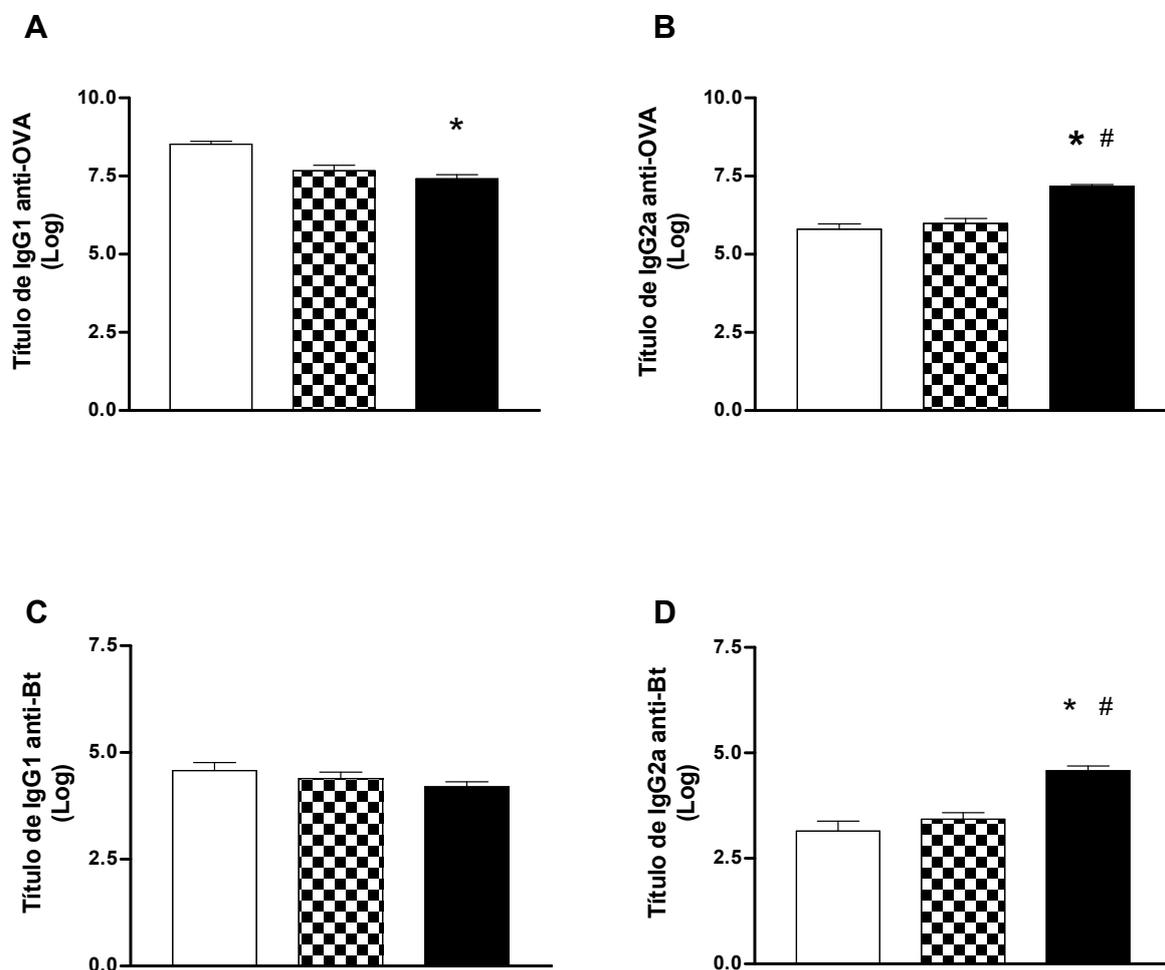
Como podemos observar na Figura 8, a associação de ODN-CpG na imunização com dois alérgenos foi capaz de diminuir a produção de anticorpos IgE anti-OVA (Fig. 8A), bem como a produção de anticorpos IgE anti-Bt (Fig. 8B). Comparando-se os protocolos de imunização realizados somente com OVA ou com Bt, nota-se que o efeito inibitório do ODN-CpG na produção de IgE foi semelhante ao dos animais imunizados com dois alérgenos.

Além disso, ao avaliarmos a produção de anticorpos IgG anti-OVA, observamos uma diminuição dos níveis de anticorpos IgG1 (Fig. 9A) e aumento dos níveis de anticorpos IgG2a (Fig. 9B). Apesar dos níveis de IgG2a anti-Bt serem inferiores aos de anti-OVA, um aumento da produção de IgG2a foi detectável com a associação do CpG na imunização dos animais (Fig. 9D).

Estes resultados mostram que a associação de CpG na imunização simultânea com dois alérgenos distintos, OVA e Bt, também é capaz de interferir na resposta a ambos os antígenos de maneira semelhante à imunização realizada separadamente.



**Fig. 8:** Efeito do ODN-CpG na produção de anticorpos IgE de animais adultos na imunização simultânea de OVA e Bt. Camundongos com 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com OVA e Bt e reforçados com ambos os antígenos aos 14 e 21 dias pós-imunização. Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (OVA/Bt + CpG) ou ODN-controle (OVA/Bt + ODN) na imunização. Os animais foram sangrados no 28<sup>o</sup> dia pós-imunização. Os soros obtidos foram analisados individualmente por ACP para determinação de anticorpos IgE anti-OVA (A) e IgE anti-Bt (B). Os traços representam o valor da mediana. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA/Bt; # $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA/Bt + ODN.



**Fig. 9:** Efeito do ODN-CpG na produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA de animais adultos na imunização simultânea de OVA e Bt. Camundongos com 8 a 10 semanas de idade foram imunizados com OVA e Bt e reforçados com ambos os antígenos aos 14 e 21 dias pós-imunização. Grupos de camundongos receberam ODN-CpG (OVA/Bt + CpG) ou ODN-controle (OVA/Bt + ODN) na imunização. Os animais foram sangrados no 28º dia pós-imunização. Os soros obtidos foram analisados individualmente por ELISA para determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA (A e B) e anti-Bt (C e D). As barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA/Bt; # $p \leq 0,05$  em relação ao grupo OVA/Bt + ODN.

#### **4.6 Linfócitos T de camundongos neonatos apresentam maior expressão de moléculas B7 após estímulo antigênico do que células de camundongos adultos**

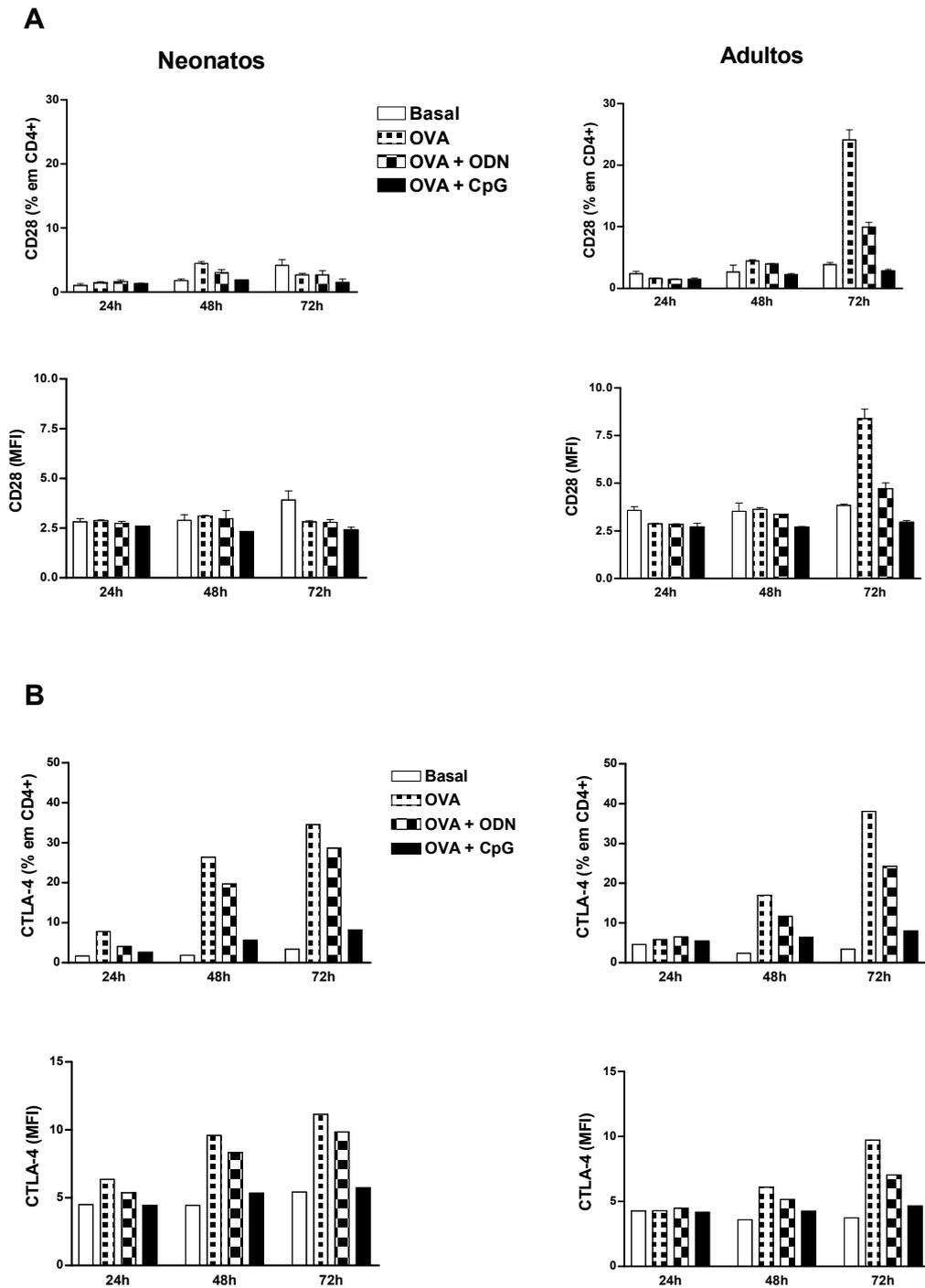
Prosseguimos com a avaliação da característica da resposta antígeno específica em camundongos, para isso analisamos a expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T CD4<sup>+</sup> após estímulo *in vitro* com OVA. Desta vez, foram utilizados esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade ou de 6 a 8 semanas, para comparação entre camundongos neonatos e adultos, respectivamente. A expressão de moléculas CD28, CTLA-4, ICOS, B7.1 e B7.2 foi avaliada por citometria de fluxo após 24, 48 e 72 horas de estímulo com OVA.

Ao compararmos a expressão de moléculas CD28 em neonatos e adultos, observamos o aumento da expressão desta molécula nos linfócitos T de adultos após 72 horas de estímulo (Fig. 10A). Também houve aumento no percentual (~25%) de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> neste período. Esta regulação da expressão de CD28 não foi observada nos linfócitos T de neonatos, mantendo-se em níveis basais (~7%).

