UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Porinas e suas ações imunomoduladoras dependentes de TLR2

Laura de Oliveira Nascimento

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador: Adalberto Pessoa Júnior

Co-orientador: Marco Antônio Stephano

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Porinas e suas ações imunomoduladoras dependentes de TLR2

Laura de Oliveira Nascimento

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador: Adalberto Pessoa Júnior

Co-orientador: Marco Antônio Stephano

São Paulo

2011

Laura de Oliveira Nascimento

Porinas e suas ações imunomoduladoras dependentes de TLR2

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Dr. Marco Antônio Stephano
Co-orientador/Presidente

_____
1º. Examinador

_____
2º. Examinador

_____
3º. Examinador

_____
4º. Examinador

São Paulo, _____de _____.

Agradecimentos

Agradeço a todos que participaram de alguma forma desta tese nos quatro anos de dedicação a este estudo e que posso esquecer aqui neste breve agradecimento.

Adalberto Pessoa Júnior, por sua prontidão e auxílio desta jornada.

Marco Antônio Stephano, pelo seu apoio, confiança, seriedade e amizade.

Jony, Fernanda, Patrícia e Marnen, muito mais que colegas de trabalho.

Sandra Farsky, Neuza Gallina, Monamaris Borges, Sílvia Boscardin, Bronislaw Polakiewicz, Thereza Penna e Priscila Mazzola, professores que me ajudaram imensamente e possibilitaram a realização deste estudo.

Carol, Ana, Angela e Milena pelo ombro amigo de todas as horas.

Miriam, Juarez, Elza, Majô, Elaine e Jorge por todo auxílio nas burocracias e compreensão nas falhas.

Lee Wetzler, Damiana Chiavolini e Paola Massari pelo apoio profissional e moral no meu tempo fora do país.

Minha família e meu marido por incontáveis razões e apoio incondicional.

A força maior por nos fazer seguir em frente, sempre.

Dedico esta tese a minha família e marido, aos quais amo, admiro e me espelho para ser uma pessoa melhor a cada dia

Resumo

Oliveira-Nascimento, L. Porinas e suas ações imunomoduladoras independentes de TLR2. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os micro-organismos podem infectar seu hospedeiro por diferentes vias, sendo a principal o trato respiratório. O reconhecimento pela mucosa dessas vias pode desencadear inibição da proliferação e bloqueio da entrada microbiana, assim como estimular resposta direcionada a memória imunológica para prevenir posteriores infecções. Alguns micro-organismo, como as bactérias *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*, são capazes de modular a resposta imune de mucosa diretamente, ou por meio das células epiteliais respiratórias. Este trabalho propôs, então, a avaliação das porinas B provenientes destas bactérias como moduladoras da produção de IL-8 nas linhagens BEAS-2B e Detroit 562. Também foi avaliada a dependência deste estímulo ao receptor TLR2. Ambas as porinas se ligaram a TLR2 e por este receptor estimularam a produção de IL-8. O perfil de produção foi dependente da expressão de TLR2 pelas células. A porina lactâmica induziu menos IL-8 por regular negativamente a expressão de TLR2, mas sua afinidade pelo receptor se mostrou maior que a da porina meningocócica. As porinas são então moduladoras das células de mucosa, fato que somado a atividade adjuvante destas proteínas por via parenteral estimulou a avaliação destas como adjuvantes de mucosa. O modelo escolhido para a avaliação foi o de inoculação intranasal de camundongos, utilizando como antígeno o lipopolissacarídio pouco imunogênico de *Franciscella tularensis* atenuada (Ft-LPS). A análise foi baseada no título de anticorpos IgG e IgM séricos. A porina meningocócica se mostrou a mais imunogênica, mas por ser originária de patógeno acarreta maior risco biológico em sua produção. Para viabilizar a porina meningocócica como adjuvante, a mesma foi substituída por porina homóloga produzida de modo recombinante em *Escherichia coli* não patogênica.

A porina recombinante foi avaliada pelo mesmo sistema *in vivo* e comparada a adjuvantes experimentais de ação conhecida (rCTB, QS-21 e ODN 1826). A porina apresentou o melhor desempenho entre todos os adjuvantes, principalmente dois meses após o fim do esquema vacinal. O mesmo adjuvante foi adicionado ao vírus da raiva para

caracterizar a amplitude de antígenos para sua aplicação e o efeito biológico dos anticorpos induzidos. Os resultados obtidos por via intranasal com antígeno da raiva confirmaram a propriedade de adjuvante de mucosa da porina recombinante, aumentando os títulos de IgG séricos. O ensaio biológico dos anticorpos por RFFIT comprovaram a funcionalidade dos anticorpos gerados, neutralizando a infectividade viral em células BHK-21. O uso da porina por via subcutânea não aumentou o nível de anticorpos neutralizantes, mas aumentou o de IgG. Não foi detectada imunidade celular específica de linfócitos do baço ao vírus da raiva nos parâmetros avaliados, independente da adição de adjuvantes. Em resumo, as porinas foram caracterizadas como relevantes na imunomodulação de células da mucosa respiratória por infecção meningocócica. A modulação também foi relevante para o aumento de resposta humoral frente a diferentes antígenos, por diferentes vias de administração, o que demonstra a eficiência e versatilidade da porina recombinante como adjuvante imunológico.

Palavras chave: Porina, TLR2, adjuvante, IL-8, vacinação intranasal, vírus da raiva.

Abstract

Oliveira-Nascimento, L. Porins and their immunomodulatory effects triggered by TLR2. Thesis (Doctoral) – College of Pharmaceutical Ciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2010.

Microorganisms can invade the host through many routes, specially the respiratory tract. The respiratory mucosa is responsible for recognition, inhibition, proliferation and entry blockade of microorganisms, besides incitation of immunological memory to prevent further infections. Some microorganisms, such as *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*, can modulate the mucosa immune response directly or through stimulation of respiratory epithelial cells. The present work proposed the evaluation of porin B proteins, derived from these microorganisms, as modulators of IL-8 production on respiratory epithelial cell strains BEAS-2B and Detroit 562. TLR2 receptor dependency for the modulation was also evaluated. Both porins bounded to TLR2 and through this receptor were able to stimulate IL-8 production, whereas this profile was correlated with TLR2 expression. Lactamica porin (*Nlac* PorB) induced less IL-8 and TLR2 expression, also for a shorter period of time. The effect caused by *Nlac* PorB was attributed to TLR2 down regulated expression, since its binding affinity to the receptor is greater than meningococcal porin (*Nmen* PorB). Porins were therefore able to immune modulate mucosal cells, fact that allied with their parenteral adjuvant activity incited evaluation of porins as potential mucosal adjuvants. The model chosen for the evaluation was intranasal immunization of mice, using as the antigen a low immunogenic lipopolysaccharide extracted from attenuated *Franciscella tularensis* (Ft-LPS). The evaluation was based on IgG and IgM serum titers. After the immunization scheme, *Nmen* PorB induced higher IgG and IgM titers than *Nlac* PorB. Although *Nmen* PorB was more efficient, it comes from a pathogen. To overcome the risk of its production, it was replaced by recombinant porin (rPorB) produced by *Escherichia coli*. rPorB was evaluated by the same model and compared with well known experimental adjuvants (rCTB, QS-21 e ODN 1826). rPoB had the highest IgM and IgG titers among all adjuvants tested, specially two months after vaccination. The same adjuvant was also combined with a viral antigen to characterize its application wideness and biological function

of incited antibodies. Results obtained with rabies antigen by intranasal route confirmed the mucosal adjuvant properties of rPorB, increasing IgG titers induced by the antigen. These antibodies were also capable of virus neutralization, as demonstrated in RFFIT assays. rPoB didn´t raise neutralizing antibody titers by subcutaneous route, but increased IgG titers. Cellular immunity was undetectable in spleen lymphocytes with the screening method used, regardless of adjuvant addition. In conclusion, porins were characterized as revelant for immunomodulation of the respiratory mucosal cells, caused by infection with meningococcus. The immunomodulation was also revelant for increase of humoral reponse to different antigens and by different routes, pointing out recombinant porin B as an efficient and versatile immunological adjuvant.

Keywords: Porin, TLR2, adjuvant, IL-8, intranasal vaccination, rabies virus.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% = porcentagem

µ = micro

µg = micrograma(s)

µl = microlitro(s)

ACIP = Comitê de Práticas em Imunização Americano

APC = célula Apresentadora de Antígeno (Antigen Presenting Cell)

ASO4 = adjuvante contendo monofosforil lipídio A e hidróxido de alumínio

BCR = receptor de célula B

BEAS 2B = linhagem de células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas por vírus

BHK 21 = linhagem de células de rim de camundongo neonato

BSA = albumina bovina sérica

C° = grau(s) Celsius

CCID50 = concentração que infecta 50% das células em cultura

CD = grupo de diferenciação (1,3,4,8 e 86) (Cluster of Differentiation)

cDNA = ácido desoxiribonucléico codificador

céls. = células

CFSE = carboxifluoresceína succinimidil éster

cm^2 = centímetros quadrados

SNC = sistema nervoso central

CO_2= dióxido de carbono

ConA = concanavalina A

CPG = sequência curta de DNA com alta repetição de base citosina ligada a guanina

CTL = célula T citotóxica

CVS -11 = cepa padrão do vírus da raiva para desafio número 11

DC = célula dendrítica

DMEM = meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucleico

EDTA = sal etileno diamino tetrassódico

ELISA = ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

EMEM = meio de Eagle essencial

FACS = selecionador de célula ativado por fluorescência

FB11 = anticorpo monoclonal antiFt-LPS FB11

FBS = soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

FITC = isotiocianato de fluoresceína

FL2 = detector de fluorescência de FACS na faixa de 575 nm

Ft-LPS = lipopolissacarídeo extraído de *Franciscella tularensis* subsp. *holarctica*

g = grama(s)

GD1a = gangliosídeo D1a

GTP = guanosina trifosfato

h= hora(s)

H1N1 = subtipo de vírus influenza

Hib = *Haemophilus influenzae* tipo b

IFN- α, β ou γ = Interferon (tipo α, β ou γ)

Ig A/D/M/G/E = imunoglobulina (classe A,D,M,G,E)

IL = interleucina (vários tipos indicados por número a frente da sigla)

IRF = fator regulador de interferon

KDa = quilo Dalton

L = litro(s)

lacPor = porina purificada de *Neisseria lactamica*

log = logarítimo

LPS = lipopolissacarídeo purificado de *Escherichia coli*

LRR = trechos repetitivos ricos em leucina

LVS = cepa vacinal *Franciscella tularensis* subsp. *Holarctica* (Live Vaccine Strain)

m = mili

M = molar

MAPK = quinase ativada por mitógeno

MEM = meio de cultura essencial

MF 59 = adjuvante contendo esqualeno

mg = miligrama(s)

MHC = Complexo Principal de Histocompatibilidade

min = minuto(s)

ml = mililitro(s)

mM = milimolar

MPLA = monofosforil lipídio A

mRNA = Ácido ribonucléico (mRNA)

MyD88 = fator de diferenciação mieloide

n = nano

NALT = tecido linfoide nasal

NF-κB = fator de necrose κB

ng = nanograma(s)

NIH = Instituto Nacional de Saúde (Estados Unidos)

Nlac PorB = porina B purificada de *Neisseria lactâmica* (porina lactâmica)

Nme PorB = porina B purificada de *Neisseria Meningiditis* (porina meningocócica)

ODN 1826 = oligodeoxinucleotídeos contendo dinucleotídeos de fosfato de citosina

OMS = Organização Mundial de saúde

Pam 3CSK4 = liporpoteína triacetilada sintética ligante de TLR1/TLR2

PAMP = moléculas padrões associadas a patógenos

PBS = tampão salino de fosfato

pg = picogramas

pH= potencial hidrogeniônico

PNPP = p-nitrofenil fosfato dissódico

PRR = receptores reconhecedores de moléculas padrões

PVDF = fluoreto de polivinil

PVP = polivinil pirrolidona

QS-21 = extrato purificado de *Quillaja saponaria* fração 21

rCTB = subunidade b da toxina colérica purificada de *Escherichia coli* recombinante

RFFIT = teste rápido de inibição de focos fluorescentes

RNA = ácido ribonucleico

RPM1 = meio de cultura estabelecido pelo instituto Roswell Park Memorial

rPorB = porina meningocócica purificada de *Escherichia coli* recombinante

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa

SDS -PAGE = eletrofore em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio

TA = temperatura ambiente

TCR = receptor de célula T

Tfh = linfócito T folicular

TGF-β = fator de crescimento tumoral

Th = linfócito T auxiliar (1,2,17 ou 21)

TIR = domínio de toll semelhante a receptor de interleucina 1

TLR = receptor semelhante a receptor Toll (tipos 1 a 13)

TNF = fator de necrose tumoral

UI = unidades internacionais

VRI = vírus da raiva inativado

x g = unidade de velocidade de rotação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 PANORAMA DO SISTEMA IMUNE MAMÍFERO 16

1.1.1 RECONHECIMENTO DE MICROORGANISMOS PELO SISTEMA IMUNE 17

1.1.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA CONTRA MICROORGANISMOS 19

1.1.3 INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA NA MUCOSA NASAL 21

1.1.4 EPITÉLIO COMO MODULADOR DA IMUNIDADE INDUZIDA PELA MUCOSA NASAL 22

1.2 TLR2 COMO IMPORTANTE RECEPTOR DO SISTEMA IMUNE 23

1.2.1 ESTRUTURA E ENGAJAMENTO EXTRACELULAR DE TLR2 24

1.2.2 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ATIVADA POR TLR2 25

1.3 IMUNOMODULAÇÃO APLICADA A VACINOLOGIA 26

1.3.1 ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS – FOCO EM ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL 26

1.3.2 PORINAS LIGANTES DE TLR2 COMO IMUNOMODULADORAS 28

1.3.3 FT-LPS COMO ANTÍGENO MODELO PARA ESTUDOS DE ADJUVANTES 30

1.3.4 UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA COMO ANTÍGENO PRÁTICO 31

2 OBJETIVOS 36

3 MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1 MATERIAL 37

3.1.1 ADJUVANTES, ANTÍGENOS E LIGANTES DE TLR 37

3.1.2 ANTICORPOS 38

3.1.3 KITS E REAGENTES 38

3.1.4 LINHAGENS CELULARES E VÍRUS 39

3.1.5 ANIMAIS 39

3.2 MÉTODOS 40

3.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE DAS PORINAS 40

3.2.2 CULTIVO CELULAR 41

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA SECREÇÃO CELULAR DE IL-8 POR ELISA SANDUÍCHE 42

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSCRIÇÃO DE MRNA PARA IL-8, TLR1 E TLR2 43

3.2.5 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO CELULAR DE TLR NA MEMBRANA 44

3.2.6 LIGAÇÃO DE *NLAC* PORB EM BEAS-2B 45

3.2.7 CONTROLE DE QUALIDADE DE FT-LPS 45

3.2.8 INOCULAÇÃO DE FORMULAÇÕES TESTE EM CAMUNDONGOS 47

3.2.9 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS PROVENIENTES DO BAÇO MURINO 52

3.2.10 ANÁLISE MATEMÁTICA E ESTATÍSTICA DE DADOS 53

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

4.1 PORINAS ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE IL-8 EM CÉLULAS RESPIRATÓRIAS HUMANAS, ATRAVÉS DO ENGAJAMENTO E AUMENTO DA EXPRESSÃO DE TLR2 55

4.1.1 ANÁLISE QUALITATIVA DAS PORINAS 55

4.1.2 PORINAS ESTIMULAM SECREÇÃO DE IL-8 EM CÉLULAS HUMANAS RESPIRATÓRIAS 56

4.1.3 A SECREÇÃO DE IL-8 ESTIMULADA POR PORINAS É MEDIADA POR TLR2 58

4.1.4 A PRODUÇÃO DE IL-8 É PROPORCIONAL A EXPRESSÃO DE TLR2 59

4.1.5 *NLAC* PORB É LIGANTE DE TLR2 60

4.2 PORINA ESTÍMULA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO MODELO 62

4.2.1 ANÁLISE QUALITATIVA DE FT-LPS 62

4.2.2 PORINA MENINGOCÓCICA INDUZ MAIS ANTICORPOS QUE A LACTÂMICA 63

4.2.3 PORINA INDUZ MAIS ANTICORPOS QUE OUTROS ADJUVANTES 64

4.3 PORINA COMO ADJUVANTE DO VÍRUS DA RAIVA INATIVADO 66

4.3.1 PORINA AUMENTA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDA PELO VÍRUS DA RAIVA ... 66

4.3.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EM ESPLENÓCITOS 70

5 CONCLUSÃO 72

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76

7 ANEXOS 85

7.1 ANEXO A: ARTIGO DE REVISÃO 85

7.2 ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO 1 115

7.3 ANEXO C: ARTIGO PUBLICADO 2 126

7.4 ANEXO D : CÓPIA DAS APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 140

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANORAMA DO SISTEMA IMUNE MAMÍFERO

O sistema imune é o responsável pela defesa e reestabelecimento do equilíbrio do organismo frente a ameaças exógenas, como micro-organismos, e endógenas, como dano aos tecidos. Em mamíferos, o sistema conta com barreiras mecânicas (tecido epitelial, peristaltismo, movimento ciliar e muco), fisiológicas (pH, tensoativos e ácidos graxos) e biológicas (microbiota) (TURVEY; BROIDE, 2010), aliadas a componentes celulares e humorais, tecidos e órgãos. A rede imune se distribui por todo o organismo, sendo a medula óssea o órgão gerador das células progenitoras, que migram aos tecidos e sangue para diferenciação ou maturação, ou que migram ao timo para maturação no caso dos linfócitos T. Apesar da ampla cobertura para manutenção do equilíbrio imunológico, as células de defesa se concentram nos linfonodos, baço e tecidos linfáticos (BONILLA; OETTGEN, 2010).

A estratégia da defesa imune, para fins didáticos, pode ser dividida em inata (generalizada) e adaptativa (específica), sendo a intercomunicação entre estas intensa e complexa (figura 1). A resposta inata é considerada imediata, munida de estratégias de defesa diversificadas em função do tamanho de partículas, de moléculas ou de micro-organismos, além do reconhecimento de padrões moleculares exógenos e endógenos. Quando se referem a patógenos (PAMPs), esses padrões contêm estruturas essenciais à patogenicidade, à sobrevivência ou à replicação, como toxinas, moléculas de membrana e material genético (TURVEY; BROIDE, 2010; WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). O mecanismo adaptativo é dependente do inato para uma resposta primária completa, na qual a ação é iniciada pelo reconhecimento específico de pedaços ou moléculas inteiras (antígenos), que desencadeiam a resposta e memória imunológica individual contra as mesmas. A resposta primária pode, por outro lado, culminar em tolerância, quando o organismo suprime a sinalização que desencadeia a eliminação do antígeno ou sua fonte (CLARK; KUPPER, 2005; MEDZHITOV, RUSLAN, 2007).

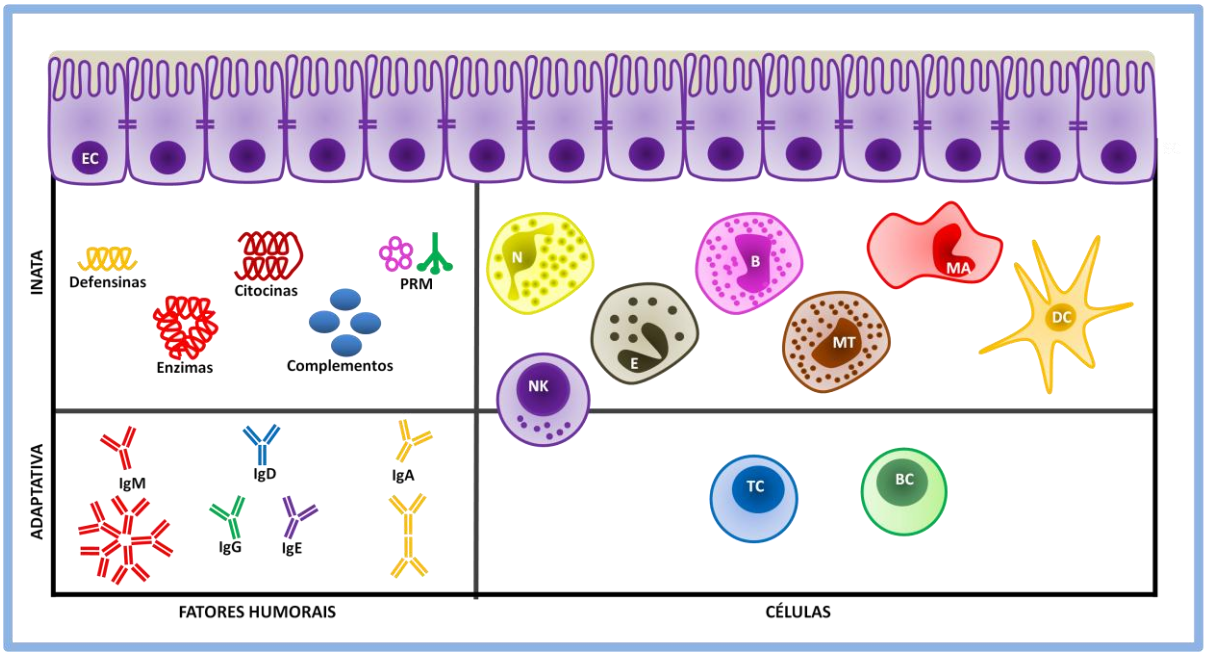

Figura 1 - Subdivisão dos componentes do sistema imune mamífero

Subdivisão em imunidade adaptativa e inata, com componentes celulares e humorais. As células Natural Killer (NK) ficam sobre a divisão por apresentarem características de ambos os tipos de resposta. As células epiteliais acima da subdivisão participam ativamente da resposta imune inata por secreção de defensinas e interleucinas, apesar de não serem consideradas células da imunidade inata. Alguns fatores humorais da imunidade inata podem ser secretados por células da imunidade adaptativa, porém não são específicos como os anticorpos. Células dendríticas (DC) e macrófagos (MA) se originam de monócitos, que não estão representados na figura. Linfócitos B, ao reconhecerem antígenos, podem se diferenciar em plasmócitos, não representados na figura. Ig (A,M,D,G e E)= imunoglobulina. PRM = moléculas solúveis reconhecedoras de padrões (ficolinas, pentraxinas, colectinas, etc.). N = neutrófilos. B = Basófilos. E = eosinófilos. MT = mastócitos. TC = células T. BC = células B. EC = células epiteliais. (BOTTAZZI et al., 2010; MADDUR; KAVERI; BAYRY, 2010; TURVEY; BROIDE, 2010)

1.1.1 RECONHECIMENTO DE MICROORGANISMOS PELO SISTEMA IMUNE

Para que o sistema imune cumpra sua função no combate a infecções é crucial que ele seja capaz de identificar a ameaça. A resposta imune humoral reconhece padrões moleculares de patógenos (resposta inata) ou antígenos específicos (anticorpos da resposta adaptativa), com a finalidade de neutralizar a molécula ou micro-organismo reconhecido, facilitar sua eliminação pelos fagócitos e ativar o sistema complemento para causar a lise de membranas microbianas (PALANIYAR, 2010). As citocinas, por sua vez, são moléculas sinalizadoras secretadas em decorrência do reconhecimento celular, amplificando este sinal e modulando as respostas inatas e adaptativas. O micro-organismo ainda pode sofrer dano direto por meio de fatores humorais como proteases e antimicrobianos (defensinas) (TURVEY; BROIDE, 2010).

As células da imunidade inata também reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e podem desencadear, em função da célula que os reconhece, a liberação de fatores humorais, a captura do micro-organismo reconhecido e a potencialização de mecanismos intracelulares de eliminação microbiana (espécies reativas e proteases) (WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). Todas as células do sistema imune inato e linfócitos B ainda são capazes de atuar como Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), que capturam micro-organismos ou seus produtos e os processam, gerando antígenos que se ligam a Complexos Principais de Histocompatibilidade (MHCs) para exposição na membrana celular. As células especializadas para esta função são linfócitos B, macrófagos e dentríticas. A APC mais eficiente é a célula dendrítica, por seu conjunto de expressão de moléculas coestimulantes e receptores de PAMPs, pelo ambiente de degradação proteica ideal para fornecimento de peptídeos antigênicos e outros atributos (HANNA et al., 2004; MADDUR; KAVERI; BAYRY, 2010; SAVINA; AMIGORENA, 2007).

Na resposta imune adaptativa celular, os linfócitos T e B utilizam os receptores TCR e BCR, respectivamente, sendo que cada clone de linfócito expressa receptores que reconhecem especificamente um conjunto de epítopos de determinado antígeno. A especificidade e diversidade da ligação com antígenos são possibilitadas por recombinação somática de genes da região variável dos receptores BCR e TCR. O reconhecimento antigênico por linfócitos T só ocorre quando o antígeno está ligado a um MHC, expresso na membrana das APCs. O conjunto da ligação TCR-antígeno-MHC e de moléculas coestimulantes de ambas as células é chamado de sinapse imunológica, sendo sua dinâmica determinante na orientação subsequente da resposta contra o invasor (CARREÑO; GONZÁLEZ; KALERGIS, 2006). No caso do linfócito B, o reconhecimento é direto (ligação cruzada de dois BCRs com antígeno), mas sua completa ativação depende de linfócitos T para certos tipos de antígenos, como proteínas (HANIUDA et al., 2011).

Como o estudo de modulação de resposta imune adaptativa é um dos focos deste estudo, esta é detalhada a seguir.

1.1.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA CONTRA MICROORGANISMOS

A indução primária da resposta imune adaptativa ocorre nos tecidos linfoides, geralmente por sinapses imunológicas de linfócitos T com APCs ativadas (figura 2, sinal 1), sendo estas migrantes de locais infectados e carregadas de antígeno. As APCs são estimuladas antes e durante a sinapse para apresentar o antígeno de maneira eficiente (figura 2, sinal 0), o que inclui inibição de novas capturas, com aumento da expressão de moléculas coestimulantes (figura 2, sinal 2) e de liberação de citocinas polarizadoras de resposta (figura 2, sinal 3A/B). Uma vez induzida, a primeira fase da resposta é a de expansão clonal dos linfócitos efetores e subsequente ativação dos mecanismos de eliminação de patógenos (Figura 2) ou ação anti-inflamatória (GOLDRATH; BEVAN, 1999; SPRENT; SURH, 2002).

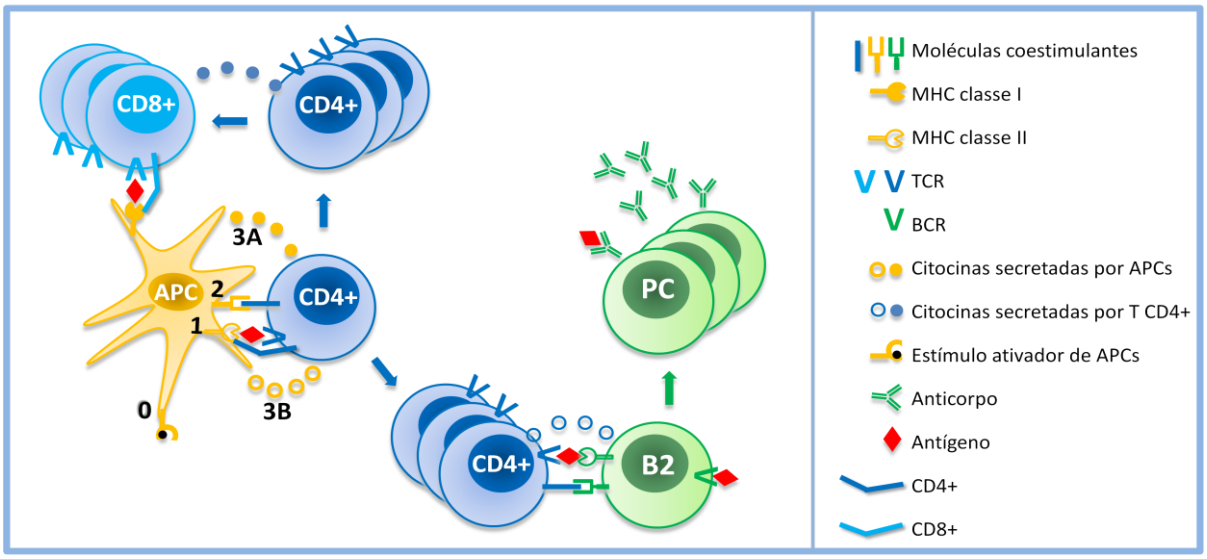

Figura 2 - Representação simplificada da indução de resposta imune adaptativa direcionada à eliminação de micro-organismos via linfócito T dependente

Sinal 0 = estímulo preferencial direto de PAMPs em APCs carregadas com antígeno, indireto por citocinas produzidas por outras células da imunidade inata e/ou por estimulação direta do inflamassoma NLPR3. Sinal 1 = apresentação de antígeno via MHC classe II para reconhecimento pelo linfócito T CD4+ via TCR. Sinal 2 = estímulo concomitante ao sinal 1 via ligação de moléculas coestimulantes. Sinal 3A/B = liberação de citocinas indutoras de fenótipo T CD4+ auxiliar, feita por APCs ou outras células do sistema inato. APCs ativadas podem apresentar antígeno via MHC classe I ao linfócito T CD8+, que pode ser coestimulado por T CD4+ auxiliar ativado para sua ativação e expansão. Linfócitos B2 ativados apresentam antígenos via MHC classe II para linfócitos T CD4+ auxiliares ativadas, que por sua vez liberam citocinas indutoras de diferenciação da célula B em plasmócito (PC) e expansão clonal. Linfócitos B1 e MZB podem montar resposta contra polissacarídeos de forma independente de linfócito T, mas esse mecanismo não está elucidado claramente. (CLARK; KUPPER, 2005; FAGARASAN; HONJO, 2000; DE GREGORIO; D'ORO; WACK, 2009; GUY, 2007; KRIEG, 2007)

Na resposta adaptativa celular, os linfócitos T que expressam CD8 reconhecem MHC classe I das APCs ativadas e, ao serem estimulados, se transformam em citotóxicos (CTL) e eliminam células infectadas (que expressam o mesmo antígeno e tipo de MHC). Já os linfócitos T CD4+ reconhecem antígenos ligados a MHC classe II das APCs e a dinâmica desta ligação, aliada às citocinas liberadas pela APC e a estímulos por PAMPs, direciona sua polarização e expansão clonal (GROSCURTH; FILGUEIRA, 1998; ROY 2003). Os subtipos de T CD4+ resultantes (tabela1) podem ter caráter citotóxico (análogo a CTL), regulatório/anti-inflamatório (Treg) ou auxiliar da resposta subsequente (Th), sendo que o subtipo expresso pode inibir a polarização para outros subtipos (APPAY, 2004). Os linfócitos auxiliares ativados secretam citocinas moduladoras de T CD8+ na imunidade celular, em principal o subtipo Th1, estimulando diferenciação e expansão clonal. Th1, Th2, Th17 e Tfh estimulam linfócitos B que apresentam o antígeno por MHC classe II. Os linfócitos B ativados se diferenciam em plasmócitos, secretando anticorpos de classes variadas e influenciadas pelo tipo de linfócito T que auxiliou esta resposta. Os anticorpos secretados nessa fase circulam por tempos variáveis, fornecendo imunidade passiva.

