Ricardo Wesley Alberca Custódio

**Imunoterapia de processos alérgicos por agonistas
de receptores do tipo toll**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2019**

RESUMO

Alberca-Custódio RW. Imunoterapia de processos alérgicos por agonistas de receptores do tipo toll. [Tese de Doutorado em Ciências (Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

A prevalência de alergias vem aumentando no mundo todo, em especial a asma alérgica que é considerada uma síndrome inflamatória pulmonar, que em sua forma clássica está associada ao descontrole da atividade de células T *helper* (Th) 2. As terapias correntes são em sua maioria sintomáticas. Porém, a imunoterapia específica (SIT, do inglês *Specific-Immunotherapy*) é potencialmente curativa. A SIT consiste na administração do alérgeno específico repetidamente em doses crescentes com o objetivo de promover a dessensibilização do paciente. O presente trabalho, utilizando a ovoalbumina (OVA) como alérgeno em modelo de asma alérgica experimental, investigou protocolos profiláticos e terapêuticos de SIT. Durante a realização do protocolo profilático, os animais foram sensibilizados com OVA adsorvida em hidróxido de alumínio (Alum) associada com diferentes agonistas de receptores do tipo toll (TLR, do inglês *toll-like receptors*). O agonista de TLR 9 (CpG) foi o mais eficiente em inibir a sensibilização alérgica quando comparado aos demais agonistas de TLR testados. Esta inibição do desenvolvimento da inflamação alérgica pulmonar por CpG foi dependente da molécula IL-10 e da sinalização via MyD88 nas células dendríticas. Além disso, sabendo que a SIT terapêutica, administrada pela via subcutânea é capaz de desencadear uma reação anafilática, encapsulamos a OVA em lipossoma catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-sulfato (DOTAP) com o intuito de aumentar a segurança da formulação e paralelamente potencializar o efeito do CpG. Os resultados verificaram que o encapsulamento da OVA diminuiu a reação anafilática cutânea e sistêmica induzida por este alérgeno. Verificamos também que a SIT com alérgeno/CpG encapsulados no DOTAP (OVA+CpG/DOTAP ou BT+CpG/DOTAP) promove uma significativa inibição da inflamação alérgica pulmonar e produção de IgE Total. Essa inibição da alergia pulmonar foi associada com o aumento da produção de IL-10, mas não de IFN- γ no lavado bronco-alveolar (BAL). Notavelmente, o efeito terapêutico inibitório de OVA+CpG/DOTAP não foi verificado em animais deficientes para as moléculas de MyD88, IL-10 ou IFN- γ . Verificamos que a SIT terapêutica também era dependente da sinalização via MyD88 nas células dendríticas. Além disso, ao utilizarmos animais reconstituídos com células de animais doadores alérgicos, verificamos que o efeito terapêutico da SIT não foi encontrado em animais reconstituídos com células de animais IFN- γ KO, e que animais reconstituídos com células de animais IL-10KO apresentavam aumento de IL-10 no BAL. A transferência de células de medula óssea de animais C57BL/6 (WT), mas não de animais IFN- γ KO, tratados com OVA+CpG/DOTAP foi capaz de reverter o quadro inflamatório alérgico de animais WT e induzir o aumento de IL-10 no BAL. Esses resultados contribuem para a elucidação dos mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória da SIT e potenciais utilizações do CpG e DOTAP em processos alérgicos.

Palavras-chave: Alergia, Asma, Imunoterapia, Anafilaxia, Inflamação.

ABSTRACT

Alberca-Custódio RW. Immunotherapy of allergic processes by toll like receptor agonists. [PhD Thesis in Sciences (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

The prevalence of allergies is increasing worldwide, especially allergic asthma that is considered a pulmonary inflammatory syndrome, which in its classic form is associated with the lack of control of T helper cell (Th) 2 activity. Current therapies are mostly symptomatic. However, specific immunotherapy (SIT) is potentially curative. SIT consists of administering the specific allergen repeatedly in increasing doses in order to promote patient desensitization. The present study, using ovalbumin (OVA) as an allergen in an experimental allergic asthma model, investigated prophylactic and therapeutic SIT protocols. During the prophylactic protocol, the animals were sensitized with OVA adsorbed on aluminum hydroxide (Alum) associated with different toll-like receptors (TLR) agonists. The TLR 9 agonist (CpG) was the most efficient in inhibiting allergic sensitization when compared to the other TLR agonists tested. This inhibition mediated by CpG of the development of the allergic lung inflammation was dependent on the IL-10 molecule and the MyD88 signaling in dendritic cells. In addition, knowing that the therapeutic SIT, administered by the subcutaneous route is capable of triggering an anaphylactic reaction, we encapsulated OVA in 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium sulphate (DOTAP), a cationic liposome, in order to increase the safety of the formulation and in parallel potentiate the effect of CpG. The results showed that OVA encapsulation reduced the cutaneous and systemic anaphylactic reaction induced by this allergen. We also verified that SIT with the allergen and CpG encapsulated in DOTAP (OVA+ CpG/DOTAP or BT+CpG/DOTAP) promotes a significant inhibition of lung allergic inflammation and Total IgE production. This inhibition of lung inflammation was associated with increased production of IL-10 but not of IFN- γ in the bronchoalveolar lavage (BAL). Notably, the inhibitory therapeutic effect of OVA+CpG/DOTAP was abrogated in animals deficient in the MyD88 or IL-10 or IFN- γ molecules. We found that therapeutic SIT was also dependent on MyD88 signaling on dendritic cells. In addition, when we used animals reconstituted with cells from allergic donor animals, we found that the therapeutic effect of SIT was not found in animals reconstituted with cells from IFN- γ KO animals, and that animals reconstituted with IL-10KO animal cells had increased IL-10 in the BAL. The transfer of bone marrow cells from C57BL/6 (WT) animals but not from IFN- γ KO animals treated with OVA+CpG/DOTAP was able to reverse the lung allergic inflammation of WT animals and induce the increase of IL-10 in the BAL. These results contribute to the elucidation of the mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of the SIT and potential uses of CpG and DOTAP in allergic processes.

Keywords: Allergy, Asthma, Immunotherapy, Anaphylaxis, Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Alergias

O termo alergia foi primeiramente utilizado por Clemens von Pirquet para designar indivíduos com reações de hipersensibilidade quando expostos a determinadas substâncias¹. Atualmente as síndromes alérgicas atingem aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo e estima-se que em 2050 aproximadamente 4 bilhões de pessoas serão acometidas por alguma alergia ². Dentre as síndromes alérgicas podemos destacar a rinite alérgica, dermatite atópica, alergias alimentares e a asma alérgica ³.

1.1 – Asma – Definição

Asma é uma síndrome pulmonar complexa composta por vários fenótipos^{4,5}. Um dos fenótipos mais prevalentes é a asma alérgica que é caracterizada como uma síndrome inflamatória pulmonar crônica mediada por células T auxiliares tipo 2 (Th2) que orquestram a inflamação pulmonar⁶. A inflamação crônica está associado à hiperresponsividade brônquica e hipersecreção de muco, o que leva a episódios recorrentes de dispneia. A obstrução brônquica pode ser reversível espontaneamente ou mediante tratamento com broncodilatadores⁷. A exacerbação da asma consiste de ataques ou piora dos sintomas e da função pulmonar e como consequência pode levar ao óbito do paciente nos casos denominados de asma fatal⁸.