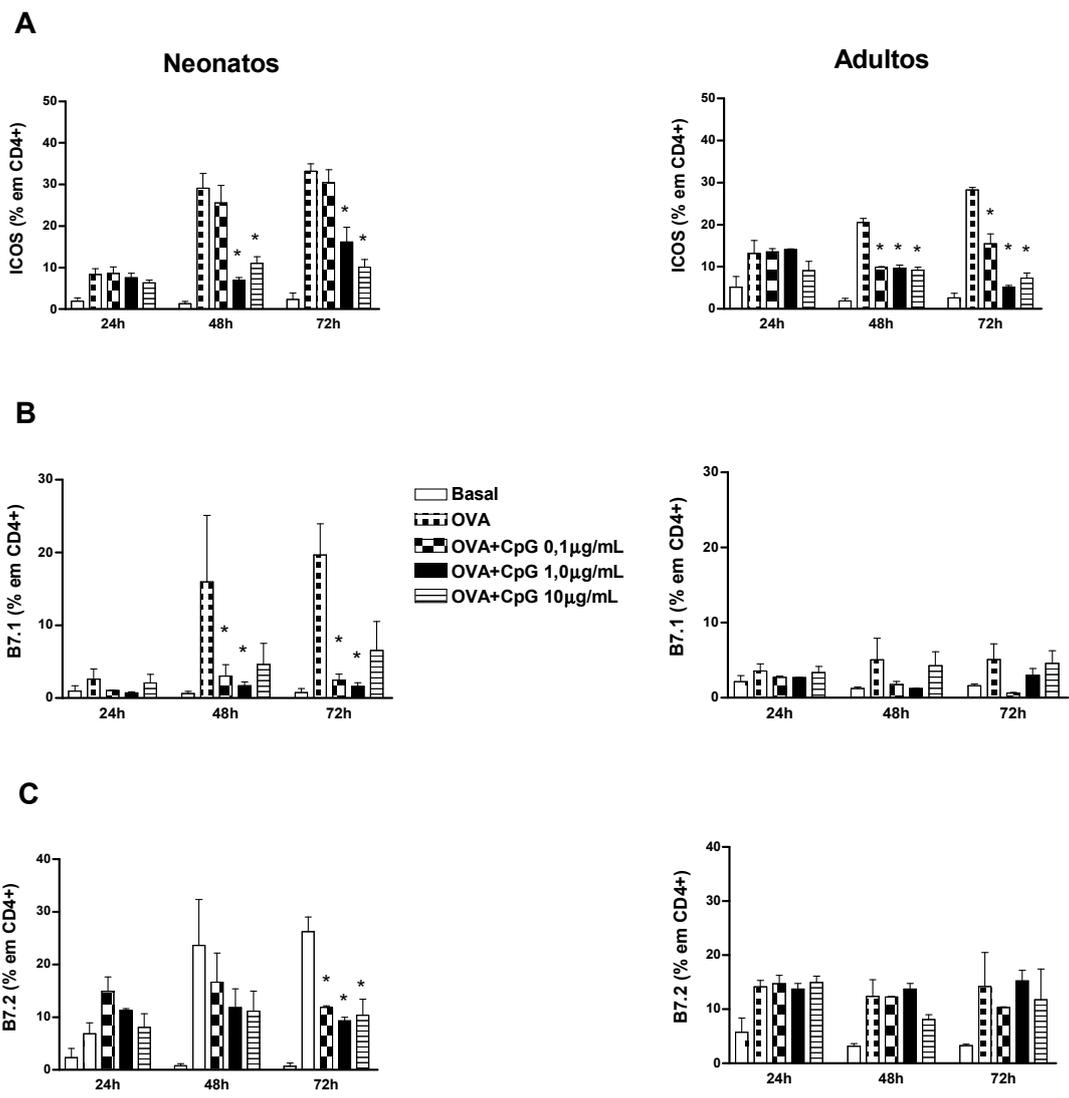
Por outro lado, a expressão de CTLA-4 é aumentada em ambos os grupos. Este aumento inicia-se após 48 horas (16-26%) de estímulo e permanece após 72 horas (~37%, Fig. 10B). A adição de ODN-CpG na cultura de células inibiu o aumento da expressão das moléculas CD28 e CTLA-4, mantendo-as em níveis semelhantes às células não estimuladas.

Na avaliação da molécula ICOS, os resultados mostraram um aumento da expressão nas células estimuladas com OVA (Fig. 11A). O ODN-CpG regula negativamente a expressão de ICOS, porém, quando analisamos diferentes concentrações de CpG, vemos que a regulação em adultos ocorre a partir de 0,1µg/mL enquanto em neonatos é necessária uma concentração 10 vezes maior (Fig. 11A e 12A).

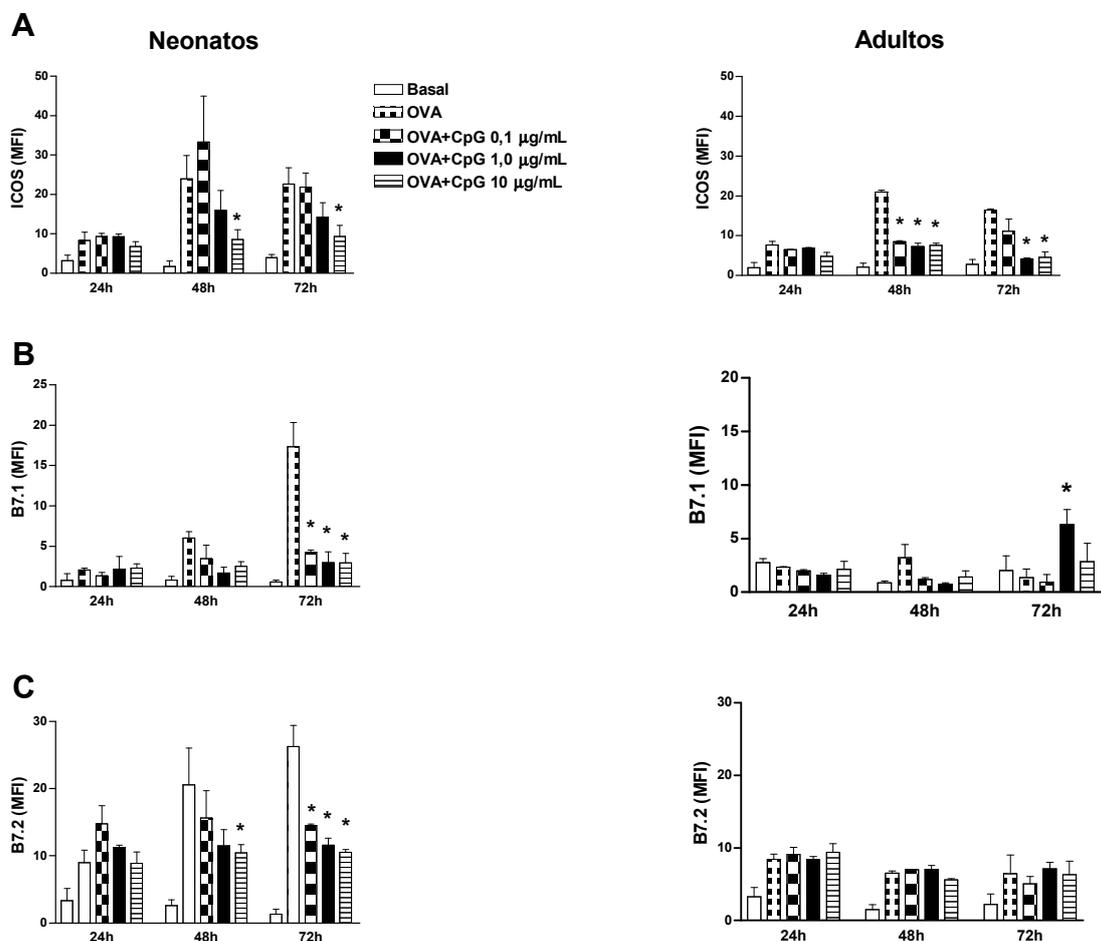
Tem sido descrito que a expressão de moléculas B7 em linfócitos tem um caráter inibitório, pela ligação às moléculas CTLA-4 expressas pelas células vizinhas. Para investigarmos se expressão de moléculas B7 estaria envolvida na relativa “imaturidade” neonatal, analisamos a expressão de moléculas B7.1 e B7.2 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Interessantemente, a expressão de moléculas B7.1 (Fig. 11B e 12B) e B7.2 (Fig. 11C e 12C) teve um aumento acentuado nos linfócitos T de camundongos neonatos, comparado com um modesto aumento em camundongos adultos. Além disso, o CpG foi capaz de diminuir a expressão das moléculas B7 tanto em neonatos como adultos.



**Fig. 10:** Efeito da adição de CpG em cultura de esplenócitos na expressão de moléculas CD28 e CTLA-4 de linfócitos T CD4+. Esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade (2 experimentos com n=3) ou de 6 a 8 semanas (2 experimentos com n=2) foram cultivados por 3 dias sob estímulo de OVA (100 µg/mL) associada a 10 µg/mL de CpG (OVA+CpG) ou ODN-controle (OVA+ODN). O percentual e intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas CD28 (A) e CTLA-4 (B) foram avaliados após 24, 48 e 72 horas, por citometria de fluxo, na população CD4+ (10.000 eventos). As barras representam a média e erro padrão (A) ou ilustram um experimento (B).



**Fig. 11:** Percentual de expressão de ICOS e B7 em linfócitos T estimulados *in vitro* com OVA associada ao CpG. Esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade (4 experimentos com n=3) ou de 6 a 8 semanas (3 experimentos com n=2) foram cultivados por 3 dias sob estímulo de OVA (100 μg/mL) associada ao CpG em diferentes concentrações (0,1 – 10 μg/mL). O percentual da expressão das moléculas ICOS (A), B7.1 (B) e B7.2 (C) foi avaliado após 24, 48 e 72 horas, por citometria de fluxo, na população CD4+ (10.000 eventos). As barras representam a média e erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao estímulo com OVA.



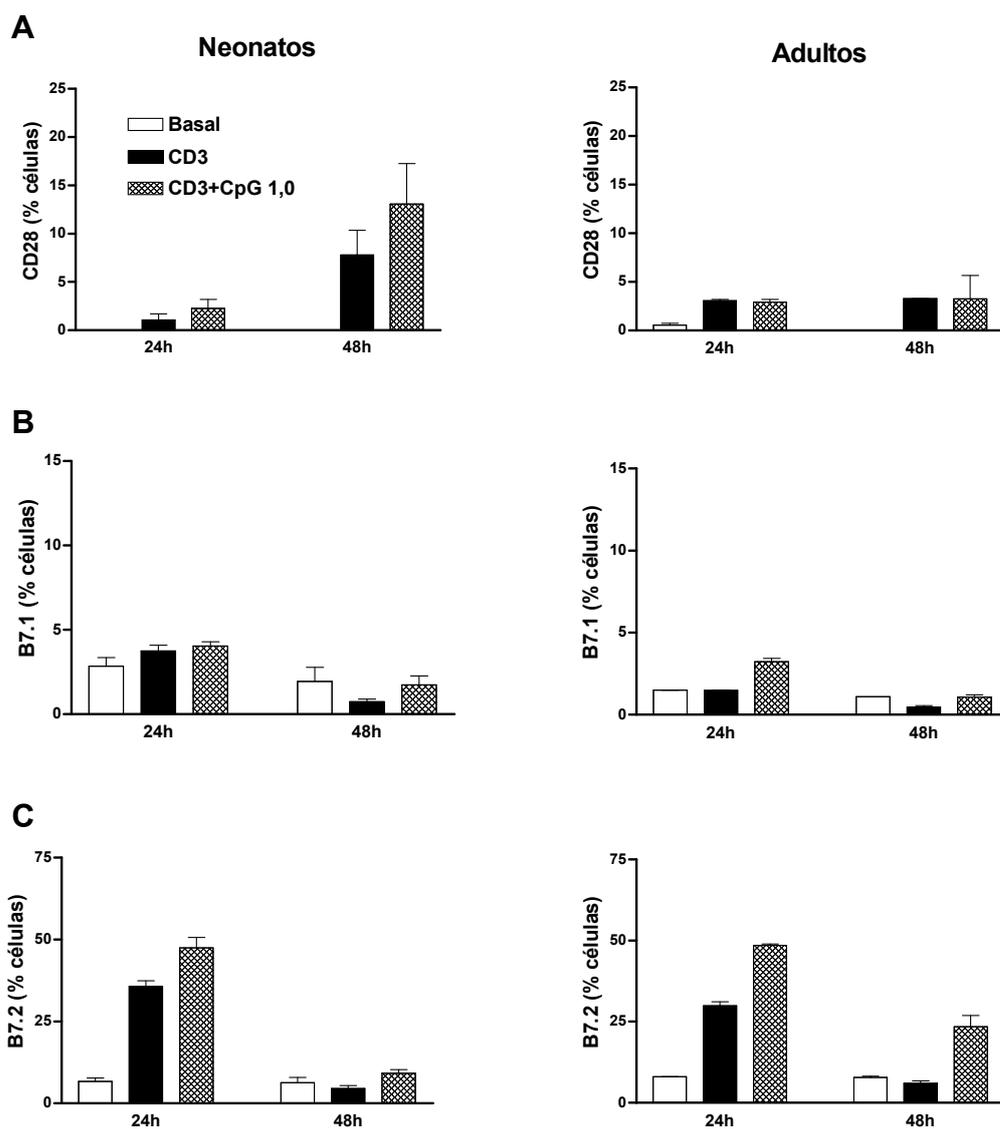
**Fig. 12:** Intensidade média de fluorescência de expressão de ICOS e B7 em linfócitos T estimulados *in vitro* com OVA associada ao CpG. Esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade (4 experimentos com n=3) ou de 6 a 8 semanas (3 experimentos com n=2) foram cultivados por 3 dias sob estímulo de OVA (100 µg/mL) associada ao CpG em diferentes concentrações (0,1 – 10 µg/mL). A intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas ICOS (A), B7.1 (B) e B7.2 (C) foi avaliada após 24, 48 e 72 horas, por citometria de fluxo, na população CD4+ (10.000 eventos). As barras representam a média e erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao estímulo com OVA.