Tabela 1 - Subtipos de linfócito T CD4 auxiliar: citocinas indutoras e produzidas

Citocinas polarizadoras (DEENICK et al., 2011; FAZILLEAU et al., 2009)	**Subtipo gerado**	**Principais citocinas produzidas pelo subtipo** (O'SHEA; PAUL, 2010)	**Principais funções dos subtipos** (DEENICK et al., 2011)
IL-12/IFN-γ	Th1	IFN- γ	Imunidade viral/microbiana, inflamação e mediador de resposta celular
IL-4/ IL2/IL-33	Th2	IL-4/IL-13	Imunidade contra parasitas extracelulares e resposta alergênica
IL-6/TGF-β/IL-23	Th17	IL17a/IL17f/IL22	Imunidade de mucosa e inflamação
IL-6/IL-21	Tfh	IL-21/IL4	Ativação e diferenciação de linfócitos B
IL-2/TGF-β	Treg	IL-10/IL-35/TGF- β	Regulação e indução de tolerância

OBS: As células T CD4+ citotóxicas, assim como Th9 e Th22, não estão na tabela porque as suas funções e estímulos ainda estão sendo esclarecidos. Th = T auxiliar. Thf = T auxiliar folicular. Treg= T regulador. IL= Interleucina.TGF = Fator de transformação de crescimento. IFN = Interferon.

A segunda fase da resposta é a de contração, em que a maioria dos linfócitos T e B ativados entram em apoptose. A terceira e última fase da resposta primária é a de manutenção da memória imunológica, em que linfócitos T e B efetores remanescentes se transformam em células de memória. Essas células vigiam o organismo recirculando pelo

sistema circulatório, ou ainda sendo endereçadas a tecidos específicos do organismo. No momento em que as células de memória encontram o antígeno pelo qual foram maturadas, inicia-se a quarta fase (resposta secundária), com consequente reexpansão clonal (GOLDRATH; BEVAN, 1999; SPRENT; SURH, 2002).

1.1.3 INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA NA MUCOSA NASAL

As vias respiratórias são compostas principalmente de células epiteliais justapostas por proteínas adesivas, cobertas por uma camada de muco, que impedem a passagem de moléculas acima de aproximadamente 40 kDa (JAHNSEN et al., 2006). Abaixo da camada epitelial se encontram células dendríticas (DCs), capazes de estender prolongamentos entre as justaposições para constante vigília, sem comprometer a barreira (JAHNSEN et al., 2006).

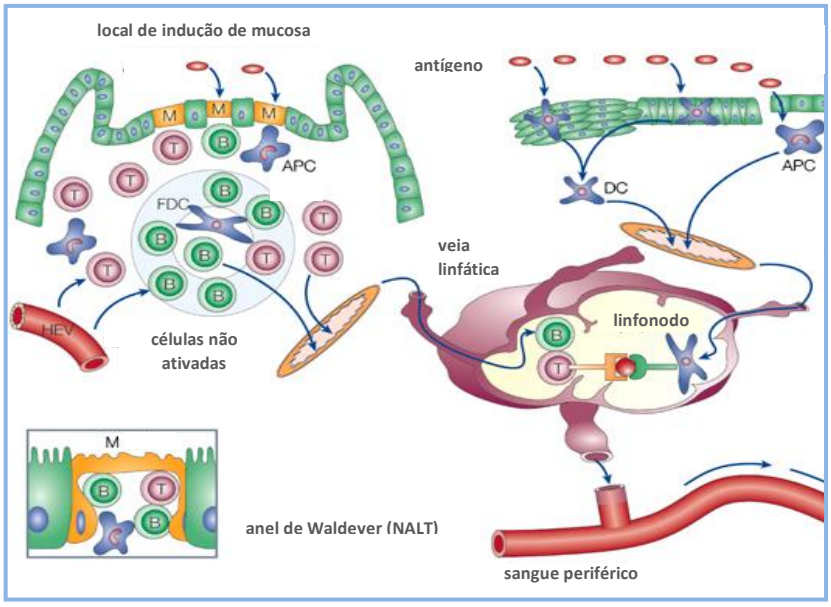

Figura 3 - Indução de resposta imune adaptativa na mucosa nasal
B= linfócito B. T= linfócito T. DC= célula dendrítica. APC= célula apresentadora de antígeno. FDC= célula dendrítica folicular. M= células M. NALT= Tecido Linfoide Associado à mucosa Nasal. HEV= Vênulas Endoteliais Altas. (BRANDTZAEG et al., 2008)

Ao encontrar antígenos, as APCs (em principal DCs) os capturam e migram aos linfonodos regionais, para apresentá-los aos linfócitos T que iniciam a resposta imune adaptativa (BRANDTZAEG et al., 2008). Apesar da habilidade de captura direta, as DCs capturam o antígeno principalmente pela mediação de células M (figura 3), localizadas entre

células epiteliais. Essas células servem como canais, transportando ativamente antígenos do lúmem ao NALT (Tecido Linfoide Associado à mucosa Nasal). Esse tecido especializado, contendo DCs e aglomerados de linfócitos, é constitutivo ou induzido mediante inflamação de acordo com a espécie do animal (DEBERTIN et al., 2003). Linfócitos B e T, ativados nos linfonodos ou folículos, migram para se integrar ao sangue periférico. As células endoteliais permitem o extravasamento das células ativadas para resposta local, enquanto a permanência dessas no sangue leva a respostas sistêmicas (BRANDTZAEG et al., 2008).

1.1.4 EPITÉLIO COMO MODULADOR DA IMUNIDADE INDUZIDA PELA MUCOSA NASAL

O epitélio é capaz de reconhecer micro-organismos por vários receptores, inclusive os receptores similares a Toll (TLRs), além de formar a barreira física. O reconhecimento pode resultar em produção de antimicrobianos liberados no lúmem respiratório, como a induzida por ativação de TLR2 (BIRCHLER et al., 2001). Ações indiretas também derivam de ativação de receptores, como liberação de citocinas e quimiocinas que podem recrutar fagócitos e linfócitos (BALS; HIEMSTRA, 2004). Células epiteliais respiratórias humanas favorecem ambiente anti-inflamatório pela produção de TGF-β para manutenção da homeostase. Porém, quando estimuladas para o perfil inflamatório ativam DCs (MAYER et al., 2008). As células epiteliais respiratórias podem maturar DCs através de citocinas (REGAMEY et al., 2007), que em conjunto com o efeito quimiotático contribuem para uma resposta adaptativa mais eficiente na mucosa respiratória.

A interleucina-8 (IL-8) é um dos marcadores principais da ativação epitelial para perfil inflamatório e recruta diversas células, inclusive as dendríticas (FEIJOÓ et al., 2005), mas o recrutamento de APCs por IL-8 ainda não foi estudado na mucosa respiratória. Esta mesma citocina é induzida em fibras musculares pelos sais de alumínio, como um dos mecanismos de adjuvanticidade (DE GREGORIO; D'ORO; WACK, 2009). A IL-8 pode ser estimulada por porinas via TLR2 em células epiteliais, como descoberto e demonstrado nesta tese, o que pode favorecer a resposta imune protetora contra meningococos (que produzem porina). O favorecimento provavelmente se estende à resposta contra outros microorganismos ou antígenos combinados as porinas imunomoduladoras. Em relação à ativação por TLR2,

células epiteliais expressam baixa quantidade deste receptor (HOMMA et al., 2004), geralmente aumentada quando em presença de patógenos ou interleucinas produzidas em resposta aos mesmos (SHA et al., 2004).

1.2 TLR2 COMO IMPORTANTE RECEPTOR DO SISTEMA IMUNE

O grupo TLR, pertencente aos PRRs, tem sequência proteica muito similar entre si e é expresso em uma grande variedade de células e de animais (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Até o momento, 13 TLRs foram identificados, sendo que os primeiros 10 estão presentes no genoma humano, enquanto o DNA do camundongo não contém somente o gene funcional para TLR10 (BEUTLER, 2009). O reconhecimento das PAMPs pelos TLRs inicia uma cascata de eventos ativadores do sistema imune atacado para combater a ameaça (WEST; KOBLANSKY; GHOSH, 2006). Apesar de ter sido recentemente identificado em humanos (MEDZHITOV; PRESTONHURLBURT; JANEWAY, 1997), a resposta imune mediada por receptores Toll representa uma forma de defesa ancestral (LEULIER; LEMAITRE, 2008).

Extensivas pesquisas apontam TLR2 como um receptor crucial na resposta imune dos vertebrados, por diversas razões. Por exemplo, TLR2 é o único TLR descrito que forma heterodímeros funcionais com mais de um tipo de TLR, além de interagir com uma grande variedade de moléculas assessórias. A gama de parcerias faz com que esse seja o TLR de maior abrangência no reconhecimento de PAMPs, tanto molecular quanto microbiana (ZÄHRINGER et al., 2008). Além disso, a expressão de TLR2 ocorre em praticamente todas as células envolvidas na resposta imune, ativando-as de forma diferenciada de acordo com as moléculas assessórias expressas, o ligante envolvido e outros fatores ainda não elucidados claramente (FLO et al., 2001), o que reforça o grande potencial do receptor como alvo de imunomodulação.

1.2.1 ESTRUTURA E ENGAJAMENTO EXTRACELULAR DE TLR2

TLRs são glicoproteínas transmembrana integrais do tipo I, que contêm domínio intracelular homólogo (TIR, porção do receptor Toll homóloga a do receptor para IL-1), domínio transmembrana em forma de hélice e ectodomínio em forma solenoide (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). O ectodomínio é composto de 16 a 28 módulos ricos em leucina (LRRs) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006), permitindo a divisão de TLRs em seis subfamílias de acordo com o perfil de LRRs.

O reconhecimento por TLR2 se faz principalmente por heterodimerização entre sua subfamília, sendo que TLR2/TLR1 e TLR2/TLR6 são descritos como pré-formados e necessários ao reconhecimento de praticamente todos os ligantes de TLR2 descritos. Os dímeros pré-formados se mantêm por interação dos ectodomínios, mas não têm interação intracelular e subsequente sinalização sem a conexão do ligante com o complexo (JIN; LEE, 2008). Homodimerização TLR2/TLR2 foi sugerida como existente, mas ainda não comprovada (JIN et al., 2007), enquanto o dímero pré-formado TLR2/TLR10 foi detectado, mas sua função ainda não foi esclarecida (GUAN et al., 2010). Moléculas assessórias foram descritas com a função de concentrar ligantes na superfície celular ou em fagossomos, disponibilizando-os aos dímeros de TLR. Em muitos casos, a ação é essencial para uma ativação de TLR2 que resulte em imunomodulação. Sendo assim, proteínas ancoradas em microdomínios da membrana celular, chamados “lipid rafts”, podem complexar com o ligante e o dímero de TLR2 respectivo, causando ativação e posterior internalização desse complexo. O grupo assessório é formado por CD36 (JIMENEZ-DALMARONI et al., 2009), CD14 (TRIANTAFILOU et al., 2006), RP 105 (BLUMENTHAL et al., 2009) e GD1a (LIANG et al., 2007). Moléculas solúveis também concentram ligantes, como lecitina ligante de manose (MBL) (IP et al., 2008) e a vitronectina, sendo que a última se liga ao receptor de integrina β3 nos “lipid rafts”(GEROLD et al., 2008).

Os ligantes de TLR2 são os mais variados entre os de TLRs, incluindo moléculas com acilgliceróis, proteínas e polissacarídeos que são expressos por vírus, parasitas, bactérias e fungos. Ligantes endógenos também foram descritos, agindo como “alarminas” liberadas frente a danos teciduais, necrose ou por células tumorais, como fragmentos de matriz extracelular ou proteínas de choque térmico (CURTIN et al., 2009; SCHEIBNER et al., 2006).

1.2.2 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ATIVADA POR TLR2

Ao ser estimulado pelo ligante, dímeros de TLR2 iniciam a cascata de sinalização por recrutamento do adaptador MyD88, assim como os outros TLRs, exceto TLR3 (figura 4). Essa via transloca o fator nuclear κB (NF-κB) para o núcleo e modula genes de transcrição para produção de citocinas. A mesma via pode ativar quinases específicas para serina/treonina (MAPKs), que podem influenciar tanto a transcrição de genes de citocinas, quanto a estabilidade dos RNAs mensageiros transcritos (WATTERS; KENNY; O'NEILL, 2007).

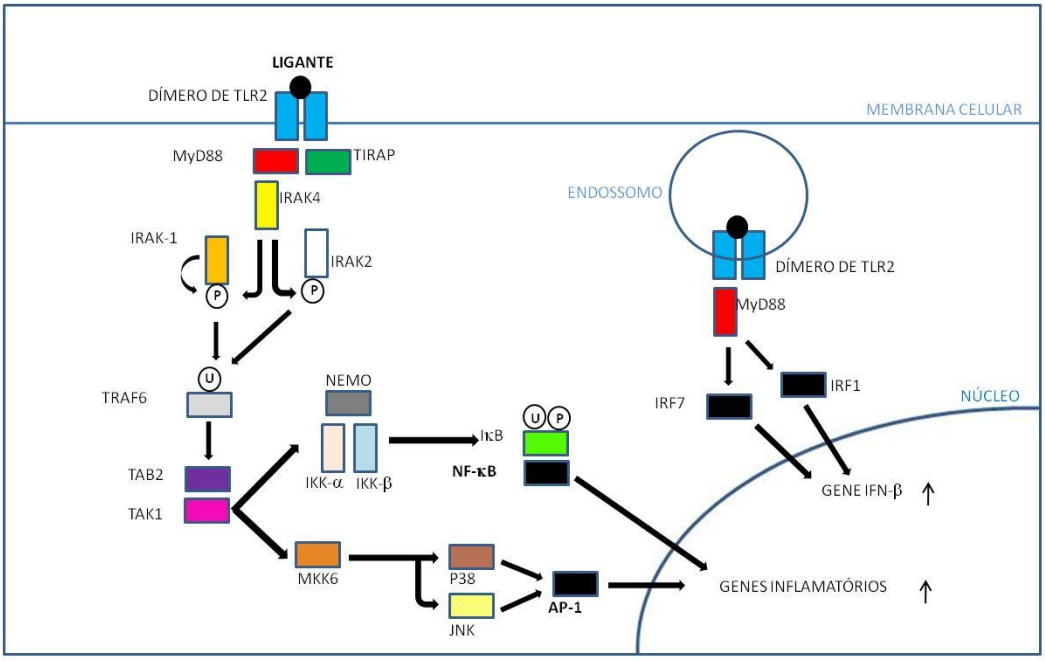

Figura 4 - Sinalização intracelular ativada por TLR2

Após ligação e rearranjo do dímero de TLR2, seu domínio TIR se conecta ao domínio homólogo da proteína TIRAP, resultando no recrutamento de MyD88. IRAKs são então recrutadas e IRAK 4 fosforila (P) IRAK1, que por sua vez se auto fosforila. IRAK1 fosforilada se dissocia do complexo e ativa TRAF6. Como IRAK 1 é rapidamente degradada, IRAK2 posteriormente mantém ativação de TRAF6. TRAF6 ubiquitinado (U) ativa a sequência TAB2 - TAK1 – complexo IKK. IkB fosforilado e ubiquitinado pelo complexo IKK causa sua degradação e consequente liberação de NF-kB, translocado ao núcleo para aumentar a expressão de genes. TAK1 também ativa MKK6 para ativação subsequente de JNK e p38, levando ao final a ativação de AP-1, responsável pela produção de citocinas inflamatórias. Em via alternativa a ser elucidado, o complexo de TLR2 internalizado e ativado por ligante viral resulta em ativação de IRF7/1 e subsequente aumento da expressão de IFN-β. MyD88 = Fator 88 de diferenciação mieloide. TIRAP = Proteína adaptadora de TIR. IRAK = Receptor de IL-1 associado à quinase. TRAF = fator associado ao receptor de TNF. TAK = quinase ativada por fator de crescimento β. TAB = proteína ligante de TAK1. MKK /JNK / P38 = MAP quinases. NEMO / IKK = complexo de quinases. IkB = proteína inibidora. AP = Proteína Ativadora. IRF = Fator Regulador de Interferon.

Recentemente foi descrita nova via de ativação por TLR2, também dependente de MyD88, resultando na produção de interferon β (IFN-β) (figura 4). Sabe-se que a cascata de sinalização descoberta requer internalização nos endossomos e ativação dos genes

reguladores de interferon IRF1/7 (DIETRICH et al., 2010). Vários componentes desta cascata podem ser degradados ou coativados por outras vias, o que pode intensificar ou interromper a resposta iniciada pelo TLR2 ativado.

O papel do TLR2 na imunidade e infecção microbiológica está detalhado em review, elaborado no percurso desta tese, e submetido à publicação (ANEXO A).

1.3 IMUNOMODULAÇÃO APLICADA A VACINOLOGIA

1.3.1 ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS – FOCO EM ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL

Adjuvantes imunológicos são moléculas ou complexos moleculares que possibilitam ou incrementam a potência e memória de uma resposta imune, sendo parte essencial à eficácia das vacinas. Essa propriedade pode permitir a redução da dose antigênica de uma potencial vacina ou do número de imunizações necessárias para uma imunidade protetora, além de propiciar proteção a grupos de imunidade pouco desenvolvida ou deficitária, como recém-nascidos, idosos ou pessoas imunologicamente comprometidas (CHEN et al., 2010). Os adjuvantes podem fazer parte do micro-organismo, como em vacinas com cepas inteiras atenuadas ou inativadas, ou ainda serem adicionadas à formulação, como nas vacinas constituídas apenas de antígenos (vacinas de subunidade) (WACK; RAPPUOLI, RINO, 2005).

A natureza química e a origem destes imunomoduladores são variadas, atuando no sistema imune como fornecedor antigênico, como as emulsões, ou imunoestimulante, como os TLRs. Uma formulação vacinal pode apresentar ambas as características por ter um adjuvante que as atenda ou por uma combinação destes. No fornecimento antigênico, o adjuvante preserva o antígeno da degradação, carregando-o até a célula alvo e liberando-o lentamente para aumentar a eficiência de sua captura e processamento. A função imunoestimulante direta tem como principal alvo as APCs, seguidas dos linfócitos. No caso das APCs, os adjuvantes podem aumentar a expressão de moléculas coestimulantes, a liberação de citocinas polarizadoras ou ainda fornecer o sinal primordial para ativação destas células (MARCIANI, 2003). Quando a intervenção se concentra nos linfócitos, soma-se às

ações acima a influência na polarização dos linfócitos auxiliares e consequente direcionamento da resposta, além do estímulo de expansão clonal dos linfócitos pré-ativados em geral. No caso do linfócito B, pode haver ainda a troca de classes de anticorpos produzidos ou seus subtipos (KRIEG, 2007). Os compostos de alumínio, por exemplo, atuam diretamente nas APCs e direcionam a resposta subsequente para Th2, com produção de IgG1 e IgE. A função imunoestimulante também pode ser indireta, como ocorre com compostos de alumínio que causam necrose celular no local da imunização e decorrente extravasamento de DNA, molécula endógena estimulante das células imunes, resultando em polarização para Tfh e IgG1 / Th2 e IgE (MARICHAL et al., 2011). Os sais de alumínio, porém, não induzem imunidade celular satisfatória, não sendo indicados para vacinas em que esse tipo de resposta é primordial (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Os compostos de alumínio são os adjuvantes mais usados e os únicos aprovados para uso geral em vacinas humanas, enquanto MF59 (emulsão de esqualeno) e AS04 (sal de alumínio com monofosforil lipídio A - MPLA) foram aprovados somente como componentes de vacinas específicas (PETROVSKY et al., 2007).

As características da resposta imunológica também estão diretamente ligadas à via de administração de vacinas, que em humanos são usadas predominantemente a subcutânea e a intramuscular, seguida da oral e da intradérmica. Em relação às vacinas por via intranasal, apenas Flumist® (gripe sazonal) e equivalente para gripe H1N1 são aprovadas para uso humano, constituídas de vírus da gripe atenuado. A via nasal tem se mostrado uma alternativa vantajosa à tradicional vacinação parenteral, capaz de estimular respostas locais e sistêmicas, mas pouco explorada. Esta via não invasiva contorna a necessidade de injeções, prática de risco responsável por 40% da incidência de hepatite C mundial em 2004, entre outras doenças transmissíveis, e aumenta a adesão da população a vacinação (HAURI; ARMSTRONG; HUTIN, 2004). Além disso, é considerada a via mucosa mais imunogênica, a frente da oral e vaginal (CLARK et al., 2010; DI TOMMASO et al., 1996).

Atualmente, um fator limitante para o uso da via intranasal é a falta de adjuvantes adequados (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). Essa lacuna representa um dos motivos pelo qual as vacinas aplicadas por via mucosa e aprovadas para uso humano são constituídas de cepas atenuadas ou inativadas, e não de subunidades (CHEN et al., 2010). A toxina colérica é até hoje um dos melhores adjuvantes de mucosa testados, seguido da toxina lábil termicamente de *E. coli,* e sua ação se dá sobre as APCs, desencadeando resposta Th2/Th17 (DATTA et al.,

2010). No entanto, estas proteínas apresentam toxicidade significativa em humanos, direcionando pesquisas atuais em modificações moleculares para manter adjuvanticidade sem toxicidade, ainda sem um protótipo ideal (GUY, 2007). A subunidade b da toxina colérica foi levantada como umas das alternativas, sem apresentar a toxicidade da proteína inteira e incitando IgA de mucosa e IgG por interação com APCs (SCHNITZLER; BURKE; WETZLER, 2007; WU; RUSSELL, 1998). Uma das classes de adjuvantes de mucosa mais promissoras é a de oligodesoxinucleotídeos contendo CpG (CPG ODN), presente em diferentes vacinas em fase de estudo clínico. Ligantes de TLR9, induzem, por esse receptor, resposta Th1, interagindo principalmente com células dendríticas (STEINHAGEN et al., 2011).

O presente estudo propõe a utilização de porinas, ligantes de TLR2, como adjuvantes parenterais e de mucosa em vacinas bacterianas e virais. Atualmente, o extrato de proteínas de membrana meningocócicas (contendo porinas) é utilizado conjugado a polissacarídeos de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), em vacinas comerciais de Hib. Essas vacinas induzem secreção de citocinas IL-6 e TNF-α por engajamento de TLR2, sendo o receptor crucial para a alta imunogenicidade da vacina (LATZ et al., 2004). Outros adjuvantes direcionados à ativação de TLR2 já foram utilizados em vacinas experimentais, como contra o vírus herpes tipo 2, em que a indução local e sistêmica de linfócitos T CD8(+) protegeram contra o desafio viral (ZHANG et al., 2008). Lipopeptídeos ligantes de TLR2 demonstraram ser seguros e eficazes com adjuvantes em testes clínicos até então (STEINHAGEN et al., 2011).

1.3.2 PORINAS LIGANTES DE TLR2 COMO IMUNOMODULADORAS

As porinas bacterianas constituem uma família proteica presente em bactérias gram-negativas. Quando em forma nativa trimérica, estas moléculas formam canais aquosos transmembrana dependentes de voltagem, que por sua vez permitem difusão pela camada bilipídica de pequenos metabólitos, essenciais à sobrevivência do organismo (QI; TAI; BLAKE, M S, 1994). Estas proteínas têm monômeros de aproximadamente 35 kDa e estrutura secundária com alto teor de folhas beta antiparalelas, modelando a estrutura terciária em forma de barril beta (figura 5)(MASSARI et al., 2003).

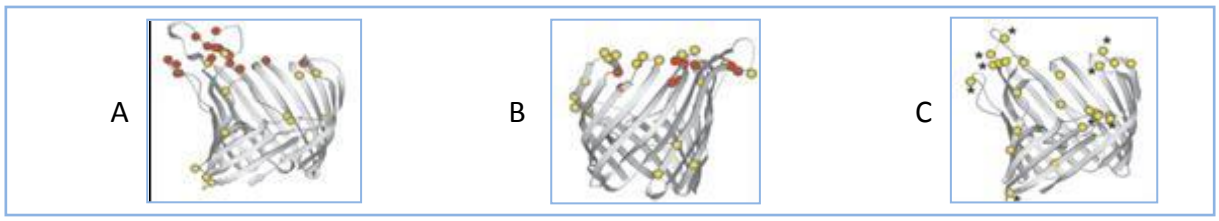

Figura 5 - Diagrama de fitas ilustrando monômeros de porinas do gênero Neisseria

A – Porina B2 meningocócica. B - Porina B3 meningocócica. C – Porina lactâmica. Os círculos coloridos representam as voltas (loops) expostas de maior variabilidade estrutural proteica, provavelmente por seleção imune em sua evolução. Os vermelhos são de alta variabilidade, os amarelos de média variabilidade e os asteriscos são regiões de predição de variabilidade (BENNETT et al., 2008).

As porinas do gênero Neisseria apresentam alta homologia estrutural entre si, sendo a classe proteica mais abundante na membrana externa dessas bactérias (BENNETT et al., 2008). Quando proveniente dos patógenos deste gênero (gonococo - *Neisseria gonorrhoeae* e meningococo – *Neisseria meningitidis)*, as porinas são capazes de se translocar do micro-organismo e se inserir em membranas celulares humanas, causando uma mudança temporária do potencial de membrana e interferindo na sinalização celular (BJERKNES et al., 1995). A interferência é relacionada a três resíduos de lisina conservados, que funcionam como ligante de guanosina trifosfato (GTP) regulando a função do poro. Esse mesmo ligante também é encontrado nas porinas das espécies comensais *Neisseria lactamica* e *polysaccharea*, as quais são altamente homólogas às porinas B dos patógenos (DERRICK et al., 1999). Apesar da alta homologia entre essas porinas, as regiões de variabilidade podem resultar em diferente indução do sistema imune e estar envolvidas na relação de patogenicidade. A colonização das vias respiratórias superiores pela espécie lactâmica protege animais desafiados com o meningococo e é relacionada à proteção cruzada ao meningococo em crianças (LI, YANWEN et al., 2006), sendo que a porina pode estar envolvida nesse reconhecimento cruzado (TRONCOSO et al., 2002).

O estudo da classe porina inicialmente como antígeno vacinal mostrou sua imunogenicidade e ação moduladora do sistema imune, motivando novos estudos de função adjuvante. Quando a porina é administrada conjugada a polissacarídeos, induz resposta imune dependente de linfócito T, mais duradoura e robusta que a T independente elicitada por polissacarídios sem adjuvantes. Esse resultado se dá principalmente pela ação mitogênica das porinas sobre os linfócitos B, induzindo maior produção de anticorpos e de moléculas coestimulantes de linfócitos T (MACKINNON et al., 1999).

A porina B, da bactéria patogênica *Neisseria Meningitidis* (*Nme* PorB), ativa tanto linfócitos B quanto as apresentadoras de antígeno (APCs), sendo a imunomodulação em APCs mediada por aumento da expressão da molécula coestimulante B7-2 (CD86) (MASSARI; RAM; MACLEOD; et al., 2003h). Para esse efeito, a porina interage com o heterodímero de TLR2/TLR1 e, dependente de MyD88, ativa NF-κB (MASSARI et al., 2002; MASSARI et al., 2006). Apesar de não terem sido descritas moléculas assessórias para esse complexo, a molécula GD1a pode estar envolvida, por ser assessória do complexo de mesmo heterodímero com a enterotoxina de *E. coli* tipo II, uma proteína formadora de poros oligomérica como as porinas (LIANG et al., 2007). A *Nme* PorB também pode interagir com o sistema imune independente de TLR2, como quando interage com elementos da cascata de complementos ou insere-se na mitocôndria das células de defesa. A inserção impede a despolarização mitocondrial e subsequente liberação de fatores pró-apoptóticos, o que inibe a apoptose e pode prolongar a resposta das células ativadas (MASSARI et al., 2010).

A similaridade das porinas meningocócica e lactâmica, aliada ao fato da lactâmica provir de micro-organismo não patogênico, incitou a aplicação da última como adjuvante. Utilizando como modelo a proteína ovalbumina, a adição *Nlac* PorB resultou em alta produção de anticorpos, indução de linfócitos específicos ao antígeno e resposta mista das subpopulações de linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1/Th2). A modulação se apresentou similar a *Nme* PorB, e também dependente de TLR2 (LIU; WETZLER; MASSARI, 2008).

1.3.3 FT-LPS COMO ANTÍGENO MODELO PARA ESTUDOS DE ADJUVANTES

Francisella tularensis é uma bactéria gram negativa intracelular facultativa, responsável por causar pneumonia severa, denominada tularemia. Apesar da taxa de incidência mundial da doença ser baixa, não há vacina licenciada para humanos. Sua alta virulência e fácil disseminação por aerossol a coloca como potencial arma biológica (OYSTON; SJOSTEDT; TITBALL, 2004). A cepa vacinal viva (LVS) de *F. tularensis,* derivada de cepa virulenta do tipo B, foi usada para vacinação humana, posteriormente suspendida pela falta de dados sobre o mecanismo de atenuação (OYSTON; QUARRY, 2005).