1.2 – Asma – Epidemiologia

A prevalência da asma vem aumentando no mundo, tanto em países de baixa quanto de alta renda per capita ^{9,10}. Estima-se que existam 300 milhões de indivíduos asmáticos em todo o mundo¹¹. Sabe-se que 250 mil pessoas pacientes asmáticos morrem prematuramente todos os anos por falta de tratamento adequado¹².

O Brasil ocupa a oitava posição mundial em prevalência de asma, com aproximadamente 273 mil internações e 2.500 óbitos em 2007, gerando um custo aproximado de R\$ 98,6 milhões para o Sistema Único de Saúde (SUS)¹³.

1.3 – Asma – Fisiopatologia

Como definido anteriormente, a asma é considerada uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação pulmonar crônica associada a uma obstrução intermitente, hiperreatividade e inflamação das vias aéreas, podendo ser desencadeada por vários estímulos, como alérgenos ambientais ou infecções virais^{7,14,15}.

Esses estímulos geram um processo inflamatório que acomete o tecido pulmonar e está associado a uma obstrução do fluxo aéreo, devido a alterações principalmente da contração da musculatura lisa brônquica, aumento da produção de muco que com o tempo podem levar a mudanças estruturais e funcionais no tecido, caracterizando o remodelamento pulmonar^{16,17}. O conceito de mudanças estruturais no tecido pulmonar foi estabelecido a mais de 100 anos, por estudos de necropsias, através de análises macroscópicas de mudanças morfológicas no tecido pulmonar das vias aéreas de asmáticos pós morte¹⁸.

Sabe-se que a patogênese da asma brônquica encontra-se associada a componentes genéticos que determinam a susceptibilidade à essa doença. Esses componentes podem ser reunidos em quatro grupos principais de genes: o primeiro envolve genes que codificam moléculas associadas com a imunidade inata e imunoregulação (*CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR10*, *NOD1*, *NOD2*, *IL-10*, *TFG-B*, *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*); o segundo engloba os genes envolvidos com a diferenciação e funções efetoras das células Th2 (*GATA2*, *TBX21*, *IL-4*, *IL-13*, *IL-4RA*, *IL-5*, *IL-5A* e *STAT-6*); o terceiro contém os genes envolvidos com a biologia e imunidade das células da mucosa (*CCL5*, *CCL11*, *CCL24*, *CCL26*, *DEFB1*, *SPINK5*, *FLG*, *ADAM33*, *SCGB1A1*) e o quarto grupo envolve os genes associados com as funções pulmonares, remodelamento tecidual e gravidade das doenças (*TGF*, *GPRA*, *ADBR2*, *TNF*, *NOS1*)^{19–21}.

Em muitos casos, especialmente em crianças e adultos jovens, a asma está associada à atopia, manifestando-se através de mecanismos dependentes da imunoglobulina E (IgE)^{22,23}. A IgE pode ser classificada pela sua afinidade, IgE de alta afinidade é gerada através da mudança de classe seqüencial, em que uma fase intermediária de IgG é necessária para a maturação por afinidade da resposta IgE.

Em contraste, a IgE de baixa afinidade é gerada através da troca de classe direta e menos mutada²⁴.

Há a indução da síntese de de IgE total e IgE alérgeno específica, que ligam-se aos receptores Fc em células do sistema imune inato como mastócitos e basófilos, podendo desencadear um quadro anafilático ^{25,26}.

O quadro anafilático é caracterizado pelo aumento sistêmico na permeabilidade vascular, vaso dilatação, contração das musculaturas dos brônquios e produção de muco²⁷, podendo ser letal e necessitando de tratamento imediato, usualmente com epinefrina²⁸. A prevalência de quadros anafiláticos aumentou nos últimos anos²⁹, com uma incidência de 42 casos a cada 100 mil pessoas³⁰. É importante destacar que embora incidência de anafilaxia em tratamentos de imunoterapia alérgeno específica (SIT) seja baixa, 1 a cada 2-2,5 milhões de doses^{31,32}, resulta em uma média de 3,4 mortes/ano³².

O processo asmático é classicamente dividido em duas fases: a) fase imediata, causada principalmente pelo espasmo da musculatura lisa brônquica, levando a broncoconstrição típica da fisiopatologia; b) fase tardia, quando após um tempo variável de exposição ao antígeno, ocorre um aumento na migração de células inflamatórias³³⁻³⁵.

A inflamação crônica na asma, gerada na fase tardia, é mediada por uma resposta imunológica predominantemente do tipo 2, associada a células T *helper* (Th) 2, e a produção de interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13, que apresentam um importante papel no remodelamento e manutenção da inflamação³⁶.

Para a ativação dos linfócitos T (CD4 e CD8) é necessário a apresentação de um antígeno pelas células apresentadoras, por meio das moléculas do *Major Histocompatibility Complex* (MHC) (de classe II para as células T CD4+ e de classe I para as células T CD8+). É importante destacar que a participação de células dendríticas apresentadoras de antígenos nas vias aéreas³⁷. Elas se originam na medula óssea e formam uma extensa rede de células abaixo do epitélio das vias respiratórias³⁷⁻³⁹. Esse subtipo celular é fundamental para a geração de uma resposta imune Th2⁴⁰ e subsequente indução da produção de IgE por células B⁴¹. Durante o processo alérgico dentre as diversas citocinas produzidas é importante destacar a

produção de IL-5 na produção, mobilização, ativação, recrutamento, proliferação e sobrevivência dos eosinófilos⁴².

Na asma crônica, um número aumentado de eosinófilos são encontrados em biópsias brônquicas, frequentemente abaixo da membrana basal. A grande maioria dos asmáticos alérgicos ou não alérgicos, incluindo aqueles que desenvolvem uma asma leve, apresentam eosinófilos nos brônquios. Sabe-se que há uma associação variável entre a ativação de eosinófilos e a gravidade da asma⁴³ e hiperresponsividade das vias aéreas⁴⁴.

Os eosinófilos possuem uma grande variedade de propriedades biológicas, incluindo a produção e liberação de radicais livres de oxigênio, eicosanoides⁴⁵, fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas⁴⁶, e fatores de crescimento⁴⁷. Os eosinófilos ativados podem iniciar a contração dos músculos lisos das vias aéreas⁴⁸, aumentar a permeabilidade microvascular⁴⁹, e induzir hiperresponsividade⁵⁰.

1.4 - Asma Alérgica Experimental

Modelos animais de inflamação alérgica pulmonar foram desenvolvidos com a finalidade de mimetizar o quadro asmático. Esses animais que apresentam as características imunológicas e inflamatórias da asma são ferramentas importantes para dissecar as bases moleculares e os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença pulmonar alérgica⁵¹.

Modelos murinos demonstraram o papel fundamental dos linfócitos T CD4+ que secretam citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-5 e IL-13⁵². Estudos experimentais demonstraram que tanto a IL-4 como a IL-13 estão envolvidas na produção de IgE e na secreção de muco, além de estarem associadas ao desenvolvimento de hiperreatividade brônquica (HRB)⁵³. Já a IL-5 tem sido apontada como responsável pelo crescimento, diferenciação e ativação dos eosinófilos⁵⁴.