#### **4.7 Análise de expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T de camundongos neonatos e adultos após estímulo policlonal**

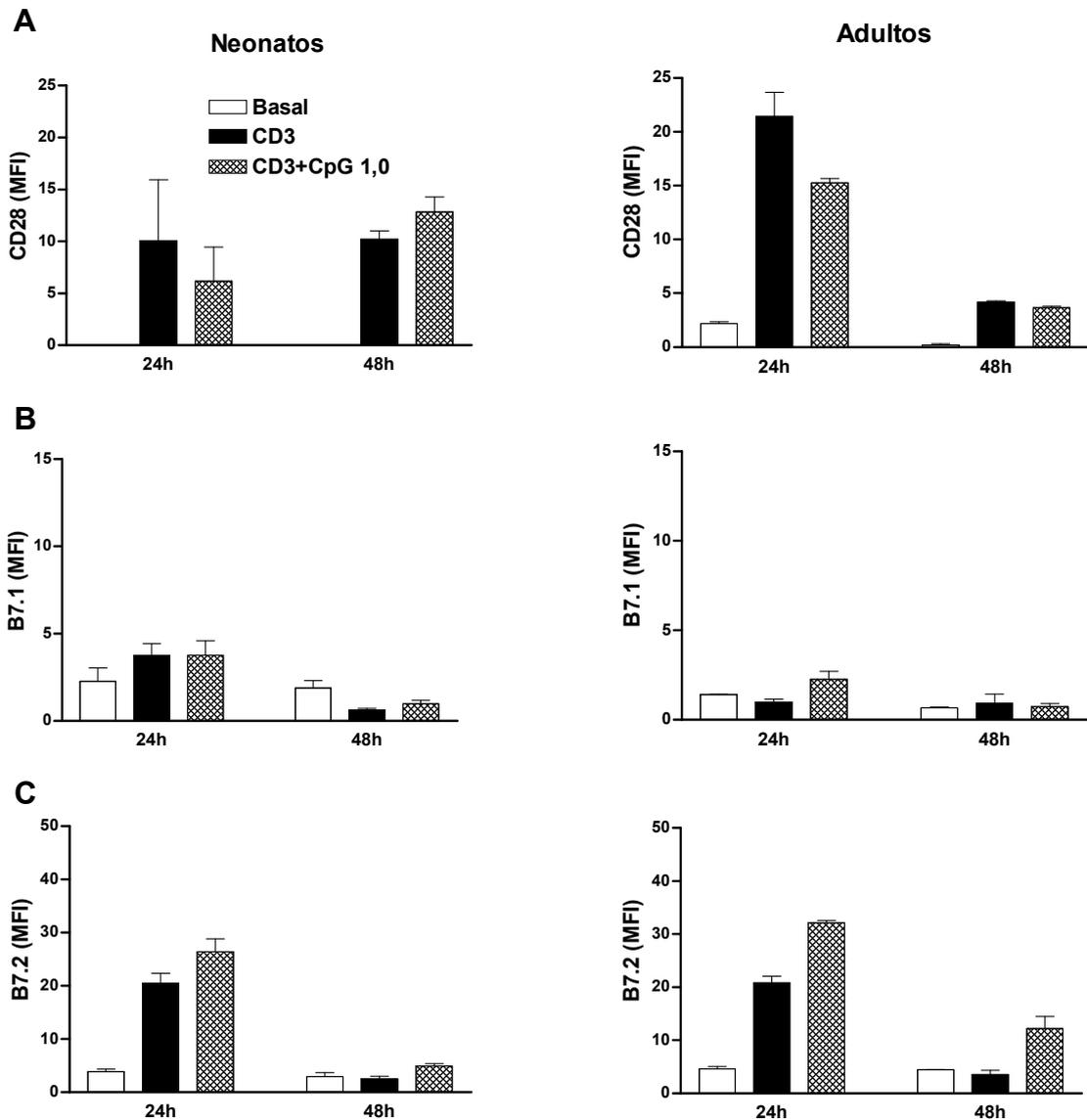
Prosseguindo com a investigação da expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T, avaliamos a expressão de moléculas B7 e CD28 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos BALB/c. Para analisarmos se o aumento da expressão de moléculas B7 observado nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos DO11.10 neonatos é dependente da interação do linfócito com a célula apresentadora, realizamos culturas de esplenócitos de camundongos BALB/c na presença de 1 µg/mL de anti-CD3. Também foi avaliado o efeito da adição de 1 µg/mL de CpG na cultura, esta concentração foi escolhida por ter apresentado maior efeito modulatório nas células de camundongos DO11.10.

Como mostrado nas figuras 13 e 14, o estímulo com anti-CD3 promoveu aumento da expressão das moléculas CD28 e B7.2, tanto em neonatos como em adultos. Diferente dos resultados obtidos anteriormente com as células de camundongos DO11.10, não observamos diferenças entre neonatos e adultos no percentual e na intensidade de fluorescência de expressão de nenhuma das moléculas avaliadas. Além disso, o CpG não suprimiu a expressão destas moléculas. Ao contrário, o CpG parece aumentar a expressão de B7.2 em camundongos adultos e neonatos.

Estes resultados sugerem que a diferença na expressão de moléculas coestimulatórias entre camundongos neonatos e adultos, detectada após estímulo Ag-específico, dependa da participação de células apresentadoras na ativação dos linfócitos T, contrastando quando o estímulo é realizado diretamente nos linfócitos T.



**Fig. 13:** Análise da expressão de CD28, B7.1 e B7.2 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulados *in vitro* com anti-CD3 na presença de ODN-CpG. Esplenócitos de camundongos BALB/c com 10 dias de idade (4 experimentos, n=2 animais/expto) ou de 6 a 8 semanas (4 experimentos, n=2 animais/expto) foram cultivados por 48 horas sob estímulo de anti-CD3 (1 µg/mL) associada ao ODN-CpG (1,0 µg/mL). O percentual da expressão das moléculas CD28, B7.1 e B7.2 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram avaliados após 24 e 48 horas, por citometria de fluxo, na população CD4<sup>+</sup> (10.000 eventos). As barras representam a média e erro padrão.



**Fig. 14:** Análise da expressão de CD28, B7.1 e B7.2 em linfócitos T CD4+ estimulados *in vitro* com anti-CD3 na presença de ODN-CpG. Esplenócitos de camundongos BALB/c com 10 dias de idade (4 experimentos, n=2 animais/expto) ou de 6 a 8 semanas (4 experimentos, n=2 animais/expto) foram cultivados por 48 horas sob estímulo de anti-CD3 (1 µg/mL) associada ao ODN-CpG (1,0 µg/mL). A intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas CD28, B7.1 e B7.2 em linfócitos T CD4+ foram avaliados após 24 e 48 horas, por citometria de fluxo, na população CD4+ (10.000 eventos). As barras representam a média e erro padrão.

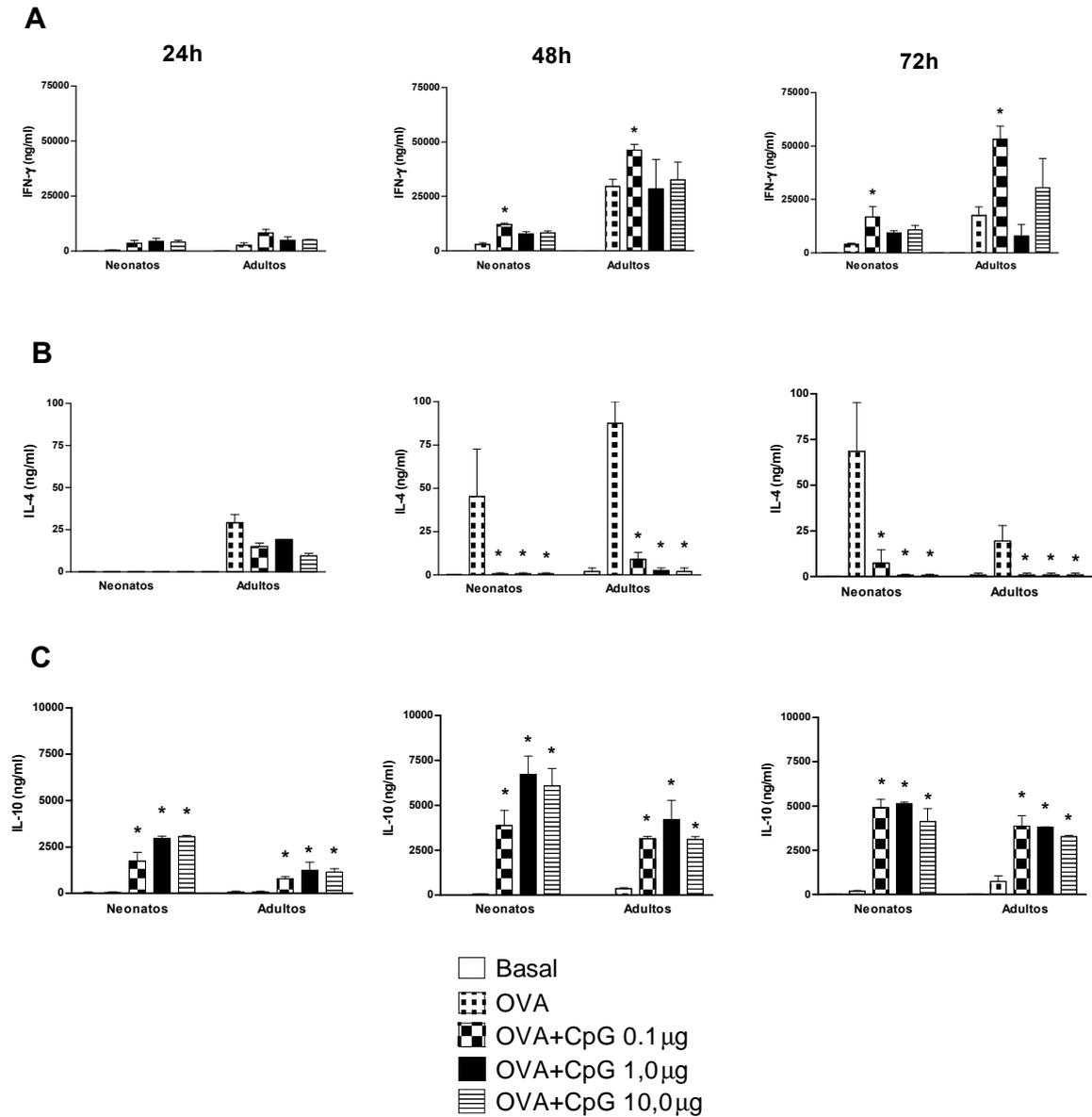
#### **4.8 Efeito *in vitro* do CpG associado ao estímulo antigênico na produção de citocinas**

Para avaliarmos o efeito do CpG na produção de citocinas induzida pelo antígeno foram utilizados esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade ou de 6 a 8 semanas, para comparação entre camundongos neonatos e adultos, respectivamente. As células foram estimuladas com OVA na presença de diferentes concentrações de CpG e após 24, 48 e 72 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas por ELISA.