Uma das alternativas para substituir os micro-organismos atenuados são as vacinas de subunidade. Aliadas à via intranasal, podem produzir uma melhor proteção da mucosa de maneira mais segura e efetiva. A molécula de maior potencial antigênico seguro é o lipopolissacarídeo desta bactéria (Ft-LPS), mas este foi basicamente estudado por vias parenterais, causando proteção mínima contra desafio com cepas virulentas do Tipo B (CONLAN et al., 2002, 2003). Ft-LPS não tem ação imunomoduladora conhecida por apresentar mutação na porção do lipídio 2, além de ser pouco imunogênico. Foi demonstrado que Ft-LPS combinado a *Nme* PorB, por via subcutânea, protegeu 70% dos animais contra desafio subcutâneo com LVS (CHIAVOLINI et al., 2008). Diversas proteínas provenientes dessa bactéria também foram testadas como antígenos, mas conferiram pouca proteção (GOLOVLIOV et al., 1995; HARTLEY et al., 2004).

Em relação à imunização intranasal, estudo com a subunidade b da toxina colérica foi utilizada com LVS inativado, conferindo média proteção (em torno de 50%) (BITSAKTSIS et al., 2009), mas não há relatos do uso dessa via com vacinas de subunidade.

1.3.4 UTILIZAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA COMO ANTÍGENO PRÁTICO

1.3.4.1 Vírus da raiva: infecção e imunidade

Raiva é uma encefalite viral desenvolvida principalmente em mamíferos, geralmente transmitida por mordeduras, lambeduras ou arranhaduras de animais infectados. O vírus neurotrópico se encontra na saliva destes animais, infectando o novo hospedeiro quando há lesão de pele ou mucosa permitindo sua entrada. Transmissões mais raras se dão por aerossóis em cavernas ou em transplantes de órgãos. Animais silvestres são reservatórios naturais virais, enquanto o cão, seguido do gato, é o reservatório e maior transmissor no ambiente urbano (JOHNSON; CUNNINGHAM; FOOKS, 2010).

O vírus da raiva é envelopado, constituído de RNA de fita simples com polaridade negativa. Seu genoma codifica para cinco diferentes tipos de proteína: nucleoproteína, polimerase, fosfoproteína, glicoproteína e proteína de matriz (Figura 6).

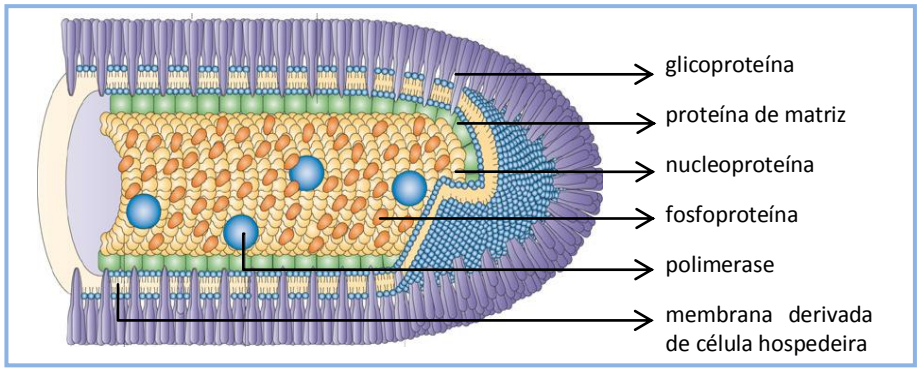

Figura 6 - Representação esquemática do vírion da raiva (SCHNELL et al., 2010)

O RNA viral se encontra encapsulado pela nucleoproteína, formando a ribonucleoproteína, que serve de molde para replicação e transcrição do RNA. Em conjunto com a fosfoproteína e polimerase formam o capsídeo. A proteína de matriz condensa esse capsídeo e ancora as glicoproteínas triméricas, entremeadas pela membrana da célula hospedeira anterior. Vírion = partícula completa infectante.

No âmbito celular, o vírion é internalizado pela célula hospedeira e tem a membrana anterior mesclada com a nova que o envolve. Em seguida, com ajuda de TLR3 do hospedeiro, são formados os agregados proteicos citosólicos chamados Corpúsculos de Negri. Nessas estruturas ocorre a transcrição, na qual o complexo polimerase-fosfoproteína realiza os passos enzimáticos, seguida da replicação. As proteínas são posteriormente sintetizadas e encapsulam o RNA replicado, formando um novo vírus, que se funde com a membrana celular hospedeira e inicia novo ciclo de infecção (MÉNAGER et al., 2009; RAUX; FLAMAND; BLONDEL, 2000; SCHNELL et al., 2010). Há evidências de que o vírus neurotrópico infecta células de origem neural utilizando os receptores de nicotina e acetilcolina, receptores de fator de crescimento de nervo de baixa afinidade, ou ainda moléculas de adesão de células neurais. No entanto, nenhum receptor foi identificado até o momento como essencial à infecção intracelular. Células não neurais são invadidas utilizando receptores ainda não identificados (MOORE; HANLON, 2010; SCHNELL et al., 2010).

A patogenicidade do vírus da raiva é diretamente relacionada com sua infectividade celular, mas inversamente proporcional à replicação viral e à taxa de expressão da glicoproteína. Esta proteína facilita a entrada do vírus nas células e sua disseminação intercelular, mas é também a mais imunogênica, o que facilita o reconhecimento pelo sistema imune e pode diminuir a patogenicidade (DIETZSCHOLD et al., 2008).

No âmbito sistêmico, o vírus invasor pode infectar nervos periféricos, que por transporte axonal retrógrado levam o agente infeccioso até os gânglios das raízes dorsais, momento em que a replicação viral passa a ser detectável. Esse estágio pode levar dias em

modelos murinos, mas em humanos pode levar semanas, meses ou até anos. Alguns autores relatam a possibilidade de que o vírus replique em baixa taxa no tecido muscular do local de entrada, ou entre em latência (HOOPER et al., 2009; JOHNSON; CUNNINGHAM; FOOKS, 2010).

No sistema nervoso central (SNC), o vírus neurotrópico infecta neurônios e leva a três quadros infecciosos possíveis: (1) ausência da resposta imune antiviral devido à integridade da barreira hemato-encefálica resultando em infecção letal; (2) células imunes efetoras atravessam essa barreira e mediam a resposta imune antiviral, com consequente quadro inflamatório exacerbado e imunopatologia, contribuindo com a doença; (3) células efetoras cruzam a barreira e eliminam o vírus do SNC sem danos significativos ao tecido (caso este extremamente raro em humanos). Como indivíduos que sucumbem à raiva apresentam baixa inflamação no SNC e barreira hematoencefálica intacta, o primeiro quadro é o mais provável em humanos (HOOPER et al., 2009; MÉNAGER et al., 2009). De acordo com essa observação, infecção com cepas não patogênicas causa maior ativação de NF-κB e consequente inflamação do que com cepas patogênicas (DIETZSCHOLD et al., 2008). O reconhecimento pelo receptor ativador de resposta antimicrobiana RIG também é bloqueado pelo vírus (MASATANI et al., 2010). Além desses mecanismos anti-inflamatórios, a fosfoproteína viral se liga ao transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT 1) que induz transcrição de IFN, impedindo a ação antiviral desencadeada por esta citocina (ITO et al., 2010).

Os mecanismos de reconhecimento imune e invasão viral descritos carecem de interligações e complementações para prover um quadro completo da resposta imune na infecção, enquanto novas pesquisas estão em andamento e provavelmente fornecerão mais peças a esse quebra-cabeça.

1.3.4.2 Vacinação de raiva

Apesar da disponibilidade de vacinas efetivas, a raiva ainda é um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento e mata por volta de 55 mil pessoas por ano, especialmente na África e Ásia. Para pré-exposição são recomendadas três doses e para pós-

exposição viral são indicadas cinco doses. No caso de exposição severa, há ainda a administração de imunoglobulinas antivírus da raiva de alto custo ou soros hiperimunizados heterólogos (DACHEUX; DELMAS; BOURHY, 2011; ERTL, 2009). A quantidade de doses necessárias à proteção diminui a adesão da população, além de ser um esquema dispendioso. O Comitê consultivo em Práticas de Imunizações Americano (ACIP) recomenda a exclusão da quinta dose para vacinação pós-exposição, alegando não haver evidências que comprovem o benefício adicional. Estima-se que essa medida propicie uma economia de 16,6 milhões de dólares nos Estados Unidos (MITKA, 2010).

As vacinas de raiva experimentais e comerciais atuais se baseiam em uma variedade de técnicas, desde os tradicionais vírus atenuados até formulações com glicoproteínas, DNA e vetores virais recombinantes (ERTL, 2009). No Brasil, as vacinas comerciais são constituídas de vírus cultivados em linhagens de células de origem animal, sendo inativados com β-propriolactona e purificados. Alguns fabricantes, como o Instituto Butantan, adaptaram suas culturas celulares em meio livre de soro bovino (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004), o que diminui o risco de reações alérgicas e contaminantes trazidos por esse suplemento (KOZASA et al., 2011; OHMORI et al., 2007). Apenas vacinas de raiva brasileiras para animais contêm adjuvantes, que são compostos de alumínio e/ou saponina. O uso de compostos de alumínio em vacinas humanas não traz benefícios claros segundo os estudos, pois não se traduz em menor número de doses ou em maior tempo da proteção oferecida, que normalmente varia entre 3 e 4 anos (BERLIN, 1990; ERTL, 2009; LIN; PERRIN, 1999).

Nas pesquisas de novas vacinas destacam-se os vírus atenuados por mutação, nos quais genes cruciais foram excluídos e substituídos por um segundo gene codificador de glicoproteína, induzindo respostas imunes mais potentes e rápidas que as vacinas tradicionais em estudos pré-clínicos. Estas cepas mutantes são candidatas à substituição das atuais vacinas no esquema pós-exposição (ERTL, 2009). Em se tratando de novos adjuvantes, o CPG DNA induziu a produção mais intensa e rápida de anticorpos neutralizantes em relação à vacina tradicional, com consequente aumento de proteção dos camundongos quando desafiados com o vírus da raiva. Três doses da vacina com adjuvante de DNA induziram a mesma taxa de anticorpos neutralizantes que cinco doses da vacina com sal de alumínio. Porém, foi demonstrado que a ativação por TLR9 em camundongos resulta em maior secreção de IFN-γ, IL-12, TNF-α e IL-6 do que em humanos (WANG et al., 2008).

Considerando a rota de imunização, camundongos vacinados por via intramuscular e intraperitoneal com vírus inativado induziram maior título de anticorpos neutralizantes e melhor proteção, quando comparados à via subcutânea (WANG, et al., 2008). O protocolo comum em humanos é o de imunização intramuscular (pré-exposição: 0, 7 e 28 dias; pós exposição: 0, 3, 7, 14 e 28 dias). A Organização Mundial de Saúde (OMS) também recomenda doses intradérmicas, o que permite menor quantidade de vacina por dose e consequente redução de custos. Porém, a OMS não recomenda esta via para vacinas que contêm adjuvantes. Esquemas de imunização intradérmicos foram implantados com sucesso para pós-exposição à raiva em países em países asiáticos em desenvolvimento (RAHIM et al., 2010).

2 OBJETIVOS

A hipótese inicial desta tese foi a de que a porina da bactéria comensal *Neisseria lactamica* modularia a resposta imunológica de mucosa respiratória por indução da secreção de IL-8 em células epiteliais, e que essa modulação seria diferente da feita pela porina do patógeno *Neisseria meningitidis*, mas realizada pelo mesmo conjunto de receptores TLR2/TLR1. No caso de hipótese inicial confirmada, a imunomodulação de mucosa por *Neisseria lactamica* poderia se estender a células do sistema imune que expressam TLR2/TLR1, como ocorre com a meningocócica, e modular a resposta de um antígeno por essa via. A porina meningocócica recombinante, produzida em *Escherichia coli,* também seria testada por via intranasal como segunda opção de porina proveniente de microorganismo não patogênico, no caso da porina lactâmica apresentar resultados insatisfatórios.

Para testar as hipóteses levantadas, os seguintes objetivos foram realizados:

1) Avaliar as porinas extraídas de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica* como imunomoduladoras do sistema imune em mucosas, utilizando como modelo as células epiteliais respiratórias humanas imortalizadas, seu mecanismo de indução de IL-8 e produção desta citocina.

2) Aplicar as porinas imunomoduladoras nativas como adjuvantes por via intranasal em camundongos, utilizando como antígeno o lipopolissacarídio pouco imunogênico de *Francisella tularensis (*Ft-LPS). Avaliação do poder adjuvante das mesmas em relação ao título de anticorpos obtidos pela inoculação.

3) Avaliar a porina de melhor desempenho no objetivo anterior frente a adjuvantes experimentais de comprovada eficiência e mecanismos de ação diferenciados, sendo escolhidos QS-21, rCTB e ODN 1826.

4) Avaliar a porina de melhor desempenho no objetivo 2 como adjuvante do vírus da raiva inativado por via intranasal/subcutânea e comparação com ODN 1826, por meio da análise de anticorpos neutralizantes produzidos por camundongos imunizados, além da proliferação de linfócitos para mensurar a extensão da resposta celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 ADJUVANTES, ANTÍGENOS E LIGANTES DE TLR

A porina recombinante (rPorB), proveniente de *Escherichia coli* E. coli BL21(λDE3) ΔompA (QI; TAI; BLAKE, 1994), foi produzida e purificada pelo laboratório do Dr. Lee Wetzler (CHIAVOLINI, 2010), assim como a porina extraída de *Neisseria lactamica* (*Nlac* PorB) (LIU; WETZLER; MASSARI, 2008) e *Neisseria Meningitidis* (*Nme* PorB) (MASSARI et al., 2005). Os adjuvantes utilizados para comparação com a porina recombinante foram: *Quillaja saponaria* fração 21 (QS-21, Antigenics Inc), subunidade b da toxina colérica recombinante (rCTB, SBL Vaccin AB) e oligodeoxinucleotídeos sintéticos contendo dinucleotídeos de fosfato de citosina – guanosina (ODN 1826 – Invivogen).

O antígeno modelo utilizado foi a solução de lipopolissacarídeo (Ft-LPS) extraída de *Francisella tularensis* subespécie *holarctica* LVS (ATCC 29684) pelo laboratório de Dr. Wetzler (CHIAVOLINI et al., 2010), liofilizada e ressuspensa em água deionizada na concentração de 1 mg/ml. Como antígeno prático, foi utilizada suspensão de vírus da raiva inativado por β-propiolactona (instituto Butantan), obtido de células Vero cultivadas livre de soro fetal bovino (ATCC-CCL81) e infectadas com vírus fixo da cepa PV/RV/VERO Stock I (Institute Pasteur) (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004), contendo 8 UI/ml e 1mg de proteínas totais. A suspensão foi testada pelo instituto para vírus adsorventes, micoplasma, DNA residual, esterilidade e inativação de agentes adventícios, tendo sido aprovada em todos os testes.

Os ligantes de TLR utilizados *in vitro* foram lipoproteína sintética Pam3CSK4 (EMC Microcollections, Tubingen) e lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* purificado por extração com fenol (Sigma).

3.1.2 ANTICORPOS

Para bloqueio de TLR2 foi usado antiTLR2 humano proveniente do clone TL2.1 (antiTLR2 clone TL2.1), produzido e doado pelo doutor Egil Lien, da Universidade de Massachusetts (LIEN, E et al., 1999), e como controle de isotipo deste anticorpo empregou-se anticorpo de camundongo IgG2a k (eBiosciences). Para detecção de TLR2 por citometria de fluxo foi usado antiTLR2 clone TL2.1 conjugado a ficoeritrina (PE, eBiosciences). Para o teste de detecção de imunoglobulinas do soro foram usados o fragmento F(ab')2 do anticorpo de cabra anti-IgG ou IgM de camundongo (Jackson Laboratories), IgG ou IgM murina (Sigma) e anticorpo de cabra anti-IgG ou IgM de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma). Para detecção de Ft-LPS foi usado anticorpo monoclonal FB11 antiFt-LPS (ab2033, Abcam). Para o teste de RFFIT foi utilizado anticorpo antinucleoproteína do vírus da raiva conjugado a FITC (Biorad) e o padrão internacional da OMS de imunoglobulina humana anti-rábica de referência (NISBC) de 30 UI/ml. Para detecção de linfócitos em proliferação por citometria de fluxo foram usados anticorpos de rato da empresa BD: antiCD3 de camundongo marcado com APC-Cy7, antiCD4 de camundongo marcado com PerCP-Cy5.5 e antiCD8 de camundongo marcado com Pe-Cy7. Os anticorpos utilizados que não foram descritos nesta lista eram pertencentes aos kits completos de análise.

3.1.3 KITS E REAGENTES

Kit de detecção de IL-8 por ensaio imunoenzimático: Human IL-8 OptEIA ELISA set (BD). Kit de extração de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA): Rneasy MiniKit (Qiagen). Kit de transcrição reversa: Omniscript transcriptase reverse (Qiagen). Kit para PCR: Taq polymerase (qiagen). Kit para determinação de endotoxinas: Pyrotell 0,03 EU/ml (Associates of Cape Cod), utilizado com endotoxina padrão CSE 0,5 µg/vial (Associates of Cape Cod). Kit para determinação de proteínas Colloidal Gold reagent (Bio-Rad). Kit de detecção de proliferação celular Celltrace (Molecular Probes) diluente das soluções foi água deionizada, quando não especificada de forma diferente. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico, ou,

quando aplicável, testados para cultura celular. São apresentados neste estudo com o nome seguido de parênteses descrevendo o nome comercial ou sigla (quando aplicável) e fabricante, ao serem citados pela primeira vez. Quando não descritos os fabricantes, pertencem ao kit descrito no item em questão.

3.1.4 LINHAGENS CELULARES E VÍRUS

As linhagens utilizadas neste estudo foram células epiteliais bronquiais humanas imortalizadas por vírus e nomeadas BEAS-2B (ATCC CRL-9609), e células epiteliais nasofaríngeas humanas nomeadas Detroit 562 (ATTC CCL-138). Para o teste de neutralização de anticorpos virais da raiva será utilizada a linhagem de células de rim de camundongo neonato denominada BHK-21 (C-13, ATCC). A cepa padrão de vírus da raiva para desafio (CVS) utilizada foi a CVS11, produzida em BHK-21 (Instituto de Tecnologia do Paraná).

3.1.5 ANIMAIS

Para comparação de adjuvanticidade com o antígeno modelo Ft-LPS decidiu-se pela utilização de camundongos isogênicos C57BL/6J (The Jackson Laboratories), de quatro a cinco semanas de idade, fêmeas e com peso médio de 20 gramas. Os mesmos foram mantidos em sala descontaminada do biotério da Universidade de Boston, dentro de gaiolas microisoladoras estéreis com no máximo cinco camundongos por unidade. Para comparação de adjuvanticidade, utilizando a suspensão viral inativada, decidiu-se pela utilização de camundongos isogênicos Balb C (Instituto Butantan), de quatro a cinco semanas de idade, peso médio de 15 gramas e machos. A mudança da linhagem isogênica e sexo do animal deu-se pela larga experiência do Butantan com o segundo perfil nos testes experimentais de raiva. Os mesmos serão mantidos em sala descontaminada do infectório do Instituto Butantan, dentro de gaiolas pré-esterilizadas com no máximo cinco camundongos por unidade. As gaiolas em ambos os casos foram higienizadas duas vezes por semana, com água

estéril e ração balanceada consumidos a vontade e todos os procedimentos envolvendo os animais realizados em capela de fluxo laminar. Ao final do experimento os camundongos foram abatidos em câmara de dióxido de carbono (CO_2). Todos os experimentos foram realizados após aprovação das comissões de ética da Universidade de Boston ou da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (ANEXO D).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 CONTROLE DE QUALIDADE DAS PORINAS

3.2.1.1 Avaliação qualitativa por eletroforese

Para avaliação qualitativa foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras foram preparadas em água deionizada com 1 µg de cada porina e solução tampão 4 x concentrada contendo 400 µM de Ditiotreitol (DTT, Sigma), 200 µM de Tris (Tris (hidroximetil) aminometano) pH 6,8 (Fischer), 8% de SDS (Sigma) e 40% de glicerol (Sigma), dissolvidos em água. Para denaturação foi feita fervura por 5 min. A amostra foi aplicada em gel pré-moldado SDS-PAGE (Pierce) com 12% de grau de polimerização, usando como controle o padrão molecular Dual Color (Bio-Rad), de acordo com o fabricante. A eletroforese foi realizada a 100 voltz no equipamento Mini Protean 3 (Bio-Rad), com tampão de corrida Tris glicina: Tris - ácido clorídrico 25 mM e pH 8,8 (Fischer), glicina 200 mM (Sigma) e SDS 0,1%. Após eletroforese o gel foi lavado em água deionizada, sendo posteriormente mergulhado em solução corante contendo metanol 0,5%, etanol 20% e Brilliant Blue R250 (Pierce) 0,2%, por 1 h. Para retirar o excesso de corante o gel foi mergulhado em metanol (Sigma) 30%, sendo trocado a cada 30 min, até as bandas ficarem visíveis e o fundo claro. O gel então foi novamente lavado com água e fotografado para análise.

3.2.2 CULTIVO CELULAR

Para cultivo celular foram utilizados frascos estéreis descartáveis de poliestireno, aperfeiçoados para aderência celular, com tampa ventilada e 75 ou 25 cm^2 de área. A manutenção e expansão das células foram conduzidas de acordo com as recomendações do fornecedor. Alíquotas previamente congeladas e mantidas a -70 °C (nitrogênio líquido) foram descongeladas em banho de água a 37 °C, diluídas em meio de cultura e cultivadas. Para subcultivo ou estímulo das células lavou-se a camada celular aderida com tampão fosfato pH 7,4 estéril (PBS, Invitrogen) e adicionou-se de 5 a 8 ml de solução de descolamento. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 125 x g / 10 min, descartado o sobrenadante e o precipitado suspenso em novo meio de cultura. As culturas foram subdivididas (passagens) em novas garrafas antes de atingir confluência. Não mais do que 30 passagens foram utilizadas a partir do estoque do banco de células. Todos os cultivos e incubações foram realizados em estufa (Thermo Electron) a 37 °C e 5% CO_2, enquanto toda manipulação celular foi feita em cabine de segurança biológica. Dessa forma as seguintes linhagens celulares foram utilizadas:

- BEAS-2B foi cultivada com meio de Eagle Modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes F-12 (DMEM F-12, Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS, Cellgro), 2 mM de L-glutamina (Sigma) e solução de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep 100x concentrada, Omega Scientific). Frascos de cultivo foram pré-tratados com fibronectina de plasma bovino (Invitrogen) 0,01 mg/ml, colágeno bovino tipo I (Invitrogen) 0,03 mg/ml e albumina sérica bovina (BSA, Sigma) 0,01 mg/ml, dissolvidos em DMEM F-12 e incubados a 37 °C por 1 h, o que possibilita a aderência celular dessa linhagem. Como meio de descolamento foi usada tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM (Cellgro), suplementada com polivinilpirrolidona 0,5% (PVP, Sigma). Como meio de congelamento das alíquotas utilizou-se PVP 1% e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) 7,5% em DMEM F-12, na concentração de $1x10^6$ céls/ml.
- Detroit 562 foi cultivada com meio de Eagle modificado (MEM, Gibco) suplementado com 5% de FBS (Cellgro), 2 mM de L-glutamina (Sigma) e solução de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep 100x concentrada, Omega Scientific). Como meio de descolamento foi usada tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM (Cellgro). Como meio de

congelamento das alíquotas utilizou-se DMSO 10% em MEM, na concentração de $1x10^6$ céls/ml.

- BHK-21 foi cultivada com meio essencial de Eagle (EMEM) suplementado com 5% de FBS. Como meio de descolamento foi usada tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM. Como meio de congelamento das alíquotas utilizou-se DMSO 10% em EMEM, na concentração de $1x10^6$ céls/ml.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA SECREÇÃO CELULAR DE IL-8 POR ELISA SANDUÍCHE

BEAS 2B e DETROIT 562 foram cultivadas de acordo com item 3.2.2. Para serem estimuladas as células foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços (Costar, Corning) e incubadas pernoite para aderência em carência de FBS na quantidade de 1×10^4 céls/poço. Em seguida as células foram estimuladas com *Nlac* PorB (10 µg/ml), *Nme* PorB (10 µg/ml), Pam3CSK4 (100 ng/ml) e LPS (100 ng/ml – células com ou sem 5% FBS), ou não estimuladas, incubadas e o sobrenadante coletado nos horários escolhidos para determinação de IL-8. Nos experimentos em que se desejou bloquear TLR2, células foram pré-tratadas com 10 µg/ml de anticorpo antiTLR2 humano por 30 min antes da adição dos estímulos. A secreção de IL-8 por medição direta de sua concentração na amostra foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche, utilizando o kit Human IL-8 OptEIA ELISA set (BD Biosciences) e placas de ELISA de 96 poços Immulon 2HB (Thermo Scientific), de acordo com o manual do kit. As placas foram incubadas pernoite com anticorpo de captura para aderência, 100 µl/ poço, 4 °C. Depois de lavada por três vezes, a placa foi incubada por 1 h/temperatura ambiente (TA) com tampão de bloqueio, 200 µl/poço, para cobrir regiões onde o anticorpo não aderiu. Nova lavagem foi seguida da incubação das amostras, dos controles positivos e IL-8 padrão serialmente diluído, 100 µl/poço, 2h/TA. Nova lavagem foi feita por três vezes e incubado 100 µl de anticorpo de detecção/poço, 1h/TA. Última série de lavagem por 7 vezes precedeu incubação na ausência de luz de 100 µl de substrato por 30 min/TA. A reação foi interrompida com 50 µl de ácido fosfórico 1M e a leitura da placa feita em espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments), 450 nm.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSCRIÇÃO DE mRNA PARA IL-8, TLR1 E TLR2

A linhagem BEAS 2B foi cultivada de acordo com item 4.2.2. Para serem estimuladas as células foram transferidas para placas de cultura celular de 6 poços (Costar, Corning) e incubadas pernoite para aderência em carência de soro fetal bovino na concentração de 1 x 10^6 céls/poço. Em seguida as células foram estimuladas com *Nlac* PorB (10 µg/ml), *Nme* PorB (10 µg/ml), Pam3CSK4 (100 ng/ml) e LPS (100 ng/ml, células com 5% de FBS), ou não estimuladas. Em seguida foram incubadas por 6 e 24 h para extração de RNA mensageiro (mRNA) pelo kit Rneasy Minikit. O sobrenadante então foi descartado, as células lavadas com PBS e descoladas dos poços. Após adição de mesmo volume de meio de cultura com 10% FBS, as células foram transferidas para minitubo de centrífuga (Axygen) livre de RNA e centrifugadas em minicentrífuga (Eppendorf) por 5 min/300 x g/TA. Seguido do descarte de sobrenadante, as células foram lisadas por 600 µl de solução de guanidina-isotiocianato, de acordo com o kit, seguidas de homogeneização por pipetagem, adição de mesmo volume de etanol e transferência de 700 µl por vez para minicoluna de sílica do kit, apoiada sobre tubo de coleta (Axygen), para purificação. Após adição de 700 µl de tampão RW1, o conjunto foi centrifugado por 15 seg/8000 x g/TA, e o liquido filtrado descartado. Após adição de 500 µl de tampão RPE à coluna, nova centrifugação por 15 seg/8000 x g/TA foi feita e descarte de filtrado, sendo este passo repetido com centrifugação por 2 min. O tubo de coleta foi trocado e nova centrifugação por 1 min foi feita para retirada de resíduos. Após nova troca de tubo de coleta, a coluna foi eluída por centrifugação por 1 min em água livre de RNA para recuperação do mRNA.

Tendo o mRNA purificado, este foi reversamente transcrito a cDNA pelo kit Omniscript Reverse Transcriptase. Neste kit os primers, a transcriptase reversa, o inibidor de RNase e desorribonuleotídeos trifosfatados formam a mistura reacional adicionada ao mRNA extraído, seguido de incubação por 60 min/37 °C. Em seguida, alíquota da reação de transcrição reversa é adicionada a mistura reacional de PCR, composta de Taq Polimerase (Qiagen), primers e desorribonuleotídeos trifosfatados diluídos em tampão de PCR. Por último, molde de DNA é adicionado e a mistura colocada em termociclador (Eppendorf) de acordo com os seguintes parâmetros: TLR1 e TLR2 = 50 °C/30 min – 94 °C /1 min – 54 °C/1 min – 72 °C/1 min por 30 ciclos; IL-8 e GAPDH = 50 °C/30 min – 94 °C /1 min –

57 °C/ 1 min – 72 °C/1 min por 30 ciclos. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1,2%. As amostras foram comparedas de acordo com a intensidade da respectiva banda visualizada no gel. As sequências de DNA utilizadas como primers nas reações descritas acima foram:

- TLR1 (5'-ACCAAGTTGTCAGCGATGTGTT-3', 3'-GATTGTCCCCTGCTTTTATTGA5')
- TLR2 (5'-GAGTGAGTGGTGCAAGTATTGAAC-3', 3'-GGGCCACTCCAGGTAGGTCT-5'),
- IL-8 (5'-CATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3', 3'-GAGACACCATAGCTTCTTAGTCACT-5')
- GAPHD (5'-TCCATGACAACTTTGGTATCGTG-3', 3'-AGGAGACTGAAGTTGTGCTGT-5').