1.5 - Imunoterapia – Conceito

O conceito de imunoterapia engloba processos profiláticos e terapêuticos e pode envolver a administração de anticorpos, antígenos, peptídeos, imunossuppressores, imunomoduladores, alérgenos, células, etc.⁵⁵. Frequentemente a

imunoterapia é utilizada para tratar diversas doenças como câncer, doenças autoimunes e alergias⁵⁶.

Na história moderna, a idéia de modular a resposta a uma antígeno com a finalidade de prevenir ou tratar doenças, vem sendo explorada há alguns séculos. Um dos primeiros registros da tentativa de imunoterapia profilática foi realizada por James Nooth, que injetou em si próprio um homogenato de células de tumor maligno, afim de criar uma imunidade contra o câncer⁵⁷.

Willian Bradley Coley (1826-1936) foi um dos pioneiros na imunoterapia a tumores, ao utilizar injeções contendo *Streptococcus* em pacientes com câncer inoperáveis⁵⁸. Mais recentemente, imunoterapias com anticorpos e receptores solúveis de interleucinas também estão sendo estudadas. Por exemplo, o tratamento com anticorpos monoclonais anti-IgE é capaz de atenuar as respostas imediatas e tardias das vias respiratórias, o remodelamento das vias aéreas, a hiperresponsividade, e o fluxo de eosinófilos para as vias aéreas após desafio com alérgeno inalado⁵⁹. Este anticorpo anti-IgE é também eficaz na melhoria dos sintomas e controle da asma em ensaios clínicos. Estas observações fornecem evidência inequívoca para um papel fundamental da IgE em pacientes asmáticos^{60,61}.

A administração do receptor solúvel de IL-4 para se ligar ao IL-4 livre, impedindo-o de se ligar aos receptores de IL-4 das células, demonstrou efeitos anti-inflamatórios benéficos tanto em modelos animais quanto em humanos^{62,63}. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a duração e efeito da descontinuidade desses tratamentos.

1.6 - Imunoterapia alérgeno específica

O tratamento farmacológico para pacientes asmáticos consiste na utilização de agonistas de β 2-adrenoceptor e glucocorticóides, porém o tratamento sintomático nem sempre é efetivo⁶⁴, e/ou esses pacientes não possuem acesso a um tratamento adequado.

As causas para as alergias e possíveis tratamentos curativos são estudados há quase dois séculos⁶⁵. Um dos primeiros registros da aplicação da SIT consistiu em administrar o alérgeno de maneira subcutânea objetivando reduzir a sensibilização⁶⁶.

A SIT é considerada uma intervenção com potencial curativo para doenças alérgicas, podendo ser aplicadas de maneira preventiva ou terapêutica. A SIT pode tornar desnecessária a utilização de tratamento sintomático, dessa forma reduzindo os custos totais do tratamento.

Uma estratégia comum no tratamento e prevenção das reações alérgicas alimentares é evitar o consumo do alimento, entretanto para indivíduos asmáticos é difícil evitar totalmente o contato com alérgenos respiratórios.

O tratamento de uma alergia previamente estabelecida é o principal objetivo das imunoterapias para alérgicos, entretanto o potencial preventivo pode vir a ser considerado. Um possível alvo para o tratamento profilático seriam por exemplo crianças com rinite alérgica que apresentam 3x mais chances de desenvolverem asma alérgica⁶⁷ ou indivíduos com histórico familiar de asma⁶⁸.

A SIT atualmente utilizada na prática clínica consiste na administração do alérgeno específico repetidamente em doses crescentes⁶⁹. Em modelos animais de SIT, a administração prolongada de alérgenos, tais como a OVA, induzem uma redução eficiente do número de eosinófilos, dos níveis de IL-5, IL-13 e IgE OVA-específica⁷⁰⁻⁷⁴

Atualmente é preconizada a utilização de imunoterapia em pacientes não responsivos aos tratamentos farmacológicos para controle da asma. É importante frisar que a SIT pode ter um efeito colateral grave que é o desencadeamento de choque anafilático, podendo levar o paciente a óbito⁷⁵. As duas vias mais utilizadas para aplicação da imunoterapia são a via subcutânea (ISC) e a via sublingual (ISL). Apesar da ISC esta bem estabelecida a ISL apresentou-se como uma alternativa para atenuar a possibilidade de anafilaxia, porém os resultados obtidos foram conflitantes a respeito de sua eficácia e segurança⁷⁶.

Devido ao risco de anafilaxia outras formas de imunoterapias começaram a ser desenvolvidas, como: imunoterapia com peptídeos⁷⁷, imunoterapia sublingual⁷⁸ e terapias aplicadas por via intranasal⁷⁹, intravenosa⁸⁰, oral⁸¹ e subcutânea⁸².

1.7 - Mecanismos da Imunoterapia

A imunoterapia tradicional visa a redução do quadro alérgico, com diminuição de número de eosinófilos e IgE total, com o aumento da produção de anticorpos das

classe IgG (IgG1 e IgG4 em alta afinidade) que competem com a IgE específica, além da redução potencial de anafilaxia com a exposição ao alérgeno⁸³. Porém, este mecanismo tem sido questionado, pois nem sempre o aparecimento de IgG está associado com a melhora do quadro alérgico⁸⁴.

A inibição da resposta alérgica também é associada ao aumento das células que secretam IL-10 e TGF-beta (do inglês - transforming growth factor beta), denominadas Th reguladoras FoxP3+ (Treg) ou FoxP3- (Tr1), células capazes de controlar a ativação de células efectoras e a tolerância⁸⁵.

É possível observar uma redução da produção de IgE e concomitantemente aumento da produção de IgG4 em humanos. Além disso, pode ocorrer também um aumento de células B produtoras de IL-10⁸⁶.

A ISC é considerada o padrão ouro para aplicação de IT, sendo a mais estudada⁸⁷. Alternativamente, utilização da IT por via ISL procura utilizar o ambiente da mucosa oral para gerar um estímulo tolerogênico frente ao alérgeno⁸⁸, facilitando a captação do antígeno por células dendríticas mielóides e plasmocitóides, além das células de Langerhans da mucosa oral, capazes de produzir IL-10 e TGF-beta e induzir células Treg⁸⁹.

As células dendríticas estimuladas com IL-10 podem modular a resposta de células T alérgicas de humanos, resultando em uma menor produção de IFN-g, IL-4 e IL-5⁹⁰. As células dendríticas então, podem induzir células Treg ou Tr1 alérgeno específicas, supressoras da resposta alérgica⁹¹, e células Treg que podem agir impedindo diretamente a desgranulação de mastócitos⁹².

1.8 - Toll like receptors

Os receptores do tipo toll-like (TLR, do inglês *Toll-Like Receptors*) são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern-Recognition Receptores*), que reconhecem estruturas moleculares inicialmente descritas como sendo comuns a uma série de patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)⁹³, porém posteriormente foram descritos padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*), os quais também sinalizam via TLR e induzem uma resposta do sistema imune⁹⁴.

O reconhecimento dos DAMPs/PAMPs, leva a uma ativação dos TLR e outros PRR localizados na superfície celular, citoplasma ou vesículas intracelulares, exercendo uma sinalização intracelular, incluindo moléculas adaptadoras, quinases e fatores de transcrição⁹⁵.

Particularmente, o TLR9 está localizado na membrana intracelular em compartimentos como o retículo endoplasmático, o endossomo e o lisossomo⁹⁶.