Os resultados mostraram que a produção de IFN- $\gamma$  em camundongos neonatos foi menor do que em camundongos adultos após estímulo com OVA (Fig. 15A). Apesar da associação do CpG induzir um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , os níveis observados nas culturas de células de neonatos mantiveram-se menores do que nas culturas de adultos.

Em relação à IL-4, observamos que a produção desta citocina nos neonatos é mais tardia, mas atinge níveis semelhante aos adultos (Fig. 15B). O CpG foi capaz de modular negativamente a produção de IL-4 em ambas as idades.

Após estímulo com OVA, os níveis de IL-10 foram baixos em todos os períodos. A associação do CpG ao estímulo antigênico aumentou a produção de IL-10, tanto em neonatos como em adultos, que se manteve durante as 72 horas analisadas (Fig. 15C).

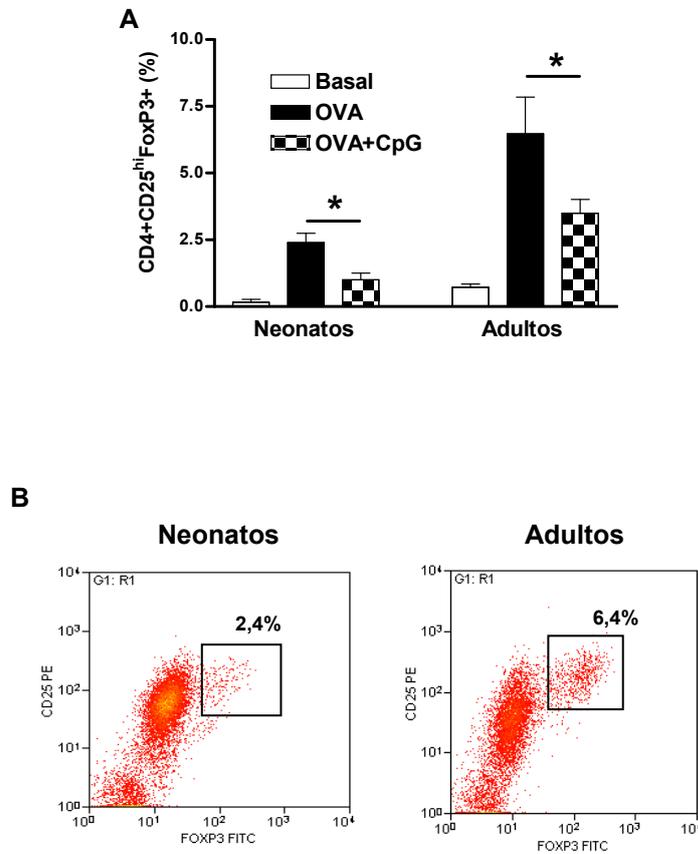


**Fig. 15:** Produção de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados *in vitro* com OVA associada ao CpG. Esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade (4 experimentos com n=3) ou de 6 a 8 semanas (3 experimentos com n=2) foram cultivados por 3 dias sob estímulo de OVA (100  $\mu$ g/mL) associada ao CpG em diferentes concentrações (0,1 – 10  $\mu$ g/mL). Após 24, 48 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados e analisados por ELISA para dosagem de IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B) e IL-10 (C). As barras representam a média e o erro padrão. \* $p \leq 0,05$  em relação ao estímulo com OVA.

#### **4.9 Efeito *in vitro* do ODN-CpG na indução de células T regulatórias após estímulo antigênico**

Para avaliar se o efeito imunoestimulatório do CpG poderia ter algum envolvimento na supressão de linfócitos T regulatórios (Treg), nós analisamos a indução de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3 após cultura de esplenócitos de camundongos DO11.10 com OVA. Após período de 72 horas de cultura, as células foram coletadas e o número de Treg foi quantificado por citometria de fluxo.

Como mostrado na figura 16, o número de células Treg após estímulo com OVA é consideravelmente maior do que na ausência de estímulo, indicando a geração de células Treg após estímulo antigênico. Entretanto, quando associamos o CpG ao estímulo com OVA, o número de células T regulatórias diminui cerca de 50% em relação à cultura estimulada somente com OVA. Este efeito foi observado tanto na cultura de linfócitos de neonatos quanto na de adultos. Interessantemente, o número de Treg geradas na cultura de células de neonatos estimuladas com OVA foi significativamente menor do que em adultos. Este resultado contrasta com o perfil imunológico do neonato, o qual está mais susceptível à indução de tolerância. Evidenciamos que as populações celulares, sejam efetoras ou reguladoras, são quantitativamente menores na fase neonatal.



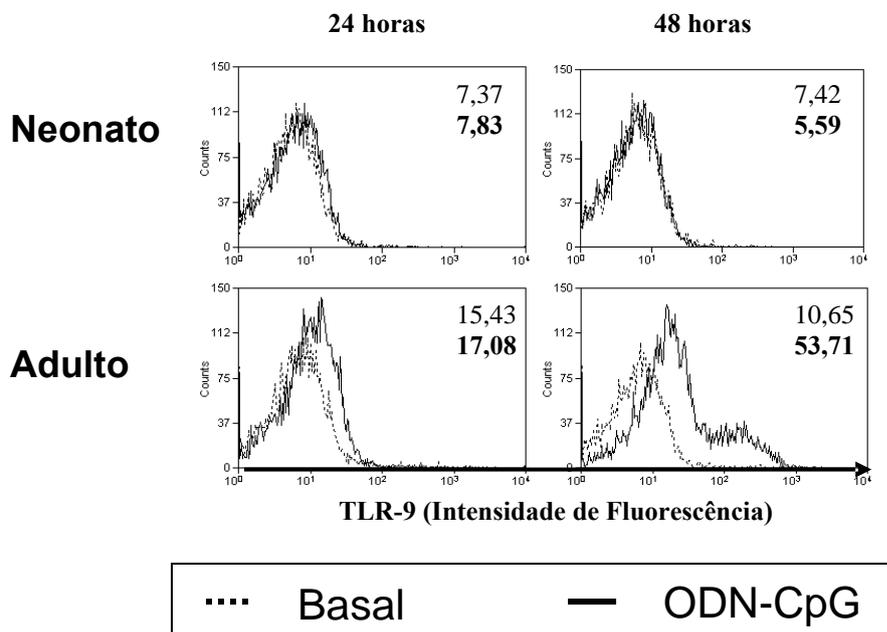
**Fig. 16:** CpG suprime a indução de linfócitos T regulatórios após estímulo antigênico *in vitro*. Esplenócitos de camundongos DO11.10 com 10 dias de idade (n=4 animais) ou de 6 a 8 semanas (3 animais) foram cultivados por 72h com 100 µg/mL de OVA na presença ou não de ODN-CpG (A). Figura B apresenta um histograma ilustrativo da diferença do número de células Treg geradas em neonatos e adultos após estímulo com OVA por 72h. \* $p \leq 0,05$ .

#### **4.10 Avaliação da influência do ODN-CpG na expressão de TLR-9 em linfócitos B de camundongos neonatos e adultos**

Após a análise do efeito do CpG na ativação de linfócitos T de camundongos em fase precoce de vida, tornou-se interessante investigar o efeito do CpG em células apresentadoras de antígeno. Neste sentido, iniciamos a avaliação da expressão de TLR-9, receptor responsável pelo reconhecimento do CpG, em linfócitos B de camundongos. Para isso, foi realizada cultura de esplenócitos de camundongos A/Sn com 10 dias de idade e de camundongos adultos com anticorpos anti-IgM ou CpG. A expressão de TLR-9 foi avaliada por citometria intracelular após 24, 48 e 72 horas de estímulo.

A expressão de TLR-9 em linfócitos B em repouso é muito baixa, aumentando após a ativação celular (BERNASCONI et al., 2003). Desta forma, não foi possível detectar, por citometria, a expressão de TLR-9 em células não estimuladas, tanto nos camundongos adultos quanto nos animais de 10 dias de idade. Entretanto, após 48 horas de estímulo com CpG, foi observado um aumento de cerca de 20% na expressão de TLR-9 em linfócitos B de camundongos adultos (Fig. 17). Este efeito não foi observado nas células de camundongos com 10 dias de idade, as quais se mantiveram em níveis basais de expressão, menos de 1% (Fig. 17), mesmo após 72 horas de estímulo com CpG (dados não mostrados). O estímulo com anticorpos anti-IgM não influenciou na expressão de TLR-9 dos grupos analisados.

Estes resultados mostram maior sensibilidade dos linfócitos B adultos em relação aos linfócitos B neonatais ao estímulo com CpG.



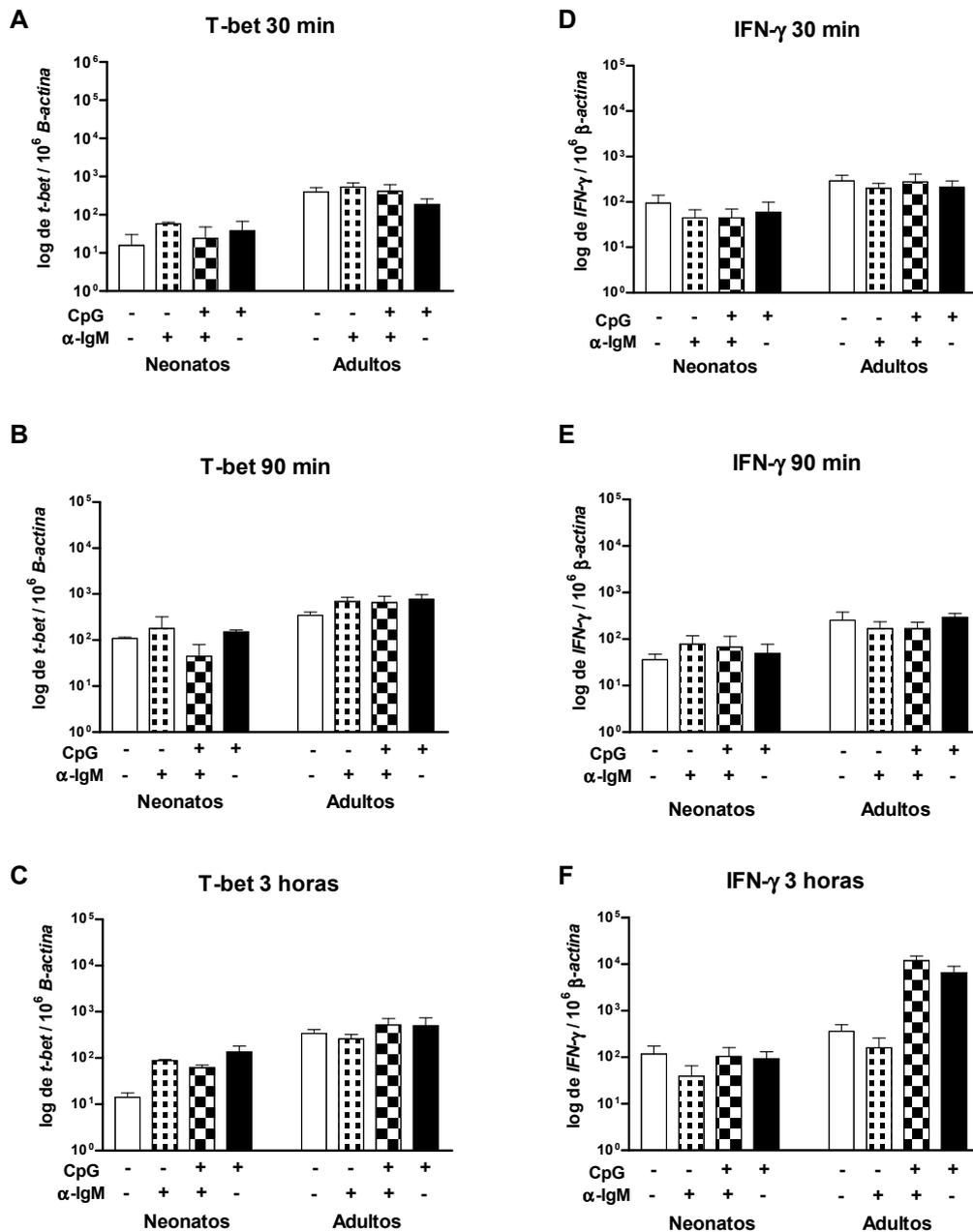
**Fig. 17:** Efeito do CpG em cultura de esplenócitos na expressão de TLR-9 de linfócitos B. Esplenócitos de camundongos A/Sn com 10 dias de idade ou adultos foram cultivados com ODN-CpG. A expressão intracelular de TLR-9 foi avaliada após 24 e 48 horas por citometria de fluxo, na população B220+ (10.000 eventos). Os números presentes no histograma representam os valores de intensidade média de fluorescência das células não estimuladas (acima) e estimuladas (abaixo em negrito). A figura representa resultados de um de dois experimentos realizados.