3.2.5 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO CELULAR DE TLR NA MEMBRANA

A linhagem BEAS 2B foi cultivada de acordo com item 4.2.2 e plaqueadas de acordo com o item 3.2.4. Em seguida as células foram estimuladas com *Nlac* PorB (10 µg/ml), *Nme* PorB (10 µg/ml) e Pam3CSK4 (100 ng/ml), ou não estimuladas, seguidas de incubação por 6 e 24 h. O sobrenadante foi descartado, e as células descoladas dos poços. Após transferência para tubos de análise por FACS, as células foram centrifugadas a 300 x g/5 min/4 °C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em PBS (lavagem). Após nova lavagem, foram adicionados 100 µl de PBS com 5% de FBS. Em seguida, foram adicionados em tubos separados de células não estimuladas (controles): 5 µl de anticorpo controle de isotipo marcado com PE (0,25 µg), 5 µl de anticorpo antiTLR2 marcado com PE (1 µg) e um terceiro tubo sem marcação. Aos tubos de células estimuladas foram adicionados 5 µl de anticorpo antiTLR2 marcado com PE (1 µg). Após 30 min/4 °C, as células foram lavadas novamente por duas vezes e ressuspensas em PBS + 5% FBS. Os tubos foram então analisados por citômetro de fluxo (FACScan, BD), ajustado para o filtro FL2 e aquisição de 10000 eventos por tubo. Os dados foram adquiridos pelo programa Cell Quest (BD), sendo excluídos da análise sinais representativos de debris celulares.

3.2.6 LIGAÇÃO DE *NLAC* PORB EM BEAS-2B

A linhagem BEAS 2B foi cultivada de acordo com item 3.2.2. As células foram transferidas para placas de 96 poços em formato de U (Costar, Corning) e incubadas com 1 h/ 0 °C/1 x 10^5 céls/poço, com crescentes concentrações (0,2 a 50 µg/ml) de *Nlac* PorB marcada com o fluorocromo Alexa 594. Determinada a melhor concentração, nova placa com células foi adicionada da concentração escolhida de *Nlac* PorB marcada e crescentes ou fixadas concentrações de antiTLR2 humano, controle de isotipo, ou *Nme* PorB. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células ressuspensas em PBS + 5% FBS. As placas foram analisadas por citômetro de fluxo (FACScan, BD), ajustado para o filtro FL2 e aquisição de 10000 eventos por tubo. Os dados foram adquiridos pelo programa Cell Quest (BD), sendo excluídos da análise sinais representativos de debris celulares.

3.2.7 CONTROLE DE QUALIDADE DE FT-LPS

Para controle de qualidade do Ft-LPS foi realizada determinação de proteínas totais e detecção de Ft-LPS por SDS-PAGE seguido de Western Blot, descritos em seguida.

3.2.7.1 Detecção de Ft-LPS por SDS-PAGE seguido de Western Blot

A amostra foi preparada em água deionizada com 1 µg de Ft-LPS e solução tampão redutora Laem mli 4x concentrado (Boston Bioproducts), perfazendo 20 µl de amostra. Para denaturação foi feita fervura por 5 min. A amostra foi aplicada em gel pré-moldado de Dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida (SDS-PAGE, Pierce), gradiente de polimerização 4-20%, usando como controle o padrão molecular Dual Color (Bio-Rad), de acordo com o fabricante. A eletroforese foi realizada a 100 Voltz no equipamento Mini Protean 3 (Bio-Rad), com tampão de corrida constituído de Tris, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonico e SDS (Tris-HEPES-SDS, Pierce).

Após eletroforese, o gel foi colocado no módulo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), para ser transferido a uma membrana de poli-1,1-difluoretano (PVDF, Bio-Rad), utilizando o tampão de transferência Tris-glicina (Bio-Rad). O processo é realizado por 60 min a 350 miliamperes. Para o processo imunoenzimático foi utilizado o kit Immun-Blot Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-AP (Bio-Rad). De acordo com o manual, a membrana foi bloqueada contra reações inespecíficas utilizando gelatina a 1% em tampão Tris por 1 h. Em seguida a mesma foi incubada com o anticorpo primário pernoite. Após lavagem com tampão Tris seguiu a incubação com o anticorpo conjugado a fosfatase alcalina anti-IgG por 1 h, nova lavagem e posterior incubação com a solução de substrato, até revelação da cor azul referente ao Ft-LPS. A membrana por ultimo foi escasseada para análise. O anticorpo primário utilizado para detecção de Ft-LPS é o monoclonal FB11 antiFt-LPS (ab2033, Abcam), na diluição 1: 2000. Este anticorpo se liga ao tetrassacarídeo denominado antígeno "O", porção da molécula de Ft-LPS que é reconhecida pelo sistema imune.

3.2.7.2 Teor proteico por reação com ouro coloidal

O teor proteico da amostra de Ft-LPS foi determinado por reação com ouro coloidal (Colloidal Gold reagent, Bio-Rad). Como proteína padrão foi utilizada BSA, nas concentrações de 50, 25 e 10 µg/ml, equivalentes a 5, 2.5 e 1% da massa total liofilizada da amostra. Em uma membrana de PVDF pré-umedecida com metanol, subdividida em quadrados de 1 cm^2, foram aplicados 2 µl de cada amostra (1 mg/ml), padrão e branco (PBS). Após secagem em temperatura ambiente, a membrana foi mergulhada no reagente de ouro coloidal e deixada em agitação até desenvolvimento de cor no padrão mais diluído. A concentração proteica é proporcional à intensidade da coloração rosada. A membrana, por fim, foi lavada com água deionizada e seca em temperatura ambiente, sendo posteriormente fotografada.

3.2.8 INOCULAÇÃO DE FORMULAÇÕES TESTE EM CAMUNDONGOS

3.2.8.1 Preparação das formulações teste

As formulações teste foram preparadas por simples mistura de reagentes e inoculadas nos camundongos logo após o preparo, de acordo com as tabelas a seguir. A tabela 2 se refere às preparações para inoculação intranasal com antígeno modelo Ft-LPS e a Tabela 3 para inoculação subcutânea (A-E) e intranasal (F-G) com o vírus da raiva como antígeno.

Tabela 2 - Formulações teste preparadas para inoculação de camundongos C57BL/6, utilizando o antígeno modelo Ft-LPS (quantidade de reagentes por unidade de dose).

	Formulação	**Reagente 1**	**Reagente 2**
A	Controle	PBS - 20 µl	----------
B	Antígeno	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	PBS - 10 µl
C	Antígeno + *Nlac* PorB	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	*Nlac* PorB 1 mg/ml - 10 µl
D	Antígeno + *Nme* PorB	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	*Nme* PorB 1 mg/ml - 10 µl
E	Antígeno+ rPorB	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	rPorB 1 mg/ml - 10 µl
F	Antígeno + ODN 1826	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	ODN 1826 1 mg/ml - 10 µl
G	Antígeno + QS-21	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	QS-21 0,8 mg/ml - 10 µl
H	Antígeno+ rCTB	Ft-LPS 1 mg/ml - 10 µl	rCTB 1 mg/ml - 10 µl

Tabela 3 - Formulações teste preparadas para inoculação de camungongos BALB/c, utilizando o vírus da raiva inativado - VRI (quantidade de reagentes por unidade de dose).

	Formulação	**Reagente 1**	**Reagente 2**	**Reagente 3**
A	Controle	PBS - 100 µl	----------	----------
B	Antígeno	VRI 8 UI/ml – 62 µl	PBS - 38 µl	----------
C	Antígeno + rPorB	VRI 8 UI/ml – 62 µl	rPorB 1 mg/ml - 10 µl	PBS - 28 µl
D	Antígeno + ODN 1826	VRI 8 UI/ml – 62 µl	ODN 1826 1 mg/ml - 10 µl	PBS - 28 µl
E	Antígeno+ rPorB + ODN 1826 (*)	VRI 8 UI/ml – 62 µl	ODN 1826 1 mg/ml - 10 µl	ODN 1826 1 mg/ml - 10 µl
F	Antígeno	VRI 8 UI/ml -20 µl	PBS - 5 µl	----------
G	Antígeno + rPorB	VRI 8 UI/ml -20 µl	rPorB 2 mg/ml - 5 µl	----------

(*) A formulação teste E foi completada para 100 µl com PBS.

Todas as preparações utilizaram como diluente PBS. As concentrações de antígeno modelo Ft-LPS (CHIAVOLINI et al., 2008) e das porinas (WETZLER, 1994) utilizadas foram pré-determinadas pelo grupo do Dr. Lee Wetzler em estudos anteriores por via subcutânea. Os outros adjuvantes foram utilizados de acordo com a recomendação dos fabricantes.

3.2.8.2 Esquema de inoculação e coleta de sangue

O esquema de inoculação com o antígeno modelo Ft-LPS seguiu o estabelecido pelo laboratório em trabalhos anteriores e é representado na figura 7. A inoculação ocorreu quinzenalmente, no total de três inoculações. A coleta de sangue pré-imune se deu uma semana antes da primeira inoculação, enquanto o sangue imune foi coletado duas semanas e sete semanas depois de completado o esquema. As coletas intermediárias, quando realizadas, foram feitas dois dias antes da inoculação subsequente. O intervalo mínimo de dois dias entre coleta e inoculação foi dado para que o camundongo pudesse estar recuperado da coleta ao ser imunizado.

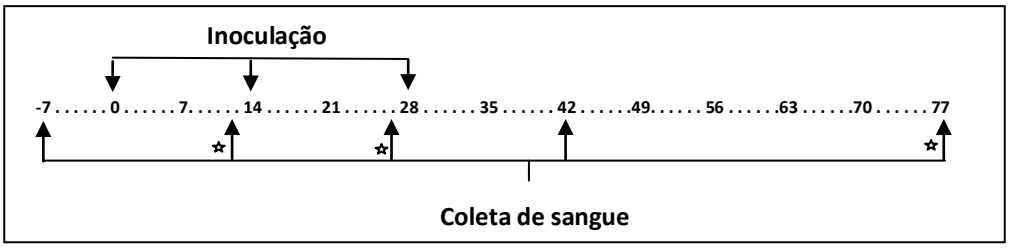

Figura 7 - Esquema de inoculação e coleta de sangue murino – antígeno modelo Ft-LPS
O esquema é representado com escala em dias, sendo o marco zero correspondente a primeira inoculação. Onde houver estrela (✰) significa que aquela coleta não foi realizada em todos os experimentos.

O esquema de inoculação como o vírus da raiva seguiu o esquema vacinal pré-exposição utilizado em humanos, perfazendo três inoculações em 0, 7 e 28 dias. A coleta de soro foi feita dois dias antes da primeira e terceira inoculação. O soro também foi coletado três semanas depois de completado o esquema. O esquema é ilustrado a seguir:

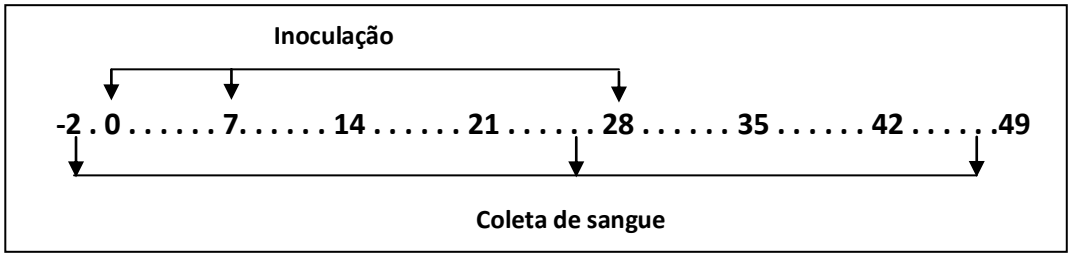

Figura 8 - Esquema de inoculação e coleta de sangue murino
O esquema é representado com escala em dias, sendo o marco zero correspondente à primeira inoculação.

3.2.8.3 Inoculação

Intranasal: Para que o animal possa absorver a formulação sem risco de espirrá-la ou engoli-la, é indicada a pré-anestesia intraperitoneal com xilasina (7,5 µg/g corpórea - Lloyd Laboratories) e quetamina (75 µg/g corpórea - Fort Dodge Animal Health) diluídas em PBS. Após a anestesia, administrou-se 20 µl de formulação em suas narinas, com o auxílio de pipeta automática de 20 µl (Eppendorf). No caso do experimento com o vírus da raiva foram inoculados 25 µl, sendo 12,5 µl em cada narina. Os camundongos anestesiados e imunizados foram colocados na gaiola e observados até acordarem.

Subcutânea: A inoculação foi feita na região peritonial dos animais por seringa com agulha 18 gauges e 1 ½ polegadas de comprimento, num total de 100 µl por animal.

3.2.8.4 Coleta de sangue e preparo do soro

As coletas de sangue intermediárias foram obtidas por perfuração da veia submandibular, localizada diretamente sob a pele na região da junção mandibular. O camundongo imobilizado foi perfurado por agulha de 18 G 1 ½, o sangue coletado em tubos cônicos (Eppendorf) e o fluxo de sangue estancado por pressão da região com gaze estéril (DONOVAN; BROWN, 2006). A preferência por esse método se deu por dispensar anestesia, por ser de rápida execução e promover rápida recuperação do animal. As coletas tiveram duas semanas de intervalo mínimo e 150 µl de volume máximo por vez, de acordo com as

normas da comissão de ética americana e brasileira vigentes. O sangue então foi centrifugado a 1500 x g/20 min e o sobrenadante (soro) colhido para análise imediata ou armazenado em novo tubo cônico a -20 °C.

3.2.8.5 Análise de Imunoglobulinas murinas antiFt-LPS por ELISA indireto

A análise em questão foi adaptada de Current Protocols of Immunology (HORNBECK, 2001). Imunoglobulina G e M (IgG e IgM) foram avaliadas por ELISA indireto.

Para determinação em soro de camundongo inoculado com antígeno modelo Ft-LPS, uma placa Immulon 4HB (Thermo Scientific) de fundo chato e 96 poços foi tratada com 100 µl, por poço teste, de Ft-LPS 1 µg/ml diluído em PBS. Os poços reservados a curva padrão foram tratados com 100 µl, 10 µg/ml em PBS, de fragmento F(ab')2 de cabra anti-IgG ou IgM de camundongo (Jackson Laboratories), de acordo com a imunoglobulina analisada na vez (coating). Após pernoite (4 °C) a placa foi lavada por três vezes com 0,05% polissorbato 20 (tween 20) em PBS (tampão de lavagem) e a placa bloqueada com a solução de lavagem acrescida de gelatina 0,5%. Em seguida, os poços teste foram incubados com soro murino diluído serialmente na solução de lavagem, em duplicata. Os poços da curva padrão foram incubados com IgG (Sigma) ou IgM (Sigma) murina a partir de 0,5 mg/ml, 100 µl, seguindo diluição seriada em duplicata. Após incubação pernoite, a placa foi novamente lavada e incubada com 100 µl de anticorpo conjugado a fosfatase alcalina anti-IgG (cadeia α) ou IgM (cadeia µ) (Sigma), diluído 1:10000. Após 1 h de incubação, a placa foi lavada por 5 vezes e o substrato para-nitrofenil fosfato dissódico (PNPP, Pierce) adicionado 100 µl por poço. A reação foi terminada após 30 min, por adição de 50 µl de Hidróxido de Sódio (Sigma) 2 M e a leitura da placa feita em espectrofotômetro para leitura de placas de ELISA, a 405 nm.

Para determinação em soro de camundongo inoculado com vírus da raiva, o coating foi realizado pernoite (4 °C) com 100 µl por poço de suspensão de vírus da raiva inativado, contendo 0,2 UI/ml, tendo sido diluída em tampão carbonato pH 9,6. A placa foi lavada como descrito anterirmente e incubada com as amostas de soro diluídas serialmente na solução de lavagem. Soro de camundongo imunizado, previamente testado como positivo, foi utilizado como controle de eficácia e reprodutibilidade do teste. Após incubação por 2 h,

a placa foi novamente lavada e incubada com 100 µl de anticorpo conjugado a fosfatase alcalina anti-IgG (cadeia α) ou IgM (cadeia µ) (Sigma), diluído 1:10000. Após 1 h de incubação, a placa foi lavada por 5 vezes. Foi adicionado no poço 100 µl de substrato orto-fenildiamina (OPD, Sigma) diluído em tampão citrato 5,5. A reação foi terminada depois de 15 min por adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2,5 M (Labsynth) e a leitura da placa feita em espectrofotômetro para leitura de placas de ELISA, a 490nm e a 630 nm para subtração do sinal da placa.

3.2.8.6 Analise de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva por RFFIT

A análise de rápida inibição de focos fluorescentes (RFFIT) foi realizada como descrita e validada anteriormente (DE MOURA et al., 2008). Amostras de soro obtido dos camundongos imunizados foram aquecidas a 56 °C por 30 min para inativação de complemento, com posterior diluição seriada em duplicata em placa de 96 poços, 50 µl/poço. Para controle positivo foi feita diluição seriada de soro referência de 30 UI/ml. Como controle negativo foi utilizado soro de camundongo não imunizado. Dose constante de CVS, previamente titulada em 200 CCID50/50 µl (dose infectante de 50% de células em cultura), foi adicionada na placa 50 µl/poço. Após 90 min de incubação (37 °C/5% CO_2), 50 µl de suspensão de células BHK21 $8x10^5$ céls/ml, diluídas em meio EMEM com 2,5% de FBS, foram adicionadas. Em seguida, nova incubação por mais 22 h foi realizada e as células lavadas ao final com PBS, seguido de fixação com acetona 80% gelada (-20 °C) por 15 min e posterior secagem por 10 min. Adição de anticorpo antinucleoproteína do vírus da raiva conjugado a FITC (Bio-Rad) foi seguido de nova incubação por 30 min no escuro e posterior lavagem com PBS por duas vezes. Os focos fluorescentes representativos de resíduos do vírus da raiva foram identificados em 8 campos diferentes por poço em microscópio fluorescente invertido (200x). O resultado é expresso por número de focos fluorescentes dividido pelo total de focos fluorescentes lidos. Os títulos das amostras de soro foram calculados por comparação com o soro referência.

3.2.9 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS PROVENIENTES DO BAÇO MURINO

3.2.9.1 Extração de esplenócitos murinos

Camundongos inoculados com as formulações teste de raiva foram eutanasiados por CO_2 entre 15 e 20 dias após a última inoculação, sendo imediatamente colocados em capela de fluxo laminar e feita assepsia com álcool iodado. O baço foi retirado por incisão na lateral do camundongo, sendo a carcaça resultante descartada. Os esplenócitos foram coletados com material cirúrgico pré-esterilizado, levados ao fluxo laminar de células, lavados com PBS e incubados em tampão hemolítico (ACK, Sigma). Após nova lavagem foram ressuspensos em meio completo: RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM, FBS 10%, tampão Hepes 1%, piruvato de sódio 1mM, 2- mercaptoetanol $5x10^{-5}$ M e gentamicina (40 mg/L) (todos Sigma). As células foram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio do corante tripan blue (Sigma).

3.2.9.2 Marcação de esplenócitos com o rastreador de proliferação CFSE

As suspensões celulares obtidas acima foram diluídas para $5x10^7$ céls/ml e marcadas com o rastreador, de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada suspensão 1 ml foi centrifugado (1000 g /10 min), o meio descartado e o pellet celular ressuspenso em PBS com 0,1% de BSA e 5 µM de CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) a 37 °C. Após 10 min de incubação a 37 °C, com agitação manual a cada 2 min, foram adicionados 10 ml de meio completo para neutralização do rastreador. As soluções foram incubadas por 5 min em gelo e lavadas com meio completo por três vezes, mantendo 1 ml de meio completo na lavagem final. Para confirmar a eficiência da marcação, as células marcadas e não marcadas foram comparadas em citômetro de fluxo com laser de 488 nm de excitação.

3.2.9.3 Marcação dos esplenócitos com anticorpos

Após o período de estímulo descrito acima, centrifugou-se a placa (5 min/1700 rpm), os sobrenadantes foram descartados por inversão e os pellets ressuspensos em 50 µl de PBS com 1% de albumina sérica bovina (tampão de FACS), transferindo-os para placa de 96 poços de fundo V (triplicatas juntas em 1 poço). As células foram lavadas com tampão de FACS e ressuspendidas em 50 µl de mix de anticorpos (tabela abaixo). Após 45 min de incubação no gelo, 150 µl de tampão de FACS foi adicionado, seguido de duas lavagens com o mesmo tampão e ressuspensão final em 200 µl de tampão de FACS. Todas as amostras preparadas foram lidas em citômetro de fluxo FACS canto II (BD) e o resultado analisado no programa Flow Jo (Tree Star).

Tabela 4 - Fluorocromos e anticorpos usados na marcação de esplenócitos

Fluorocromo	Proteína marcada	Diluição
APC-Cy7	CD3	1:50
PerCP-Cy5.5	CD4	1:400
Pe-Cy7	CD8	1:200

3.2.10 ANÁLISE MATEMÁTICA E ESTATÍSTICA DE DADOS

Para determinação da equação das curvas padrões enzimáticas foi utilizado o método log-log de ajuste (PLIKAYTIS et al., 1991), sendo a curva traçada apenas na porção linear do gráfico, com no mínimo quatro pontos. A curva foi feita para cada experimento de leitura e no mínimo em duplicata, sendo aceita somente se R^2 for maior ou igual a 0,99. A amostra cuja leitura foi superior ao range linear foi diluída, ou quando abaixo do range, calculada com a equação linear para efeito ilustrativo gráfico ou de comparação estatística, devidamente identificada.

Para analisar a diferença entre as médias de grupos de amostras *in vivo*, estas foram comparadas par a par pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney U, com intervalo de confiança de 95% e valor P bicaudal. Por este método, a diferença foi

considerada significante quando a probabilidade calculada (P) das médias serem iguais era pequena, menor que 5% ($P < 0,05$). Para analisar a diferença entre as médias de grupos de amostras *in vitro,* estas foram comparadas par a par pelo teste T de *Student* não pareado. Por este método, a diferença foi considerada significante quando a probabilidade calculada (P) das médias serem iguais é pequena, menor que 1% ($P < 0,01$). Todas as análises e gráficos relativos a essas foram feitos no programa Prism versão 5.01 (GraphPad).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PORINAS ESTIMULAM A PRODUÇÃO DE IL-8 EM CÉLULAS RESPIRATÓRIAS HUMANAS, ATRAVÉS DO ENGAJAMENTO E AUMENTO DA EXPRESSÃO DE TLR2

4.1.1 ANÁLISE QUALITATIVA DAS PORINAS

Para verificação qualitativa da pureza e integridade proteica, as porinas foram submetidas à eletroforese não denaturante (figura 9).

As bandas ao redor de 34 kDa confirmam a presença das proteínas. A ausência de bandas definidas abaixo deste valor mostra que não houve fragmentação significativa da cadeia. Na ausência de SDS no tampão de amostra, apenas *Nlac* PorB manteve seu estado nativo trimérico, demonstrado pela banda ao redor de 100 kDa. *Nme* PorB e rPorB, que são a mesma proteína expressa em diferentes micro-organismos, não apresenta bandas de trimeros quando não há SDS no tampão pois tem maior tendência a formar oligômeros, que não descem na malha do gel.

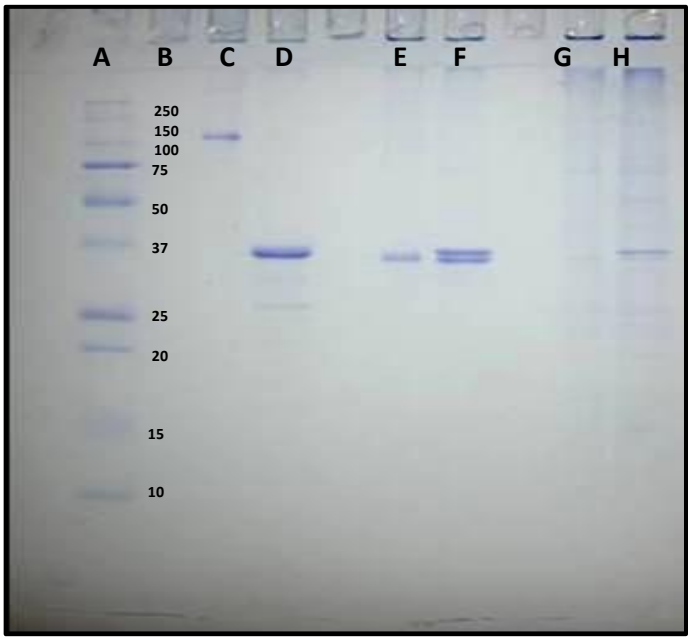

Figura 9 - Análise qualitativa das porinas por SDS-PAGE.
A. Padrão de peso molecular. **B.** Escala de peso molecular (kDa). **C.** *Nlac* PorB sem SDS (1 µg). **D.** *Nlac* PorB (1 µg). **E.** rPorB sem SDS (1 µg). **F.** rPorB (1 µg). **G.** *Nme* PorB sem SDS (1 µg). **H.** *Nme* PorB (1 µg).

4.1.2 PORINAS ESTIMULAM SECREÇÃO DE IL-8 EM CÉLULAS HUMANAS RESPIRATÓRIAS

A citocina IL-8 é considerada como marcadora de ativação de perfil inflamatório em células epiteliais respiratórias humanas (BÉRUBÉ et al., 2009). Assim, a secreção de IL-8 estimulada por porinas foi medida por ELISA em células BEAS-2B e Detroit 562, após indução por 24 h. *Nlac* PorB induziu menor secreção de IL-8 que *Nme* PorB em ambas as linhagens, enquanto *Nme* PorB induziu níveis comparáveis ao do ligante de TLR2/TLR1 referência usado, Pam3CSK4 (figura 10A e 10B). LPS, ligante de TLR4 referência, não induziu aumento significativo na secreção de IL-8 em Detroit 562. FBS é fonte de MD-2, molécula não expressada por BEAS-2B (SCHULZ et al., 2002), essencial a ativação por LPS. Por esse fato, LPS na ausência de FBS não induziu aumento de secreção de IL-8 por BEAS-2B, enquanto na presença de FBS estimulou secreção similar a Pam3CSK4 (figura 10A). Em BEAS-2B a porcentagem de IL-8 secretada em resposta as porinas é independente de FBS (dado não mostrado), o que atesta ausência de quantidade imunomoduladora de LPS contaminante.

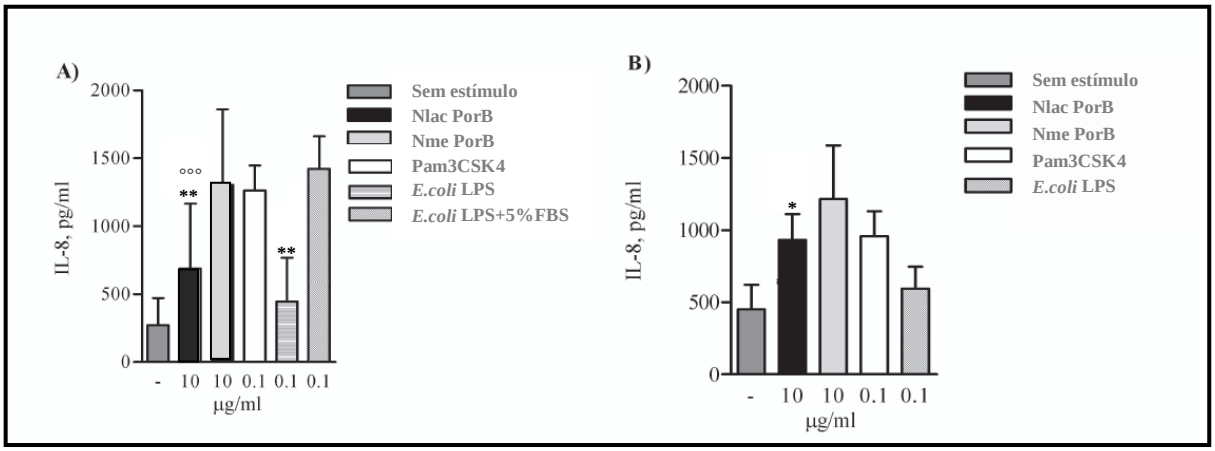

Figura 10 - Indução de IL-8 por porinas em células respiratórias humanas.
A) Células BEAS-2B e **B)** Detroit 562 incubadas por 24h com 10 µg/ml de *Nlac* PorB, 10 µg/ml de *Nme* PorB, 100 ng/ml de Pam3CSK4 e 100 ng/ml de LPS de *E. coli*, sendo o último na ausência e presença de FBS. As colunas representam a média de ao menos três experimentos independentes com triplicata de poços enquanto as barras referem-se a ± desvio padrão. Diferenças consideradas significativas pelo teste t não pareado, identificadas por: * $p = 0,026$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ou °°° $p < 0,001$, em relação à produção estimulada por *Nlac* PorB (asteriscos), ou por LPS e PAM3CSK4 (círculos).

Análise temporal da secreção de IL-8 pelas porinas mostrou que o fenômeno em BEAS-2B é induzido no começo do experimento, sendo detectada produção da citocina em apenas 1 h de estímulo, enquanto que em Detroit 562 o estímulo se distingue apenas após 6 h (figura 11). Em ambas as linhagens, a secreção induzida por *Nlac* PorB foi menor que a induzida por *Nme* PorB ou por PAM3CSK4. A indução *Nlac* PorB também foi de curta

duração, evidenciado pelo estagnamento da secreção de IL-8 após a primeira detecção (figura 11). A secreção de IL-8 induzida por *Nme* PorB foi menor que por PAM3CSK4 em BEAS-2B (figura 11A), mas equivalente em Detroit 562 (figura 11B). Em conjunto, os dados apresentados mostram que, entre as porinas, *Nlac* PorB induz baixa secreção de IL-8 por tempo curto,enquanto *Nme* PorB é indutora constante de IL-8 dentro do período estudado. O perfil é independente da linhagem celular, porém mais sutil em Detroit 562.