O TLR9 reconhece DNA bacteriano⁹⁷ ou agonistas sintéticos, como o CpG-ODN. Existem três tipos de CpG, A, B e C. O CpG tipo A, possui a capacidade de estimular a produção de interferons do tipo I por pDC e a maturação de células apresentadoras de antígenos, enquanto o tipo B pode estimular a maturação de células B e a produção de TNF-alfa e IL-6⁹⁸. O CpG tipo C combina as características imunoestimuladoras do tipo ⁹⁹A e B, possuindo a capacidade de estimular células humanas e murinas¹⁰⁰. Além disso, outras moléculas atuam como co-receptores auxiliando neste reconhecimento e/ou no processo de endocitose, tais como o KIR3DL2¹⁰¹, CD14¹⁰² e DEC-205¹⁰³.

Após sua ativação, o TLR9 sinaliza via a molécula adaptadora MyD88 (Fator de Diferenciação Mielóide 88, do inglês *Myeloid Differentiation Factor 88*) e outras moléculas sinalizadoras como IRAK-4, TRAF6, IRF-1, IRF-5 e IRF-7, levando a ativação do NF-κB (Factor Nuclear Kappa B do inglês, *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells*), um importante fator de transcrição nuclear envolvido na síntese de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios^{104,105}.

A estimulação de células dendríticas e macrófagos pelo CpG, gera a produção de citocinas como TNF-alfa, IL-6 e IL-12, além de aumentar a expressão de moléculas de superfície como MHC de classe II e outras moléculas co-estimuladoras¹⁰⁶. A estimulação dessas células e seu contato com células Th, pode induzir uma polarização da resposta para um perfil Th1, caracterizado pela liberação da citocina interferon-gamma (IFN-γ)¹⁰⁷.

Células B também expressam TLR9, e podem ser estimuladas via CpG, aumentando sua proliferação e facilitando a mudança de classe de IgM para IgG2a¹⁰⁸

e inibindo IgG1 e IgE¹⁰⁹. Apesar de existirem relatos da necessidade da associação entre células Th e células B para que ocorra esse fenômeno¹¹⁰.

1.9 - Imunoterapia por agonistas de TLR

As SIT são tratamentos que buscam alterar o curso natural da doenças alérgica. Um dos mecanismos propostos para as SIT é o desvio imunológico (para um padrão de resposta do tipo Th1 ou Th17) ou por indução de tolerância (via células Treg ou Tr1)⁸⁴.

Agonistas de TLRs são vistos como adjuvantes que favorecem a imunidade Th1/Th17¹¹¹. Entretanto, agonistas de TLR já foram utilizados em modelos experimentais de alergia para atenuar a imunidade Th2, sem aparente desvio imunológico para um perfil Th1/Th17^{112,113}.

Os agonistas de TLRs induzem a maturação de células dendríticas e aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras. Porém, a secreção de citocinas locais é fundamental para a diferenciação das sub populações de células T¹¹⁴. Os agonistas de TLRs são adjuvantes do tipo 1, uma vez que a sinalização via a molécula adaptadora MyD88 induz a secreção de IL-12, uma citocina essencial para a diferenciação de células Th1. Exemplos típicos de adjuvantes do tipo 1 são o MPLA (agonista de TLR4) que sinaliza via molécula TRIF (Adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon-Beta, do inglês *Domain Containing Adapter Inducing Interferon Beta*) e o CpG (agonista de TLR9) que sinaliza via MyD88¹¹⁵ foram liberados para uso em humanos¹¹⁶.

1.10 Imunoterapia alérgeno específica combinada ao CpG

CpG oligodeoxinucleotídeos (CpG) são uma nova classe de adjuvantes sendo proposta para o desenvolvimento de vacinas com antígenos recombinantes. Em modelos experimentais, a administração de antígenos com CpG produziu respostas protetoras no sistema imunológicos a uma variedade de patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitas¹¹⁷.

O uso de CpG como adjuvante, mostrou um aumento da imunidade tanto da mucosa como sistêmica, acelerando e aumentando a imunidade antígeno específica.

Utilizando modelos experimentais pesquisadores já demonstraram o potencial de reduzir ou eliminar o processo alérgico quando o CpG foi utilizado durante a fase de sensibilização^{117,118}, e reverter um processo já estabelecido de inflamação eosinofílica nas vias aéreas^{119,120}.

Os receptores do CpG, o *toll-like receptor 9*, são localizados exclusivamente no endossoma, mas não na superfície celular¹²¹. A captação e/ou estimulação de células dendríticas por agonistas de TLR9 é aumentada em até 100 vezes quando encapsulados em um reagente de transfecção liposomal DOTAP (lipídeo catiônico 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-sulfato)¹²², induzindo a ativação das células via sinalização TLR9¹²³ sem aumentar a toxicidade do composto¹²⁴, como a utilização de CpG com reagente de transfecção lipossômica (CpG/DOTAP) apresentou-se como uma alternativa a CpG em diferentes experimentos^{125–128} apresentando um aumento da captação pelas células dendríticas, células dendríticas plasmocitóides, macrófagos e monócitos¹²⁸. Outra possível vantagem da utilização de um veículo lipídico, em uma SIT, seria minimizar os riscos de anafilaxia.

Portanto, o presente trabalho avaliou o efeito da administração de agonistas de diferentes TLRs na supressão das respostas alérgicas, em aplicações profiláticas e terapêuticas. Sendo assim, agregando conhecimento sobre os possíveis mecanismos do efeito inibitório da imunoterapia alérgeno específica, além de enfatizar a importância do veículo de carregamento objetivando reduzir o risco de anafilaxia.

2. CONCLUSÃO

Coletivamente, nosso trabalho destaca as vias moleculares e as propriedades da formulação alérgeno/CpG no protocolo profilático pela ação conjunta das moléculas MyD88 em células dendríticas e produção sistêmica de IL-10 na inibição do desenvolvimento de uma resposta inflamatória alérgica e produção de IgE. Além do potencial da formulação Alum/CpG em vacinas e processos anti-alérgicos. Em relação ao protocolo terapêutico, nosso trabalho evidencia o potencial curativo da SIT alérgeno+CpG/DOTAP no modelo de inflamação alérgica pulmonar. Além de mostrar que a utilização da membrana de carregamento DOTAP diminui a reação anafilática cutânea e sistêmica frente ao alérgeno. A SIT terapêutica é completamente dependente da sinalização via MyD88 em células dendríticas, células adaptativas capazes de produzir IFN- γ e da produção de IL-10 pelas células inatas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huber, B. 100 years of allergy: Clemens von Pirquet - His idea of allergy and its immanent concept of disease. *Wiener Klinische Wochenschrift* (2006). doi:10.1007/s00508-006-0701-3
2. Akdis, C. A. (Eds). *Global Atlas of Asthma. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)* (2013). doi:10.1183/09031936.00027509.
3. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature07204
4. Holgate, S. T. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J. Allergy Clin. Immunol.* (2011). doi:10.1016/j.jaci.2011.06.052
5. GINA. Global Strategy For Asthma Management and Prevention - 2018 update. *GINA* (2018). doi:10.1183/09031936.00138707
6. (GINA), T. G. I. for A. *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016. Gina* (2016). doi:10.1183/09031936.00138707
7. (NHLBI), N. H. L. and B. I. National Asthma Education and Prevention Program. *Children* (2007). doi:10.1016/j.jaci.2007.09.029
8. Fuhlbrigge, A. *et al.* Asthma outcomes: Exacerbations. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2012). doi:10.1016/j.jaci.2011.12.983
9. Pawankar, R., Canonica, G. W., Holgate, S. T. & Lockey, R. F. Allergic diseases and asthma: A major global health concern. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (2012). doi:10.1097/ACI.0b013e32834ec13b
10. Pawankar, R. Allergic diseases: A global public health issue. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* (2012). doi:10.1186/1939-4551-7-12
11. Braman, S. S. The global burden of asthma. in *Chest* (2006). doi:10.1378/chest.130.1_suppl.4S
12. D'Amato, G. *et al.* Asthma-related deaths. *Multidisciplinary Respiratory*

