DANIEL MAY DE OLIVEIRA

Efeito da Sinvastatina na Evolução Clínica e na
Resposta Imune Celular Th17 na Encefalite Auto-
Imune Experimental

Dissertação Apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade De São Paulo, para
Obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2009

Resumo

Daniel MO. Efeito da Sinvastatina na Evolução Clínica e na Resposta Imune Celular Th17 na Encefalite Auto-Imune Experimental [Dissertação]. São Paulo: Instituto de ciências biomédicas da universidade de São Paulo; 2009.

Encefalite auto-imune experimental (EAE) é o modelo animal da doença humana esclerose múltipla, doença auto-imune que se caracteriza por inflamação do sistema nervoso central (SNC) com importante destruição da bainha de mielina mediada por linfócitos T. Foi demonstrado que as estatinas, medicamentos usados para tratamento de dislipidemia, podem ter efeitos benéficos na EAE e em outros modelos de inflamação. Diversos mecanismos de ação foram descritos para explicar esses efeitos, entre eles: estímulo a expressão de HO-1, inibição da expressão de *Toll-like receptors* (TLR) e inibição da produção de citocinas de padrão Th1. O papel dos TLRs na EAE é ainda controverso com resultados contraditórios na literatura. Assim estudamos o efeito de uma estatina, a sinvastatina, na evolução clínica da EAE e seus mecanismos de ação. Também avaliamos o papel do TLR4 na EAE. A EAE foi induzida com peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Foram usados camundongos C57BL/6J selvagens e TLR-4 “knockouts” (-/-). Os animais foram tratados com sinvastatina por gavagem 1 e 5 mg/kg/dia. A evolução da doença foi avaliada clinicamente e a expressão das diferentes moléculas foi avaliada por PCR em tempo real e por ensaio luminex. O infiltrado inflamatório no SNC foi avaliado por citometria de fluxo. Culturas de astrócitos foram usadas para avaliar o efeito da sinvastatina e da ativação do TLR4 *in vitro*. O tratamento com sinvastatina melhorou a evolução clínica da EAE nas doses de 1 e 5 mg/kg/dia, ($P < 0,01$ e $0,05$ respectivamente). A análise por PCR em tempo real não evidenciou diferenças estatísticas no tratamento com sinvastatina. A análise do infiltrado celular no SNC mostrou mudança do padrão de diferenciação dos linfócitos com menor porcentagem de células produtoras de IL-17 nos grupos tratados em relação aos controles ($P < 0,001$). Em comparação aos controles, os camundongos TLR-4 -/- apresentaram melhor evolução da doença ($P = 0,005$). Não ocorreram diferenças estatísticas nos níveis de citocinas de animais TLR4 -/- em relação aos controles. A ativação do TLR4 em astrócitos mostrou aumento de HO-1, TNF- α e IL-1 β . Concluímos que o tratamento com sinvastatina melhora a evolução clínica da EAE através da inibição da produção de IL-17. Animais TLR-4 -/- têm melhor desfecho clínico na EAE que controles selvagens. A produção de citocinas inflamatórias desencadeada pela ativação do TLR4 em astrócitos pode explicar, em parte, a melhor evolução dos animais TLR4 -/-.

Palavras-chave: EAE. Estatinas. Sinvastatina. Interleucina-17. Toll-like Receptor-4.

Abstract

Daniel MO. The Effects of Simvastatin in Clinical Outcome and in the Development of Th17 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis [Master thesis]. São Paulo: Instituto De Ciências Biomédicas Da Universidade De São Paulo; 2009.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is considered the experimental model for the human multiple sclerosis disease, an autoimmune disorder which its hallmark is an inflammatory response in the central nervous system (CNS) mediated by T lymphocytes. It has been demonstrated that statins, used as lipid-lowering agents, can have beneficial effects on EAE and other models of inflammation. Several actions have been described to explain these effects: enhancement of HO-1 expression, inhibition of Toll-like receptors expression and inhibition of Th1 cytokines. The role of TLRs in EAE is still matter of controversy with data showing contradictory results. We have investigated the effect of a statin, simvastatin, on EAE clinical development and the mechanisms behind those effects. EAE was induced with MOG₃₅₋₅₅ peptide. C57BL/6J wild type (WT) and TLR4 knockout (-/-) mice were used. Simvastatin was administered orally at doses of 1 and 5 mg/kg once a day. EAE development was evaluated clinically; Real time PCR and luminex assay were used to evaluate expression of different molecules. The cellular inflammatory infiltrate in the CNS was evaluated by flow cytometry. Primary astrocyte cultures were used to evaluate the effect of simvastatin and of TLR activation *in vitro*. Simvastatin treatment ameliorated EAE clinical outcome at doses 1 and 5 mg/kg/day ($P < 0.01$ e 0.05 respectively). Real time PCR analysis did not show significant differences between simvastatin treatment and control group considering the molecules: HO-1, IL-6, TGF- β , TLR4 and MCP-1. SNC cellular infiltrates analysis showed altered pattern of differentiation with decreased percentage of IL-17-producing T lymphocytes in treated group comparing with controls ($P < 0.001$). Comparing to controls, TLR4 -/- mice showed better clinical development ($P < 0.005$). There were no statistical differences in cytokines levels when TLR4 -/- mice and controls were compared. TLR4 activation on astrocytes showed increased expression of HO-1, TNF- α and IL-1 β . We concluded that simvastatin treatment ameliorates EAE clinical outcome through inhibition of IL-17 production. Mice TLR4 -/- have better EAE clinical outcome than WT controls. The production of inflammatory cytokines initiated when TLR4 is activated in astrocytes can explain, at least in part, the better clinical outcome in knockout mice.

Palavras-chave: EAE. Statins. Simvastatin. Interleukin-17. Toll-like Receptor-4.

1 Introdução

Esclerose múltipla (EM) é doença do sistema nervoso central (SNC) que, do ponto de vista anátomo-patológico, manifesta-se por desmielinização focal aguda de caráter inflamatório e perda axonal que evolui para formação de placas escleróticas que dão nome à doença (1, 2). Apresenta diferentes formas de evolução, sendo mais comum a forma remitente-recorrente que ocorre em cerca de 80% dos pacientes e caracteriza-se por exacerbações seguidas por períodos de estabilidade clínica. A doença é típica do adulto jovem com dois terços dos casos iniciando-se entre 20 e 40 anos de idade, sendo, por isso, causa importante de incapacidade neurológica nessa população (1).

As placas são encontradas nos hemisférios cerebrais, tronco cerebral, medula espinal, nervos ópticos e quiasma óptico. As lesões caracterizam-se por desmielinização e gliose com importante perda de oligodendrócitos no centro e presença de fagócitos mononucleares, linfócitos e, eventualmente, plasmócitos e eosinófilos. O grau de lesão axonal é variável sendo a perda de mielina quase sempre mais intensa (3).