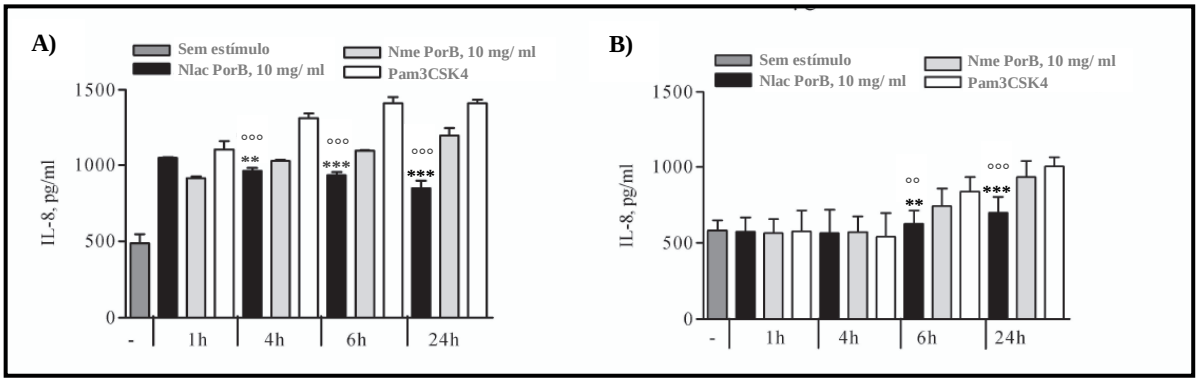

Figura 11 - Indução temporal de IL-8 por porinas em células respiratórias humanas.
A) Células BEAS-2B e **B)** Detroit 562 incubadas por 1, 4, 6 e 24h com 10 µg/ml de *Nlac* PorB, 10 µg/ml de *Nme* PorB e 100 ng/ml de Pam3CSK4. Medium = meio sem estímulo. As colunas representam a média de ao menos três experimentos independentes com triplicata de poços enquanto as barras referem-se a ± desvio padrão. Diferenças consideradas significativas pelo teste t não pareado são identificadas por: ** $p < 0,01$ ou °° $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ou °°°$p < 0,001$, em relação à produção estimulada por *Nlac* PorB (asteriscos), ou por PAM3CSK4 (círculos).

Para avaliar a participação da regulação transcricional do gene de IL-8 no aumento da secreção desta citocina, as linhagens foram estimuladas com as porinas e ligantes de TLR, sendo avaliados por RT-PCR (figura 12). O aumento da taxa de transcrição de mRNA codificador de IL-8 foi induzida por ambas as porinas e seguiu o padrão de secreção da citocina, onde o estímulo por *Nlac* PorB decresce em função do tempo. Portanto, a indução da secreção de IL-8 pela porina é diretamente relacionado à taxa de transcrição de mRNA codificador de IL-8. Apesar de ter induzido crescente secreção de IL-8, PAM3CSK4 apresentou decréscimo na taxa de transcrição de mRNA, em acordo com artigo anterior com a linhagem celular A549 (BÉRUBÉ et al., 2009).

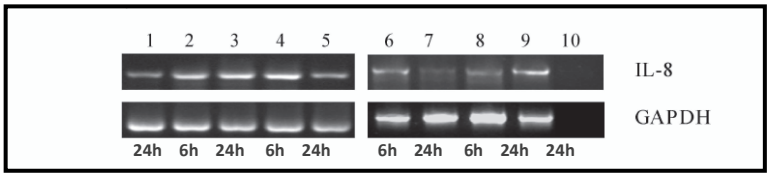

Figura 12 - Indução de mRNA codificador de IL-8 por porinas em BEAS-2B.
Gel de agarose representativo da indução de mRNA codificador de IL-8 por *Nme* PorB (colunas 2 e 3), *Nlac* PorB (colunas 4 e 5), Pam3CSK4 (colunas 6 e 7) e LPS com FBS (coluna 8 e 9). Como controles negativos, meio de cultura (coluna 1) e PBS (coluna 10). mRNA para o gene constitutivo GAPDH foi utilizado como controle da corrida eletroforética .

4.1.3 A SECREÇÃO DE IL-8 ESTIMULADA POR PORINAS É MEDIADA POR TLR2

A porina meningocócica foi identificada como ligante de TLR2/TLR1, enquanto o engajamento desse complexo resulta em ativação de NF-κB (MASSARI et al., 2006). NF-κB, por sua vez, foi identificado como essencial à produção de IL-8 por células respiratórias humanas (BÉRUBÉ et al., 2009). Para confirmar que a secreção de IL-8 pelas porinas é dependente de TLR2, utilizou-se anticorpo antiTLR2 humano. O anticorpo foi efetivo supressor de IL-8, enquanto que o controle de isotipo não (figura 13).

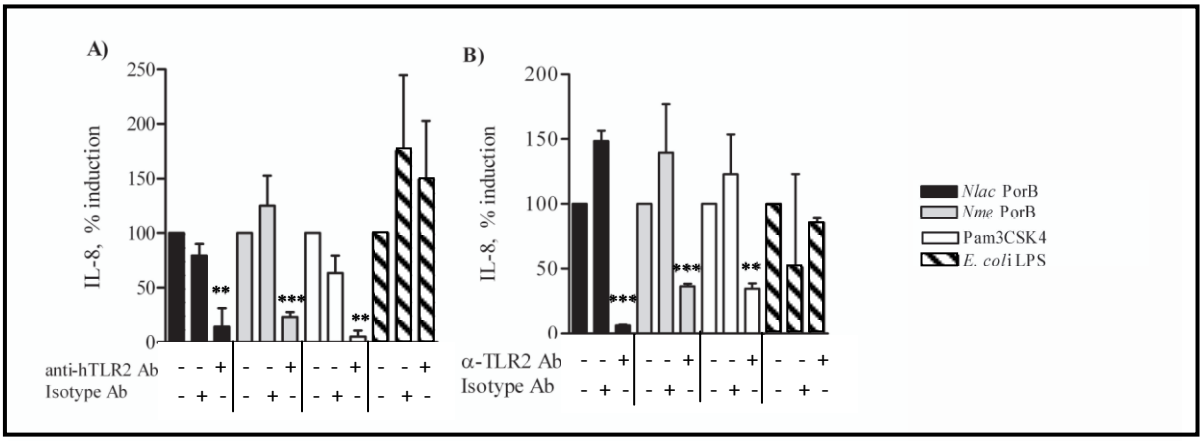

Figura 13 - Indução de IL-8 dependente de TLR2.

A) células BEAS-2B e **B)** Detroit 562 foram incubadas com anticorpo antiTLR2 humano (αTLR2 Ab - 10 µg/ml) ou com controle de isotipo para observação de ligações inespecíficas (Isotype Ab - 10 µg/ml) por 30 min/TA. Em seguida adicionou-se 10 µg/ml de *Nlac* PorB, 10 µg/ml de *Nme* PorB, 100 ng/ml de Pam3CSK4 ou 100 ng/ml de LPS com FBS por mais 24h. Os resultados foram expressos em% de IL-8 induzida (% Induction). As colunas representam a média de ao menos dois experimentos independentes com triplicata de poços enquanto as barras referem-se a ± desvio padrão. Diferenças consideradas significativas pelo teste t não pareado são identificadas por: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação à produção estimulada sem a presença do anticorpo.

A ativação de NF-κB e consequente produção de IL-8 através de TLR4 e TLR2 são induzidas pela mesma via intracelular (LIEW et al., 2005). Portanto, a supressão foi resultado somente do bloqueio extracelular de TLR2, já que o anticorpo não foi capaz de suprimir a secreção de IL-8 induzida por LPS, ligante de TLR4. Sendo assim, porinas induzem expressão de IL-8 em células respiratórias humanas de maneira dependente de TLR2.

4.1.4 A PRODUÇÃO DE IL-8 É PROPORCIONAL A EXPRESSÃO DE TLR2

Para avaliar se as variações da secreção de IL-8 induzida pelas porinas são influenciadas por variações na taxa de transcrição de TLR2, BEAS-2B foi estimulada para medir a taxa de transcrição de mRNA codificador de TLR2, assim como de seu correceptor TLR1, por RT-PCR. Mais uma vez o fenômeno temporal se confirma, pois a taxa de transcrição de mRNA para TLR2 é aumentada por *Nme* PorB e diminuída por *Nlac* PorB ao passar do tempo (figura 14A). A taxa de transcrição de mRNA para TLR1 é fracamente induzida por ambas as porinas, sem clara relação tempo/intensidade (figura 14A). A cinética da transcrição de mRNA para TLR2 foi acompanhada pela expressão de TLR2 medido por FACS, pois o mesmo perfil foi detectado de acordo com a porcentagem de intensidade média de fluorescência, relativa a células não estimuladas (figura 14B). A mesma medida ressalta a alta porcentagem de expressão de TLR2 induzida por *Nme* PorB, superando a induzida por Pam3CSK4. Coletivamente, os resultados demonstram que a produção de IL-8 pelas porinas em células respiratórias humanas é relativa à indução de transcrição de mRNA para TLR2 e consequente expressão deste receptor na superfície celular.

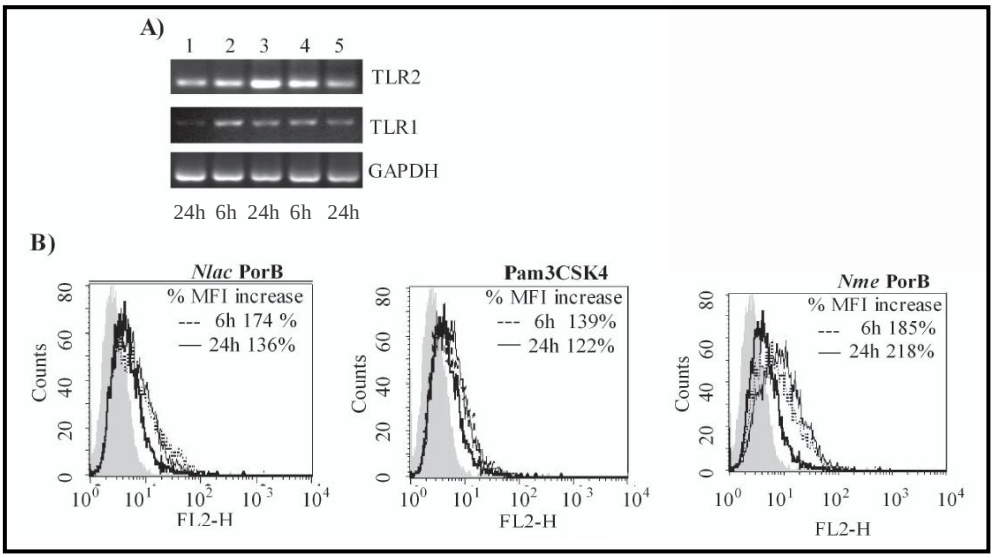

Figura 14 - Indução de TLR2 e respectivo mRNA por porinas.
A) RT-PCR de mRNA para TLR2 e TLR1 induzidos em BEAS-2B incubada com meio de cultura (coluna 1), 10 µg/ml de *Nme* PorB (colunas 2 e 3) e 10 µg/ml de *Nlac* PorB (colunas 4 e 5). Leitura de transcrição do mRNA para GAPDH foi utilizado como controle do experimento por ser expresso de maneira constitutiva nessa célula. **B)** Citometria de fluxo para análise de expressão de TLR2 em BEAS-2B, incubadas como descrito acima, além de poço com 10 µg/ml de Pam3CSK4 como controle positivo. O controle de isotipo para observação de ligações inespecíficas é representado pela área cinza, células não estimuladas pela linha fina, células estimuladas por 6h pela linha pontilhada e estímulo de 24 h pela linha grossa. Os histogramas são representativos de ao menos três experimentos independentes, referente à contagem de células (eixo y = counts) e eixo x ao log da intensidade de fluorescência medida por filtro FL2-H. Em destaque no gráfico, a% de aumento da intensidade média de fluorescência (%MFI increase) é relativa à apresentada por células não estimuladas.

4.1.5 *NLAC* PorB É LIGANTE DE TLR2

Nme Por B foi descrita como ligante de TLR2 (MASSARI; HENNEKE; HO; et al., 2002f), enquanto *Nlac* PorB ainda não havia sido caracterizada de acordo com seu receptor. Para atestar que *Nlac* PorB é ligante direto de TLR2, células BEAS-2B foram primeiramente incubadas com quantidades crescentes desta proteína marcada com fluorocromo Alexa 594, sendo a intensidade de fluorescência medida por citômetro de fluxo. A fluorescência apresentou relação logarítmica à concentração de *Nlac* PorB na faixa testada (Tabela 3) de equação : fluorescência = 28,076ln (concentração *Nlac* PorB) + 38,941, com R^2 = 0,9956. A concentração de 12,5 µg/ml foi então escolhida por ser a menor concentração com alta fluorescência e desvio padrão aceitável a este tipo de experimento.

Tabela 5 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de porina lactâmica

***Nlac* PorB (µg/ml)**	**Intensidade Média de Fluorescência (MFI) ±**
100	164,5 ± 11,7
50	153,1 ± 12,9
25	128,9± 14,4
12,5	110,1 ± 16,8
6,25	90 ± 23,3
3,12	73,5 ± 25,8
1,6	49,5 ±24,6
0	13,5 ± 3,9

Em seguida, novas células foram incubadas com a quantidade fixada de *Nlac* PorB fluorescente e quantidades crescentes de anti TLR2 ou anticorpo para controle de isotipo. Como esperado, apenas o anticorpo anti TLR2 foi capaz de diminuir a fluorescência apresentada (Tabela 4), enquanto o controle não foi capaz de causar alteração. Na concentração de 100 µg/ml, o anticorpo diminuiu a fluorescência ao valor respectivo a 2,75 µg/ml de *Nlac* PorB fluorescente (de acordo com a equação obtida acima), inibindo portanto a ligação de 78% da quantidade de porina disponível. Abaixo de 12,5 µg/ml, o anticorpo não desloca mais *Nlac* PorB e portanto não diminui a fluorescência.

Tabela 6 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de porina lactâmica

Anti TLR2 (µg/ml)	Intensidade Média de Fluorescência (MFI) ± desvio
100	67,3 ± 11,6
50	78,4 ± 8,6
25	95,1 ± 7,1
12,5	102 ± 3,44
6,25	112 ± 8,1
0	110 ± 16,8

Por último, novas células foram incubadas somente com quantidades crescentes de *Nlac* PorB fluorescente ou quantidade fixa de *Nlac* PorB não marcada ou *Nme* PorB . Porina lactâmica não marcada foi capaz de diminuir a fluorescência, como esperado, ao passo que porina meningocócica não alterou o perfil fluorescente (figura 15). Este resultado mostra que ambas as porinas se ligam de modo diferenciado ao mesmo ligante, o TLR2.

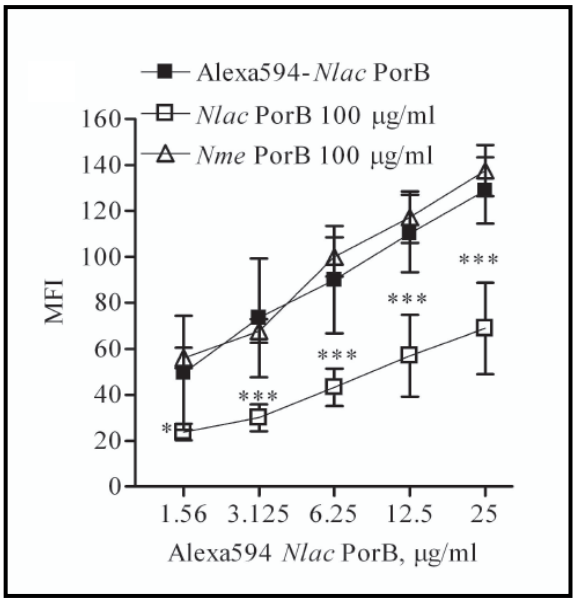

Figura 15 - Intensidade de fluorescência média (MFI) em função da concentração de porina lactâmica.

4.2 PORINA ESTÍMULA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO MODELO

Para que se pudesse analisar o potencial imunomodulador *in vivo* da porina, primeiramente foram comparadas diferentes porinas obtidas no laboratório. O antígeno escolhido foi o Ft-LPS, por ter sido anteriormente estudado pelo grupo e apresentado aumento no título de anticorpos por via subcutânea quando administrado em conjunto com a porina meningocócica (CHIAVOLINI et al., 2010).

4.2.1 ANÁLISE QUALITATIVA DE FT-LPS

O antígeno Ft-LPS (lote teste) foi analisado de acordo com seu teor proteico e de perfil de bandas imunorreativas por Western Blot. Em todos os testes foi comparado ao lote denominado referência, do qual se obteve resultados satisfatórios nas imunizações prévias já publicadas (CHIAVOLINI, 2010). O teor proteico do lote teste, analisado por reação da proteína com reagente de ouro coloidal, se mostrou abaixo da curva padrão de albumina, assim como o lote referência (figura 16). Como o limite da curva padrão (10 µg/ml) equivale a 1% do peso total do lote teste e referência (1 mg/ml), o teor proteico é menor que 1%.

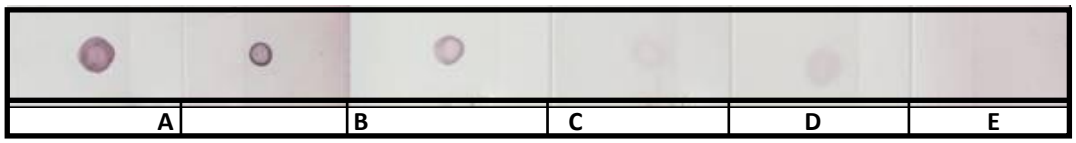

Figura 16 - Teor proteico de Ft-LPS por reação com ouro coloidal
Membrana de PVDF corada com ouro coloidal: **A**. Albumina 50 µg/ml, **B**. Albumina 25 µg/ml, **C.** Albumina 10 µg/ml **D.** Ft-LPS 1 mg/ml lote referência – esterilizado por filtração, **E.** Ft-LPS 1 /ml lote teste – esterilizado por filtração, **F.** PBS.

A análise por Western blot (figura 17) mostrou nos lotes o mesmo padrão de bandas, representativo das frações reconhecidas pelo anticorpo específico. No entanto, o lote teste tem uma concentração maior das frações de baixo peso molecular (abaixo de 15 kDa), quando comparado ao de referência, apesar da massa total aplicada ser a mesma (1 µg).

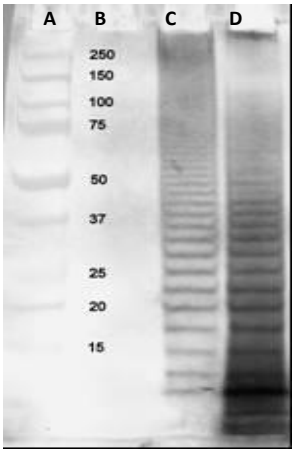

Figura 17 - Ft-LPS western blot.
A. Padrão de peso molecular. **B.** Escala de peso mol. (kDa). **C.** Lote referência de Ft-LPS (1 µg). **D.** Lote teste de Ft-LPS (1 µg).

4.2.2 PORINA MENINGOCÓCICA INDUZ MAIS ANTICORPOS QUE A LACTÂMICA

Os resultados anteriores demonstraram a superioridade de *Nme* PorB em induzir IL-8 em células respiratórias humanas, quando comparada a *Nlac* PorB. Para verificar se o perfil se repetia em relação à produção de anticorpos estimulados por ambas, via intranasal, foi realizado teste de inoculação de camundongos com Ft-LPS como antígeno modelo. O soro coletado foi analisado em relação aos títulos de IgG e IgM por ELISA, e os grupos acima comparados. Os valores dos grupos imunizados com PBS, *Nme* PorB 2 e *Nlac* PorB sem antígeno foram abaixo do limite de detecção e, portanto, não demonstrados nas figuras.

Os níveis de IgM não mostram padrão claro distintivo em função do número de imunizações, mas todos os grupos de adjuvantes apresentaram aumento significativo de IgM quando comparados ao grupo imunizado com antígeno somente (figura 18A). Já a IgG aumenta com o aumento de imunizações, sendo a primeira inoculação insuficiente para que os títulos das formulações teste com adjuvantes se diferenciassem do obtido com o antígeno somente (figura 18B). A *Nme* PorB novamente apresentou maior estimulação do sistema imune, tendo títulos mais altos de IgG e IgM que *Nlac* PorB ao final do esquema de inoculação.

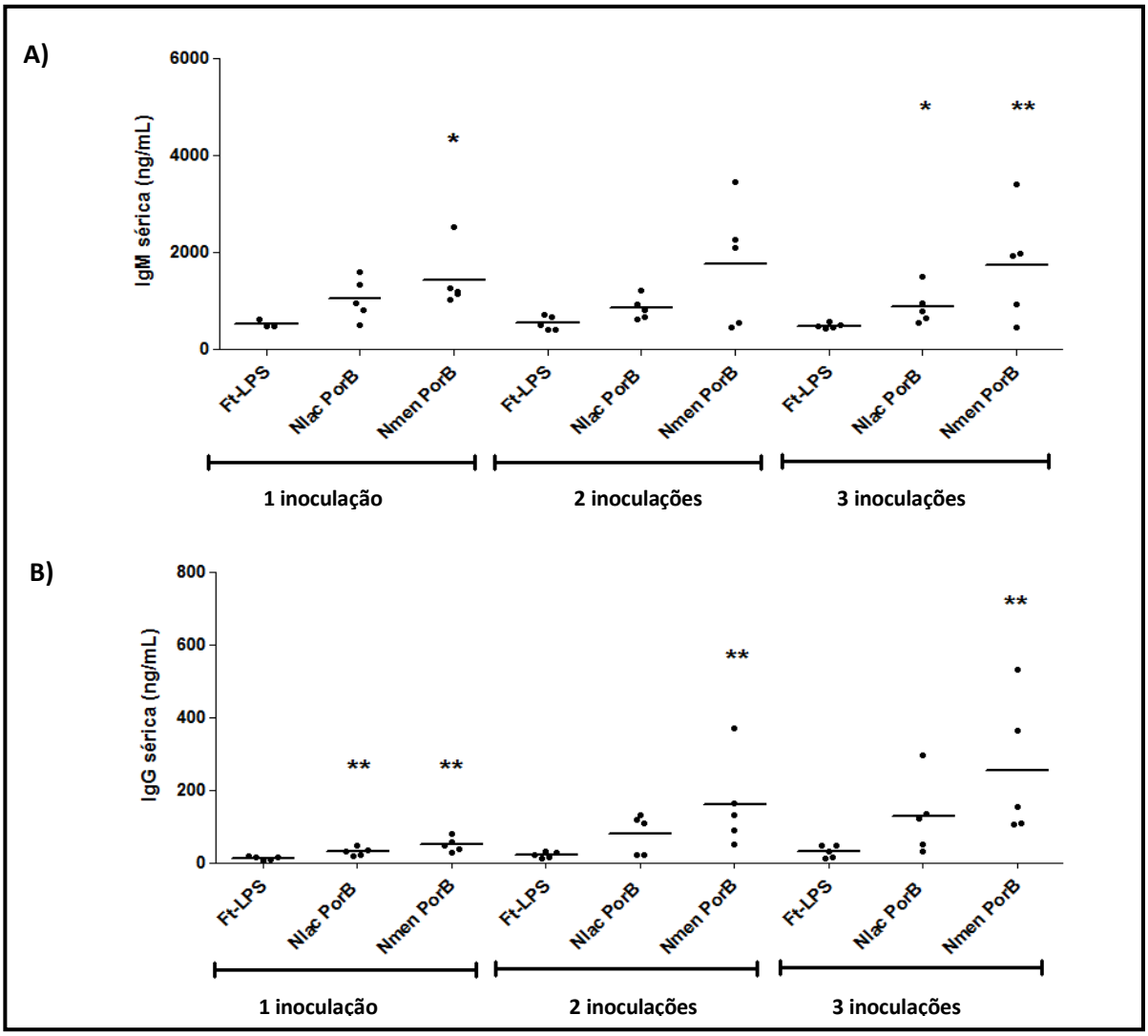

Figura 18 - Quantidade sérica de IgG e IgM de camundongos C57BL/6J imunizados

As amostras de soro foram coletadas 2 dias antes do primeiro reforço (1 inoculação), 2 dias antes do segundo reforço (2 imunizações), e 2 semanas depois do segundo reforço (3 imunizações). Todos os camundongos estão representados pelos círculos pretos e as médias de cada grupo representadas por linhas horizontais pretas. Diferenças consideradas significativas pelo teste t não pareado são identificadas por: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em relação à produção estimulada sem a presença do anticorpo.

4.2.3 PORINA INDUZ MAIS ANTICORPOS QUE OUTROS ADJUVANTES

A porina meningocócica foi substancialmente a melhor porina indutora de resposta imune. Porém, o micro-organismo produtor desta proteína é patogênico, dificultando a produção da mesma. Sendo assim optou-se por trabalhar com a mesma porina produzida em *Escherichia coli* recombinante, e compará-la com adjuvantes experimentais consagrados sendo escolhidos o ODN 1826, QS-21 e rCTB.

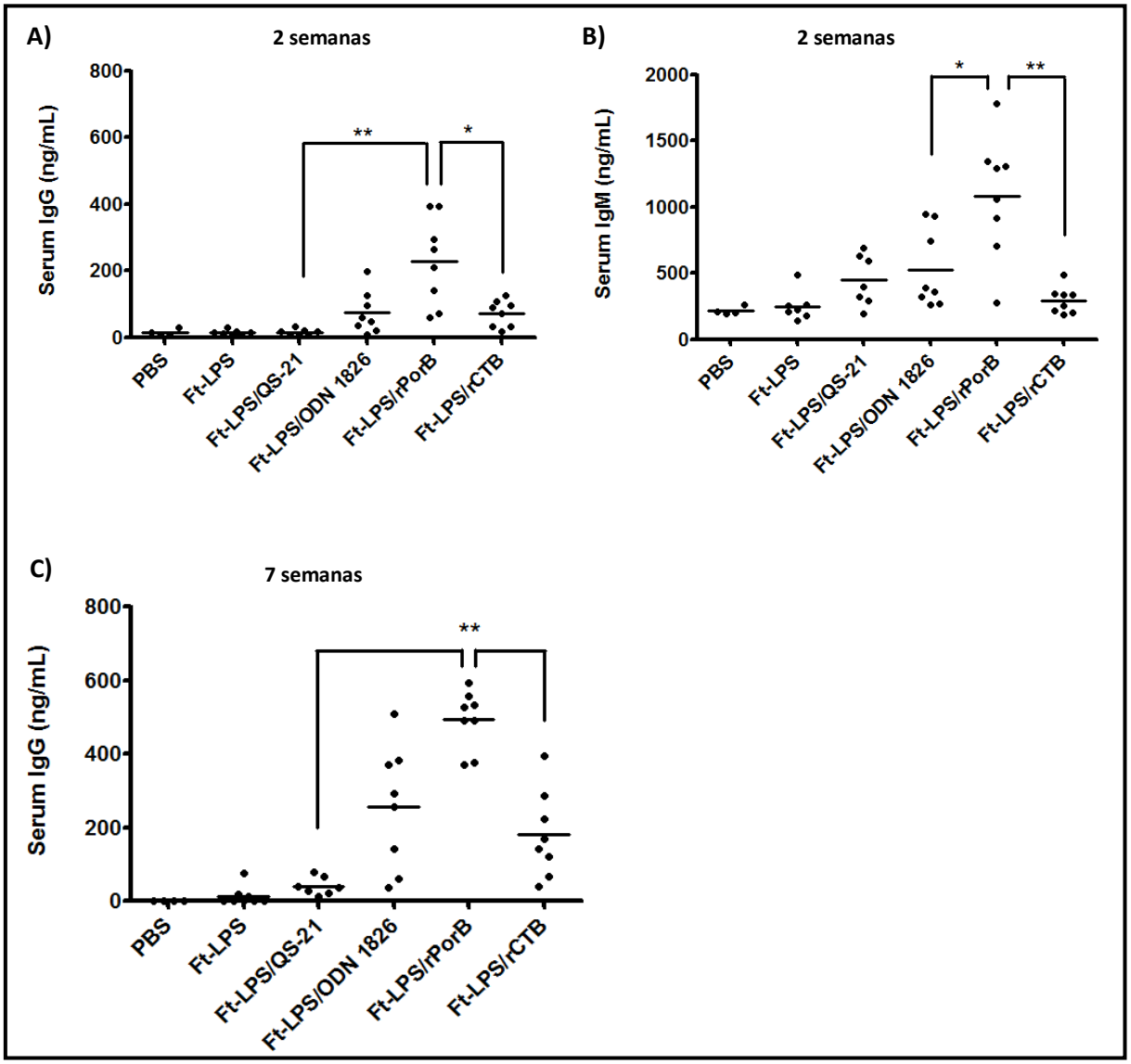

Figura 19 - Quantidade sérica de IgG e IgM de camundongos C57BL/6J imunizados

As amostras de soro foram coletadas 2 semanas depois do segundo reforço (3 imunizações) para os gráficos superiores, e o gráfico inferior foi resultado da coleta 7 semanas após o ultimo reforço. Todos os camundongos estão representados pelos círculos pretos enquanto as médias de cada grupo representadas por linhas pretas. Onde há uma estrela (*) o valor P estatístico é ≤ 0.05, enquanto valores de P ≤ 0.01 são representados por duas estrelas (**).

Todas as formulações teste com adjuvantes apresentaram níveis de anticorpos significativamente maiores que o antígeno, a exceção do nível de IgG do grupo imunizado com QS-21, grupo esse de pior resultado (figura 19A). A inoculação utilizando a porina recombinante teve o maior título de anticorpos de ambas as classes, seguido do grupo com ODN 1826 e logo abaixo rCTB (figura 19A e B).

Apesar de QS-21 ter se mostrado eficiente em estimular produção de IgG por via intranasal em vacina de DNA contra vírus da síndrome de imunodeficiência (WYDE et al., 2001), ainda não havia sido utilizado na literatura sozinho com polissacarídeo e portanto não era previsível sua ação. Além de seu fraco desempenho, foi tóxico na concentração inicial de

10 µg/dose no teste piloto e teve que ser utilizado na concentração de 8 µg/dose, o que indica interação do adjuvante com o antígeno ou a anestesia.