Medicine (2016). doi:10.1186/s40248-016-0073-0

13. BRASIL. *Doenças Respiratórias Crônicas*. Ministério da Saúde (2010). doi:10.1007/s002140100263
14. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and B. I. National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report III: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. Nov (2007). doi:10.1016/j.jaci.2007.09.029
15. U.S Department of Health and human services. *Managing asthma: Aguide for schools. National Asthma Education and Prevention Program* (2014). doi:10.1530/rep.1.01069
16. Holgate, S. T. The Airway Epithelium is Central to the Pathogenesis of Asthma. *Allergol. Int.* (2008). doi:10.2332/allergolint.R-07-154
17. Holgate, S. T. & Davies, D. E. Rethinking the Pathogenesis of Asthma. *Immunity* (2009). doi:10.1016/j.immuni.2009.08.013
18. Huber, H. L. & Koessler, K. K. The pathology of bronchial asthma. *Arch. Intern. Med.* (1922). doi:10.1001/archinte.1922.00110120002001
19. Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology* (2008). doi:10.1038/nri2257
20. Ober, C. & Yao, T. C. The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective. *Immunol. Rev.* (2011). doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x
21. Akhabir, L. & Sandford, A. J. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology* (2011). doi:10.1111/j.1440-1843.2011.01939.x
22. Barnes, P. J. Molecular mechanisms of atopy. in *Mediators of Inflammation* (2001). doi:10.1080/09629350120102000
23. Pearce, N., Pekkanen, J. & Beasley, R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* (1999). doi:10.1136/thx.54.3.268

24. Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20111941
25. Ishizaka, K. & Ishizaka, T. Physicochemical properties of reaginic antibody. I. Association of reaginic activity with an immunoglobulin other than γ A- or γ G-globulin. *J. Allergy* (1966). doi:10.1016/0021-8707(66)90091-8
26. Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010). doi:10.1016/j.jaci.2009.11.017
27. Tupper, J. & Visser, S. Anaphylaxis: A review and update. *Canadian Family Physician* (2010).
28. Martelli, A. *et al.* Anaphylaxis in the emergency department: A paediatric perspective. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (2008). doi:10.1097/ACI.0b013e328307a067
29. Irani, A.-M. & Akl, E. G. Management and Prevention of Anaphylaxis. *F1000Research* (2015). doi:10.12688/f1000research.7181.1
30. Lee, S. *et al.* Trends, characteristics, and incidence of anaphylaxis in 2001-2010: A population-based study. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.jaci.2016.04.029
31. Reid, M. J. *et al.* Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1993). doi:10.1016/0091-6749(93)90030-J
32. Bernstein, D. I., Wanner, M., Borish, L. & Liss, G. M. Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2004). doi:10.1016/j.jaci.2004.02.006
33. Larché, M., Robinson, D. S. & Kay, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2003). doi:10.1067/mai.2003.169
34. Ishmael, F. T. The Inflammatory Response in the Pathogenesis of Asthma. *J. Am. Osteopath. Assoc.* (2011). doi:10.1177/027836498600500102

35. Fadal, R. G. IgE-mediated hypersensitivity reactions. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* (1993).
36. Finkelman, F. D., Hogan, S. P., Hershey, G. K. K., Rothenberg, M. E. & Wills-Karp, M. Importance of Cytokines in Murine Allergic Airway Disease and Human Asthma. *J. Immunol.* (2010). doi:10.4049/jimmunol.0902185
37. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998). doi:10.1038/32588
38. De Jong, E. C., Smits, H. H. & Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Seminars in Immunopathology* (2005). doi:10.1007/s00281-004-0167-1
39. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* (2003). doi:10.1038/nri1246
40. Phythian-Adams, A. T. *et al.* CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J. Exp. Med.* (2010). doi:10.1084/jem.20100734
41. Deo, S., Mistry, K., Kakade, A. & Niphadkar, P. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India* (2010). doi:10.4103/0970-2113.63609
42. Mukherjee, M., Sehmi, R. & Nair, P. Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. *World Allergy Organization Journal* (2014). doi:10.1186/1939-4551-7-32
43. Bradley, B. L. *et al.* Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: Comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronc. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1991). doi:10.1016/0091-6749(91)90160-P
44. Sedgwick, J. B. *et al.* Comparison of airway and blood eosinophil function after in vivo antigen challenge. *J Immunol* (1992).
45. Broide, D. H. *et al.* Cytokines in symptomatic asthma airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1992). doi:10.1016/0091-6749(92)90218-Q

46. Gleich, G. J. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1990). doi:10.1016/0091-6749(90)90151-S
47. Akuthota, P. & Weller, P. F. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin. Hematol.* (2012). doi:10.1053/j.seminhematol.2012.01.005
48. Rabe, K. F. *et al.* Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am J Physiol* (1994). doi:10.1152/ajplung.1994.267.3.L326
49. Fujimoto, K., Parker, J. C. & Kayes, S. G. Activated eosinophils increase vascular permeability and resistance in isolated perfused rat lungs [see comments]. *Am.Rev.Respir.Dis.* (1990). doi:10.1164/ajrccm/142.6_Pt_1.1414
50. Foster, P. S. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* (1996). doi:10.1084/jem.183.1.195
51. Nials, A. T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis. Model. Mech.* (2008). doi:10.1242/dmm.000323
52. Yssel, H. & Groux, H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. *International Archives of Allergy and Immunology* (2000). doi:10.1159/000024292
53. Grünig, G. *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* (80-.). (1998). doi:10.1126/science.282.5397.2261
54. Dent, L. A. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J. Exp. Med.* (1990). doi:10.1084/jem.172.5.1425
55. Calderón, M. A., Frankland, A. W. & Demoly, P. Allergen immunotherapy and allergic rhinitis: False beliefs. *BMC Med.* (2013). doi:10.1186/1741-7015-11-255
56. Wraith, D. C. The future of immunotherapy: A 20-year perspective. *Front. Immunol.* (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.01668
57. Rosenberg, S. A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes

- that encode cancer antigens. *Immunity* (1999). doi:10.1016/S1074-7613(00)80028-X
58. McCarthy, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop. J.* (2006). doi:2006;26:154-8
 59. Busse, W. *et al.* Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2001). doi:10.1067/mai.2001.117880
 60. Milgrom, H. *et al.* Treatment of Allergic Asthma with Monoclonal Anti-IgE Antibody. *N. Engl. J. Med.* (1999). doi:10.1056/NEJM199912233412603
 61. Fahy, J. V. *et al.* Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1999). doi:10.1164/ajrccm.160.3.9810012
 62. Liu, Y., Zhang, H., Ni, R., Jia, W. Q. & Wang, Y. Y. IL-4R suppresses airway inflammation in bronchial asthma by inhibiting the IL-4/STAT6 pathway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* (2017). doi:10.1016/j.pupt.2017.01.006
 63. Borish, L. C. *et al.* Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2001). doi:10.1067/mai.2001.115624
 64. Rabe, K. F. & Schmidt, D. T. Pharmacological treatment of asthma today. *Eur. Respir. J.* (2001). doi:10.1183/09031936.01.00252501
 65. Ramachandran, M. & Aronson, J. K. John Bostock's first description of hayfever. *Journal of the Royal Society of Medicine* (2011). doi:10.1258/jrsm.2010.10k056
 66. Ring, J. & Guterthum, J. 100 years of hyposensitization: History of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2011). doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02541.x
 67. Burgess, J. A. *et al.* Childhood allergic rhinitis predicts asthma incidence and persistence to middle age: A longitudinal study. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2007). doi:10.1016/j.jaci.2007.07.020

68. Paaso, E. M. S., Jaakkola, M. S., Rantala, A. K., Hugg, T. T. & Jaakkola, J. J. K. Allergic diseases and asthma in the family predict the persistence and onset-age of asthma: A prospective cohort study. *Respir. Res.* (2014). doi:10.1186/s12931-014-0152-8
69. Akdis, C. A. Therapies for allergic inflammation: Refining strategies to induce tolerance. *Nature Medicine* (2012). doi:10.1038/nm.2754
70. Razafindratsita, A. *et al.* Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2007). doi:10.1016/j.jaci.2007.04.009
71. Yamada, T. *et al.* Sublingual Immunotherapy Induces Regulatory Function of IL-10-Expressing CD4+CD25+Foxp3+ T Cells of Cervical Lymph Nodes in Murine Allergic Rhinitis Model. *J. Allergy* (2012). doi:10.1155/2012/490905
72. Maazi, H. *et al.* Contribution of regulatory T cells to alleviation of experimental allergic asthma after specific immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* (2012). doi:10.1111/j.1365-2222.2012.04064.x
73. Vissers, J. L. M. *et al.* Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2004). doi:10.1016/j.jaci.2004.02.041
74. Van Oosterhout, A. J. M. *et al.* Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a Murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998). doi:10.1165/ajrcmb.19.4.3112m
75. Cappella, A. & Durham, S. Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. *Hum. Vaccin. Immunother.* (2012). doi:10.4161/hv.21629
76. Normansell, R. & Kew, K. M. Sublingual immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2014). doi:10.1002/14651858.CD011293
77. MacKenzie, K. J. *et al.* Combination peptide immunotherapy based on T-cell epitope mapping reduces allergen-specific IgE and eosinophilia in allergic airway inflammation. *Immunology* (2013). doi:10.1111/imm.12032

78. Canonica, G. W. *et al.* Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organization Journal* (2014). doi:10.1186/1939-4551-7-6
79. Takabayashi, K., Libet, L., Chisholm, D., Zubeldia, J. & Horner, A. A. Intranasal Immunotherapy Is More Effective Than Intradermal Immunotherapy for the Induction of Airway Allergen Tolerance in Th2-Sensitized Mice. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.170.7.3898
80. Borish, L., Tamir, R. & Rosenwasser, L. J. Intravenous desensitization to beta-lactam antibiotics. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1987). doi:10.1016/0091-6749(87)90037-6
81. Kitagaki, K., Businga, T. R. & Kline, J. N. Oral administration of CpG-ODNs suppresses antigen-induced asthma in mice. *Clin. Exp. Immunol.* (2006). doi:10.1111/j.1365-2249.2005.03003.x
82. Roche, A. M. & Wise, S. K. Subcutaneous immunotherapy. *International Forum of Allergy and Rhinology* (2014). doi:10.1002/alr.21382
83. Cox, L., Li, J. T., Nelson, H. & Lockey, R. Allergen immunotherapy: A practice parameter second update. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2007). doi:10.1016/j.jaci.2007.06.019
84. Larché, M., Akdis, C. A. & Valenta, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2006). doi:10.1038/nri1934
85. Arce-Sillas, A. *et al.* Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of Immunology Research* (2016). doi:10.1155/2016/1720827
86. Matsuoka, T., Shamji, M. H. & Durham, S. R. Allergen Immunotherapy and Tolerance. *Allergol. Int.* (2013). doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0650
87. Durham, S. R. & Penagos, M. Sublingual or subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2016). doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1298

88. Keller, A. C. *et al.* Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2006). doi:10.1016/j.jaci.2005.10.019
89. Jay, D. C. & Nadeau, K. C. Immune Mechanisms of Sublingual Immunotherapy. *Current Allergy and Asthma Reports* (2014). doi:10.1007/s11882-014-0473-1
90. Bellinghausen, I. *et al.* Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: Differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2001). doi:10.1067/mai.2001.117177
91. Wing, K., Fehérvári, Z. & Sakaguchi, S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *International Immunology* (2006). doi:10.1093/intimm/dxl044
92. Gri, G. *et al.* CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* (2008). doi:10.1016/j.immuni.2008.08.018
93. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1989). doi:10.1101/SQB.1989.054.01.003
94. Vénéreau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M. E. DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in Immunology* (2015). doi:10.3389/fimmu.2015.00422
95. Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. & Lotze, M. T. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* (2012). doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x
96. Latz, E. *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* (2004). doi:10.1038/ni1028
97. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
98. Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines* (2011). doi:10.1586/erv.10.174

99. Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L. & Moretta, A. Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur. J. Immunol.* (2006). doi:10.1002/eji.200535781
100. Vollmer, J. *et al.* Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* (2004). doi:10.1002/eji.200324032
101. Sivori, S. *et al.* A novel KIR-associated function: Evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood* (2010). doi:10.1182/blood-2009-12-256586
102. Baumann, C. L. *et al.* CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *J. Exp. Med.* (2010). doi:10.1084/jem.20101111
103. Caminschi, I., Meuter, S. & Heath, W. R. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Oncoimmunology* (2013). doi:10.4161/onci.23128
104. Kumagai, Y., Takeuchi, O. & Akira, S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2008). doi:10.1016/j.addr.2007.12.004
105. Napetschnig, J. & Wu, H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu. Rev. Biophys.* (2013). doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130338
106. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. & Akira, S. The Roles of Toll-Like Receptor 9, MyD88, and DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in the Effects of Two Distinct CpG DNAs on Dendritic Cell Subsets. *J. Immunol.* (2003). doi:10.4049/jimmunol.170.6.3059
107. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* (2000). doi:10.1038/35047123
108. Lin, L., Gerth, A. J. & Peng, S. L. CpG DNA redirects class-switching towards 'Th1-like' Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur. J. Immunol.* (2004). doi:10.1002/eji.200324736
109. Liu, N., Ohnishi, N., Ni, L., Akira, S. & Bacon, K. B. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat. Immunol.*