No passado, acreditava-se que a doença era praticamente restrita à substância branca com mínimo envolvimento da substância cinzenta. Atualmente, sabe-se que o envolvimento da substância cinzenta é comum, tendo sido descrito em até 93% dos pacientes. Da mesma forma, a lesão axonal, desprezada no passado, é agora alvo de intensa investigação. Sua importância é salientada pela clara relação entre o grau de perda axonal e a incapacidade neurológica dos pacientes (3-5).

Nos últimos anos, avanços importantes ocorreram em relação à compreensão dos mecanismos responsáveis pelos aspectos patológicos cardinais da EM: inflamação, desmielinização e neurodegeneração (2). Apesar de todo o conhecimento adquirido, ainda não foi possível esclarecer qual o evento inicial da doença, no

entanto, a vasta gama de informações acumuladas permitiu o surgimento de novas medicações e muitos outros fármacos estão hoje em fase de teste (3, 6).

Existem também doenças que se assemelham a EM. A doença de Devic ou neuromielite optica foi considerada uma variante de EM no passado e hoje é considerada doença a parte. Também é doença auto-imune, mas é mediada por mecanismos imunopatológicos diferentes daqueles envolvidos na EM (7). A encefalomielite disseminada aguda (conhecida pela sigla: ADEM) é outra doença auto-imune e desmielinizante do SNC que se diferencia da EM por ter evolução clínica monofásica, sem remissões e ser com frequência precedida por infecções ou vacinação (8).

1.1 Encefalite Auto-imune Experimental

A encefalite auto-imune experimental é doença inflamatória do sistema nervoso central (SNC), induzida em animais de laboratório através da imunização ativa com peptídeos da mielina ou através de transferência adotiva de células T CD4+ reativas a mielina. É amplamente usada como modelo animal de esclerose múltipla e como modelo de doença auto-imune órgão específica (9).

Existem diversas variações do modelo de acordo com o tipo de animal utilizado e o material escolhido para indução, podendo-se utilizar proteínas, peptídeos ou mesmo macerado de tecido nervoso. O uso do peptídeo PLP proveniente da proteína de proteolípídeo no camundongo de linhagem SJL produz doença de evolução remittente recorrente como a doença humana. No entanto, os animais não desenvolvem fase secundariamente progressiva como os pacientes com EM (10, 11). A imunização de camundongos da linhagem NOD (do inglês, *Non-obese diabetic*) pelo peptídeo MOG₃₅₋₅₅ produz doença com fase secundariamente progressiva muito parecida com a evolução clínica da EM (12, 13).

A imunização de camundongos C57BL/6 pelo peptídeo MOG₃₅₋₅₅ se caracteriza por lesões inflamatórias e desmielinizantes em nervo óptico, quiasma e substância branca do cérebro e medula espinhal (14). Os infiltrados inflamatórios são perivasculares constituídos principalmente por macrófagos e linfócitos T e B. Ocorre também algum grau de resposta humoral com formação de títulos significativos de anticorpos anti-MOG. O sistema nervoso periférico é poupado (12). Este padrão é muito semelhante ao encontrado na EM (8).

O modelo de EAE no camundongo C57BL/6 caracteriza-se por padrão altamente reprodutível e previsível com quase todos os animais apresentando paralisia de caráter ascendente, sendo, no entanto, doença crônica progressiva ou monofásica sem remissões (15).

1.2 Imunopatologia da EM e da EAE

O estudo dos aspectos imunopatológicos da EM é limitado pelo fato de ser essa doença restrita ao sistema nervoso central. A dificuldade de obtenção de amostras do tecido nervoso impede que alguns aspectos sejam estudados em seres humanos. Portanto, a maior parte do conhecimento sobre o papel do sistema imune na EM se deve aos modelos experimentais, por isso a imunopatologia das doenças: humana e experimental, será discutidas em conjunto.

A noção de EM como doença auto-imune mediada por células T CD4⁺ veio do modelo experimental, a depleção das células T CD4⁺ tratava de forma eficiente a doença(16).

As células T CD4⁺ podem ser divididas em subpopulações de acordo com o tipo de citocinas que produzem: Th1 (secretores de IFN-gama e IL12) ou Th2 (secretores de IL-4). Na EAE, células com perfil Th1 e Th2 são encontradas no baço, porém apenas células com perfil Th1 são encontradas no SNC. As células T CD4⁺

produtoras de IFN- γ ou TNF- α são encontradas no SNC a partir do 7º dia pós-imunização e atingem um pico por volta do 20º dia. Também respondem pela produção de TNF- α : células da microglia e macrófagos infiltrantes, sendo, os últimos, mais importantes a partir do 14º dia(17). Os mecanismos efetores de lesão são celulares; os anticorpos anti-MOG, embora presentes, não são necessários para desencadear lesão(18).

Em humanos, estudos mostraram que células T autoreativas (CD4+ e CD8+) podem desencadear inflamação e desmielinização no SNC (19, 20). Pacientes com EM tem o mesmo número de linfócitos T reativos à mielina que controles saudáveis. Existem, no entanto, diferenças qualitativas entre esses dois grupos. Nos pacientes com EM, essas células apresentam fenótipo efector ou de memória enquanto que, nos controles, elas apresentam fenótipo “naive”. O perfil de citocinas produzidas por esses linfócitos também difere nos dois grupos: Th1 nos pacientes com EM e, Th2, nos controles (21, 22).

Existem também evidências que sugerem que células T CD8+ com especificidade para mielina sejam mais numerosas em pacientes com EM remitente-recorrente que em pessoas híginas (22, 23).

A produção intratecal de imunoglobulinas está aumentada em pacientes com EM. Fato que é sugerido pela presença de bandas oligoclonais no líquido cefalorraquiano (LCR) (8). Estudos recentes evidenciaram proliferação de células B no LCR, mostrando que existe resposta humoral contra antígenos específicos no SNC e que clones de células B com a mesma especificidade estão ausentes na circulação periférica. Atualmente estudos estão em andamento com o objetivo de determinar quais antígenos são reconhecidos pelos auto-anticorpos produzidos pelos clones de linfócitos B no SNC (24-26).

Não se sabe que tipo de evento inicia a doença humana, nem se ela inicia dentro ou fora do SNC (8). A EAE é induzida por emulsão que é injetada no subcutâneo do

animal (11). Nos linfonodos que drenam a emulsão ocorre ativação de células apresentadoras de antígenos que captam os antígenos da mielina utilizados, por exemplo, MOG₃₅₋₅₅ e os apresentam em moléculas de MHC de classe II. Essas APCs também expressam moléculas co-estimuladoras como B7-1 o que permite a ativação de linfócitos T reativos a antígenos da mielina (11). A importância da co-estimulação na EAE foi demonstrada em estudos que bloquearam essas moléculas com anticorpos e, dessa forma, preveniram o desenvolvimento da doença. Em seres humanos, a importância da co-estimulação não é clara. Foi demonstrado que, em paciente com EM, a proliferação de células mononucleares de sangue periférico é relativamente independente da co-estimulação o que sugere perda da regulação dessas vias na patologia da EM (27).