O CPG-DNA é reconhecido como eficiente adjuvante de mucosa (BHAT et al., 2009; NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006) e, após a porina, foi o adjuvante de melhor desempenho. Já rCTB, reconhecido como adjuvante de mucosa de desempenho variável (WU; RUSSELL, 1998), obteve resultados pouco abaixo dos obtidos com ODN 1826. Era esperado algum aumento de imunoglobulinas com a porina, por ter sido esse o resultado obtido em experimentos anteriores do grupo via subcutânea (CHIAVOLINI et al., 2010), mas não que a mesma obtivesse a melhor indução de anticorpos do grupo. Outra surpresa foi o aumento significativo de IgG sete semanas após o último reforço de quase todos os grupos adjuvantes. Essa informação é essencial no caso de um possível desafio desses animais com *Francisella tularensis*, que normalmente é realizado apenas quatro semanas após o fim do esquema de inoculação, tempo em que a quantidade de imunoglobulinas não se diferencia da obtida após duas semanas (dado obtido pelo grupo).

4.3 PORINA COMO ADJUVANTE DO VÍRUS DA RAIVA INATIVADO

4.3.1 PORINA AUMENTA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS INDUZIDA PELO VÍRUS DA RAIVA

A potência das vacinas de raiva é determinada pelo teste do NIH, que se constitui em teste de desafio de camundongos com vírus infectante, onde o resultado deve ser maior ou igual a 2,5 UI (unidades internacionais) por dose. O teste sorológico de neutralização viral *in vitro* RFFIT, por sua vez, é recomendado para análise de potência de imunoglobulinas antivírus da raiva. Em estudo comparativo foi demonstrada boa correlação entre o teste NIH e o RFFIT, onde todas as vacinas reprovadas no teste *in vivo* também reprovaram no teste sorológico (KRAMER et al., 2009). O teste do NIH, apesar de obrigatório para liberação de lotes de vacinas humanas, demanda um grande número de camundongos e desafio intracerebral. Sendo assim, o teste RFFIT foi escolhido para verificar se a porina recombinante pode potencializar a resposta imune obtida com vírus da raiva inativado. O

adjuvante ODN 1826, da classe dos oligodesoxinucleotídeos, também foi utilizado combinado ou não com a porina, pois essa classe foi relatada como potencializadora da resposta induzida por este antígeno viral. Análise de IgG total foi realizada para qualificação desta resposta humoral.

A via intraperitonial é a via utilizada para comparação de potência vacinal no teste NIH, mas não é via utilizada nem para humanos nem para animais na prática clínica. Por esse fato, para as inoculações deste estudo foram escolhidas as vias subcutânea e intranasal, sendo a última ainda não estudada com este antígeno. O esquema de inoculação escolhido foi o de 0, 7 e 28 dias, com 8 camundongos por grupo.

Todos os camundongos inoculados por via subcutânea apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes acima de 0,5 UI/ml (exceto o controle negativo), a partir da segunda inoculação (figura 20). De acordo com a OMS, para ser considerado imunizado o título de anticorpos específicos deve ser maior ou igual a 0,5 UI/ml. (MOORE; HANLON, 2010). Não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos neutralizantes entre os grupos. No entanto, é possível verificar que, após a segunda inoculação, o grupo que recebeu o vírus da raiva inativado (RVI) + rPorB + ODN 1826 teve o maior número de camundongos com títulos mais altos (figura 20A). Ao final do experimento, VRI + rPorB é o grupo com maior número de camundongos com altos títulos (figura 20B).

A inoculação por via intranasal resultou em camundongos com títulos abaixo de 0,5 UI/ml após a segunda inoculação (dados não mostrados). Ao final de três inoculações, 50% dos camundongos do grupo sem adjuvante continuavam abaixo ou nessa marca, enquanto o grupo adicionado de rPorB teve apenas 1 camundongo abaixo de 0,5 UI/ml, além de média de quantidade de anticorpos do grupo significativamente mais alta que quando sem adjuvante. O grupo com porina por via intranasal não alcançou os altos níveis da resposta alcançados por via subcutânea, porém foi utilizado aproximadamente um terço da quantidade de antígeno utilizado na inoculação subcutânea. A quantidade de antígeno via nasal foi a maior possível em termos técnicos, pois foram aplicados 25 µl de formulação em cada dose de solução concentrada de antígeno disponível, quantidade próxima do limite de líquido absorvido por essa via (VISWESWARAIAH et al., 2002).

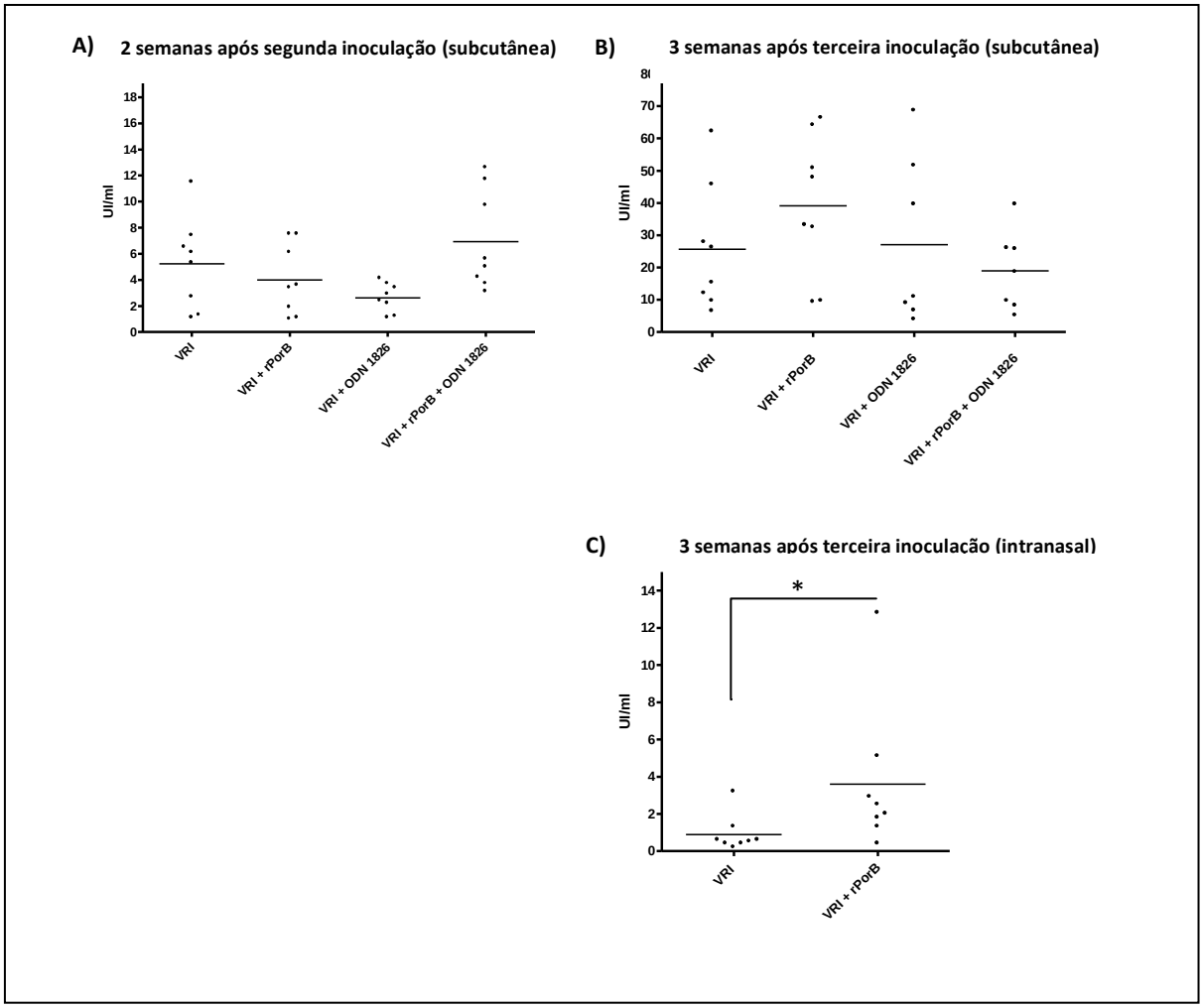

Figura 20 - Quantidade sérica de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva

As amostras de soro foram coletadas 2 semanas depois da segunda inoculação (gráfico A – via subcutânea), e 3 semanas após a última inoculação (gráfico B subcutânea e C intranasal), com oito camundongos por grupo. Cada camundongo está representado em seu grupo, e as médias de cada grupo estão representadas por linhas pretas. Onde há uma estrela (*) o valor P estatístico é ≤ 0.05.

Foi feita análise de IgG total sérica reconhecedora do vírus da raiva inativado, no intuito de correlacionar esse tipo de imunoglobulina com o título de anticorpos neutralizantes, em todos os camundongos da análise anterior (figura 21). A imunoglobulina foi escolhida por ser a dominante e de maior afinidade depois de inoculação com o vírus inativado (BRINKMAN et al., 2003). Os grupos com adjuvantes por via subcutânea apresentaram as absorbâncias mais altas nas curvas de titulação, seguido do grupo inoculado apenas com o vírus. Esse perfil difere um pouco do apresentado pelos anticorpos neutralizantes, onde não há essa distinção. Já os perfis de títulos de anticorpos IgG induzidos via intranasal foram comparativos aos títulos de anticorpos neutralizantes, pois o grupo

vacinado com porina apresenta absorbâncias significativamente mais altas que o grupo vacinado apenas com o vírus.

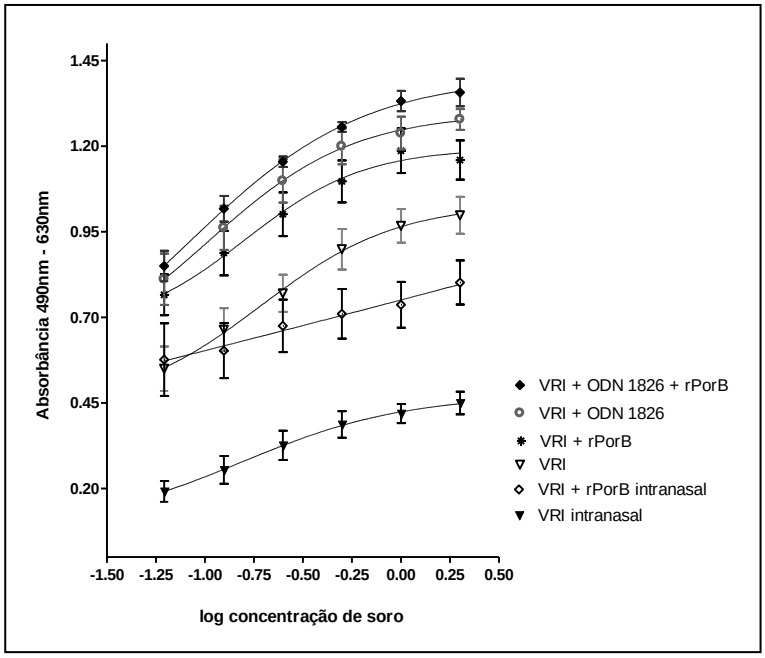

Figura 21 - Análise de IgG sérica murina

As amostras de soro foram coletadas 3 semanas após a última inoculação. Cada ponto da curva representa a média da absorbância dos oito camundongos por grupo, referente a diluição representada. Cada barra de erros representa o desvio padrão da cada média.

A diferença de inclinação nas curvas de diluição se deve ao fato de haver diferentes subtipos de IgG induzidos, tendo cada subtipo uma dinâmica e cinética de ligação diferente pelo antígeno, refletida na absorbância da diluição. De modo geral, o perfil de IgG acompanhou o perfil de anticorpos neutralizantes, mas as discrepâncias provavelmente se devem ao fato do conjunto de subtipos induzidos ser diferente entre os grupos.

4.3.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR *IN VITRO* EM ESPLENÓCITOS

O vírus da raiva inativado induz produção de anticorpos protetores, motivo pelo qual é o único constituinte imunomodulador da maioria das vacinas de raiva. O que não está claro é a correlação da imunidade celular com esta proteção. No intuito de analisar este aspecto, 3 baços de camundongos por grupo, pré-inoculados com as formulações teste de acordo com o esquema de inoculação estabelecido (ítem 3.2.8), foram processados 3 semanas após última inoculação. Os esplenócitos obtidos de cada grupo foram combinados e cultivados *in vitro* em triplicata para reestímulo com o antígeno (ítem 3.2.9). Os linfócitos T, responsáveis pela resposta imune celular, foram identificados por CD3/CD4 e CD3/CD8 dentro do grupo dos esplenócitos totais. Grupos de inoculação intranasal não foram testados. Após cinco dias de incubação, não houve proliferação significativa de linfócitos T quando comparados às células não reestimuladas com o antígeno (Tabela 7,8 e figura 21). O experimento foi repetido em seguida e o mesmo resultado obtido. O controle positivo foi eficiente nas duas amostras, o que exclui a possibilidade de falha do método. Como foi mostrada anteriormente a produção de anticorpos nestes grupos de camundongos, a possibilidade de inoculações insuficientes ao estímulo de resposta imune também fica excluída.

Na revisão bibliográfica feita, apenas um artigo relatou a proliferação de linfócitos frente ao vírus da raiva inativada em camundongos (WIKTOR; DOHERTY; KOPROWSKI, 1977). Apesar de o autor afirmar que há proliferação após quatro a seis dias de incubação, o método de análise e o vírus da raiva inativado foram diferentes do usado neste experimento, além do vírus não ser purificado e não apresentar qualquer tipo de controle de qualidade. Por outro lado, relatos mais recentes afirmam proliferação de linfócitos em humanos pré-vacinados, mas derivados do sangue e não de baço. A proliferação, no entanto, é pequena ou insignificante no quinto dia, chegando ao seu pico entre o sexto e oitavo dia de proliferação (GHAFFARI et al., 2001; MOORE et al., 2006), a exceção de um grupo com proliferação satisfatória em cinco dias (BRINKMAN et al., 2003). Como o tempo de estímulo utilizado neste experimento foi o padrão (cinco dias), é possível que houvesse proliferação se o tempo de incubação fosse maior, ou ainda se fosse utilizada outra fonte de linfócitos como sangue ou linfonodos.

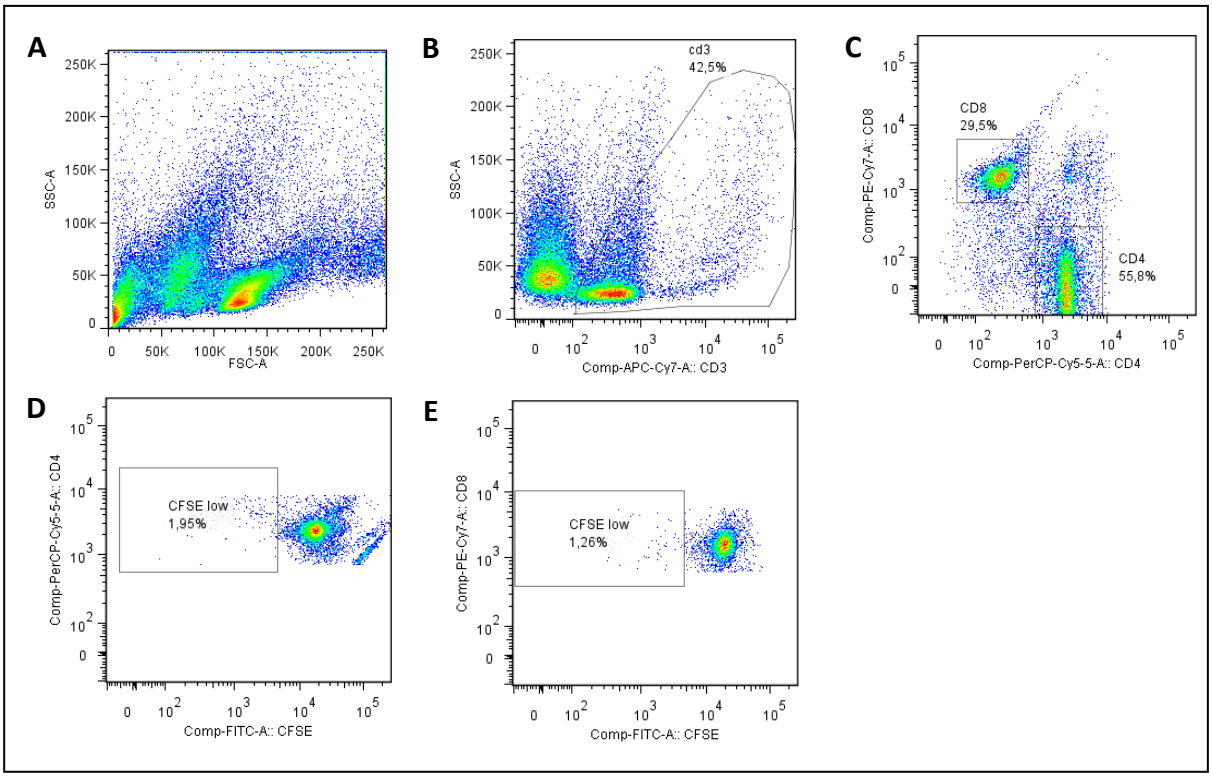

Figura 22 - Proliferação de linfócitos marcados com CFSE e analisados por FACS

Para análise por FACS e obtenção da proporção de linfócitos que proliferaram, as células foram inicialmente visualizadas como um todo em gráfico por tamanho (SSC-A) e granulosidade (FSC-A) (gráfico A). As cores representam a densidade celular, partindo de alta densidade (vermelho) a baixa densidade (azul). Em seguida, foi analisado o gráfico de tamanho celular por fluorescência do anticorpo anti-CD3 APC-Cy7 (gráfico B) para seleção de população positiva para este marcador. Dentro da população positiva para CD3 foi selecionada a população positiva para CD4 (PerCP-Cy5.5) e CD8 (PE Cy7) (gráfico C). Na população positiva para CD4 foi selecionada a população de sinal baixo ou negativo para CFSE (gráfico D – CFSE low), pois a divisão celular também divide a quantidade de rastreador CFSE, diminuindo a intensidade do sinal (eixo X). As células de alta intensidade de CFSE não se dividiram. O mesmo foi feito para a população positiva para CD8 (gráfico E).

Tabela 7 - Frequência de linfócitos CD3+CD4+ que proliferaram pós-incubação (%)

Grupos de inoculação	célula sem estímulo (-)	com ConA (+)	com raiva 20 µg/ml	com raiva 2 µg/ml	com raiva 0,2 µg/ml	com parvovírus
PBS	4,30	20,10	4,50	3,50	4,05	4,74
RVI	1,80	15,40	1,71	2,83	2,75	2,84
RVI + rPorB	0,81	13,79	0,89	1,95	1,08	1,45
RVI +ODN 1826	2,17	14,35	2,58	2,83	2,75	2,34
RVI+rPorB+ODN 1826	1,33	9,55	0,93	0,93	1,86	0,81

Tabela 8 - Frequência de linfócitos CD3+CD8+ que proliferaram pós-incubação (%)

Grupos de inoculação	célula sem estímulo (-)	com ConA (+)	com raiva 20 µg/ml	com raiva 2 µg/ml	com raiva 0,2 µg/ml	com parvovírus
PBS	3,41	22,50	3,81	4,76	4,02	3,45
RVI	0,83	12,35	2,30	2,24	3,09	3,82
RVI + rPorB	1,08	11,20	1,11	1,26	1,25	1,21
RVI +ODN 1826	4,30	12,50	2,45	2,24	3,09	3,82
RVI+rPorB+ODN 1826	0,67	8,90	0,44	1,94	1,36	0,57

5 CONCLUSÃO

Células epiteliais são frequentemente colonizadas por micro-organismos comensais, pois se o epitélio respondesse a toda bactéria colonizadora, causaria estado inflamatório constante. Por esse fato, apesar de expressar os mesmos PRRs que as células do sistema imune, estes são expressos e regulados de forma diferente (MAYER; DALPKE, 2007). Como exemplo do fenômeno descrito, nosso grupo demonstrou que a bactéria comensal *N. lactamica* induz menor produção de IL-8, IL-6, TNF-α e expressão de TLR2 que a bactéria patogênica *N. meningitidis,* em células epiteliais respiratórias BEAS-2B. *N. lactamica* morta por aquecimento também induziu pouco IL-8, atividade inibida quando o anticorpo anti TLR2 foi utilizado (ANEXO B). Sendo a citocina IL-8 um marcador de inflamação nessas células, a baixa expressão e consequente fraca sinalização por TLR2 expõe um dos mecanismos pelo qual a bactéria comensal consegue colonizar as vias respiratórias.

Nme PorB é ligante de TLR2 e induz ativação celular por este receptor (MASSARI et al., 2006). Como *Nlac* PorB tem estrutura semelhante, havia a possibilidade de ter a mesma ação. De fato, foi mostrado neste estudo que ambas as porinas foram capazes de induzir IL-8 em células epiteliais respiratórias BEAS-2B e Detroit 562, de maneira semelhante às bactérias das quais provêm, em que *Nlac* PorB produz menor quantidade da citocina. A porina lactâmica ainda induziu IL-8, respectivo mRNA e mRNA codificador de TLR2 por menor tempo, frente à porina meningocócica que apresentou indução constante. Por final, a citocina teve sua expressão drasticamente reduzida por anticorpo anti TLR2, o que comprova que a pouca expressão de IL-8 induzida por *Nlac* PorB é consequência da baixa indução de seu gene, relacionado à baixa expressão de TLR2 na membrana celular de BEAS-2B.

A ligação *Nme* PorB / TLR2 foi demonstrada em estudo anterior (MASSARI et al., 2006). Este trabalho comprovou que *Nlac* PorB também se liga a TLR2 na superfície de células BEAS-2B, de maneira dose-dependente, sendo esta ligação inibida por anticorpo anti TLR2. O conjunto de resultado nos leva a crer que ambas as porinas são ligantes de TLR2 e por este receptor estimulam IL-8 em células epiteliais respiratórias, onde o perfil é dependente da expressão de TLR2.

A ligação *Nlac* PorB / TLR2 sofreu competição homóloga, mas inesperadamente não foi deslocada por competição heteróloga com *Nme* PorB, indicando que as porinas se ligam ao TLR2 de maneiras diferentes. Estudos posteriores feitos pelo grupo mostraram que porina lactâmica tem maior afinidade por TLR2 que a meningocócica. A discrepância pode ser decorrente das diferenças de carga apresentadas nas regiões de interação com TLR2, já que foi proposto que as porinas interagem com o receptor por ligações eletrostáticas (TANABE; NIMIGEAN; IVERSON, 2010). Estes resultados nos mostram que, ativando o TLR2 de maneira diferente, *Nlac* PorB induz menos IL-8 por regular negativamente a expressão do receptor em células epiteliais respiratórias, e não por menor afinidade ao mesmo. Os dados referentes às células epiteliais obtidos neste estudo foram agrupados aos obtidos por nosso grupo com micro-organismos vivos e publicados (ANEXO B).

Nme PorB usada como adjuvante protegeu 70% dos camundongos imunizados com Ft-LPS via subcutânea e desafiados com LVS (CHIAVOLINI et al., 2010). Apesar da baixa estimulação de perfil inflamatório em células epiteliais respiratórias, *Nlac* PorB também foi demonstrada como eficiente adjuvante, em adição ao antígeno modelo ovalbumina em camundongos por via subcutânea (LIU; WETZLER; MASSARI, 2008). Sendo o trabalho focado em imunomodulação de mucosas, Ft-LPS foi escolhido como antígeno modelo, para inoculação intranasal de camundongos C57BL/6J, na avaliação de porina lactâmica como alternativa a *Nme* PorB. A avaliação foi feita pelo título de anticorpos, baseada no fato de que soro de camundongos ou humanos obtidos por vacinação com LVS e posteriormente administrados a camundongos os protegeu contra subsequente desafio com LVS (FULOP et al., 2001).

Novamente, *Nlac* PorB teve menor desempenho como estimulante, demonstrado por menor produção de anticorpos IgG/IgM quando comparada a *Nme* PorB. A baixa e curta estimulação inflamatória do epitélio da mucosa pode ter contribuído para este perfil, sendo que estudos posteriores devem ser realizados para verificar este fator e analisar se o perfil se repete em células dendríticas, principais APC, e células B, produtoras dos anticorpos.

O risco da manipulação do organismo patogênico *Neisseria meningitidis* para produzir *Nme* PorB obscurece as vantagens de sua aplicação. Apesar de *Nlac* PorB ser produzida por organismo não patogênico, não obteve mesma produção de anticorpos. A alternativa encontrada foi a de utilização de mesma porina, porém produzida de modo recombinante em *E. coli* não patogênica (rPorB). Para atestar sua eficiência, rPorB foi comparada no

mesmo modelo com os adjuvantes QS-21, rCTB e ODN-1826, tendo apresentado o maior título de IgM/IgG entre todos os grupos, duas semanas após completado o esquema vacinal. Seu efeito na produção de IgG foi aumentado dois meses após a última inoculação, ressaltando a importância de períodos mais longos entre a vacinação e o desafio microbiano.

Mais estudos de caracterização da imunogenicidade como subtipos de IgG e poder de neutralização de anticorpos não puderam ser realizados por limitação do micro-organismo LVS, fonte de Ft-LPS. No período de experimentação no exterior a licença do laboratório para trabalhar com LVS não foi renovada, já que a nova administração da comissão interna de biossegurança da universidade exigiu resultados validados de comprovação genética da atenuação desta cepa, não existentes na época.

O estudo de imunogenicidade relatado nessa tese foi base para o posterior desafio realizado por nosso grupo, mostrando que rPorB via intranasal foi capaz de proteger 70% dos camundongos de desafio com LVS (CHIAVOLINI et al., 2010), a mesma taxa de proteção obtida com a porina meningocócica nativa por via subcutânea (CHIAVOLINI et al., 2010). Para que fosse possível comparar ambos os esquemas, foi mantido o desafio após quatro semanas de término do esquema de inoculação, mas o título de anticorpos IgG pré-desafio se encontrava mais baixo que os obtidos neste trabalho com intervalo de dois meses. Digno de nota, a imunização não previne a instalação inicial da infecção, mas sim a morbidade severa e consequente mortalidade. Análise dos pulmões de camundongo protegidos da doença apresentaram agregados linfocitários nas áreas perivasculares e peribronquiais, características de tecido induzido linfoide associado aos brônquios (iBALT). Essas áreas apresentaram linfócitos B e T proliferativos, centros germinais, infiltrados de células T, e células dendríticas. Os resultados *in vivo* coletivamente mostram que rPorB tem desempenho equiparável a proteína homóloga nativa e alto potencial como adjuvante de mucosa, tendo a indução de BALT correlacionada à proteção. Os resultados de imunogenicidade deste estudo foram somados aos de desafio e necropsia realizados pelo nosso grupo e transformado em artigo (ANEXO C: (CHIAVOLINI et al., 2010)).

Os resultados obtidos por via intranasal com antígeno da raiva repetiram o fenômeno demonstrado com o Ft-LPS, em que houve aumento dos títulos de IgG contra o antígeno quando a porina foi utilizada como adjuvante. O ensaio biológico dos anticorpos por RFFIT comprovaram a funcionalidade dos anticorpos gerados, neutralizando a infectividade viral em células BHK-21. O uso da porina por via subcutânea não aumentou o nível de anticorpos

neutralizantes, mas aumentou o de IgG, o que pode ser traduzido em maior tempo de proteção, parâmetro não avaliado nesta tese. O próximo passo, partindo das conclusões desta tese, é estudar a duração dos títulos de anticorpos protetores e subtipos de IgG, no intuito de descobrir o subtipo principal envolvido e se o adjuvante consegue prolongar o tempo que os altos títulos de anticorpos se mantêm.

Não foi detectada imunidade celular específica de linfócitos do baço ao vírus da raiva nos parâmetros avaliados, independente da adição de adjuvantes. Estudos em andamento visam abordar a imunidade celular, modificando a origem dos linfócitos e tempo de incubação para confirmar a ausência de imunidade celular detectável e publicação dos dados.

Em resumo, as porinas foram caracterizadas como relevantes na imunomodulação de células da mucosa respiratória por infecção meningocócica. A modulação também foi relevante para o aumento de resposta humoral frente a diferentes antígenos, por diferentes vias de administração, o que demonstra a eficiência e versatilidade da porina recombinante como adjuvante imunológico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T-cells: the holy grail? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 10-13, 2004.

BALS, R.; HIEMSTRA, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **European Respiratory Journal**, v. 23, n. 2, p. 327 -333, 2004.

BENNETT, J. S.; CALLAGHAN, M. J.; DERRICK, J. P.; MAIDEN, M. C. J. Variation in the Neisseria lactamica porin, and its relationship to meningococcal PorB. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1525-1534, 2008.

BERLIN, B. S. Rabies Vaccine Adsorbed: neutralizing antibody titers after three-dose pre-exposure vaccination. **American Journal of Public Health**, v. 80, n. 4, p. 476-478, 1990.

BÉRUBÉ, J.; BOURDON, C.; YAO, Y.; ROUSSEAU, S. Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 3, p. 448-456, 2009.

BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-1407, 2009.

BHAT, A. A.; SETH, R. K.; BABU, J.; BISWAS, S.; RAO, D. N. Induction of mucosal and systemic humoral immune responses in murine system by intranasal immunization with peptide antigens of P. vivax and CpG oligodeoxynucleotide (ODN) in microparticle delivery. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1197-1208, 2009.

BIRCHLER, T.; SEIBL, R.; BÜCHNER, K. et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 11, p. 3131-3137, 2001.

BITSAKTSIS, C.; RAWOOL, D.; LI, Y; et al. Differential Requirements for Protection against Mucosal Challenge with Francisella tularensis in the Presence versus Absence of Cholera Toxin B and Inactivated F. tularensis. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, v. 182, n. 8, p. 4899-4909, 2009.

BJERKNES, R.; GUTTORMSEN, H.; SOLBERG, C.; WETZLER, L. Neisserial porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression, and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 1, p. 160-167, 1995.

BLUMENTHAL, A.; KOBAYASHI, T.; PIERINI, L. M. et al. RP105 Facilitates Macrophage Activation by Mycobacterium tuberculosis Lipoproteins. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 1, p. 35-46, 2009.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S33-S40, 2010.

BOTTAZZI, B.; DONI, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 157-183, 2010.

BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; RUSSELL, M W. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 31-37, 2008.

BRINKMAN, D. M. C.; ZIJDE, C. M. J.-V. D.; DAM, M. M. T. et al. Vaccination with Rabies to Study the Humoral and Cellular Immune Response to a T-Cell Dependent Neoantigen in Man. **Journal of Clinical Immunology**, v. 23, n. 6, p. 528-538, 2003.