(2003). doi:10.1038/ni941

110. Pasare, C. & Medzhitov, R. Immunology: Toll-like receptors and antibody responses (reply). *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04875
111. Mirotti, L. *et al.* CpG-ODN shapes alum adjuvant activity signaling Via MyD88 and IL-10. *Front. Immunol.* (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00047
112. Bortolatto, J. *et al.* Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: Role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon- γ axis. *Clin. Exp. Allergy* (2008). doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03036.x
113. Fonseca, D. M. *et al.* Requirement of MyD88 and Fas pathways for the efficacy of allergen-free immunotherapy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2015). doi:10.1111/all.12555
114. Zhu, J. & Paul, W. E. Peripheral CD4⁺T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* (2010). doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x
115. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* (2004). doi:10.1038/ni1112
116. Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C. & Klinman, D. M. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* (2011). doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.002
117. Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* (2004). doi:10.1038/nri1329
118. Kline, J. N. *et al.* Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* (1998). doi:10.1016/S1388-2481(01)00276-4
119. Sur *et. al.*, S. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* (1999).
120. Kline, J. N., Kitagaki, K., Businga, T. R. & Jain, V. V. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol.*

Lung Cell. Mol. Physiol. (2002). doi:10.1152/ajplung.00402.2001

121. Yasuda, K. *et al.* CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of 'natural' phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.* (2006). doi:10.1002/eji.200535210
122. Yasuda, K. *et al.* Requirement for DNA CpG Content in TLR9-Dependent Dendritic Cell Activation Induced by DNA-Containing Immune Complexes. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0900399
123. Akkaya, M. *et al.* T cell-dependent antigen adjuvanted with DOTAP-CpG-B but not DOTAP-CpG-A induces robust germinal center responses and high affinity antibodies in mice. *Eur. J. Immunol.* (2017). doi:10.1002/eji.201747113
124. Tada, R. *et al.* Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-chol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice. *BMC Res. Notes* (2017). doi:10.1186/s13104-017-2380-8
125. Yotsumoto, S., Saegusa, K. & Aramaki, Y. Endosomal translocation of CpG-oligodeoxynucleotides inhibits DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *J. Immunol.* (2008). doi:180/2/809 [pii]
126. Mansourian, M. *et al.* Effective induction of anti-tumor immunity using p5 HER-2/neu derived peptide encapsulated in fusogenic DOTAP cationic liposomes co-administrated with CpG-ODN. *Immunol. Lett.* (2014). doi:10.1016/j.imlet.2014.07.008
127. Tada, R. *et al.* Intranasal immunization with dotap cationic liposomes combined with DC-cholesterol induces potent antigen-specific mucosal and systemic immune responses in mice. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0139785
128. Hou, B., Reizis, B. & DeFranco, A. L. Toll-like Receptors Activate Innate and Adaptive Immunity by using Dendritic Cell-Intrinsic and -Extrinsic Mechanisms. *Immunity* (2008). doi:10.1016/j.immuni.2008.05.016
129. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CTmethod. *Nat. Protoc.* (2008). doi:10.1038/nprot.2008.73

130. Lan, F., Zeng, D., Huie, P., Higgins, J. P. & Strober, S. Allogeneic bone marrow cells that facilitate complete chimerism and eliminate tumor cells express both CD8 and T-cell antigen receptor- $\alpha\beta$. *Blood* (2001).
doi:10.1182/blood.V97.11.3458
131. Evans, H., Killoran, K. E. & Mitre, E. Measuring Local Anaphylaxis in Mice. *J. Vis. Exp.* (2014). doi:10.3791/52005
132. Doyle, E., Trosien, J. & Metz, M. Protocols for the induction and evaluation of systemic anaphylaxis in mice. *Methods Mol. Biol.* (2013). doi:10.1007/978-1-62703-496-8_10
133. 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* (2009). doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03191.x
134. Mosmann, T. R. & Moore, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Parasitol. Today* (1991). doi:10.1016/0169-4758(91)90032-J
135. Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4⁺T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* (80-.). (1993).
doi:10.1126/science.8097338
136. Hou, B. *et al.* Selective utilization of toll-like receptor and Myd88 signaling in B cells for enhancement of the antiviral germinal center response. *Immunity* (2011). doi:10.1016/j.immuni.2011.01.011
137. Rahman, A. H., Taylor, D. K. & Turka, L. A. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunologic Research* (2009).
doi:10.1007/s12026-009-8113-x
138. Volpi, C. *et al.* High doses of CpG oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9-TRIF pathway. *Nat. Commun.* (2013).
doi:10.1038/ncomms2874
139. Miyajima, I. *et al.* Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc γ RIII: Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent

- passive anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* (1997). doi:10.1172/JCI119255
140. Zhang, L. *et al.* SHP-1 Deficient Mast Cells Are Hyperresponsive to Stimulation and Critical in Initiating Allergic Inflammation in the Lung. *J. Immunol.* (2010). doi:10.4049/jimmunol.0901972
 141. Baqueiro, T. *et al.* Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: Immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. *Respir. Res.* (2010). doi:10.1186/1465-9921-11-51
 142. Yan Chua, K. *et al.* The *Blomia tropicalis* Allergens. *Protein Pept. Lett.* (2007). doi:10.2174/092986607780363862
 143. Akdis, C. A. & Akdis, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2011). doi:10.1016/j.jaci.2010.11.030
 144. Cappella, A. & Durham, S. R. Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (2012). doi:10.4161/hv.21629
 145. Akdis, M. New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organization Journal* (2014). doi:10.1186/1939-4551-7-23
 146. Mosbech, H. & Terhalle, O. Does the effect of immunotherapy last after termination of treatment? Follow-up study in patients with grass pollen rhinitis. *Allergy* (1988). doi:10.1111/j.1398-9995.1988.tb01631.x
 147. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.180.9.5771
 148. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Mol. Cell. Biol.* (2001). doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
 149. Wilson, M. S. *et al.* IL-13R α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* (2007). doi:10.1172/JCI31546
 150. Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. & Harding, C. V. CpG

- Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity. *J. Exp. Med.* (1997). doi:10.1084/jem.186.10.1623
151. Ashino, S. *et al.* CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung. *Int. Immunol.* (2008). doi:10.1093/intimm/dxm138
 152. Barr, T. A., Brown, S., Mastroeni, P. & Gray, D. B Cell Intrinsic MyD88 Signals Drive IFN- Production from T Cells and Control Switching to IgG2c. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0803706
 153. Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S. G. & Choi, S. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006 – 2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* (2011). doi:10.1517/13543776.2011.569494
 154. Vollmer, J. & Krieg, A. M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2009). doi:10.1016/j.addr.2008.12.008
 155. Hayashi, T. & Raz, E. TLR9-Based Immunotherapy for Allergic Disease. *Am. J. Med.* (2006). doi:10.1016/j.amjmed.2005.12.028
 156. Creticos, P. S. *et al.* Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* (2006). doi:10.1542/peds.2007-0846GGGG
 157. Beeh, K. M. *et al.* The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013). doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1561
 158. Bortolatto, J., Mirotti, L., Rodriguez, D., Gomes, E. & Russo, M. Adsorption of Toll-Like Receptor 4 Agonist to Alum-Based Tetanus Toxoid Vaccine Dampens Pro-T Helper 2 Activities and Enhances Antibody Responses. *J. Immunol. Res.* (2015). doi:10.1155/2015/280238
 159. Barboza, R. *et al.* Endotoxin Exposure during Sensitization to *Blomia tropicalis* Allergens Shifts TH2 Immunity Towards a TH17-Mediated Airway Neutrophilic Inflammation: Role of TLR4 and TLR2. *PLoS One* (2013).