A apresentação de antígenos nas moléculas de MHC de classe II também é importante na EAE tanto nos linfonodos drenantes(28) quanto dentro do SNC, pois foi demonstrado que animais que não expressam MHC de classe II no SNC são resistentes a indução de EAE (29).

Uma vez ativados nos linfonodos, os linfócitos precisam migrar para o SNC atravessando a barreira hemato-encefálica. No processo de migração celular é importante a atuação das selectinas para o rolamento dos leucócitos. Na EAE a L-selectina é importante nesse processo (30). Em seguida é necessário que ocorra adesão firme ao endotélio, processo que é dependente das integrinas (31). Linfócitos T ativados expressam as integrinas LFA-1 e VLA-4 que se ligam respectivamente a ICAM-1 e VCAM-1. Animais deficientes em ICAM-1 produzem menores quantidades de citocinas Th1, mas, surpreendentemente, desenvolvem EAE de forma mais intensa (32). O bloqueio da VLA-4 já é realidade no tratamento da doença humana (33). Por fim, para chegar ao parênquima do SNC os leucócitos precisam passar pela membrana basal sendo necessário, nesse caso, a atividade proteolítica de enzimas como as metaloproteinases. A importância da MMP-9 já foi

demonstrada em animais (34) e também existem evidências de sua importância na EM (35).

Para que os linfócitos sejam atraídos para o SNC é necessária a ação das quimiocinas. Elas têm papel chave na formação do infiltrado celular na EAE. A CCL2, também conhecida como MCP-1 (do inglês: *monocyte chemoattractant protein 1*), é produzida por astrócitos (36, 37). Seu receptor CCR2 tem dupla função no desenvolvimento da doença atuando simultaneamente no recrutamento de linfócitos e monócitos para o SNC e intensificando a resposta Th1 (38, 39). De fato, o MCP-1 é importante não apenas na EAE (40, 41) como também em outros modelos de inflamação (42). Alguns estudos demonstraram que as estatinas, amplamente usadas no tratamento de dislipidemia, podem ser usadas para inibir a expressão de MCP-1, dessa forma, atenuando a inflamação e melhorando o desfecho clínico (43, 44).

Durante anos a EAE foi considerada como doença de padrão exclusivamente Th1 (45). Por outro lado, vários relatos apontavam na direção oposta. Animais deficientes em INF- γ , receptor de IFN- γ e STAT-1, essenciais para resposta Th1, são extremamente susceptíveis ao desenvolvimento de EAE e o fazem de forma clinicamente mais intensa (46-50). A caracterização em 2005 de novo subtipo de células T diferenciadas das células Th1 e Th2 pela produção de interleucina 17 (IL-17) elevou o entendimento da fisiopatologia da EAE e de outras doenças auto-imunes a um novo patamar (51, 52).

A IL-17 representa nova família de citocinas envolvidas em proliferação, maturação e quimiotaxia de neutrófilos. Tem efeitos pleiotrópicos induzindo a expressão de citocinas inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , fator estimulante de colônia de granulócitos e MCP-1 em vários tipos de células. Também age como coestimulador de células T e participa do processo de rejeição de transplantes por favorecer a maturação de células dendríticas (53, 54).

O papel fundamental da resposta Th17 no desenvolvimento da EAE ficou claro a partir de estudos com anticorpos anti-IL-17 que resultaram em proteção parcial contra o desenvolvimento da doença (52). Esses resultados foram corroborados por estudo com animais deficientes em IL-17 (IL-17 $-/-$) que também apresentaram resistência parcial à doença (55). O fato de que não houve resistência total, mostra que a EAE não é exclusivamente produzida pela resposta Th17, mas sim o produto de uma combinação dos padrões Th1 e Th17.

Nos últimos anos, o papel da resposta Th17 tem sido demonstrado também na EM. Análise por microarranjos mostrou aumento da transcrição de IL-17 em lesões de EM (56). Foi demonstrado que o líquido cefalorraquiano de pacientes com EM tem níveis aumentados de IL-17 e IL-8 quando comparado ao de controles (57). Por fim, linfócitos T de memória produtores de IL-17 e IL-23 têm a capacidade de infiltrar o SNC e promover inflamação no SNC (58).

Como em outras doenças auto-imunes, exacerbações desencadeadas por infecções são comuns na EM (8, 59). Os mecanismos envolvidos nesse processo são hoje motivo de investigação. É possível que células T auto-reativas previamente tolerizadas sejam reativadas em algumas situações. Foi demonstrado que no modelo de EAE a ativação de APCs via *Toll-like receptor-9* (TLR-9) pode “quebrar” a tolerância imunológica e precipitar exacerbações da doença (60). Os TLRs serão discutidos adiante.

1.3 Estatinas

As estatinas são medicamentos de prescrição oral que inibem a enzima 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA para L-mevalonato. São amplamente usados no tratamento de dislipidemias, estima-se que são usados por mais de 25 milhões de pessoas em

diversos países (61). O interesse por seus efeitos imunomoduladores surgiu em 1995 com a divulgação de que transplantados cardíacos em tratamento com pravastatina apresentavam menor incidência de episódios de rejeição e menor mortalidade (62). As ações imunomodulatórias das estatinas parecem estar diretamente relacionadas à inibição da produção de L-mevalonato que é substrato não apenas para síntese de colesterol, mas também para isoprenilação de proteínas ligadas ao GTP como, por exemplo, Ras e Rho. Isoprenilação é processo necessário para o trânsito intracelular dessas proteínas e sua localização na superfície interna da membrana citoplasmática (63).

A partir desse primeiro relato, diversos estudos revelaram inúmeras ações imunomoduladoras das estatinas. Em 2002, surgiram os primeiros relatos de uso de estatinas na EAE (64, 65) que foram seguidos por outros relatos revelando novos mecanismos de ação (66), (67).

Embora o efeito metabólico das estatinas seja pontual ao nível da HMG-CoA redutase, a inibição do L-mevalonato leva a diversos efeitos imunomoduladores em diferentes níveis do sistema imune com repercussões importantes na fisiopatologia de doenças auto-imunes em diferentes tipos de inflamação (61).

A atorvastatina pode inibir a expressão constitutiva de moléculas de MHC II em células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais e a expressão induzida dessas moléculas em APCs não profissionais. Esse efeito também foi demonstrado na microglia evidenciando que a atorvastatina também pode inibir a apresentação de antígenos no SNC (64, 68).

A expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 que são necessárias no processo de ativação dos linfócitos T através da ligação com CD28 também pode ser inibida pela ação das estatinas. Foi demonstrado que tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina podem inibir a expressão dessas moléculas dificultando o

processo de maturação das APC e, dessa forma, reduzindo a capacidade dessas células de ativar linfócitos T (69). O mesmo efeito foi descrito na microglia (64).