#### 4.11 Avaliação da expressão de t-bet e IFN- $\gamma$ em linfócitos B purificados

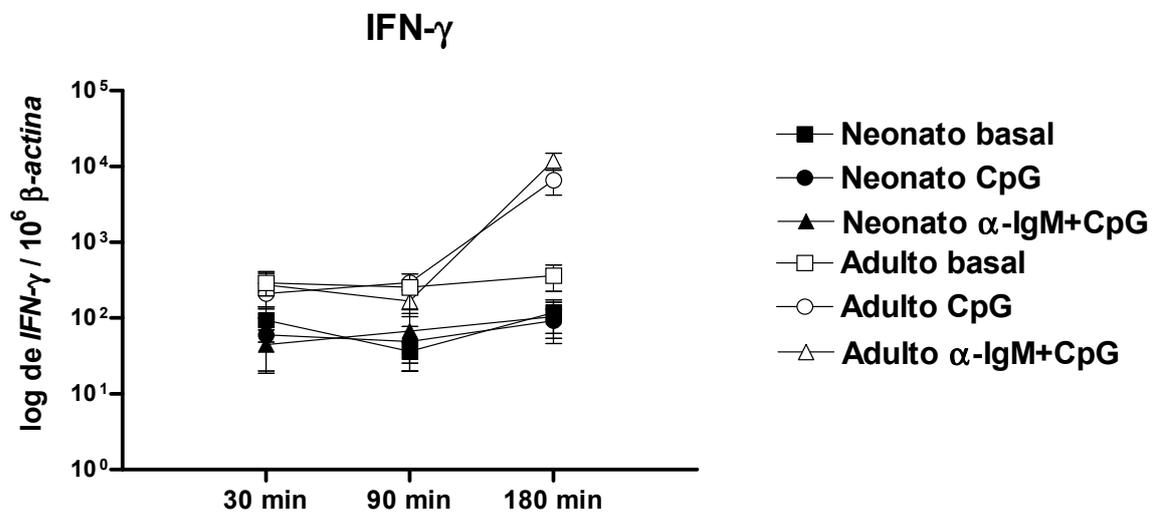
Nossos resultados mostraram uma menor expressão de TLR-9 em linfócitos B de neonatos após ativação com CpG, em relação às células de camundongos adultos. Prosseguindo com as investigações, avaliamos a expressão do fator de transcrição t-bet e IFN- $\gamma$  por RT-PCR quantitativo. Para isso, os linfócitos B foram, primeiramente, isolados através de seleção negativa em coluna magnética. A pureza foi avaliada por citometria, obtendo níveis acima de 90% de linfócitos B. Após 30, 90 e 180 minutos de estímulo com 10  $\mu\text{g/mL}$  de CpG e/ou 10  $\mu\text{g/mL}$  anti-IgM, as células foram congeladas em *RNA later* (Sigma-Aldrich). Posteriormente, o RNA foi isolado, reversamente transcrito para cDNA e realizada a reação de cadeia da polimerase para análise da expressão de  $\beta$ -actina, t-bet e IFN-  $\gamma$ .

Conforme mostra a figura 18, não foi possível observar aumento da expressão de RNA para t-bet pelo estímulo com CpG nos tempos analisados. Segundo alguns trabalhos sugerem, o CpG seria capaz de induzir a troca de classes de imunoglobulinas pela indução da expressão de t-bet, independentemente da presença de IFN- $\gamma$ . Entretanto, parece ser necessário maior tempo de estímulo para que sua expressão seja quantificada.

Ao avaliarmos a expressão de RNA para IFN- $\gamma$ , observamos um aumento de expressão pelas células de camundongos adultos após 3 horas de estímulo com CpG associado ou não à anti-IgM. Este aumento não foi observado pelas células de camundongos neonatos, as quais mantiveram expressão aproximadamente 100 vezes menor (Fig. 18 e 19).



**Fig. 18:** Análise da expressão de t-bet e IFN- $\gamma$  em linfócitos B de camundongos neonatos e adultos estimulados com CpG. Linfócitos B purificados de baço de camundongos A/Sn com 20 dias de idade (3 experimentos, n=3 animais/expto) ou de 6 a 8 semanas (3 experimentos, n=3 animais/expto) foram cultivados por 30 (A e D), 60 (B e E) e 180 minutos (C e F) sob estímulo de ODN-CpG (10  $\mu$ g/mL) e/ou anti-IgM (10  $\mu$ g/mL). A análise da expressão de t-bet (A – C), IFN- $\gamma$  (D – F) e o controle interno beta-actina foi realizada por PCR em tempo real com SYBR Green. Os resultados estão expressos como número de cópias de t-bet ou IFN- $\gamma$  por 10<sup>6</sup> cópias de  $\beta$ -actina.



**Fig. 19:** Análise da expressão de IFN- $\gamma$  em linfócitos B de camundongos neonatos e adultos estimulados com CpG. Linfócitos B purificados de baço de camundongos A/Sn com 20 dias de idade (3 experimentos, n=3 animais/expto) ou de 6 a 8 semanas (3 experimentos, n=3 animais/expto) foram cultivados por 30, 60 e 180 minutos sob estímulo de ODN-CpG (10  $\mu$ g/mL) e/ou anti-IgM (10  $\mu$ g/mL). A análise da expressão de IFN- $\gamma$  e o controle interno beta-actina foi realizada por PCR em tempo real com SYBR Green. Os resultados estão expressos como número de cópias de t-bet ou IFN- $\gamma$  por  $10^6$  cópias de  $\beta$ -actina.

#### **4.12 Análise da ativação de linfócitos B de camundongos neonatos e adultos pela expressão de moléculas coestimulatórias após estímulo *in vitro* com CpG**

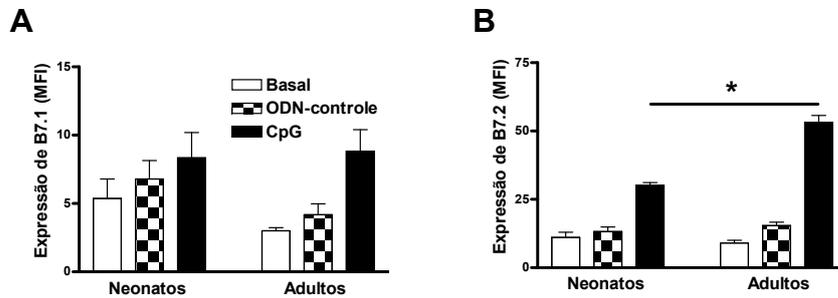
Para verificar se a ausência do aumento de expressão de TLR-9 em linfócitos B poderia estar relacionada com uma baixa resposta funcional, nós analisamos a expressão dos marcadores de ativação B7.1 e B7.2 e a produção de citocinas. Nesta etapa, realizamos cultura de esplenócitos ou linfócitos B purificados de camundongos BALB/c na presença de 1µg/ml de CpG por 24 horas.

Na cultura de esplenócitos estimulados com CpG, observamos uma diminuição na expressão de B7.2 em linfócitos B de camundongos neonatos em comparação com células de adultos (Fig. 20). Entretanto, quando linfócitos B purificados foram estimulados, a expressão de B7.2 em adultos foi similar ao de neonatos. Interessantemente, a expressão de B7.1 e B7.2 foi mais baixa na cultura de linfócitos B purificados do que na cultura de esplenócitos, tanto em neonatos como em adultos, sugerindo que outras populações celulares possam contribuir para a ativação de linfócitos B, provavelmente por citocinas induzidas pelo CpG.

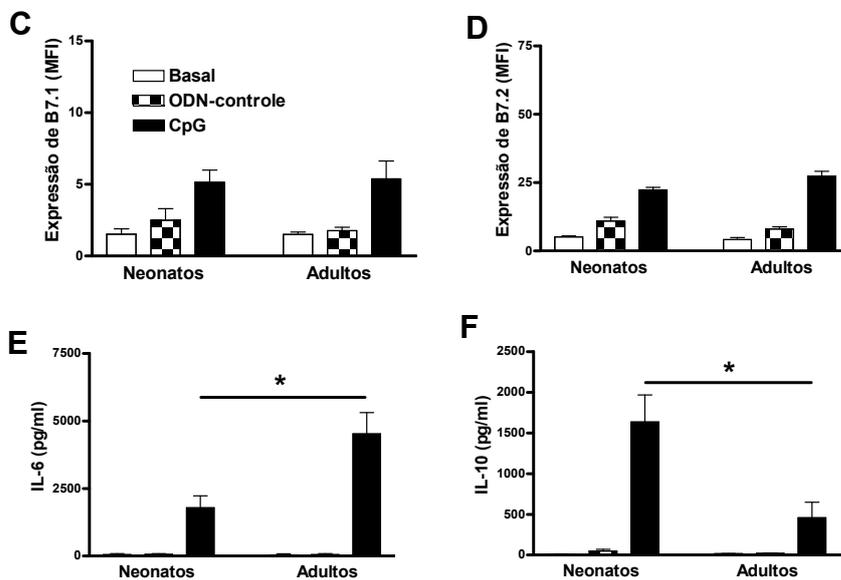
Quando avaliados os níveis de citocinas no sobrenadante de cultura, os resultados mostram diminuição de IL-6 (Fig. 20E) e aumento de IL-10 (Fig. 20F) na cultura de células de neonatos em relação à cultura de células de adultos, indicando um maior efeito supressor do que pró-inflamatório. Além disso, observamos que os níveis de MCP-1, uma quimiocina relacionada com a resposta Th2, é induzida pelo CpG somente na cultura de células de neonatos, mas não de adultos (Fig. 21).

Estes resultados mostram que os linfócitos B de camundongos neonatos apresentam diferenças funcionais, qualitativas e quantitativas, na ativação com o ODN-CpG em relação às células de camundongos adultos. Estas diferenças podem estar envolvidas na menor eficiência do CpG na modulação da resposta ao alérgenos.