doi:10.1371/journal.pone.0067115

160. Van Strien, R. T. *et al.* Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2004).
doi:10.1016/j.jaci.2004.01.783
161. Gavett, S. H. *et al.* Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* (1995). doi:10.1084/jem.182.5.1527
162. Kinjo, T., Tomaru, K., Haines, D. C. & Klinman, D. M. The counter regulatory response induced by CpG oligonucleotides prevents bleomycin induced pneumopathy. *Respir. Res.* (2012). doi:10.1186/1465-9921-13-47
163. Bekeredjian-Ding, I. & Jegou, G. Toll-like receptors - Sentries in the B-cell response. *Immunology* (2009). doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03173.x
164. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* (1995). doi:10.1038/374546a0
165. Nemazee, D., Gavin, A., Hoebe, K. & Beutler, B. Toll-like receptors and antibody responses. *Nature* (2006). doi:10.1007/s10457-008-9185-7
166. Hou, B., Benson, A., Kuzmich, L., DeFranco, A. L. & Yarovinsky, F. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *PNAS* (2011).
doi:10.1167/iov.12-10765
167. Sun, J. *et al.* TLR Ligands Can Activate Dendritic Cells to Provide a MyD88-Dependent Negative Signal for Th2 Cell Development. *J. Immunol.* (2005).
doi:10.1093/infdis/65.3.246
168. Blander, J. M. & Medzhitov, R. Regulation of Phagosome Maturation by Signals from Toll-Like Receptors. *Science* (80-.). (2004).
doi:10.1126/science.1096158
169. Magarian Blander, J. & Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* (2006).

doi:10.1038/nature04596

170. West, M. A. *et al.* Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* (80-.). (2004).
doi:10.1126/science.1099153
171. Caton, M. L., Smith-Raska, M. R. & Reizis, B. Notch–RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁺ dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* (2007).
doi:10.1084/jem.20062648
172. Arnold-Schrauf, C., Berod, L. & Sparwasser, T. Dendritic cell specific targeting of MyD88 signalling pathways in vivo. *European Journal of Immunology* (2015).
doi:10.1002/eji.201444747
173. Zhou, H. *et al.* Differential IL-10 production by DCs determines the distinct adjuvant effects of LPS and PTX in EAE induction. *Eur. J. Immunol.* (2014).
doi:10.1002/eji.201343744
174. Chen, L. *et al.* Distinct Responses of Lung and Spleen Dendritic Cells to the TLR9 Agonist CpG Oligodeoxynucleotide. *J. Immunol.* (2006).
doi:10.4049/jimmunol.177.4.2373
175. Longhi, M. P. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J. Exp. Med.* (2009). doi:10.1084/jem.20090247
176. Makabe-Kobayashi, Y. *et al.* The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2002). doi:10.1067/mai.2002.125977
177. Faquim-Mauro, E. L., Jacysyn, J. F. & Macedo, M. S. Anaphylactic and non-anaphylactic murine IgG1 differ in their ability to bind to mast cells: Relevance of proper glycosylation of the molecule. *Immunobiology* (2003).
doi:10.1078/0171-2985-00231
178. Georgitis, J. W. *et al.* Local intranasal immunotherapy for grass-allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1983). doi:10.1016/S0002-9610(34)90165-3
179. Pajno, G. B., Cox, L., Caminiti, L., Ramistella, V. & Crisafulli, G. Oral

- Immunotherapy for Treatment of Immunoglobulin E-Mediated Food Allergy: The Transition to Clinical Practice. *Pediatr. Allergy. Immunol. Pulmonol.* (2014). doi:10.1089/ped.2014.0332
180. Jones, S. M. *et al.* Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.jaci.2016.08.017
 181. Bousquet, J. *et al.* Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* (1998). doi:10.1016/S1081-1206(10)63136-5
 182. Mahesh, P. a, Vedanthan, P. K., Amrutha, D. H., Giridhar, B. H. & Prabhakar, a K. Factors associated with non-adherence to specific allergen immunotherapy in management of respiratory allergy. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* (2009).
 183. Pfaar, O., Cazan, D., Klimek, L., Larenas-Linnemann, D. & Calderon, M. A. Adjuvants for immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (2012). doi:10.1097/ACI.0b013e32835a11d6
 184. AUDERA, C., RAMÍREZ, J., SOLER, E. & CARREIRA, J. Liposomes as carriers for allergy immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* (1991). doi:10.1111/j.1365-2222.1991.tb00816.x
 185. Bal, S. M., Hortensius, S., Ding, Z., Jiskoot, W. & Bouwstra, J. A. Co-encapsulation of antigen and Toll-like receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine* (2011). doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.061
 186. San Román, B., Irache, J. M., Gómez, S., Gamazo, C. & Espuelas, S. Co-delivery of ovalbumin and CpG motifs into microparticles protected sensitized mice from anaphylaxis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* (2009). doi:10.1159/000189193
 187. Santeliz, J. V., Nest, G. Van, Traquina, P., Larsen, E. & Wills-Karp, M. Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*

- (2002). doi:10.1067/mai.2002.122156
188. Scheiermann, J. & Klinman, D. M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* (2014). doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.065
 189. Cao, W. *et al.* Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat. Immunol.* (2008). doi:10.1038/ni.1645
 190. Jia, A. *et al.* Comparison of the roles of house dust mite allergens, ovalbumin and lipopolysaccharides in the sensitization of mice to establish a model of severe neutrophilic asthma. *Exp. Ther. Med.* (2017). doi:10.3892/etm.2017.4776
 191. Korsholm, K. S., Petersen, R. V., Agger, E. M. & Andersen, P. T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology* (2010). doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03164.x
 192. Des Roches, a *et al.* Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. V. Duration of the efficacy of immunotherapy after its cessation. *Allergy* (1996). doi:10.1111/j.1398-9995.1996.tb04643.x
 193. Capolunghi, F. *et al.* CpG Drives Human Transitional B Cells to Terminal Differentiation and Production of Natural Antibodies. *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.180.2.800
 194. Jiang, W. *et al.* TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur. J. Immunol.* (2007). doi:10.1002/eji.200636984
 195. Bauer, M. *et al.* Bacterial CpG-DNA Triggers Activation and Maturation of Human CD11c-, CD123+ Dendritic Cells. *J. Immunol.* (2001). doi:10.4049/jimmunol.166.8.5000
 196. Singh-Jasuja, H. *et al.* The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering.

Immunobiology (2013). doi:10.1016/j.imbio.2012.01.021

197. Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. & Akira, S. Endotoxin-Induced Maturation of MyD88-Deficient Dendritic Cells. *J. Immunol.* (2001).
doi:10.4049/jimmunol.166.9.5688
198. Besnard, A. G. *et al.* NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2011).
doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02586.x
199. Raetz, M. *et al.* Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat. Immunol.* (2012).
doi:10.1038/ni.2508
200. Zuany-Amorim, C., Vargaftig, B. B. & Pretolani, M. Modulation by IL-10 of Antigen-induced Allergic Responses in Mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (1997).
doi:10.1590/S0074-02761997000800019
201. Askenase, M. H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* (2015).
doi:10.1016/j.immuni.2015.05.011
202. Lai, R. *et al.* Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* (2018).
doi:10.1016/j.cell.2018.09.042
203. Van Belleghem, J. D. & Bollyky, P. L. Macrophages and innate immune memory against *Staphylococcus* skin infections . *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2018).
doi:10.1073/pnas.1816935115