As estatinas também podem inibir a proliferação de linfócitos diretamente. A atorvastatina pode provocar anergia de linfócitos T pela fosforilação da proteína ERK1 (70). Em humanos, lovastatina, sinvastatina e mevastatina inibiram de forma dose dependente a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) (71).

De todos os efeitos imunomodulatórios descritos até o momento, o que recebeu maior ênfase da literatura foi a capacidade das estatinas de inibir a resposta imune de padrão Th1. Esse efeito foi demonstrado não apenas na EAE, como também em outros modelos de doenças Th1 e nem sempre foi associado à intensificação correspondente da resposta Th2. Isso ficou claro na uveíte autoimune experimental (EAU) tratada com lovastatina e na artrite induzida por colágeno tratada com sinvastatina. Nos dois casos houve inibição da diferenciação para Th1 sem que se observasse intensificação da resposta Th2 (72, 73). Na EAE foi efetivamente demonstrado um desvio da resposta imune com inibição de citocinas Th1 e aumento das citocinas de padrão Th2. Youssef et al. mostraram que a atorvastatina inibe a fosforilação de STAT-4 e estimula a fosforilação de STAT-6 (64). Outro estudo mostrou inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e da fosforilação do fator de transcrição T-bet (74).

A infiltração de células mononucleares é passo fundamental no desenvolvimento da EAE e da EM. A estratégia de bloquear a adesão entre leucócitos e endotélio com uso de anticorpo anti-integrinas foi eficiente tanto na EAE quanto na doença humana (33, 75). As estatinas também agem nessa fase da EAE. Foi demonstrado que as estatinas podem agir em células endoteliais inibindo a expressão constitutiva e a expressão induzida por IFN- γ da ICAM-1 (76). Elas também podem agir nos leucócitos, a lovastatina tem a capacidade de se ligar diretamente a LFA-1

dificultando sua ligação com a ICAM-1 (77). A lovastatina pode ainda inibir a expressão de MAC-1 (CD11b/CD18) nos fagócitos mononucleares (78) e a expressão de VCAM-1 nas células endoteliais o que resulta em diminuição significativa da migração celular (79).

Para que as células mononucleares ganhem acesso ao SNC, a adesão ao endotélio é processo necessário, mas não suficiente. A membrana basal precisa ser degradada pelas metaloproteinases (MMP) para que os leucócitos efetivamente entrem no tecido do SNC. A fluvastatina inibe a secreção de MMP-9 por macrófagos de camundongos e humanos (80). Esse efeito também foi demonstrado com a cerivastatina em monócitos humanos de sangue periférico (81). No modelo de EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ a atorvastatina tem seus efeitos protetores intensificados quando associada a minociclina, derivado semi-sintético da tetraciclina que reduz a secreção e a atividade enzimática da MMP-9 (82).

Talvez o fato de maior relevância em relação à EM e à EAE seja a possibilidade de inibição da resposta Th17 pelas estatinas. Foi demonstrado que a pravastatina pode inibir a inflamação alérgica das vias aéreas em camundongos BALB/C pela inibição da produção da IL-17 (83). Efeito semelhante foi descrito em cultura de células epiteliais brônquicas de pacientes receptores de transplante de pulmão. Nesse estudo o tratamento com sinvastatina reduziu a expressão de mediadores inflamatórios mediada por IL-17 como, por exemplo, IL-6 e IL-8 (84). Relato de grande importância para tratamento da EM foi feito por Zhang et al. que mostraram que a sinvastatina inibe a expressão do fator de transcrição RORC em linfócitos T CD4⁺ humanos (85). No entanto, até o momento, nenhum trabalho mostrou inibição da resposta Th17 pela ação das estatinas no modelo de EAE.

Dois pequenos estudos clínicos sobre o efeito das estatinas no tratamento da EM foram relatados. A ausência de grupo controle e o curto período de acompanhamento dos pacientes impedem conclusões definitivas. Nenhuma

alteração clínica foi observada nos pacientes, porém houve redução das lesões nos exames de ressonância magnética indicando possível redução das lesões inflamatórias (86, 87). Recentemente foi publicado estudo de fase II mostrando melhora dos parâmetros da ressonância magnética em pacientes tratados com atorvastatina em monoterapia e em associação com IFN- β (88).

1.4 Toll-Like Receptors

O receptor Toll é molécula que foi inicialmente identificada na drosófila na qual executa importante função na formação de eixo dorsal-ventral durante a embriogênese (31) e na imunidade antifúngica (89). Posteriormente, receptores semelhantes ao Toll, os TLR (do inglês, *Toll-like Receptors*) foram identificados em mamíferos.

O interesse em relação aos TLR aumentou na medida em que se percebeu sua importância para a imunidade inata. Durante muitos anos imunologistas se perguntaram o que desencadeava os processos inflamatórios. Parecia óbvio que a presença de microorganismos ou lesão tecidual iniciava processo inflamatório, não havia, no entanto, explicação em nível molecular sobre como uma célula poderia perceber a presença de microorganismos e, então, iniciar resposta ao invasor. Por ironia, muito se sabia sobre a resposta imune adaptativa, teoricamente mais complexa que a imunidade inata. A descoberta de receptores semelhantes ao Toll em mamíferos não apenas respondeu a essa pergunta pendente como também abriu caminho para o entendimento da imunogenicidade de substâncias e, por conseguinte, abriu caminho para o desenvolvimento de novas vacinas (31).

De forma geral, os TLRs funcionam nos mamíferos como sensores de perigo. Eles são ativados pela presença de sinais de perigo, por exemplo, pela presença de lipopolissacáride (LPS) das bactérias gram-negativas ou peptidoglicanos das

bactérias gram-positivas e estão estrategicamente localizados em células epiteliais e do sistema imune (31).

Cada TLR apresenta especificidade diferente para padrões moleculares encontradas em microorganismos, por exemplo: TLR2 é ativado por peptidoglicanos de bactérias gram-positivas, TLR4 é ativado pelo LPS das bactérias gram-negativas e o TLR5 é ativado por flagelina (31).

Os TLR são expressos em diferentes tipos de células da resposta imune, entre elas, linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células endoteliais. Quando ativados estimulam a expressão de genes que codificam proteínas importantes na resposta imune inata como citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-12), moléculas de adesão (E-selectina) e enzimas envolvidas com a eliminação de bactérias como a óxido nítrico sintase induzida (31).

A proteína MYD88 é o adaptador citoplasmático que se liga à maioria dos TLR, ela também é utilizada pela família de receptores da IL-1 e IL-18 (90-92). Camundongos MYD88 $-/-$ são resistentes ao choque induzido por LPS (93) e também não apresentam resposta à estimulação com peptidoglicanos (94), flagelina, componentes virais (95) e outras moléculas de microorganismos que comumente ativam respostas da imunidade inata (96, 97).