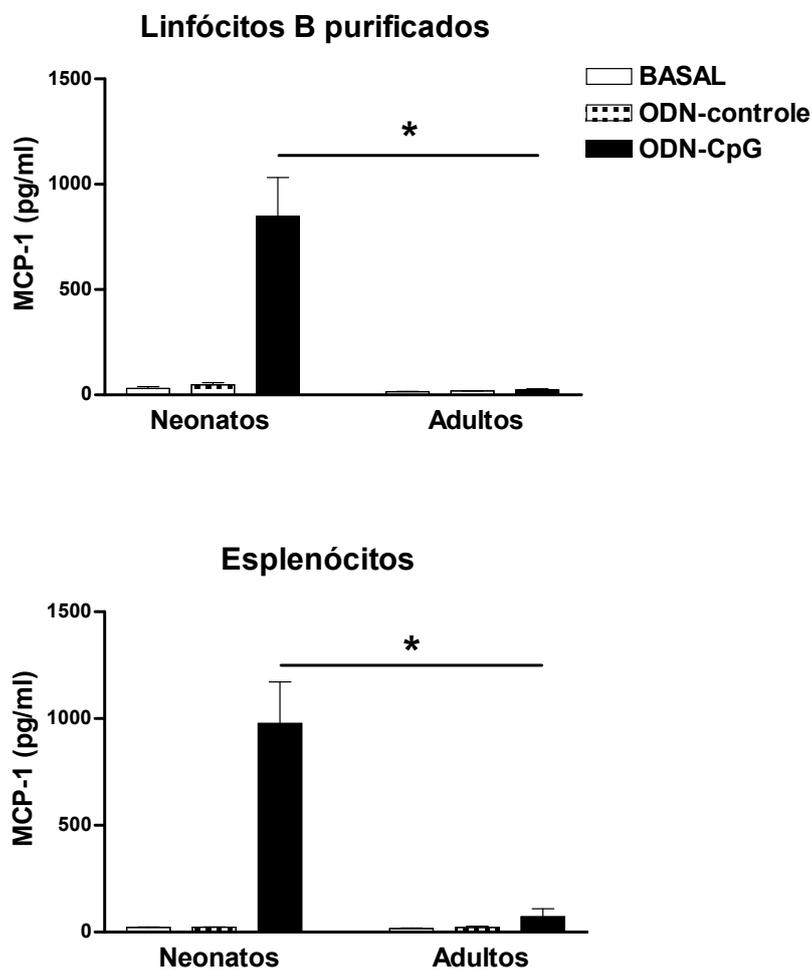
### Esplenócitos



### Linfócitos B purificados



**Fig. 20:** CpG induz expressão de B7.2 e produção de IL-6 mais elevadas em linfócitos B de camundongos adultos e maiores níveis de IL-10 por linfócitos B de camundongos neonatos. Esplenócitos (A-B) ou linfócitos B purificados (C-F) de camundongos BALB/c com 10 dias (5 animais) ou 6-8 semanas de idade (4 animais) foram cultivados por 24 h com ODN-CpG (1,0 µg/mL). A intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão das moléculas B7.1 (A e C) e B7.2 (B e D) em linfócitos B foi avaliada por citometria de fluxo (10.000 eventos). Sobrenadantes de cultura de linfócitos B purificados foram coletados para dosagem das citocinas IL-6 (E) e IL-10 (F). \* $p \leq 0.05$ .



**Fig. 21:** Análise da produção da quimiocina MCP-1/CCL2 induzida por CpG em cultura de células de neonatos. Linfócitos B purificados ou esplenócitos de camundongos BALB/c com 10 dias de idade (4 experimentos, n=2 animais/expto) ou de 6 a 8 semanas (4 experimentos, n=2 animais/expto) foram cultivados por 24 horas sob estímulo de ODN-controle ou ODN-CpG (1,0 µg/mL). Sobrenadantes foram coletados e a dosagem de MCP-1 realizada pelo método de CBA (*Cytometric Bead Array*). As barras representam a média e erro padrão. \* $p \leq 0.05$ .

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho evidenciamos o efeito imunomodulatório do CpG na fase neonatal, caracterizado pela indução de resposta Th1 e redução da produção de anticorpos IgE aos alérgenos OVA e Bt. Entretanto, algumas peculiaridades do sistema imunológico neonatal, como o aumento tardio da expressão de TLR-9 em linfócitos B, interferem na resposta inata, no papel adjuvante de PAMPs como o CpG e no desenvolvimento da resposta adaptativa, visto que seu efeito em camundongos adultos é mais pronunciado. Por outro lado, o CpG é capaz de estimular o sistema imune neonatal e diminuir a expressão das moléculas B7 em linfócitos T CD4+. Moléculas que, quando expressas em linfócitos T CD4+, desempenham um papel inibitório e, como mostrado no presente trabalho, estão mais elevadas nos linfócitos T CD4+ de camundongos neonatos do que camundongos adultos após estímulo antigênico *in vitro*. Outra peculiaridade do neonato foi que o CpG promove maior produção de citocinas anti-inflamatórias do que pró-inflamatórias por linfócitos B.

O período neonatal de camundongos é marcado pela predisposição ao desenvolvimento de resposta Th2, que propicia o desenvolvimento da resposta alérgica (BOT et al., 1997, 1998), com altos níveis de IL-4 e baixa secreção de IFN- $\gamma$ , essencialmente devido à diminuída produção de IL-12 pelas APCs (LEE et al., 1996). Além disso, alguns autores sugerem que a proteção contra o desenvolvimento de respostas alérgicas e uma rápida maturação das funções relacionadas à resposta Th1 no período pós-natal, ou mesmo a imunomodulação materna, são estratégias únicas para a profilaxia da asma (HOLT et al., 2005; RIGATO et al., 2009). A administração de oligodeoxinucleotídeos contendo a seqüência CpG (ODN-CpG) nas imunizações neonatais com OVA ou com Bt mostrou-se capaz de diminuir a produção de anticorpos anafiláticos IgE, um isótipo dependente de citocinas Th2. Em paralelo, houve um aumento dos níveis de anticorpos IgG2a, sugerindo um efeito adjuvante, porém menos eficaz do que em adultos, do ODN-CpG na indução de citocinas do tipo Th1.

Ao compararmos a eficiência modulatória do CpG nas imunizações com OVA em camundongos adultos e neonatos, observamos um maior efeito modulatório na produção de anticorpos anafiláticos em adultos. Os níveis de anticorpos IgE específicos, entre os animais imunizados com OVA que receberam CpG, foram maiores em neonatos numa proporção de cinco vezes em relação ao grupo de camundongos adultos. Também, os

títulos de IgG1 anafiláticos foram suprimidos somente nos grupos de camundongos adultos. A síntese de anticorpos IgG1 anafiláticos é dependente de IL-4 e inibida por IFN- $\gamma$  e IL-12 (FAQUIM-MAURO et al., 1999). No nosso trabalho, observamos um aumento da produção de IFN- $\gamma$  no grupo de camundongos neonatos que recebeu CpG associada à OVA, porém não foi suficiente para regular a síntese de IL-4 e anticorpos IgG1 anafiláticos. Apesar de haver diferença nas doses, tanto do antígeno quanto de CpG, entre os grupos de imunização neonatal e adulta, é provável que a imaturidade do sistema imunológico do neonato, especialmente do eixo Th1, seja responsável pela menor eficiência do CpG na inibição da resposta IgE de camundongos imunizados no período neonatal.

A OVA é uma proteína imunogênica, considerada um alérgeno alimentar capaz de induzir uma potente resposta imunológica com padrão misto Th1/Th2, o extrato de Bt é um alérgeno capaz de sensibilizar indivíduos atópicos (RIZZO et al., 1993; ARRUDA et al., 1997) e de promover a produção de IgE e inflamação pulmonar com infiltração neutrofílica em camundongos A/Sn (SATO et al., 2002; CARVALHO et al., 2004). Além disso, o Bt possui peculiaridades alergênicas, como a presença de frações capazes de induzir respostas T-independentes (SATO et al., 2002; MORI et al., 2005), que podem explicar o fato da imunização neonatal não induzir resposta IgE primária. Apesar das diferenças imunogênicas destes antígenos, o efeito modulatório do CpG foi semelhante nos dois protocolos de imunização neonatal.

O CpG parece exercer um efeito terapêutico na resposta IgE. Este efeito pode ser observado, pelo menos em adultos, até três meses após imunização sem nova dose de CpG, embora possa ser necessária nova aplicação do CpG para manutenção do controle da resposta IgE. Além disso, a associação do CpG mostrou-se eficaz em modelo de imunização com dois antígenos, modelo que, como mostrado anteriormente (OLIVEIRA et al., 2005), potencializa a produção de IgE principalmente para OVA.

Em relação à produção de citocinas, os animais que receberam ODN-CpG na imunização neonatal com OVA mostraram, aos 20 dias de idade, um aumento da produção de IFN- $\gamma$  e uma menor produção de IL-10 após estímulos policlonais. A diminuição dos títulos de anticorpos IgE e aumento dos anticorpos IgG2a específicos na imunização neonatal podem ser, pelo menos em parte, devido ao aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Este efeito também é observado na vacinação neonatal, onde camundongos BALB/c

imunizados com o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) associado ao ODN-CpG mostraram aumento de IgG2a e IFN- $\gamma$  e diminuição de IgG1 (WEERATNA et al., 2001).

Os camundongos neonatos possuem uma predisposição a respostas Th2, devido a diversos fatores, tais como a susceptibilidade à apoptose induzida pela ligação da IL-4 ao receptor IL-13R1, o qual tem sua expressão aumentada nos linfócitos Th1 de neonatos (LI et al., 2004), baixa produção de IL-12 pelas APCs (MIN et al., 2001) e a hipometilação da região CNS-1 (seqüência conservada não codificadora-1), uma região chave na regulação da produção de citocinas Th2, do DNA de linfócitos T CD4+ naive (ROSE et al., 2007). Contudo, o uso de CpG no período neonatal parece auxiliar no desenvolvimento de respostas Th1. Apesar da dificuldade na formação de resposta Th1 em neonato, a diminuição da IL-10 dos camundongos imunizados com OVA+CpG pode ter contribuído com o aumento da produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, dos anticorpos IgG2a.

Os animais imunizados com OVA que receberam ODN sem a seqüência CpG (ODN-controle) apresentaram uma diminuição na produção de IL-10 e aumento de IL-12p40 após cultura com LPS, mas não ocorreu produção detectável de IFN- $\gamma$ . É possível que a presença de estruturas modificadas fosforotioato nos oligonucleotídeos, como no ODN-controle, possa promover ligações inespecíficas do ODN a proteínas da membrana celular, resultando em estímulos independentes da seqüência (PEREZ et al., 1994; KRIEG, 2002). Sano et al. (2003) sugerem que a administração de ODN sem a seqüência CpG conjugado à OVA induz uma resposta predominante Th2, ao contrário dos resultados obtidos em nosso estudo, onde foi observada uma diminuição de IgG1.

O efeito modulatório do ODN-CpG na produção de anticorpos pode ser mediado, também, por um processo independente de citocinas Th1, por ação direta do ODN-CpG sobre os linfócitos B efetores. Neste sentido, tem sido descrito que o reconhecimento do CpG pelo linfócito B através do TLR9 induz a expressão do fator de transcrição T-bet, via STAT-1, regulando a troca de classes de imunoglobulinas, diminuindo IgG1 e IgE e aumentando IgG2a (PENG et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que linfócitos B de camundongos deficientes de TLR-9 ou MyD88 não são capazes de produzir, *in vitro*, isótipos de imunoglobulinas dependentes de citocinas Th1 após estímulo com CpG (LIU et al., 2003). Considerando ainda que o tipo de ODN-CpG (ODN 1826) utilizado neste trabalho é reconhecido principalmente pelos linfócitos B via TLR-9 (LIN et al., 2004) e pode representar um importante papel no aumento dos títulos de anticorpos IgG2a dos camundongos imunizados.