CARREÑO, L. J.; GONZÁLEZ, P. A.; KALERGIS, A. M. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 47-64, 2006.

CHEN, W.; PATEL, G. B.; YAN, H.; ZHANG, J. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems. **Human Vaccines**, v. 6, n. 9, 2010.

CHIAVOLINI, D; WEIR, S; MURPHY, J.; WETZLER, L. Neisseria meningitidis PorB, a Toll-like receptor 2 ligand, improves the capacity of Francisella tularensis lipopolysaccharide to protect mice against experimental tularemia. **CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY**, v. 15, n. 9, p. 1322-1329, 2008.

CHIAVOLINI, DAMIANA; RANGEL-MORENO, J.; BERG, G. et al. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) and Survival in a Vaccine Mouse Model of Tularemia. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11156, 2010.

CLARK, R.; KUPPER, T. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. **J Investig Dermatol**, v. 125, n. 4, p. 629-637, 2005.

CLARK, S. O.; KELLY, D. L. F.; BADELL, E. et al. Oral delivery of BCG Moreau Rio de Janeiro gives equivalent protection against tuberculosis but with reduced pathology compared to parenteral BCG Danish vaccination. **Vaccine** 2010.

CONLAN, J. W.; SHEN, H.; WEBB, A.; PERRY, M. B. Mice vaccinated with the O-antigen of Francisella tularensis LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. **Vaccine**, v. 20, n. 29-30, p. 3465-3471, 2002.

CONLAN, J. W.; VINOGRADOV, E.; MONTEIRO, M. A.; PERRY, M. B. Mice intradermally-inoculated with the intact lipopolysaccharide, but not the lipid A or O-chain, from Francisella tularensis LVS rapidly acquire varying degrees of enhanced resistance against systemic or aerogenic challenge with virulent strains of the pathogen. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 1, p. 39-45, 2003.

CURTIN, J. F.; LIU, N.; CANDOLFI, M. et al. HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. **PLoS Med**, v. 6, n. 1, p. e1000010, 2009.

DACHEUX, L.; DELMAS, O.; BOURHY, H. Human rabies encephalitis prevention and treatment: progress since Pasteur's discovery. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 251-299, 2011.

DATTA, S. K.; SABET, M.; NGUYEN, K. P. L. et al. Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 23, p. 10638 -10643, 2010.

DEBERTIN, A. S.; TSCHERNIG, T.; TÖNJES, H. et al. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 134, n. 3, p. 503-507, 2003.

DEENICK, E. K.; MA, C. S.; BRINK, R.; TANGYE, S. G. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 111-118, 2011.

DERRICK, J. P.; URWIN, R.; SUKER, J.; FEAVERS, I. M.; MAIDEN, M. C. ⁄J. Structural and Evolutionary Inference from Molecular Variation in Neisseria Porins. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 5, p. 2406-2413, 1999.

DIETRICH, N.; LIENENKLAUS, S.; WEISS, S.; GEKARA, N. O. Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. **PloS One**, v. 5, n. 4, p. e10250, 2010.

DIETZSCHOLD, B.; LI, J.; FABER, M.; SCHNELL, M. Concepts in the pathogenesis of rabies. **Future virology**, v. 3, n. 5, p. 481-490, 2008.

DONOVAN, J.; BROWN, P. Blood collection. **Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan**, v. Chapter 1, p. Unit 1.7, 2006.

ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, n.9, p.e515, 2009.

FAGARASAN, S.; HONJO, T. T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 89-92, 2000.

FAZILLEAU, N.; MARK, L.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Follicular helper T cells: lineage and location. **Immunity**, v. 30, n. 3, p. 324-335, 2009.

FEIJOÓ, E.; ALFARO, C.; MAZZOLINI, G. et al. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. **International Journal of Cancer**, v. 116, n. 2, p. 275-281, 2005.

FLO, TRUDE H.; HALAAS, O.; TORP, S. et al. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 3, p. 474-481, 2001.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. L. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, n. 4, p. 511-517, 2004.

FULOP, M.; MASTROENI, P.; GREEN, M.; TITBALL, R W. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4465-4472, 2001.

GEROLD, G.; AJAJ, K. A.; BIENERT, M. et al. A Toll-like receptor 2-integrin [beta] 3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. **Nat Immunol**, v.9, n.7, p.761-768, 2008.

GHAFFARI, G. et al. Human Lymphocyte Proliferation Responses following Primary Immunization with Rabies Vaccine as Neoantigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 880-883, 2001.

GOLDRATH, A. W.; BEVAN, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**, v. 402, n. 6759, p. 255-262, 1999.

GOLOVLIOV, I. et al. Adjuvanticity of ISCOMs incorporating a T cell-reactive lipoprotein of the facultative intracellular pathogen Francisella tularensis. **Vaccine**, v. 13, n. 3, p. 261-267, 1995.

DE GREGORIO, E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 339-345, 2009.

GROSCURTH, P.; FILGUEIRA, L. Killing Mechanisms of Cytotoxic T Lymphocytes. **Physiology**, v. 13, n. 1, p. 17 -21, 1998.

GUAN, Y. et al. Human TLRs 10 and 1 Share Common Mechanisms of Innate Immune Sensing but Not Signaling. **J Immunol**, p. jimmunol.0901888, 2010.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nat Rev Micro**, v. 5, n. 7, p. 505-517, 2007.

HANIUDA, K.; NOJIMA, T.; OHYAMA, K.; KITAMURA, D. Tolerance Induction of IgG+ Memory B Cells by T Cell-Independent Type II Antigens. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5620 - 5628, 2011.

HANNA, J. et al. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 11, p. 1612-1623, 2004.

HARTLEY, M. G. et al. Protection afforded by heat shock protein 60 from Francisella tularensis is due to copurified lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4109-4113, 2004.

HAURI, A. M.; ARMSTRONG, G. L.; HUTIN, Y. J. F. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. **International Journal of STD & AIDS**, v. 15, n. 1, p. 7-16, 2004.

HOMMA, T. et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 463-469, 2004.

HOOPER, D. C.; PHARES, T. W.; FABIS, M. J.; ROY, A. The Production of Antibody by Invading B Cells Is Required for the Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. (C. E. Rupprecht, Org.)**PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.10, p. e535, 2009.

HORNBECK, P. Enzyme-linked immunosorbent assays. **Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan**, v. Chapter 2, p. Unit 2.1, 2001.

IP, W.; TAKAHASHI, K.; MOORE, K.; STUART, L.; EZEKOWITZ, R. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, v. 205, n. 1, p. 169-181, 2008.

ITO, N. et al. Role of Interferon Antagonist Activity of Rabies Virus Phosphoprotein in Viral Pathogenicity. **J. Virol.**, v. 84, n. 13, p. 6699-6710, 2010.

JAHNSEN, F. L. et al. Accelerated Antigen Sampling and Transport by Airway Mucosal Dendritic Cells following Inhalation of a Bacterial Stimulus. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 5861-5867, 2006.

JIMENEZ-DALMARONI, M. J.et al. Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7411, 2009.

JIN, M. S. et al. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1071-1082, 2007.

JIN, M. S.; LEE, J.-O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 182-191, 2008.

JOHNSON, N.; CUNNINGHAM, A. F.; FOOKS, A. R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3896-3901, 2010.

KOZASA, T. et al. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for the detection of adventitious viruses from biological products. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 39, n. 4, p. 242-248, 2011.

KRAMER, B.; SCHILDGER, H.; BEHRENSDORF-NICOL, H.; HANSCHMANN, K.; DUCHOW, K. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. **BIOLOGICALS**, v. 37, n. 2, p. 119-126, 2009.

KRIEG, A. M. Toll-free vaccines? **Nat Biotech**, v. 25, n. 3, p. 303-305, 2007.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 621-625, 2009.

LATZ, E; FRANKO, J.; GOLENBOCK, D.; SCHREIBER, J. Haemophilus influenzae type b-outer membrane protein complex glycoconjugate vaccine induces cytokine production by engaging human Toll-like receptor 2 (TLR2) and requires the presence of TLR2 for optimal immunogenicity. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, v. 172, n. 4, p. 2431-2438, 2004.

LEULIER, F.; LEMAITRE, B. Toll-like receptors - taking an evolutionary approach. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 3, p. 165-178, 2008.

LI, Y. et al. Immunization with Live Neisseria lactamica Protects Mice against Meningococcal Challenge and Can Elicit Serum Bactericidal Antibodies. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6348-6355, 2006.

LIANG, S. et al. Ganglioside GD1a Is an Essential Coreceptor for Toll-like Receptor 2 Signaling in Response to the B subunit of Type IIb Enterotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7532-7542, 2007.

LIEN, E. et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.47, p. 33419-33425, 1999.

LIEW, F. Y.; XU, D.; BRINT, E. K.; O'NEILL, L. A. J. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 6, p. 446-458, 2005.

LIN, H.; PERRIN, P. [Influence of aluminum adjuvant to experimental rabies vaccine]. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi = Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi = Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology**, v. 13, n. 2, p. 133-135, 1999.

LIU, X.; WETZLER, L. M.; MASSARI, P. The PorB porin from commensal Neisseria lactamica induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. **Vaccine**, v. 26, n. 6, p. 786-796, 2008.

LIU, X.; WETZLER, L. M.; DE OLIVEIRA NASCIMENTO, L.; MASSARI, P. Human airway epithelial cell responses to Neisseria lactamica and purified porin via TLR2-dependent signaling. **Infection and Immunity,** 2010.

MACKINNON, F. G. et al. The Role of B/T Costimulatory Signals in the Immunopotentiating Activity of Neisserial Porin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 3, p. 755-761, 1999.

MADDUR, M. S.; KAVERI, S. V.; BAYRY, J. Basophils as antigen presenting cells. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 2, p. 45-48, 2010.

MARCIANI, D. J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 20, p. 934-943, 2003.

MARICHAL, T. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 996-1002, 2011.

MASATANI, T. et al. Rabies Virus Nucleoprotein Functions To Evade Activation of the RIG-I-Mediated Antiviral Response. **J. Virol.**, v. 84, n. 8, p. 4002-4012, 2010.

MASSARI, P.; GUNAWARDANA, J.; LIU, X.; WETZLER, L. M. Meningococcal Porin PorB Prevents Cellular Apoptosis in a Toll-Like Receptor 2- and NF-{kappa}B-Independent Manner. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 3, p. 994-1003, 2010.

MASSARI, P. et al. Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-Like Receptor 2 and MyD88 Dependent. **J Immunol**, v. 168, n. 4, p. 1533-1537, 2002.

MASSARI, P.; KING, C. A.; MACLEOD, H.; WETZLER, L. M. Improved purification of native meningococcal porin PorB and studies on its structure/function. **Protein Expression and Purification**, v. 44, n. 2, p. 136-146, 2005.

MASSARI, P.; RAM, S.; MACLEOD, H.; WETZLER, L. M. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 87-93, 2003.

MASSARI, P. et al. Meningococcal Porin PorB Binds to TLR2 and Requires TLR1 for Signaling. **J Immunol**, v. 176, n. 4, p. 2373-2380, 2006.

MAYER, A. K.; BARTZ, H.; FEY, F.; SCHMIDT, L. M.; DALPKE, A. H. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 1689-1699, 2008.

MAYER, A. K.; DALPKE, A. H. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 6, p. 353-362, 2007.

MEDZHITOV, RUSLAN. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.

MEDZHITOV, R; PRESTONHURLBURT, P.; JANEWAY, C. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **NATURE**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MÉNAGER, P. et al. Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Plays a Major Role in the Formation of Rabies Virus Negri Bodies. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000315, 2009.

MITKA, M. CDC Advisors Suggest Streamlining Postexposure Prophylaxis for Rabies. **JAMA**, v. 303, n. 16, p. 1586, 2010.

MOORE, S. M.; HANLON, C. A. Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 3, p. e595, 2010.

MOORE, S. M.; WILKERSON, M. J.; DAVIS, R. D.; WYATT, C. R.; BRIGGS, DEBORAH J. Detection of Cellular Immunity to Rabies Antigens in Human Vaccinees. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 6, p. 533-545, 2006.

DE MOURA, W.C.; GALLINA, N.M. F.; FUCHES, R.M.M.; ROMIJN, P.C.; LEITE, J.P.G. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1-2, p. 7-13, 2008.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 148-158, 2006.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. **Science**, v. 327, n. 5969, p. 1098 -1102, 2010.

OHMORI, K.; MASUDA, K.; DEBOER, D. J.; SAKAGUCHI, M.; TSUJIMOTO, H. Immunoblot analysis for IgE-reactive components of fetal calf serum in dogs that developed allergic reactions after non-rabies vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 166-171, 2007.

OYSTON, P. C. F.; QUARRY, J. E. Tularemia vaccine: past, present and future. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 4, p. 277-281, 2005.

OYSTON, P. C. F.; SJOSTEDT, ANDERS; TITBALL, RICHARD W. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 12, p. 967-978, 2004.

PALANIYAR, N. Antibody equivalent molecules of the innate immune system: parallels between innate and adaptive immune proteins. **Innate Immunity**, v.16, n.3, p.131 -137, 2010.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 488-496, 2004.

PETROVSKY, N.; HEINZEL, S.; HONDA, Y.; LYONS, A. B. New-Age Vaccine Adjuvants: Friend or Foe? **Biopharm International**, v. AOU, pp. 24-33, SUP, 2007.

PLIKAYTIS, B. D.; TURNER, S. H.; GHEESLING, L. L.; CARLONE, G. M. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate Neisseria meningitidis group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1439-1446, 1991.

QI, H. L.; TAI, J. Y.; BLAKE, M S. Expression of large amounts of neisserial porin proteins in Escherichia coli and refolding of the proteins into native trimers. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2432-2439, 1994.

RAHIM, A.; KUPPUSWAMY, K.; THOMAS, B.; RAPHAEL, L. Intradermal Cell Culture Rabies Vaccine: A Cost Effective Option in Antirabies Treatment, v.35, n.3, p.443-444, 2010.

RAUX, H.; FLAMAND, A.; BLONDEL, D. Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. **J. Virol.**, v. 74, n. 21, p. 10212-10216, 2000.

REGAMEY, N. et al. Airway Epithelial IL-15 Transforms Monocytes into Dendritic Cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 37, n. 1, p. 75-84, 2007.

ROY, C. R. Immunology: Professional secrets. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 351-352, 2003.

SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 143-156, 2007.

SCHEIBNER, K. et al. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, v. 177, n. 2, p. 1272-1281, 2006.

SCHNELL, M. J.; MCGETTIGAN, J. P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nat Rev Micro**, v. 8, n. 1, p. 51-61, 2010.

SCHNITZLER, A. C.; BURKE, J. M.; WETZLER, L. M. Induction of Cell Signaling Events by the Cholera Toxin B Subunit in Antigen-Presenting Cells. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 3150-3159, 2007.

SCHULZ, C. et al. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 56, n. 3, p. 294-302, 2002.

SHA, Q.; TRUONG-TRAN, A. Q.; PLITT, J. R.; BECK, L. A.; SCHLEIMER, R. P. Activation of Airway Epithelial Cells by Toll-Like Receptor Agonists. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 358-364, 2004.

SPRENT, J.; SURH, C. D. T CELL MEMORY. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 551-579, 2002.

STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; BODE, C.; KLINMAN, D. M. TLR-based immune adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3341-3355, 2011.

TANABE, M.; NIMIGEAN, C. M.; IVERSON, T. M. Structural basis for solute transport, nucleotide regulation, and immunological recognition of Neisseria meningitidis PorB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 15, p. 6811-6816, 2010.

DI TOMMASO, A. et al. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 974-979, 1996.

TRIANTAFILOU, M. et al. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.41, p. 31002-31011, 2006.

TRONCOSO, G.; SANCHEZ, S.; CRIADO, M.; FERREIRA, C. Analysis of *Neisseria lactamica* antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 2002.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S24-S32, 2010.

VISWESWARAIAH A. et al. Tracking the tissue distribution of marker dye following intranasal delivery in mice and chinchillas: a multifactorial analysis of parameters affecting nasal retention. **Vaccine**, v.20, p.3209-3220, 2002.

WACK, A.; RAPPUOLI, RINO. Vaccinology at the beginning of the 21st century. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 411-418, 2005.

WANG, X. et al. A CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1893-1901, 2008.

WATTERS, T. M.; KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. J. Structure, function and regulation of the Toll//IL-1 receptor adaptor proteins. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 6, p. 411-419, 2007.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, n.1, p. 409-437, 2006.

WETZLER, L. M. Immunopotentiating Ability of Neisserial Major Outer Membrane Proteins Use As an Adjuvant for Poorly Immunogenic Substances and Potential Use in Vaccines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, n. Microbial Pathogenesis and Immune Response, p. 367-370, 1994.

WIKTOR, T. J.; DOHERTY, P. C.; KOPROWSKI, H. In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.1, p.334-338, 1977.

WU, H. Y.; RUSSELL, M W. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. **Vaccine**, v. 16, n. 2-3, p. 286-292, 1998.

WU, H.-Y.; RUSSELL, MICHAEL W. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. **Vaccine**, v. 16, n. 2-3, p. 286-292,1998.

WYDE, P. R.; GUZMAN, E.; GILBERT, B. E.; COUCH, R. B. Immunogenicity and protection in mice given inactivated influenza vaccine, MPL, QS-21 or QS-7. **International Congress Series**, v. 1219, p. 999-1005, 2001.

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; INAMURA, S.; HEINE, H.; ALEXANDER, C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 205-224, 2008.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A: ARTIGO DE REVISÃO

THE ROLE OF TLR2 IN INFECTION AND IMMUNITY

THE BEGGINING

The first step to respond to a threat is to recognize it. The innate immune system in turn has germline-encoded Pattern Recognition Receptors (PRRs), to detect the pathogen threat and trigger prompt responses against them. This front line binds to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), in general essential for microbe survival and replication like cell wall molecules, toxins, RNA and others. A cascade of events takes place following receptor-molecule binding, which activates host defense mechanisms to defeat the microbe and support the latter and specialized adaptive immune response [1]. A well known group of PRRs since 1990's is the Toll-like receptor (TLR) family [2], proteins highly similar in sequence, widely expressed by a variety of cells in many animal species [3]. To date, 13 TLRs were identified, the first 10 present in the human genome while the mouse genome carries all of them, except TLR10 [4]. Although lately demonstrated in humans for the first time [5], the immune-response system mediated by Tolls represents an ancient host defense mechanism [6].

TLR2 identification, molecular characterization and cloning were first published in 1998, together with TLR1-TLR5 [7]. More than a decade of extensive research pointed TLR2 as extremely important in the vertebrate immune response context, for several reasons. This receptor is the only TLR described so far to form functional heterodimers with more than one type of TLR, besides interaction with a large set of non TLR molecules, which allows recognition of the widest structure variety of PAMPs among its receptor family [8]. This diversity comprises different types of molecules with different microbial origins as viruses, fungus, bacteria and parasites.

TLR2 expression is detected practically in all cells involved with the immune response including mast cells [9], macrophages/monocytes, polymorphonuclear cells, dendritic cells, endothelial cells, epithelial cells, and B and T-lymphocytes[10]. This variety opens a wide range of possible roles for TLR2 according to cell type, besides the ligand nature influence, that are still to be evaluated. To be functional, TLR2 relies on receptor complexes and binding molecules for ligand recognition through TLR2, which are yet to be fully revealed. Numerous recent findings towards these directions motivated this wide examination of TLR2 mechanism of action with its consequent implications in human infectious diseases.

THE CORE: DIMERIZATION AND LIGANDS FOR PATHOGEN RECOGNITION

TLR receptors are type I integral transmembrane glycoproteins that have in common a conserved intracellular TIR (Toll-Interleukin-1 receptor homology) domain, a single transmembrane helix domain and a solenoid ectodomain [11]. The ectodomain is responsible for pathogen recognition and is composed of 16-28 diverse leucine-rich-repeat (LRR) modules [3]. TLRs can be divided into six major families, according to the repeat number of LRRs and the motifs of two cysteine clusters flanking the LRRs [12]. This approach puts TLR2, together with TLR6 and TLR10, members of the TLR1 subfamily [12].

Ligand specific recognition and signaling through TLR2 happens mostly with heterodimerization among its subfamily. TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 are described to be pre-formed, and needed for almost all ligands observed for TLR2. When the co-TLRs are not present, homodimerization of TLR2 was proposed but not observed with present techniques [13]. Newly released investigation observed the existence of TLR2/TLR10 pre formed dimer, though its function is not clear yet [14]. The LRR modules gives the ectodomain a horseshoe shaped structure, and each heterodimer forms an “m” shaped complex with the ligand stabilizing the two receptors. Without the ligand, the pre-formed heterodimers most likely have no interaction between their intracellular moieties and therefore there is no downstream signaling [15]. Interestingly, while TLR1 and TLR10 form dimers only with TLR2 so far, TLR6 was just described to form a heterodimer with TLR4, in response to endogenous ligands, promoting sterile inflammation [16].

TLR2 wide set of ligands includes molecules with diacyl and triacylglycerol moieties, proteins and polysaccharides (Table 1). The diversity related to ligand biochemical structures consequently raise questions about the receptor specificity. For a long time most putative ligands were put in doubt due to possible lipoprotein contamination, and a recent study claims that only lipoproteins/lipopeptides (LPs) are “true” TLR2 ligands sensed at physiological concentrations by the receptor [8]. To attest this contamination, lipoprotein lipase [17,18], boiling [19] and solvent washes [20] had been used, according to the molecular structure and physicochemical properties of the supposed TLR2 ligand. However, some methods were employed without the proper molecular structure analysis, leading to mistaken conclusions. Example of that is the use of lipoprotein lipase to attest contamination in putative ligand preparations of diacylglycerols, like LTA, that are also cleaved by the lipase [21]. Endogenous ligands were described for TLR2 as well, acting like “alarmins”, indicating tissue damage, necrosis or potential tumor cells [22-24]. It seems logical that these molecules could modulate responses to infections in which this type of damage takes place, but no studies, thus far, demonstrate a contribution of endogenous TLR2 ligands in modulating the course of any kind of infection.

Table 1. TLR2 microbial ligands

EF.	LIGAND	ORIGIN	TLR2 RECOGNITION	LIGAND DELIVERY
		BACTERIUM		
5,26	Diacyl lipopeptides (MALP-2/ FSL-1)	*Mycoplasma*	TLR2/TLR6	RP105 (B cells) /CD14/CD36
9,27,28	Heat labile enterotoxins (b subunit)	*Escherichia coli, Vibrio cholerae*	TLR2/TLR1	CD14 /GD1a
5,29	lipomannan / Lipoarabinomannan	*Mycobacterium*	TLR2/TLR1	CD14/CD36
5	Lipoprotein	*Mycobacterium*	TLR2	CD14/CD36/ RP105
	Lipossacaride (LPS)			
5,30,31	Lipoteichoic acid (LTA)	Gram-positive bacteria	TLR2/TLR6	CD14/CD36/MBL
2,33	Peptidoglycan (PG)*	*Staphylococcus*	TLR2	CD14
4-36	Porins	*Neisseria, Salmonella, Shigella*	TLR2/TLR1	unknow
7,38	Triacyl lipopeptides (LPs)	Bacteria	TLR2/TLR1	CD14/vitronectin + integrin β3
		FUNGUS		
9	Glucuronoxylomannan	*Cryptococcus neoformans / gaati*	TLR2/TLR1- TLR2/TLR6	CD-14/Not Dectin-1
0,41	Phospholipomannan	*Candida albicans*	TLR2/TLR6	CD14/Dectin-1
2	Unknow	*Paracoccidioides brasiliensis*	TLR2/?	Dectin-1
3	Unknow	*Penicillium marneffei*	TLR2/?	Dectin-1
	Unknow	Aspergillus fumigatus	TLR2/?	Dectin-1
4	yeast phase-specific protein (Yps3p)	*Histoplasma capsulatum*	TLR2/?	Dectin-1***
0,37,45	Zymosan **	*Saccharomyces cerevisiae*	TLR2/TLR6	CD14/Dectin-1
		PROTOZOAN/HELMINTH		
5,46,47	Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) anchors	Trypanosoma, plasmodium, toxoplasma (protozoans)	TLR2/TLR1**** and TLR4	CD36/(likely) CD14
8	Lipopeptidophosphoglycan	*Entamoeba histolytica* (protozoan)	TLR2/TLR6 and TLR4	
9	Lipophosphoglycan	*Leishmania* (protozoan)	TLR2/?	
0	Lyso-phosphatidylserine	*Schistosoma mansoni, Ascaris lumbricoidis* (helminth)	TLR2/	
		VIRUS		
1	EBV-encoded dUTPase	Epstein-Bar	TLR2/?	Not CD14
2-54	glycoprotein B	Cytomegalovirus	TLR2/TLR6	CD14
5	Hepatitis B Capsid*****	Hepatitis B	TLR2/?	CD14
6	hepatitis C core and NS3 protein	Hepatitis C	TLR2/TLR6	Unknow
3,57	measles virus (MV) hemagglutinin protein (HA)	Measles	TLR2/TLR6	Unknow
3,58	Unknow	Herpes Simplex (1/2)	TLR2/TLR6	Unknow
2	Unknow	Vaccinia	TLR2	Unknow
9	Unknow	Lymphocytic choriomeningitis	TLR2/?	CD14
0	Unknow	Yellow Fever	TLR2/?	Unknow
1	Unknow	Varicela Zoster	TLR2/?	CD14
3	Unknow	Respiratory Syncytial	TLR2/TLR6	Unknow

* Synthetic PGs does not induce TLR2 signaling, and TLR2 activation promoted by the natural ones was attributed to lipopeptide contamination by some authors [62,63]. Nevertheless, LTA extracted from mutant *Staphylococcus* strain lacking lipopeptides still activated TLR2 and NOD2 [33].

** Zimozan activation through TLR2 was also attributed to contamination by other authors [20].

*** Dectin-1 recognizes β-glucans from histoplasma, but these molecules are normally shielded by α-glucans in this pathogen [64]

**** Intact GPI are recognized mainly by TLR2/TLR1, but exclusion of its *sn*-2 fatty-acid portion changes the ligand heterodimer to TLR2/TLR6 [47]

***** The purity of this preparation is controversial [65].

The major TLR2 ligands demonstrated until now are LPs, ubiquitous to all bacteria and highly expressed in the outer membrane of Gram-positive bacteria. They present a unique NH3-terminal lipo-amino acid, N-acyl-S-diacylglycerol cysteine and usually three lipid chains (triacyl), except for those found in mycobacteria that can have two lipid chains (diacyl). These molecules perform a variety of functions and are described in an extensive database [66]. Triacyl LPs are recognized by TLR2/TLR1 while diacyl LPs are recognized by TLR2/TLR6 [37]. Two detailed papers confirmed and explain this statement with crystallography, showing that TLR1 ectodomain has a channel that binds the amide-bound lipid chain of the triacylated LP [67], while the same channel in TLR6 is obstructed by residues of aminoacids [68]. TLR2 has a hydrophobic pocket that interacts with the remaining lipid chains in a less specific way, allowing slight variations in length and chemical structure of lipid or hydrophobic moieties of its ligands in general [68]. No matter which of the two dimers is activated, the classical signaling cascade triggered was found to be the same [69], although the kinetics could be different among the ligands and lead to different physiological outcomes [70,71]. TLR10 appears to bind the same TLR1 ligands and require the same intracellular adaptor Myeloid Differentiation primary-response gene 88 (MyD88). In spite of that, the activated TLR2/TLR10 would not trigger the common signaling cascade, suggesting a different role for this dimer yet to be defined [14]. Independent TLR1 and TLR6 recognition of lipopeptides through TLR2 were observed using knockout TLR1 and/or TLR6 mice or even modified ligands [72], however there is no demonstration that this actually happens in physiological concentrations with microbial native ligands or when the knock out genes are functional.

TLR2 RECEPTOR COMPLEXES AND ACCESSORY MOLECULES

TLR2 form heterodimers with its co-receptors, which increases the type of molecules recognized by the receptor. Interestingly, a number of accessory molecules and co-receptors have been described as able to concentrate microbial products on the cell surface or inside phagosomes to facilitate TLR2 responses. A new ligand complex was just proposed for activation through diacylglycerol ligands, including lipopeptides: CD36 would bind to ligands and transfers them to the accessory molecule CD14, that in turn loads this molecules onto TLR2/TLR6 (FSL-1, MALP-2, and LTA), or TLR2/TLR1 (lipomannan) [25]. The ligand delivery occurs within lipid rafts, where CD14 and CD36 molecules are anchored, resulting in complex internalization addressed to the Golgi apparatus according to its respective ligand. Despite of this fact, activation occurs at the surface and seems to be independent from internalization [25,73]. A similar mechanism probably happens with GPI anchors from some protozoan parasites, since they also present the diacylglycerol moiety. In accordance, CD36 –/– macrophages have impaired response compared to wild type, when stimulated by plasmodium falciparum GPI [74]. CD36 ectodomain is the only moiety that acts in the complex, like CD14 [25], but as opposed to the latter does not bind to triacyl ligands [75]. It is notable to point out that even so CD14 and CD36 were not absolutely required for activation [76,75], as

for TLR1 and TLR6, it is still to be examined if these requirements do not exist for physiological outcomes in response to microorganisms.

Regarding TLR2 engagement through triacyl LPs, an extracellular matrix glycoprotein also present in the blood, called vitronectin, was reported as essential. The protein in its extended conformation binds to triacyl LPs and is recognized by the integrin β3 receptor, which is part of the pre formed TLR2/TLR1 signaling complex in resting monocytes [77]. CD14 also concentrates and delivers triacyl LPs to TLR2/TLR1, without binding the dimer [76], which contributes to the inflammatory response in phagocytes[78]. Other researchers identified radioprotective 105 kDa (RP105) as a receptor able to bind mycobacterial lipoproteins, mostly TLR2/TLR1 agonists, acting as an accessory molecule part of the TLR2 receptor complex in macrophages and improving the response against the pathogen [26]. RP 105 has an ectodomain related to the TLRs, but no intracellular moiety [26]. Further research is needed to define if the accessory mechanisms involved with triacyl LPs are complementary, non concomitant or overlapping.