Alguns TLRs são capazes de ativar outras proteínas e desencadear respostas a microorganismos por mecanismos independentes da proteína MYD88 (31). A produção de citocinas inflamatórias depende principalmente dela, no entanto, os TLRs 3 e 4 são capazes de estimular a produção de IFN- β através de via alternativa que utiliza como adaptador citoplasmático a proteína TRIF (98). O TLR3 utiliza exclusivamente esta via enquanto o TLR4 utiliza ambas, TRIF e MYD88 (99). A ativação da via do MYD88 resulta no recrutamento da proteína IRAK (do inglês: IL-1 receptor-associated Kinase) que se autofosforila, dissocia-se do MYD88 e ativa a proteína TRAF-6 (do inglês: TNF-R-associated factor-6) que, por sua vez, leva a

ativação do NF- κ B (do inglês: nuclear factor κ B), fator de transcrição responsável pela expressão dos genes relacionados às ações dos TLRs (31).

Inicialmente acreditava-se que o papel dos TLRs estava restrito a imunidade inata contra microorganismos, porém estudos revelaram sua participação em lesões estéreis como na lesão hepática por isquemia/reperfusão (IRI) (100) e na aterosclerose (101). À medida que o conhecimento evoluiu ficou claro que os TLRs influenciam também na imunidade adaptativa e em mecanismos regulatórios. Foi demonstrado que a ativação da via TLR-MYD88 nos linfócitos B é necessária para desencadear respostas humorais do tipo T-dependente (102). Também foi demonstrado que o TLR2 está presente nas células T regulatórias. Sua ativação inibe a função regulatória dessas células e, ao mesmo tempo, estimula sua proliferação. Isso permite que, durante processo infeccioso, ocorra inibição da regulação permitindo a ação das células efetoras. Quando ocorre o clearance do microorganismo invasor, a população expandida de células Treg pode voltar a atuar restabelecendo a homeostase (103).

O progressivo interesse pelos TLRs levou ao estudo desses receptores nas doenças autoimunes, inclusive na EAE. Prinz et al. estudaram os TLRs 2, 9 e a proteína MYD88 no modelo da EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅. Animais TLR2 $-/-$ mostraram evolução clínica idêntica a dos animais WT, os TLR9 $-/-$ apresentam EAE menos agressiva e de início clínico mais tardio em relação aos controles e os MYD88 $-/-$ foram completamente resistentes a indução da doença. O estudo concluiu que a ativação do TLR9 por patógenos pode ser responsável pelas exacerbações de EM provocadas por infecções (104). O TLR4 também foi estudado na EAE, Kerfoot et al. mostraram que camundongos TLR4 $-/-$ apresentam resistência parcial à indução da doença e que a toxina pertussis, usada nos protocolos de indução da EAE, age tanto por mecanismos dependentes quanto independentes do TLR4 (105). No entanto, o papel dos TLRs na EAE tornou-se controverso recentemente com a

publicação de estudo mostrando doença clinicamente mais grave em animais deficientes de vários TLRs. Nesse estudo Marta et al. induziram EAE em camundongos C57BL/6 com proteína MOG de rato e não com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os resultados obtidos com animais MYD88 -/- foram iguais aos de Prinz et al., ou seja, houve resistência total a indução da doença. No entanto os animais TLR4 -/- e TLR9 -/-mostraram doença clínica mais acentuada que seus correspondentes WT. Os autores sugerem que o uso da proteína MOG no protocolo de indução pode explicar as diferenças (106).

Em humanos, estudos de polimorfismo genético de TLR4 identificaram dois polimorfismos associados à diminuição da responsividade das vias aéreas à inalação de LPS. Essas mutações se caracterizam pela troca do resíduo de asparagina por glicina na posição 299 (Asp299Gly) e pela troca de treonina por isoleucina na posição 399 (Thr399Ile) (107). Portadores dessas mutações têm risco aumentado de choque por bactérias gram-negativas (108) e de nascimento prematuro (109). Por outro lado, apresentam risco diminuído para doença aterosclerótica (101). Até o momento, no entanto, nenhum estudo identificou polimorfismos genéticos de TLR4 relacionados a alterações na incidência ou evolução da EM (110-112). A ausência de resultados positivos nesses estudos sugere que as variações genéticas de TLR4 encontradas em humanos não são suficientes para determinar alterações relevantes na evolução da doença, mas não excluem que o TLR4 tenha papel relevante na doença.

Um exemplo da relevância do TLR4 para o tratamento de doenças humanas foi demonstrado por Niessner et al. que mostraram que a sinvastatina pode inibir a expressão de TNF- α e MCP-1 por monócitos humanos estimulados por LPS. Essa inibição ocorria de forma indireta via TLR4, isto é, a sinvastatina inibia a expressão do TLR4 na superfície das células o que levava a subsequente inibição de produção de citocinas efetoras, no caso, TNF- α e MCP-1 (113). Resultados semelhantes de

inibição do TLR4 foram relatados por Methe et al. que usou também atorvastatina (114).

O papel relevante dos TLRs na imunidade inata e nos processos inflamatórios em geral os torna alvo plausível não apenas para o desenvolvimento de vacinas como também para o desenvolvimento de fármacos que poderiam agir inibindo sua expressão ou sinalização. Nesse ínterim, fica clara a possibilidade de uso das estatinas em doenças onde a inflamação mediada por TLRs tenha impacto clínico importante.

1.5 Heme Oxigenase 1

As heme oxigenases (HO) são enzimas da via de metabolismo do heme. As HO-1 e HO-2 são membros desta família presentes em seres humanos, sendo a HO-2 constitutiva e expressa em diferentes tipos de células, enquanto a HO-1 é a forma induzível (115). A HO-1 possui ações anti-inflamatória, anti-apoptótica e anti-proliferativa e sua indução é desencadeada por diversos fatores nocivos às células como: radiação ultravioleta, metais pesados, citocinas (IL-10, IL-6 ou TNF- α), LPS entre outros (116, 117).

A HO-1 (que também é conhecida como proteína de choque térmico-32) catalisa o passo limitante no metabolismo do heme gerando ferro livre, monóxido de carbono (CO) e bilirrubina (118). Seus efeitos protetores são diretos, pela eliminação do heme, e indiretos, através das propriedades anti-oxidantes de seus metabólitos (revisado em (119)). O CO, por exemplo, age em monócitos e macrófagos ativados suprimindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e, ao mesmo tempo, promovendo a secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (120).

A proteína HO-1 tem importante papel nos mecanismos de defesa em situações de estresse celular, sua ativação produz potente efeito antiinflamatório em diferentes condições patológicas como: rejeição a transplantes e na IRI (119). Ela também atua de forma protetora em modelos de doenças do SNC como: doença de Parkinson experimental e isquemia transitória de neurônios corticais (121).

Já foi claramente demonstrado que a indução da expressão da HO-1 na EAE melhora a evolução clínica da mesma (122, 123). Especula-se que o estímulo à expressão dessa enzima pode ser usado como nova estratégia no tratamento de diversas doenças inflamatórias e no transplante de órgãos (119).