Ao compararmos a expressão de TLR-9 em linfócitos B de camundongos de 10 dias de idade e de camundongos adultos após estímulo com CpG, observamos que linfócitos B de camundongos jovens não aumentam a expressão do TLR-9 mesmo após 72 horas de estímulo com CpG, enquanto nos linfócitos de adultos já é possível observar um aumento em 48 horas. Estes resultados sugerem que a ação do CpG pode ser menos eficaz no período neonatal do que em adultos devido, em parte, a uma inadequada expressão do TLR-9 após estímulo agonista, gerando uma menor sensibilidade dos linfócitos B. Os linfócitos B de neonatos estimulados com CpG apresentaram uma menor expressão do marcador de ativação B7.2 e produção diminuída de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, níveis aumentados de IL-10, uma citocina supressora, em comparação aos adultos. Isto sugere que a inadequada expressão do TLR-9 após estímulo agonista pode levar a diferenças funcionais na ativação de linfócitos B pelo CpG. Além disso, detectamos um aumento da expressão de RNAm de IFN- $\gamma$  somente nos linfócitos B de camundongos adultos. Alguns estudos sugerem que a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos B pode colaborar com uma resposta Th1 (HARRIS et al., 2005; GRAY et al., 2007). Durali et al. (2003) demonstraram que linfócitos B humanos podem se diferenciar, pelo padrão de citocinas, de maneira semelhante aos linfócitos T CD4+. Em resposta à IL-12, os linfócitos B produzem IFN- $\gamma$ , induzem a expressão de t-bet e conseqüentemente o aumento da expressão de IL-12R. A incapacidade dos linfócitos B de camundongos neonatos em produzir IFN- $\gamma$  pode ser decorrente de uma menor produção de IL-12 ou de uma menor expressão das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do IL-12R, necessárias para a sinalização da IL-12. Além disto, é possível que a diferença na proporção de sub-populações de linfócitos B presentes em camundongos neonatos e adultos tenha influenciado na resposta ao CpG. Barr et al. (2007) demonstraram que os linfócitos B1 e os de zona marginal são as principais fontes de IL-10, enquanto os linfócitos B2 e os foliculares expressam RNAm de IFN- $\gamma$  constitutivamente em camundongos adultos. Contudo, não se tem descrito a diferença em relação à expressão de TLR-9 entre estas sub-populações.

Neste trabalho, mostramos que as células de camundongos neonatos produzem grandes quantidades de MCP-1 (CCL2) em resposta ao CpG. O MCP-1 é uma quimiocina relacionada com o direcionamento da resposta imunológica para um padrão Th2, podendo estar relacionada com a menor capacidade imunomodulatória do CpG em neonatos. São sugeridos dois mecanismos pelos quais o MCP-1 pode promover o desenvolvimento de resposta Th2: inibindo a produção de IL-12 pelas APCs (CHENSUE et al., 1996; BRAUN

et al., 2000) e aumentando a produção de IL-4 pelos linfócitos T ativados (KARPUS et al., 1997). A diferença entre camundongos neonato e adultos no perfil de produção de citocinas em resposta ao estímulo com CpG pode ajudar a explicar o menor efeito adjuvante do CpG em neonatos. Sun et al. (2005) mostraram que os linfócitos B1 CD5+, após a sinalização pelo CpG através do TLR-9 (HEMMI et al., 2000), produzem grande quantidade de IL-10. No período neonatal, a quantidade de linfócitos B1 é mais abundante e pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1, como na supressão de respostas aloimunes experimentais mediada pela inibição das funções de células dendríticas (WALKER; GOLDSTEIN, 2007). Contudo, a evidência da indução de MCP-1 pelo CpG em neonatos pode esclarecer ainda mais as diferenças do potencial adjuvante do CpG entre neonatos e adultos. É possível que a elevada produção de MCP-1 em neonatos favoreça o desenvolvimento de resposta Th2, diminuindo a eficiência do CpG na modulação da resposta IgE. Até o momento não há descrição na literatura de que o MCP-1 esteja envolvido na propensão de resposta Th2 nos neonatos.

Avaliando a influência do CpG na ativação antígeno específica dos linfócitos T CD4+ de camundongos DO11.10, que expressam TCR transgênico para peptídeo de OVA, em período precoce de vida, observamos uma diminuição da expressão de CD44. Esta menor ativação é acompanhada por uma menor expressão da molécula coestimulatória ICOS. Até o momento, não se tem descrito a influência negativa do CpG na ativação de linfócitos T, bem como na expressão de ICOS. ICOS é uma molécula expressa em linfócitos T e sua sinalização, induzida pelo ICOS-ligante, está relacionada à produção de citocinas, principalmente IL-10, função efetora de linfócitos Th2 e à expressão de CD40L, molécula necessária para a ativação de linfócitos B e na produção de anticorpos (OKASAKI et al., 2002; SHARPE; FREEMAN, 2002). A diminuição da expressão de ICOS, induzida pelo CpG em células T CD4+ antígeno específicas, pode refletir na menor produção de IL-10 e, conseqüentemente, maior produção de IFN- $\gamma$ .

Interessantemente, encontramos um aumento acentuado da expressão de moléculas B7 em linfócitos T CD4+ de camundongos neonatos, o que pode ser um fator relacionado com a baixa resposta imunológica e elevada predisposição à tolerância no período neonatal. A interação B7.1/B7.2-CTLA-4 em modelos de ativação T-T tem sido considerada um importante mecanismo de supressão da proliferação e sobrevivência de linfócitos T ativados (TAYLOR et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2005). Taylor et al. (2004), utilizando modelo de transplante alogênico em camundongos transgênicos com

linfócitos T deficientes de B7.2 ou com alta expressão de B7.2, mostraram que a expressão de B7.2 em linfócitos T diminui a mortalidade por doença enxerto contra hospedeiro. Em outro modelo, foi mostrado que no cultivo de linfócitos T com altas concentrações de concanavalina A a interação B7-CTLA-4 promove a supressão da proliferação e aumento de morte celular de forma dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e óxido nítrico (MUKHERJEE et al., 2005). Entretanto, não tem sido descrito até o momento diferenças na expressão de moléculas B7 entre linfócitos T de murinos neonatos e adultos. Gelman et al. (2004) mostraram que linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados expressam RNAm para TLR-9, e que o CpG promove a sobrevivência dos linfócitos T de maneira direta. É possível que a diminuição de moléculas B7 e ICOS promovida pelo CpG, mostrada em nosso trabalho, esteja envolvida no aumento da sobrevivência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Neste modelo utilizamos camundongos transgênicos para melhor avaliar as alterações fenotípicas frente a um estímulo antigênico. A seguir, avaliamos a expressão de moléculas coestimulatórias em camundongos BALB/c após estímulo com anti-CD3. Apesar de encontrarmos um aumento na expressão de moléculas B7.2 após estímulo, não observamos diferenças entre a expressão em camundongos neonatos e adultos, como mostrado anteriormente no modelo com camundongos DO11.10. É provável que as diferenças na expressão de moléculas B7 entre neonatos e adulto sejam dependentes da participação das APCs. Também é possível que, devido ao forte estímulo com anti-CD3, a resposta tenha sido muito rápida, não permitindo, assim, observar diferenças entre neonatos e adultos.

Quando analisado o efeito do CpG na geração *in vitro* de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 antígeno-específico, o percentual de células Treg foi reduzido pela adição do CpG na cultura. O CpG é capaz de bloquear a supressão de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, pela produção de fatores coestimulatórios, principalmente IL-6, pelas APCs (PASARE; MEDZHITOV, 2003) ou agindo diretamente nas células T, tanto sobre células efetoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> como sobre células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (LaROSA et al., 2007). Além disso, células T regulatórias induzidas *in vitro*, pela adição de dexametasona e vitamina D3, expressam níveis aumentados de TLR-9, tornando-se sensíveis à ativação do CpG, que pode bloquear o efeito supressor destas células (URRY et al., 2009). É possível que a diminuição da geração de Tregs pelo CpG, bem como o bloqueio da atividade supressora das Treg, seja um mecanismo importante no efeito adjuvante e na potencialização da resposta imunológica pelo CpG.

Curiosamente, o número de células Treg gerado na cultura de neonatos foi menor do que na cultura de adultos, apesar do perfil imunológico neonatal, mais favorável à tolerância. Os principais mecanismos supressores das Treg são: deprivação de IL-2, expressão de TGF- $\beta$  de membrana e de CTLA-4, que pode inibir células apresentadoras e linfócitos T efetores (PAUST et al., 2004; SAKAGUCHI, 2005; PICCIRILLO, 2008). As moléculas CTLA-4 das células Treg podem se ligar às moléculas B7 de linfócitos T efetores, promovendo sua supressão. Desta forma, o aumento acentuado da expressão de moléculas B7 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de camundongos neonatos pode ser um efeito compensatório à baixa geração de células Treg no período neonatal, uma vez que as células do neonato podem tornar-se mais sensíveis à supressão das Treg via ligação da CTLA-4. É possível que a diminuição de moléculas B7 pelo CpG, mostrada em nosso trabalho, esteja envolvida na refração dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos à inibição pelas Treg.

O uso do CpG associado à imunoterapia em humanos parece ser promissor. O tratamento de pacientes com rinite alérgica foi capaz de reduzir os sintomas nasais e pulmonares (TULIC et al., 2004). Em pacientes com rinoconjuntivite e asma, alérgicos aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* ou *farinae*, a administração subcutânea do alérgeno associado ao CpG, empacotado em partículas semelhantes a vírus, mostrou-se seguro e eficiente na diminuição dos sintomas após 10 semanas de tratamento (SENTI et al., 2009). Além da alta eficiência da imunoterapia com CpG, outra vantagem é a diminuição do tempo de tratamento em comparação à imunoterapia convencional, melhorando a adesão dos pacientes.

Nossos resultados mostram um potencial modulatório do CpG no período neonatal e adulto nas respostas a OVA e Bt. Evidenciamos, também, diferenças qualitativas e quantitativas no efeito do CpG em relação às imunizações neonatal e adulta. Considerando a susceptibilidade dos neonatos a infecções e ao desenvolvimento de alergia, torna-se importante estabelecer estratégias imunomodulatórias que potencializem as respostas inata e adaptativa e possam ser profiláticas na prevenção de doenças alérgicas.

## 6 CONCLUSÕES

- O ODN-CpG na imunização é capaz de diminuir a produção de anticorpos anafiláticos e aumentar a produção de isótipos relacionados com padrão de resposta Th1 nas imunizações com OVA ou Bt. Esta modulação foi mais evidente em camundongos adultos, possivelmente pelas peculiaridades do neonato na resposta ao CpG, principalmente pela alta produção de IL-10 e MCP-1.
- Diferenças qualitativas e quantitativas são observadas quando comparamos a estimulação de células de neonatos e adultos com ODN-CpG. Os linfócitos B de camundongos neonatos parecem ser menos sensíveis à ativação com CpG, com direcionamento a um perfil de secreção de citocinas supressoras, enquanto os adultos apresentam um perfil inflamatório.
- Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos expressam, após estímulo antígeno específico, moléculas coestimulatórias que podem estar relacionadas com a regulação negativa da resposta imune. O CpG parece reduzir o potencial regulatório na ativação de linfócitos T.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ADKINS, B. T-cell function in newborn mice and humans. **Immunol. Today**, v. 20, n. 7, p. 330-335, 1999.

ADKINS, B. et al. Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2347-2353, 2000.

ADKINS, B. et al. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 553-564, 2004.

APPLEBY, P.; CATTY, D. Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. **J. Reprod. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 203-213, 1983.

ARRUDA, L. K. et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, n. 1, p. 343-350, 1997.

BARR, T. A. et al. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 11, p. 3040-3053, 2007.

BARRIER, M. et al. Oral and intraperitoneal administration of phosphorothioate oligodeoxynucleotides leads to control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. **J. Infect. Dis.**, v. 193, n. 10, p. 1400-1407, 2006.

BAUER, S.; WAGNER, H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 270, p. 145-154, 2002.

BERNASCONI, N. L. et al. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4500-4504, 2003.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BJORKSTEN, B. The intrauterine and postnatal environments. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, n. 6, p. 1119-1127, 1999.