A relevância da HO-1 em humanos fica evidente nos estudos de polimorfismo genético. Polimorfismos do tipo microsatélite com diferentes números de repetições (GT)_n na região promotora foram associadas com a atividade transcricional do gene (124). Genes de HO-1 cujo número de repetições na região promotora é menor que 25 (genótipo S, do inglês: *short*) mostram aumento da atividade transcricional basal (125) e em resposta a vários estímulos nocivos quando comparados a genes com mais de 25 repetições (genótipo L, do inglês: *long*) (126). O polimorfismo com baixa atividade de HO-1 foi associado a carcinoma de células escamosas de cavidade oral (127) e a adenocarcinoma de pulmão em fumantes (128). Por outro lado, foi demonstrado que o polimorfismo com alta atividade de HO-1 associa-se a maior risco de câncer gástrico (129) e melanoma maligno (130).

Em relação a doenças auto-imunes, nenhuma associação foi encontrada entre o número de repetições GT e suscetibilidade para colite ulcerativa ou doença de Crohn (131). Nos pacientes com artrite reumatóide o genótipo com alta atividade transcricional, menor que 25 repetições, foi associado à melhor evolução radiológica em longo prazo, embora não ocorresse associação com a incidência da

doença (132). Também na nefropatia por IgA o genótipo S/S esteve associado a melhor prognóstico (133).

Alguns estudos mostraram que as estatinas, utilizadas rotineiramente no tratamento de dislipidemia, estimulam a indução da HO-1 em células endoteliais e de músculo liso vascular (134, 135). Esses fármacos também têm efeito benéfico na EAE que ocorre via desvio do padrão da resposta imune de Th1 para Th2 com diminuição da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12 e aumento da produção de IL-10, IL-4 e IL-5 entre outros (64). Pode-se especular que parte do efeito protetor das estatinas na EAE seja decorrente do estímulo à expressão de HO-1 como observado no endotélio e músculo liso vascular (134, 135). No entanto, até o momento, nenhum estudo investigou essa hipótese.

É possível que esses agentes tenham suas indicações ampliadas no futuro para tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes com padrão Th1.

A elucidação dos mecanismos que modulam a atividade e a expressão da HO-1 pode abrir caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que atuem estimulando a atividade ou expressão gênica da mesma. Isto teria implicações não apenas nas doenças desmielinizantes, mas também em vários outros processos patológicos e no transplante de órgãos.

De nada adianta sabermos que a HO-1 tem efeito protetor em modelos de inflamação, se não temos um “indutor de HO-1” que possa ser usado clinicamente. Nesse contexto, as estatinas aparecem como uma alternativa relevante, tendo em vista seu perfil de segurança e seu uso já consagrado na prática clínica por milhões de pessoas em todo mundo.

6 Conclusões

Os animais TLR4 $-/-$ desenvolveram EAE com sintomas clínicos menos intensos que os controles selvagens.

A ausência da sinalização do TLR4 não influenciou nos níveis de expressão de HO-1 no SNC de animais com EAE.

A ativação do TLR4 em astrócitos funcionou como estímulo à expressão de citocinas inflamatórias e de HO-1.

O tratamento com sinvastatina atenua os sintomas clínicos da EAE nas doses de 1 e 5 mg/kg/dia.

O tratamento com sinvastatina não alterou a expressão gênica de HO-1, MCP-1 e TLR4 no SNC de animais com EAE.

A sinvastatina também não alterou a expressão gênica de HO-1 e MCP-1 em astrócitos.

A sinvastatina inibe a produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ no SNC e nos linfonodos drenantes de animais com EAE.

Referências*

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002 Apr 6;359(9313):1221-31.
2. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):942-55.
3. Ludwin SK. The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Apr;65(4):305-18.
4. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998 Jan 29;338(5):278-85.
5. van Walderveen MA, Kamphorst W, Scheltens P, van Waesberghe JH, Ravid R, Valk J, et al. Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology*. 1998 May;50(5):1282-8.
6. Friesse MA, Montalban X, Willcox N, Bell JL, Martin R, Fugger L. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1940-52.
7. Matiello M, Jacob A, Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica. *Curr Opin Neurol*. 2007 Jun;20(3):255-60.
8. Victor M, Ropper AH. *Adams and Victor Principles of Neurology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
9. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 2008 Jul 7;205(7):1535-41.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

10. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71.
11. Lavi E, Constantinescu CS, editors. *Experimental Models Of Multiple Sclerosis*. New York: Springer Science Business Media, Inc.; 2005.
12. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med*. 1997 Feb;75(2):77-88.
13. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1532-43.
14. Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res*. 1992 Sep;33(1):177-87.
15. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):1951-9.
16. Brostoff SW, Mason DW. Experimental allergic encephalomyelitis: successful treatment in vivo with a monoclonal antibody that recognizes T helper cells. *J Immunol*. 1984 Oct;133(4):1938-42.
17. Juedes AE, Hjelmstrom P, Bergman CM, Neild AL, Ruddle NH. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):419-26.
18. Hjelmstrom P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH. B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4480-3.
19. Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol*. 1981 Oct;127(4):1420-3.

20. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):669-76.
21. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, et al. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol*. 2004 May;55(5):627-38.
22. Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, et al. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):5120-7.
23. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4222-31.
24. Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2725-33.
25. Monson NL, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Mobley A, Vaughan GK, Frohman EM, et al. Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2005 Jan;158(1-2):170-81.
26. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 1998 Sep 1;102(5):1045-50.
27. Oliveira EM, Bar-Or A, Waliszewska AI, Cai G, Anderson DE, Krieger JI, et al. CTLA-4 dysregulation in the activation of myelin basic protein reactive T cells may distinguish patients with multiple sclerosis from healthy controls. *J Autoimmun*. 2003 Feb;20(1):71-81.
28. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991 Feb;28(2):254-60.
29. Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC, Ting JP, Van Kaer L, Miller SD. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002 Apr 15;168(8):4173-83.

30. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Wang H, Lee WP, Tumas D, et al. CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity*. 2001 Mar;14(3):291-302.
31. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2005.
32. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Cell Immunol*. 1998 Nov 25;190(1):83-9.
33. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899-910.
34. Esparza J, Kruse M, Lee J, Michaud M, Madri JA. MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1682-91.
35. Cossins JA, Clements JM, Ford J, Miller KM, Pigott R, Vos W, et al. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 1997 Dec;94(6):590-8.
36. Tani M, Glabinski AR, Tuohy VK, Stoler MH, Estes ML, Ransohoff RM. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 1996 Mar;148(3):889-96.
37. Glabinski AR, Tani M, Tuohy VK, Tuthill RJ, Ransohoff RM. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 1995 Dec;9(4):315-30.
38. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2000 Sep 18;192(6):899-905.
39. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1075-80.

40. Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemotactic protein-1. *J Neuroimmunol*. 1998 Dec 1;92(1-2):98-108.
41. Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, et al. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*. 1993 Apr 1;7(6):592-600.
42. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*. 1997 Nov 17;186(10):1757-62.
43. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, et al. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis*. 2008 Apr 6.
44. Vieira JM, Jr., Mantovani E, Rodrigues LT, Delle H, Noronha IL, Fujihara CK, et al. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Aug;20(8):1582-91.
45. Bettelli E, Kuchroo VK. IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):169-71.
46. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. 1996 Jan 1;156(1):5-7.
47. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol*. 2000 Mar 1;164(5):2759-68.
48. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996 Oct 15;157(8):3223-7.

49. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5278-86.
50. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2004 Jul 5;200(1):79-87.
51. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
52. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
53. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):467-76.
54. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 2002 Sep;17(3):375-87.
55. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):566-73.
56. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002 May;8(5):500-8.
57. Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain.* 2005 May;128(Pt 5):988-1002.
58. Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7768-74.
59. Panitch HS. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1994;36 Suppl:S25-8.

60. Ichikawa HT, Williams LP, Segal BM. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2781-7.
61. Weber MS, Youssef S, Dunn SE, Prod'homme T, Neuhaus O, Stuve O, et al. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease. *J Neuroimmunol*. 2006 Sep;178(1-2):140-8.
62. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 1995 Sep 7;333(10):621-7.
63. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:241-69.
64. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*. 2002 Nov 7;420(6911):78-84.
65. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, et al. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med*. 2003 Mar 17;197(6):725-33.
66. Greenwood J, Walters CE, Pryce G, Kanuga N, Beraud E, Baker D, et al. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*. 2003 May;17(8):905-7.
67. Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett*. 2002 Nov 29;333(3):167-70.
68. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1399-402.
69. Yilmaz A, Reiss C, Tantawi O, Weng A, Stumpf C, Raaz D, et al. HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2004 Jan;172(1):85-93.

70. Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, et al. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5630-5.
71. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology.* 2002 Oct 8;59(7):990-7.
72. Gegg ME, Harry R, Hankey D, Zambarakji H, Pryce G, Baker D, et al. Suppression of autoimmune retinal disease by lovastatin does not require Th2 cytokine induction. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):2327-35.
73. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1524-30.
74. Robinson DS, O'Garra A. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity.* 2002 Jun;16(6):755-8.
75. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
76. Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC, et al. Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med.* 2002 Dec 31;34(6):451-61.
77. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):687-92.
78. Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Nov 1;30(5):1212-7.
79. Prasad R, Giri S, Nath N, Singh I, Singh AK. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J Neurochem.* 2005 Jul;94(1):204-14.

80. Bellostà S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Nov;18(11):1671-8.
81. Ganne F, Vasse M, Beaudeau JL, Peynet J, Francois A, Mishal Z, et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits urokinase/urokinase-receptor expression and MMP-9 secretion by peripheral blood monocytes--a possible protective mechanism against atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2000 Oct;84(4):680-8.
82. Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol.* 2008 May;211(1):214-26.
83. Imamura M, Okunishi K, Ohtsu H, Nakagome K, Harada H, Tanaka R, et al. Pravastatin attenuates allergic airway inflammation by suppressing antigen sensitisation, interleukin 17 production and antigen presentation in the lung. *Thorax.* 2009 Jan;64(1):44-9.
84. Murphy DM, Forrest IA, Corris PA, Johnson GE, Small T, Jones D, et al. Simvastatin attenuates release of neutrophilic and remodeling factors from primary bronchial epithelial cells derived from stable lung transplant recipients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Mar;294(3):L592-9.
85. Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6988-96.
86. Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet.* 2004 May 15;363(9421):1607-8.
87. Sena A, Pedrosa R, Graca Morais M. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2003 Jun;250(6):754-5.
88. Paul F, Waiczies S, Wuerfel J, Bellmann-Strobl J, Dorr J, Waiczies H, et al. Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One.* 2008;3(4):e1928.

89. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973-83.
90. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):253-8.
91. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997 Nov 28;278(5343):1612-5.
92. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):143-50.
93. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999 Jul;11(1):115-22.
94. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. 2000 Jan;12(1):113-7.
95. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002 Feb;3(2):196-200.
96. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med*. 2000 Aug 21;192(4):595-600.
97. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103.
98. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):6668-72.

99. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003 Oct 6;198(7):1043-55.
100. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Busuttil RW, Cheng G, et al. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):1793-800.
101. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18;347(3):185-92.
102. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005 Nov 17;438(7066):364-8.
103. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2006 Feb;116(2):485-94.
104. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutcher I, Wolter K, et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2006 Feb;116(2):456-64.
105. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC, et al. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):7070-7.
106. Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kampe O, Lobell A. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2008 Feb;38(2):565-75.
107. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):187-91.
108. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002 May 13;162(9):1028-32.
109. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res*. 2002 Sep;52(3):373-6.

110. Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R, Martinez A. TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *J Neuroimmunol.* 2007 Dec;192(1-2):215-8.
111. Kroner A, Vogel F, Kolb-Maurer A, Kruse N, Toyka KV, Hemmer B, et al. Impact of the Asp299Gly polymorphism in the toll-like receptor 4 (tlr-4) gene on disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Aug;165(1-2):161-5.
112. Reindl M, Lutterotti A, Ingram J, Schanda K, Gassner C, Deisenhammer F, et al. Mutations in the gene for toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 2003 Jan;61(1):85-8.
113. Niessner A, Steiner S, Speidl WS, Pleiner J, Seidinger D, Maurer G, et al. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis.* 2006 Dec;189(2):408-13.
114. Methe H, Kim JO, Kofler S, Nabauer M, Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14⁺ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;25(7):1439-45.
115. McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12568-74.
116. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(1):99-103.
117. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 29;91(7):2607-10.
118. Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem.* 1983;53-54(1-2):163-83.
119. Camara NO, Soares MP. Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2005 Feb 15;38(4):426-35.
120. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):422-8.

121. Takizawa S, Hirabayashi H, Matsushima K, Tokuoka K, Shinohara Y. Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 May;18(5):559-69.
122. Liu Y, Zhu B, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS. Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroreport.* 2001 Jul 3;12(9):1841-5.
123. Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest.* 2007 Feb 1;117(2):438-47.
124. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med.* 2004 Oct 15;37(8):1097-104.
125. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet.* 2000 Jan;66(1):187-95.
126. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, et al. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet.* 2002 Jul;111(1):1-8.
127. Chang KW, Lee TC, Yeh WI, Chung MY, Liu CJ, Chi LY, et al. Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer.* 2004 Oct 18;91(8):1551-5.
128. Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, Yasuda H, Kubo H, Nakayama K, et al. Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet.* 2005 Apr;116(5):354-60.
129. Sawa T, Mounawar M, Tatemichi M, Gilibert I, Katoh T, Ohshima H. Increased risk of gastric cancer in Japanese subjects is associated with microsatellite polymorphisms in the heme oxygenase-1 and the inducible nitric oxide synthase gene promoters. *Cancer Lett.* 2008 Sep 28;269(1):78-84.