BONA, C.; BOT, A. Neonatal immuno-responsiveness. **Immunologist**, v. 5, p. 5-9, 1997,

BOT, A. et al. Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. **Int. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 1641-1650, 1997.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BOT, A. et al. Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing hemagglutinin and nucleoprotein. **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1675-1682, 1998.
- BOURKE, E. et al. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 956-963, 2003.
- BRAUN, M. C. et al. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. **J. Immunol.**, v. 164, n. 6, p. 3009-3017, 2000.
- CAMPBELL, D. et al. Allergen immunotherapy: novel approaches in the management of allergic diseases and asthma. **Clin. Immunol.**, v. 97, n. 3, p. 193-202, 2000.
- CARVALHO, A. F. et al. *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* mites evoke distinct patterns of airway cellular influx in type I hypersensitivity murine model. **J. Clin. Immunol.**, v. 24, n. 5, p. 533-541, 2004.
- CHAKIR, H. et al. "Bystander polarization" of CD4+ T cells: activation with high-dose IL-2 renders naive T cells responsive to IL-12 and/or IL-18 in the absence of TCR ligation. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 7, p. 1788-1798, 2003.
- CHELVARAJAN, R. L. et al. CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 9, p. 2808-2818, 1999.
- CHENSUE, S. W. et al. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. **J. Immunol.**, v. 157, n. 10, p. 4602-4608, 1996.
- CHU, R. S. et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 10, p. 1623-1631, 1997.
- DE LEMOS, J. A. et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 4, p. 803-811, 2005.
- DUHEN, T. et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 8, p. 857-863, 2009.
- DURALI, D. et al. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4084-4089, 2003.
- FAQUIM-MAURO, E. L. et al. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572-3576, 1999.
- FISCHER, M.; EHLERS, M. Toll-like receptors in autoimmunity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1143, p. 21-34, 2008.

- FORSTHUBER, T. et al. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1728-1730, 1996.
- FOX, D. A. et al. Hapten specific IgE antibody responses in mice. V. Differential resistance of IgE and IgG B lymphocytes to X-irradiation. **J. Immunol.**, v. 117, n. 5 Pt 1, p. 1622-1628. 1976.
- FUJIEDA, S. et al. Synthetic oligodeoxynucleotides inhibit IgE induction in human lymphocytes. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, n. 1, p. 232-239, 2000.
- FUKATA, M. et al. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. **J. Immunol.**, v. 180, n. 3, p. 1886-1894, 2008.
- GELMAN, A. E. et al. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. **J. Immunol.**, v. 172, n. 10, p. 6065-6073, 2004.
- GRAY, D. et al. Innate responses of B cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 12, p. 3304-3310, 2007.
- HACKER, G. et al. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. **Immunology**, v. 105, n. 3, p. 245-251, 2002.
- HARRIS, D. P. et al. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. **J. Immunol.**, v. 174, n. 11, p. 6781-6790, 2005.
- HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-745, 2000.
- HERRERO, C. et al. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 171, n. 10, p. 5034-5041, 2003.
- HOLGATE, S. T. The epidemic of allergy and asthma. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. B2-4, 1999. Suppl.
- HOLT, P. G.; JONES, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. **Allergy**, v. 55, n. 8, p. 688-697, 2000.
- HOLT, P. G. et al. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 116, n. 1, p. 16-24, 2005.
- HORNER, A. A. et al. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 102-118, 2001.
- HORNER, A. A. et al. Optimized conjugation ratios lead to allergen immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugates with retained immunogenicity and minimal anaphylactogenicity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, n. 3, p. 413-420, 2002.

- HUANG, C. F. et al. Effect of neonatal sublingual vaccination with native or denatured ovalbumin and adjuvant CpG or cholera toxin on systemic and mucosal immunity in mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 68, n. 5, p. 502-510, 2008.
- ISHIZAKA, K.; ADACHI, T. Generation of specific helper cells and suppressor cells in vitro for the IgE and IgG antibody responses. **J. Immunol.**, v. 117, n. 1, p. 40-47, 1976.
- JEGERLEHNER, A. et al. TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a. **J. Immunol.**, v. 178, n. 4, p. 2415-2420, 2007.
- KARPUS, W. J. et al. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. **J. Immunol.**, v. 158, n. 9, p. 4129-4136, 1997.
- KLINE, J. N. et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. **J. Immunol.**, v. 160, n. 6, p. 2555-2559, 1998.
- KLINMAN, D. M. et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 7, p. 2879-2883, 1996.
- KOVARIK, J. et al. CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but may fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming. **J. Immunol.**, v. 162, n. 3, p. 1611-1617, 1999.
- KRAMER, D. R. et al. Cytokine mediated effects in mucosal immunity. **Immunol. Cell Biol.**, v. 73, n. 5, p. 389-396, 1995.
- KRIEG, A. M. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 546-549, 1995.
- KRIEG, A. M. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. **Vaccine**, v. 19, n. 6, p. 618-622, 2000.
- KRIEG, A. M. et al. Mechanism of action of CpG DNA. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 247, p. 1-21, 2000.
- KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 709-760, 2002.
- KRUG, A. et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 10, p. 3026-3037, 2001.
- LAROSA, D. F. et al. CpG DNA inhibits CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4<sup>+</sup> T cells. **Immunol. Lett.**, v. 108, n. 2, p. 183-188, 2007.
- LEE, S. M. et al. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 945-954, 1996.

- LI, L. et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 429-440, 2004.
- LIGHVANI, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 26, p. 15137-15142, 2001.
- LIN, L. et al. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 5, p. 1483-1487, 2004.
- LIU, N. et al. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 687-693, 2003.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.
- MANICKAN, E. et al. DNA immunization of neonates induces immunity despite the presence of maternal antibody. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 9, p. 2371-2375, 1997.
- MARSHALL-CLARKE, S. et al. Neonatal immunity: how well has it grown up? **Immunol. Today**, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2000.
- MCKENZIE, A. N. et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 8, p. 3735-3739, 1993.
- MILLER, D. L. et al. Synthesis of IgE by the human conceptus. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 52, n. 3, p. 182-188, 1973.
- MIN, B. et al. Neonatal exposure to antigen induces a defective CD40 ligand expression that undermines both IL-12 production by APC and IL-2 receptor up-regulation on splenic T cells and perpetuates IFN-gamma-dependent T cell anergy. **J. Immunol.**, v. 166, n. 9, p. 5594-5603, 2001.
- MINTY, A. et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, v. 362, n. 6417, p. 248-250, 1993.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORI, J. C. et al. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, n. 2, p. 180-184, 2001.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, v. 8, n. 16, p. 813-820, 1969.

- MUKHERJEE, S. et al. CTLA4-CD80/CD86 interactions on primary mouse CD4<sup>+</sup> T cells integrate signal-strength information to modulate activation with Concanavalin A. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, n. 1, p. 144-157, 2005.
- NAHMIA, A. J.; KOURTIS, A. P. The great balancing acts. The pregnant woman, placenta, fetus, and infectious agents. **Clin. Perinatol.**, v. 24, n. 2, p. 497-521, 1997.
- NOGRALES, K. E. et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 123, n. 6, p. 1244-1252 e1242, 2009.
- OKAZAKI, T. et al. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 779-782, 2002.
- OLIVEIRA, C. R. et al. Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *Blomia tropicalis*/ovalbumin murine co-immunization model. **J. Clin. Immunol.**, v. 25, n. 2, p. 153-161, 2005.
- OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **J. Immunol.**, v. 81, n. 4, p. 355-357, 1958.
- PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1033-1036, 2003.
- PAUST, S. et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 28, p. 10398-10403, 2004.
- PEDRAS-VASCONCELOS, J. A. et al. CpG oligodeoxynucleotides protect newborn mice from a lethal challenge with the neurotropic Tacaribe arenavirus. **J. Immunol.**, v. 176, n. 8, p. 4940-4949, 2006.
- PENG, S. L. et al. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 8, p. 5545-5550, 2002.
- PEREZ, J. R. et al. Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 13, p. 5957-5961, 1994.
- PICCIRILLO, C. A. Regulatory T cells in health and disease. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 395-401, 2008.
- PIHLGREN, M. et al. CpG-motifs enhance initial and sustained primary tetanus-specific antibody secreting cell responses in spleen and bone marrow, but are more effective in adult than in neonatal mice. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2492-2499, 2003.
- PIRES, M. C. et al. Reactivity of anti-*Blomia tropicalis* IgG and IgE in patients with atopic dermatitis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 27, n. 4, p. 309-313, 2002.
- RIZZO, M. C. et al. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Ann. Allergy**, v. 71, n. 2, p. 152-158, 1993.

- ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 85, n. 1, p. 9-18; quiz 18, 21, 2000.
- ROSE, S. et al. Murine neonatal CD4<sup>+</sup> cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **J. Immunol.**, v. 178, n. 5, p. 2667-2678, 2007.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.
- SANO, K. et al. Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner. **J. Immunol.**, v. 170, n. 5, p. 2367-2373, 2003.
- SATO, M. N. et al. Oral tolerance induction to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* in sensitized mice: occurrence of natural autoantibodies to immunoglobulin E. **Clin. Exp. Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1667-1674, 2002.
- SCHWARTZ, D. A. et al. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 1, p. 68-73, 1997.
- SEDGWICK, J. D.; HOLT, P. G. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. **J. Immunol. Methods**, v. 57, n. 1-3, p. 301-309, 1983.
- SENTI, G. et al. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. **Clin. Exp. Allergy**, v. 39, n. 4, p. 562-570, 2009.
- SEREBRISKY, D. et al. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. **J. Immunol.**, v. 165, n. 10, p. 5906-5912, 2000.
- SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 116-126, 2002.
- SHIROTA, H. et al. Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. **J. Immunol.**, v. 164, n. 11, p. 5575-5582, 2000.
- SIEGRIST, C. A. et al. Determinants of infant responses to vaccines in presence of maternal antibodies. **Vaccine**, v. 16, n. 14-15, p. 1409-1414, 1998.
- SPARWASSER, T. et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 6, p. 2045-2054, 1998.
- STACEY, K. J. et al. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. **J. Immunol.**, v. 157, n. 5, p. 2116-2122, 1996.
- SUN, C. M. et al. Upon TLR9 signaling, CD5<sup>+</sup> B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 467-477, 2005.

- SUR, S. et al. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. **J. Immunol.**, v. 162, n. 10, p. 6284-6293, 1999.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.
- TAYLOR, P. A. et al. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions. **J. Immunol.**, v. 172, n. 1, p. 34-39, 2004.
- THOMAS, W. R. et al. *Blomia tropicalis*: more than just another source of mite allergens. **Clin. Exp. Allergy**, v. 33, n. 4, p. 416-418, 2003.
- TRIFARI, S. et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 8, p. 864-871, 2009.
- TULIC, M. K. et al. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 113, n. 2, p. 235-241, 2004.
- UTAISINCHAROEN, P. et al. CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, n. 3, p. 467-473, 2002.
- VEKEMANS, J. et al. Neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4+ T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 5, p. 1531-1535, 2001.
- VELDHOEN, M. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.
- WAHN, U. What drives the allergic march? **Allergy**, v. 55, n. 7, p. 591-599, 2000.
- WALKER, W. E.; GOLDSTEIN, D. R. Neonatal B cells suppress innate toll-like receptor immune responses and modulate alloimmunity. **J. Immunol.**, v. 179, n. 3, p. 1700-1710, 2007.
- WEERATNA, R. D. et al. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 65-71, 2001.
- WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 51, n. 3, p. 301-303, 2002.
- WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunol. Today**, v. 18, n. 7, p. 335-343, 1997.
- WILD, J. S.; SUR, S. CpG oligonucleotide modulation of allergic inflammation. **Allergy**, v. 56, n. 5, p. 365-376, 2001.

WILLS-KARP, M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 255-281, 1999.

ZIMMERMANN, S. et al. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 160, n. 8, p. 3627-3630, 1998.

# 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](#)