130. Okamoto I, Krogler J, Endler G, Kaufmann S, Mustafa S, Exner M, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer*. 2006 Sep 15;119(6):1312-5.
131. Hausmann M, Paul G, Kellermeier S, Frey I, Scholmerich J, Falk W, et al. (GT)_n dinucleotide repeat polymorphism of haem oxygenase-1 promoter region is not associated with inflammatory bowel disease risk or disease course. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jul;153(1):81-5.
132. Wagener FA, Toonen EJ, Wigman L, Fransen J, Creemers MC, Radstake TR, et al. HMOX1 promoter polymorphism modulates the relationship between disease activity and joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Nov;58(11):3388-93.
133. Chin HJ, Cho HJ, Lee TW, Na KY, Yoon HJ, Chae DW, et al. The heme oxygenase-1 genotype is a risk factor to renal impairment of IgA nephropathy at diagnosis, which is a strong predictor of mortality. *J Korean Med Sci*. 2009 Jan;24 Suppl:S30-7.
134. Lee TS, Chang CC, Zhu Y, Shyy JY. Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1296-302.
135. Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurger S, et al. The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 15;37(12):2064-71.
136. Nishikubo K, Imanaka-Yoshida K, Tamaki S, Hiroe M, Yoshida T, Adachi Y, et al. Th1-type immune responses by Toll-like receptor 4 signaling are required for the development of myocarditis in mice with BCG-induced myocarditis. *J Autoimmun*. 2007 Sep-Nov;29(2-3):146-53.
137. Rallidis LS, Hamodraka ES, Fountoulaki K, Moustogiannis G, Zolindaki MG, Kremastinos DT. Simvastatin exerts its anti-inflammatory effect in hypercholesterolaemic patients by decreasing the serum levels of monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cardiol*. 2008 Feb 29;124(2):271-2.
138. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):823-35.
139. Mendez-Samperio P, Trejo A, Perez A. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces CCL5 secretion via the Toll-like receptor 2-NF-kappaB

and -Jun N-terminal kinase signaling pathways. Clin Vaccine Immunol. 2008 Feb;15(2):277-83.

140. Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, et al. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. Infect Immun. 2003 Aug;71(8):4238-49.

141. D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. J Immunol. 2006 Mar 1;176(5):3087-97.

142. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderon Gomez E, Sweeney CH, et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. J Immunol. 2008 Apr 1;180(7):4763-73.

143. Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. Eur J Immunol. 1999 Nov;29(11):3432-9.

144. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. Nat Med. 2008 Mar;14(3):337-42.

145. Marta M, Meier UC, Lobell A. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. Autoimmun Rev. 2009 May;8(6):506-9.

146. Gonçalves GMC, Cenedeze MA, Feitoza CQ, Bozza M, Pacheco-Silva A, Soares MP, Câmara NOS. Efeito dos TLR-2 e 4 na expressão de heme-oxigenase-1 (HO-1) após lesão de isquemia e reperfusão renal (I/R). J Bras Nefrol. 2008;30:123.

147. Xie XH, Law HK, Wang LJ, Li X, Yang XQ, Liu EM. Lipopolysaccharide Induces IL-6 Production in Respiratory Syncytial Virus-Infected Airway Epithelial Cells Through the Toll-like Receptor 4 Signaling Pathway. Pediatr Res. 2008 Oct 22.

148. Jiang H, Wang PZ, Zhang Y, Xu Z, Sun L, Wang LM, et al. Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Virology. 2008 Oct 10;380(1):52-9.

149. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi S, Lassman CR, et al. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl.* 2007 Oct;13(10):1435-43.
150. Klein M, Obermaier B, Angele B, Pfister HW, Wagner H, Koedel U, et al. Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis.* 2008 Oct 1;198(7):1028-36.
151. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):429-39.
152. Soulet D, Rivest S. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Aug;8(4):508-18.
153. Krasowska-Zoladek A, Banaszewska M, Kraszpulski M, Konat GW. Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR4 ligation. *J Neurosci Res.* 2007 Jan;85(1):205-12.
154. La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun.* 2003 Sep;71(9):4996-5004.
155. Martin-Saavedra FM, Flores N, Dorado B, Eguiluz C, Bravo B, Garcia-Merino A, et al. Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol.* 2007 Jul;44(14):3597-607.
156. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992 Nov 1;176(5):1355-64.
157. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol.* 1989 Nov;124(1):132-43.
158. Voskuhl RR, Martin R, Bergman C, Dalal M, Ruddle NH, McFarland HF. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity.* 1993;15(2):137-43.

159. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8.
160. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*. 1987 Apr 18;1(8538):893-5.
161. Chitnis T, Najafian N, Benou C, Salama AD, Grusby MJ, Sayegh MH, et al. Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(5):739-47.
162. Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J, Northrop SC, Hussain RZ, Ratts RB, et al. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes. *Immunity*. 2004 Nov;21(5):719-31.
163. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715-25.
164. Gueler F, Park JK, Rong S, Kirsch T, Lindschau C, Zheng W, et al. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. *Am J Pathol*. 2007 Apr;170(4):1192-9.
165. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7370-7.
166. Stuve O, Youssef S, Slavin AJ, King CL, Patarroyo JC, Hirschberg DL, et al. The role of the MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation by astrocytes and in susceptibility to central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. 2002 Dec 15;169(12):6720-32.
167. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001 Mar 19;193(6):713-26.
168. Abe K, Misawa M. Amyloid beta protein enhances the clearance of extracellular L-glutamate by cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res*. 2003 Jan;45(1):25-31.

169. Vermeiren C, Hemptinne I, Vanhoutte N, Tilleux S, Maloteaux JM, Hermans E. Loss of metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of glutamate transport in chemically activated astrocytes in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2006 Feb;96(3):719-31.
170. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007 Mar;28(3):138-45.
171. Matz PG, Weinstein PR, Sharp FR. Heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 induction in glia and neurons throughout rat brain after experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery.* 1997 Jan;40(1):152-60; discussion 60-2.
172. Turner CP, Bergeron M, Matz P, Zegna A, Noble LJ, Panter SS, et al. Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Mar;18(3):257-73.
173. Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol.* 1996 Jan;59(1):81-9.
174. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J Immunol.* 1996 Mar 15;156(6):2095-103.
175. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* 2001 Jan;59(1):106-17.
176. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
177. Mei FJ, Osoegawa M, Ochi H, Minohara M, Nan S, Murai H, et al. Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2006 Jul 15;246(1-2):71-7.
178. Segal S, Wraber B, Mesec A, Horvat A, Ihan A. IFN-beta1a and IFN-beta1b have different patterns of influence on cytokines. *Clin Neurol Neurosurg.* 2004 Jun;106(3):255-8.

179. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1990 Dec 1;145(11):3796-806.
180. Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(12):1697-710.
181. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.