To assist in recognition of non-acetylated TLR2 ligands, thus far, only the ganglioside GD1a has been described to potentially have an accessory function. It binds the b subunit of type IIb heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and enables the ligand to activate TLR2/TLR1 signaling within lipid rafts. GD1a does not access triacyl molecules [19]. Since bacterial porins, which have been shown to be TLR2 ligands [79,80], are also oligomeric pore forming proteins that binds to the same dimer, there is a possibility that GD1a may also access their signaling [34].

In regards to innate immune recognition of whole bacteria by TLRs, phagocytosis is an important step, forming phagosomes that could recruit TLR's and form different receptor complexes. The soluble molecule mannose binding lectin (MBL) was found to bind *Staphylococcus aureus* through membrane LTA and synergize with TLR2/6 for host responses, drastically increasing the inflammatory response upon internalization [30]. The same complex is likely to occur with peptidoglycan, lipoarabinomannan and lipophosphoglycan, since they were described to bind to MBL[81]. CD36 may possibly maintains its ligand delivery role inside the phagosomes, because it is required for phagocytosis of *S. aureus* [82]. Integrin β3, instead, was reported to facilitate the invasion of several bacterial pathogens and could be also linked with TLR2 triggering inside phagosomes[77].

The only non-TLR molecule found to physically interact with TLR2 and induce cross-talk signaling was Dectin-1, the main receptor for fungal recognition through β – glucans. Dectin-1 independent signaling synergizes with both TLR2 and TLR4, for production of the cytokine TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) in human primary PBMCs, when all three receptors are stimulated by its respective ligands in macrophages [83].

The immune response induced by transmembrane TLR2 was recently found to be modulated by soluble TLR2 [84], present in human plasma, milk and amniotic fluid [85]. It is yet to be described how its activity influences host defense against infections.

TLR2 INTRACELLULAR SIGNALING NETWORK

Following stimulation by the ligand, TLR2 dimers initiate a MyD88-dependent intracellular signaling pathway (Fig.1), common to all TLRs besides TLR3. This pathway translocates Nuclear Factor -κB (NF-κB) to the nucleus to modulate gene transcription and consequent inflammatory cytokine production. The cascade also triggers serine/threonine-specific protein kinases (MAPKs) that can influence both the transcription of inflammatory genes and the mRNA stability of those transcripts [86].

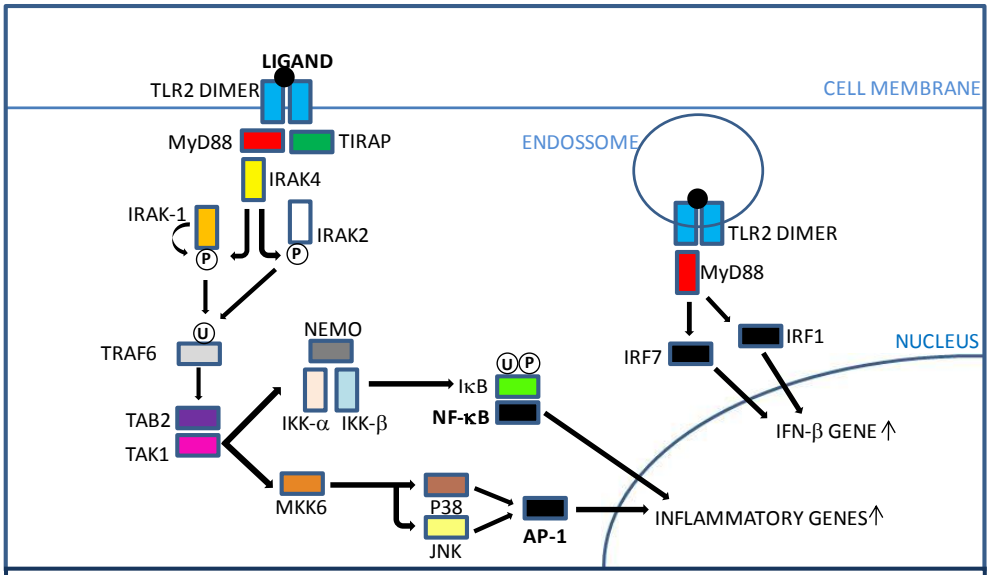

Figure 1. TLR2 intracellular activation. After ligand binding and consequent TLR2 dimer rearrangement, the TIR domain of TIRAP binds the TIR domain of TLR2 and recruits the adaptor protein MyD88. IRAKs are then recruited and IRAK 4 phosphorylates (P) IRAK1, which then initiates auto-phosphorylation . Phosphorylated IRAK1 dissociates from the complex and activates TRAF6. Since IRAK1 is rapdily degraded, IRAK2 also activates TRAF 6 in latter responses. Ubiquitinated (U) TRAF6 triggers the activation sequence TAB2 - TAK1 - IKK complex. IkB iphosphorylation and ubiquitination by the IKK complex leads to its degradation and release of NF-kB translocation to the nucleus for gene up regulation. TAK1 also activates MKK6 for subsequent JNK and p38 activation, leading to AP-1 activation and the production of proinflammatory cytokines. Internalized receptor complex triggered by a viral ligand can activate by an unknown pathway IRF7/1 to IFN-β gene upregulation.

MyD88 = Myeloid Differentiation primary-response gene 88. TIRAP = TIR Adaptor Protein. IRAK = Interleukin-1 Receptor Associated Kinase. TRAF = TNF receptor associated factor. TAK = Transforming growth factor beta-activated kinase 1. TAB = TAK1-binding protein. MKK /JNK / P38 = MAP kinases. NEMO / IKK = kinase complex. IkB = inhibitory protein. AP = Activator protein. IRF = Interferon Regulatory Factor.

Although the general pathway is not new, the phosphorylation and ubiquitination processes crucial for the cascade are not completely elucidated, especially the feedback loops. For example, IRAK1/4 were found to phosphorylate, ubiquitinate and, by that, increase degradation of TIRAP (also termed “Mal”), indicating a possible down regulation mechanism for TLR2 and TLR4 activation [87]. Sub-activating doses of TLR2 ligands may tolerize dendritic cells for TNF-α production, by a mechanism that involves disruption of signal transduction at the IRAK-1 level [88]. Bruton's tyrosine kinase (Btk) and PI3 Kinase are likewise able to modulate TLR2 production of cytokines stimulated by LTA, but their place in the cascade is not clear [89]. The signaling pathway involved in the recent described IFN-β production triggered by TLR2 via MyD88 has not been described thus far, but it is known

that internalization is required and IRF1/7 are the gene regulators involved[90]. This is a unique finding, as up until now, TLR2 signaling events were not known to involve the IRFs.

Since TLRs, Nucleotide binding Oligomerization Domains (NODs), and Dectin-1 can induce NF-κB translocation and MAPK p38 activation [91], intracellular cross talk for cytokine production synergy is likely to occur. In this context, Dectin 1 can synergize with TLR2 and TLR4 through NF-κB non-canonical pathway and augment the cytokine expression induced by the cited TLRs [92]. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) stimulated with heat killed *Listeria monocytogenes* (recognized through TLR2) or TLR4 ligand, plus a TLR7/8 or TLR8 ligand, demonstrated synergistic up-regulation of IFN-γ and, to a minor extent, of IFN-α [93]. Although with a different TLR2 ligand (Pam3CSK4), the opposite outcome of IFN-α was reported with human dendritic cells. In this case TLR2 activation restrained the type I IFN (IFN- α/β) amplification loop used by TLR4 plus TLR7/8 ligands [94]. Mutations of the NOD2 gene results in defective release of Interleukin-10 (IL-10) from PBMC stimulated with TLR2 ligands, suggesting another cross signaling [95].

The intracellular cross talk scenario is essential for understanding host-microbe interactions, since most invaders have multiple molecules recognized by multiple innate immune receptors. Investigators have still not been able to relate most of what has been learned about intracellular regulation of pathogens with infection outcomes in the host, and this must be the focus for future studies.

TLR2 AND INFECTIOUS DISEASES

HOW ARE WE EVALUATING TLR2 AND INFECTION DISEASE OUTCOMES?

In order to access the role for TLR2 in protection or enhancement of infections, a number of techniques have been developed. The vast majority of researchers cited below utilize inbred mice models as the *in vivo* model, limiting individual gene variability and allowing gene knock out. What helps can also harm, since limiting genetic variability is limiting immune response variability. In addition, another important feature to take into account is the phenotype divergence between mice and man, including TLR2 expression. Comparison of murine and human TLR2 sequences revealed more resemblance between intracellular domains (84%) than extracellular domains (65%) [96], the latter being responsible for ligand recognition. Regarding the cell type, T cells from PBMC express TLR2 in a constitutive manner in mice but not humans, among other differences [97]. These discrepancies contribute to the fact that some human pathogens do not induce the same pathology in mice, or may not even infect mice at all. Analysis *in vivo* is also done with human population presenting polymorphisms related to TLR2 function, a valuable way to account contribution to disease by the receptor. Nevertheless, there are conflicting results regarding diseases and polymorphisms association, probably due to differences in ethnicity, location, environmental factors and exposure to infectious agents [98].

In vitro models are mostly based on the use of murine cells, human cells or cell lines derived from both species, including dendritic cells, macrophages and human PBMCs.

Human PBMC are not intact from criticism as well, since they might not reflect the response obtained from resident cells in a specific infected organ [99].

All models have discrepancies from reality, so all the conclusions taken based on them should be pondered. Regarding different outcomes of infection according to the type of microbial, we shall divide the examination of the role of TLR2 in infections by pathogen type: viruses, fungi, protozoan/helminths and bacteria.

VIRUSES:

Viruses are biological organisms that only replicate inside host cells. The cell invasion happens practically without PAMP expression and recognition, except for nucleic acid characteristic patterns. Due to this fact, the host immune recognition of viruses relies mainly on a complex combination of endossomal TLRs and cytosolic non TLR receptors, activated by viral nucleic acids uncommon to the host [100]. Type I interferon (IFN) seems to be a key innate immune factor against viruses since IFN α/β receptor knockout mice are extremely vulnerable to multiple viral infections [101]. For some types of viruses, like Vaccinia Virus (VV), type II IFN is also essential to assure viral clearance [101]. Type I IFN, mainly produced by dendritic cells, can prime Natural Killer (NK) cells, essential for early infection control [102], and maturate T helper 1 (Th1) cells [103]. The production of neutralizing antibodies and activation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) are likewise important for a specific and effective antiviral immune response [104]. TLR2 involvement in viral infection is becoming more evident in light of updated studies, since the receptor is expressed in most, if not all, cells involved in viral immunity.

IFN-β production by inflammatory monocytes can be triggered by TLR2 when stimulated with virus particles like VV or murine Cytomegalovirus (CMV)[105]. TLR2 is also involved with the NK cell response, proved by impaired NK cell activity and increased murine CMV load in TLR2 knockout mice [102]. VV was newly found to directly stimulate NK cells via the TLR2-MyD88 signaling pathway [106], in addition to directly promote CD8 T cell survival, allowing cloning expansion and memory cell establishment [107]. Based on these articles, TLR2 seems to have an overall protective role in VV and murine CMV. Notwithstanding, human fibroblasts infected with human CMV produced type I IFN dependent on virus uptake and IRF3, but independent of TLR2 signaling [108]. Another human/mice discrepancy is clearly demonstrated with Respiratory Syncytial Virus (RSV). TLR2/TLR6 are important murine receptors to control the RSV infection, but not in humans infected with RSV [53].

Hemagglutinin from measles virus interacts with TLR2, resulting in IL-6 secretion by monocytes, as VV, but also increases expression of the measles receptor CD150 and, consequently, allow for increased attachment and infection of these cells [57]. Varicella Zoster Virus (VZV) induced IL-6 production by human monocytes has been shown to be dependent on TLR2 and CD-14. VZV does not stimulate murine cells though murine TLR2 does bind VZV [61]. dUTPase from Epstein-Barr Virus also induces IL-6 production through TLR2, but CD-14 does not act as the co-receptor [51]. Yellow fever attenuated virus, used as the current Yellow Fever vaccine, is capable of activating multiple TLRs, and stimulates a balanced Th1/Th2

response in murine dendritic cells. However, when TLR2 knockout mice are used, the Th1 responses are considerably intensified, while IL-6 and IL-12 production is decreased [60]. Although hepatitis B virus capsid particles was also found to prime human macrophages for production of TNF-α, IL-6, and IL-12p40 [55], the purity of this preparation remains controversial [65].

Hepatitis C virus (HCV) core and non-structural 3 (NS3) proteins can be recognized by TLR2/TLR6 dimer, in addition to nucleic acid recognition by TLR 3, 7 and 8 [56]. HCV TLR2 recognition activates human monocytes and macrophages to secrete mainly IL-10 and TNF-α, besides inhibition of macrophage-derived dendritic cell differentiation and function [56]. In fact, patients with chronic hepatitis were found to have increased expression of TLR2 in circulating monocytes [109,110] correlated with augmented circulating TNF-α and hepatic necroinflammatory activity [110]. In a different direction, *in vitro* studies showed that the TLR2 polymorphism R753Q SNP impairs TLR2 recognition of HCV core and NS3 proteins and increases the risk of allograft failure after liver transplantation for chronic hepatitis C patients with this mutation [111].

Virus stimulation can differ from species or viral type, but also according to the murine strain, organ or cell infected. TLR2/TLR9 knockout mice intravaginallly infected with Herpes Simplex (HSV) 2 have similar viral load levels in the vagina and spinal cord, but not in the brainstem, showing a synergic protective role for both TLRs [58]. Other investigations demonstrated that when HSV-1 is used, TLR2 induced inflammation may contribute to disease, since mice lacking TLR2 showed more resistance to lethal HSV encephalitis than wild-type animals [112]. This inflammatory environment is also part of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) induced death, where TLR2 is essential for induced monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), RANTES and TNF-α, in mouse central nervous system glial cells [113].

The common immune response measured by most studies was IL-6 and TNF-α production, while IL-10 was consistently found in chronic infections. IL-6 secreted by dendritic cells drives Th2/Th17 T cell differentiation [114]. Considering that type I IFN is released upon virus stimulation and constrains Th17 differentiation in mice [115], IL-6 in the context of viral infection most likely drives Th2 responses. When the Th1 phenotype is dominant, TNF-α act as an enhancer of IFN-γ killing through activation of cellular immune responses [116,117]. On the contrary, when Th2 or Th0 is dominant, TNF- α causes tissue damage [117,116]. In this context, TLR2 activation can improve viral clearance when Th1 response is fully functional and dominant, during the initial stage of infection. TLR2 can also promote Th2 responses, which induce antibody production and protect the host by inhibition of exacerbated Th1 response. However, Th2 phenotype dominance put TLR2 in a different position, damaging tissues due to TNF-α and other inflammatory cytokines. The later inflammatory suppression induced by high levels of IL-10 are beneficial to prevent inflammatory damage to the host, but after an unresolved infection gives the pathogen a chance for chronic infection.

None of the viral particles were tested for TLR2 induction of regulatory T cells (Treg) or Th17 phenotypes, which could help to understand the outcomes of the receptor activation and add information to the simplified Th1/Th2 bias studied so far. It is clear that TLR2 outcome is co-dependent of other PRRs and the subsequent adaptive immune response, therefore isolated analyses can be insufficient to determine the role of TLR2 in each infection type.

In relation to recognition, the viruses above are variable in relation to species, genetic material and disease outcomes, but all viruses assumed to be recognized by TLR2 are enveloped virus [118]. Some viruses do not have their TLR2 ligands defined. TLR6 was the only co-TLR described for viral ligands, but many ligands that have been described do not have the co-TLR defined yet. The heterodimer is in accordance with the cytokine profile described above, since the TLR2/TLR6 partnership was found to drive IL-10 production in dendritic cells as opposed to IL-12 [119]. TLR2 accessory molecules analysis has also been minimal and only limited to CD14.

FUNGI:

Different from virus, pathogenic fungi are facultative intracellular or extracellular eukaryotic organisms and therefore does not depend on the host cell to replicate. Some fungal species can interchange between different forms like yeast or conidia to hyphae and consequently modify the way it is recognized by the host. In addition to the dimorphism issue, cell wall composition varies among species and serotypes, which can also change the way these cells are processed by the immune system [120]. Fungal infections remain generally local when handled by a regular immune response, but the systemic rate is highly increased when the host is immunocompromised, have its physical barriers disrupted or have the microbiota altered [121]. Dendritic cells trigger the adaptive immune response against fungal invasion while direct clearance is mainly done by neutrophils, monocytes and macrophages. All of these cells express dectin-1, TLR2 and TLR4, receptors connected with fungal recognition [122]. Most yeasts can be phagocyted by macrophages through Dectin-1 receptor recognition, whereas TLR2 initiates the concomitant inflammatory state [123]. The two receptors, when stimulated, mutually synergize their sole cytokine responses to promote a consistent pathogen clearance [123]. As opposed to this concept, phagocytosis of hyphae is believed to occur without independent PRR recognition and leads to Th2/Treg cells bias [124].

Candida albicans is one of the most controversial microbials when it comes to its multiple recognition by PRRs, especially through TLR2. TLR2 ligand phospholipomannan is well defined and present in hyphae and yeast forms [125], while the outcomes triggered by it are not quite clearly. Cells stimulated with phospholipomannan produce IL-6 and IL-8, necessary for activation and recruitment of neutrophils and macrophages *in situ* [125]. Studies with TLR2 knockout mice showed resistance [126] or susceptibility to primary or secondary systemic *C. albicans* infection [127,128], while TLR2 knockout macrophages showed impaired fungal clearance [129], with impairment of inflammatory cytokines (specially TNF-α) or not [130,129]. The absence of this TLR also decreased chemotaxis rate of murine neutrophils,

together with the diminished killing mechanisms induction and survival of these cells [131]. TLR2 is probably not involved with humoral response after secondary *c. albicans* systemic infection, since this parameter was not altered in TLR2 knockout mice [132]. On the other hand, Dectin-1 and TLR2 were directly related with protection against oral candidiasis through IL-1 β release, but only when they are stimulated at the same time [128].

Accordingly to C. albicans, *Aspergillus fumigatus* recognition varies with morphology. Both conidium and hyphae are recognized by TLR2 [133], but hyphae is not recognized by TLR-4 and results in IL-10 production through TLR2 activation [134]. Neutrophils, on the other hand, have increased fungicidal activity and release of proinflammatory cytokines when activated by TLR2 [135]. It seems like TLR2 is essential to protection for immunocompromised but not immunocompetent mice [135] . TLR1 and TLR6 combined polymorphisms could augment the risk of invasive aspergillosis, in patients submitted to stem-cell transplants [136]. This finding suggests indirectly a protective role for TLR2 in this infection, but no conclusion was taken in this direction.

Paracoccidioides brasiliensis is recognized by TLR2, and pulmonary infection of knockout mice for the receptor leads to Th17 skewed immunity and increased [137] or equal [138] lung inflammation. Even so, fungal burden is not different from wild type mice [137], or slightly diminished [138], while in both cases led to equal mortality rates.

Cryptococcus recognition by TLR2 happens through the polysaccharide Glucuronoxylomannan, and NF-κB activation by the ligand differs among its species, apparently following polysaccharide effective diameter differences [39]. Although TLR2 was found to be important for *Cryptococcus neoformans* infection control [135], it is still quite controversial [139]. TLR2 was also shown to play a major role in protection against *Penicillium marneffei*, due to stimulation of dendritic cells to produce IL-12p40 upon fungal recognition [140]. *Hystoplasma capsulatum* is recognized by TLR2 through the cell wall protein Yps3p instead, resulting in activation of NF-κB [44]. Regardless, TLR2 knockout mice had no decrease in inflammatory cytokine production induced by this pathogen [141].

Generation of a dominant T_H1-cell response is required for the expression of protective immunity to fungi [124], as described for viruses. The presented infection models did not evaluate fungal morphology at the course of the infection, which can account for different immune responses and even survival rates. coTLRs and Dectin-1 expression were also not measured in parallel, and these parameters are able to change the profile of TLR2 responses. The shielding of β-glucans can impair Dectin-1 recognition and consequent lost of synergy with TLR2, which alone induces preferentially an anti-inflammatory response when stimulated by fungal particles [142]. In addition, it was showed that dectin-1 have different isoforms according to mice strain, fact that can impact on TLR2 function [143]. What can safely be attested is that lack of TLR2 influences macrophage and neutrophil antifungal activity, mainly through TNF-α. This cytokine is important to activate these cells against fungal infection [144]. The relevance of the influence seems to vary according to the infection environment and directly with Dectin-1 function, while in most cases a deficiency is compensated by the immune system. When TLR2 response was found to be detrimental to

the host, it was due to an overwhelming suppression of the early inflammatory response and consequent augment of the fungal burden. Since almost all fungus recognized by TLR2 are recognized by TLR4 as well, it would be meaningful to evaluate the synergism between them in the fungal context, due to recent findings with bacterial ligands showing a synergistic IL-10 production when both TLRs are stimulated [145]. To date, no TLR2 polymorphisms were directly related with susceptibility or protection to fungal infections, but it is also true that these studies are scarce in the literature.

PROTOZOAN/HELMINTHS:

Protozoa is a group of eukaryotic cells that can parasite humans and live inside or outside cells, according to its life cycle stage, producing mostly chronic infections when infecting the host [146]. TLR2 is activated by some types of the protozoan glycosylphosphatidylinositols (GPIs), while lipid and carbohydrate content of a GPI is directly linked with its ability to induce proinflammatory responses [147]. *Plasmodium falciparum*, the malaria causative agent, can trigger TNF-α and IL-6 production in macrophages, by means of TLR2 and TLR4 activation with GPI. This GPI is only recognized by the receptor in merozoites, the erythrocyte infective form of the protozoan [48]. The GPI can also modulate internalization of malaria-parasitized erythrocytes. Still, the parasite is phagocyted inside the erythrocyte and TLR ligands are not displayed to macrophages, resulting in a non inflammatory phagocytosis that delay the cytokine responses [148]. No TLR2 polymorphisms were related with *P. falciparum* infections [149]. However, human heterozygosis for a TIRAP polymorphism (TIRAP S180L) was related to protection of malaria. This adaptor protein mediates TLR2 and TLR4 signaling whereas its polymorphic variant severely decreases IL-6 production triggered by these TLRs, suggesting that a normal TLR2 response would be detrimental to the infected human host [150].

Toxoplasma gondii GPIs from the highly dividing tachyzoite form also trigger TLR2 and TLR4 for TNF-α production, besides TLR2 activation for MCP-1 expression. TLR2 knockout mice had increased susceptibility to infection caused by high doses of *T. gondii* [151], but the use of lower doses leads to an increase of parasite burden only in double TLR2/4 knockout mice [152], correlating TLR2 with a protective role in synergy with TLR4. Strong IL-12 induction through TLR11 is protective and part of the murine immune response, but since this gene is not functional in humans the other involved TLRs can have a different role in this host [153]. In humans, intestinal epithelial cells recognize the parasite through TLR2, resulting in production of IL-8 and other chemokines that are important for neutrophil and phagocyte recruitment [154]. GPI from *Trypanosoma cruzi* infective trypomastigotes signaling results in IL-12, TNF-α and nitric oxide production by murine macrophages [155]. Tc52 molecule has a TLR2 dependent activation mode as well, producing IL-6 and IL-8 [48]. TLR2 leads to IL-12 and TNF-α secretion in *T. cruzi* infections, in addition to cooperate with TLR9 to enhance this secretion. As with *T. gondii*, just double knockout, TLR2/TLR9 in this case, showed increased susceptibility to *T. cruzi* infection. The higher parasite burden of double knockouts was related to low IL-12 and IFN-γ levels[156]. *T. cruzi* IL-10 modulation of dendritic cells was found

to be independent of TLR2, surprisingly [157]. An interesting cooperation of TLR2/bradykinin receptor in *T. cruzi* subcutaneous infection was reported, where TLR2 induces leak of plasma that leads to a kininogen accumulation. This molecule is broken by T. cruzi proteases in kinins recognizable by bradykinin receptor, with consequent induction of IL-12 production by dendritic cells [158].

Entamoeba and *Leishmania* are protozoa genera that had lipopeptidophosphoglycans (LPPG) and lipophosphoglycans (LPG) respectively as the identified TLR2 ligands. *Entamoeba* LPPG, recognized by TLR4 too, leads to TNF-α, IL-12, IL-10 and nitric oxide release in phagocytes [48]. It also stimulates NK Cells for production of IFN-γ through TLR2, which is directly related with protection from amebic liver abscess [159]. Membrane LPG from *Leishmania* up regulates the same cytokine milieu as LPPG in phagocytes [49]. However, *Leishmania brasiliensis* infection of TLR2 knockout mice presented higher levels of IFN-γ and resistance to infection *in vivo*, when compared to wild type mice, while the knock out DCs had up regulated IL-12 secretion *in vitro* [160].

Human parasitic helminths are complex eukaryotic organisms that live inside the host commonly in an asymptomatic way, with infection associated to tolerogenic responses in general [161] . TLR2 is known to be activated by lyso-phosphatidylserine of two genera of this group: *Shistossoma* and *Ascaris*, but the latter has no information about the relevance of TLR2 in the infection. Soluble schistossoma extracted antigens (SEA) modulate DCs and B cells responses increasing TLR2 expression and signaling through the same to produce IL-10 and suppress IL-12 production [162]. *S. mansoni* eggs fraction containing lysophosphatidylserine also activated DCs for a Th2 profile and regulatory T-cell development [163]. Conversely, *S. mansoni* infection of MyD88$^{-/-}$ mice had a normal Th2 response and another research shows SEA induced Th2 bias independent of TLR2. It is likely that the TLR2 independent SEA reported does not contain lyso-phosphatidylserine [164].

Once more, TLR2 activation is conditioned to the inflammatory environment. Parasite clearance is related with early IFN-γ synthesis by NK cells, which in turn is mostly induced by IL-12 from dendritic cells [74,155] . TLR2 parasite ligands are able to induce IFN- γ directly in NK cells, and IL-12 in dendritic cells, but the latter production is more efficient when in cooperation with TLR4 or TLR9. Nevertheless, lack of TLR2 does not increase fungal burden or decrease Th1 responses, insinuating a redundant role in early infection. TNF-α generated by TLR2, on the other hand, is pathological when produced later in infection, as described for viruses, a possible explanation why TLR2 knockout mice or human TLR2 polymorphism often leads to an attenuated or resolved infection. Another possibility is that TLR2 driven Th2 responses collaborates to a severe disease state, since IgM and polyclonal B-cell activation exacerbated disease outcome in leishmaniasis [165]. It is likely that defective IFN-γ early response switches TLR2 to the Th2 induction and consequent suppression of IL-12. Parasites can infect cells and replicate inside them without TLR recognition, whereas the infected cell is frequently phagocyted in a non inflammatory process, which highly contributes to late responses. Curiously, IL-10 infection regulation was influenced by TLR2

ligands only in schistosomiasis, showing that the Th2 skewing outcome was more relevant than the immunossupression of the Th1/Th2 profiles in TLR2 context.

BACTERIA:

Bacteria are prokaryotic unicellular organisms with different strategies for energy production, living, infecting, and self-protection. Bacterial cells are limited by a common phospholipid bilayer membrane with inserted functional proteins, covered by a peptidoglycan cell wall. Some species have an outer membrane, while others have a capsule or are able to form a spore, which changes the way they are recognized by the host [166]. Lipoproteins, important TLR2 ligands, are produced by practically all bacteria. Due to the high number of bacterial pathogenic species, they are analyzed in the present review by its genera and gram staining group. The genera to be explored are the ones which include the main human pathogens.

Gram positive bacteria

The gram-positive bacterium cell wall contains a thick peptidoglycan layer, combined with teichoic acids and extracellular proteins. Lipoteichoic acid (LTA) can activate TLR2 differently according to the bacteria of origin [167], as lipoproteins and peptidoglycan [33]. The pathogenic bacteria considered here are from the genera *Corynebacterium, Nocardia*, *Bacillus, Listeria, Staphylococus, Clostridium, Enterococus, Streptococus*, *Micobacterium* and *Mycoplasma*. The last two genera do not gram stain because they have different cell wall structure, but are regularly grouped with gram-positive bacteria due to the genetic background [166]. All considered gram-positive bacteria activated TLR2 to some extent. Murine phagocytes with impaired TLR2 function by antibody or gene knockout, infected with the above bacteria or its cell wall components, had diminished or abolished production of TNF-α or/and IL-6 [168-173]. There were no reports considering TLR2 activation by *Actinomyces* and *Gardnerella* pathogenic bacteria, but the latter was not related with human TLR2 polymorphism [174].

Concerning infection models, induced respiratory infection of TLR2 knockout mice with *Mycoplasma* and *Mycobacterium* showed increased bacterial burden, tissue damage and death. This protective role for TLR2 was confirmed in humans since TLR2 weakly stimulated promoter variants were found to predispose to tuberculosis[175] and nontuberculous mycobacterial lung disease[176]. Conversely, protection from respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae* only requires TLR2 when the TLR4 ligand pneumolysin in not expressed, indicating redundancy in recognition of this bacteria [177]. Interestingly, middle ear infection [178] and meningitidis [179] caused by *Streptococcus* are exacerbated when TLR2 is absent, which may indicate that the toxin is differentially expressed according to the environment, besides the strain dependency. Intraperitoneal inoculation of *Enterecoccus* [172], *Listeria* [170] and *Staphylococus* [180] caused similar disease in TLR2 knockout and wild type mice, while IV inoculation of *Listeria* [170] and *Staphylococus* [168] resulted in death and bacterial burden increase in knockout animals. Regardless of strain

variations, the route of infection seems quite important to implicate TLR2 involvement in gram-positive bacterial infections in mice.

Human polymorphism studies found no relationship between TLR2 gene polymorphism R753Q and serious pneumococcal [181,182], streptococcal [183], staphylococcal infection [184] or altered cytokine patterns in gram-positive septic patients[185]. Indeed, the polymorphic gene does not respond to Lipoteichoic Acid from gram positive bacteria itself, but it seems that one functional allele is enough to compensate this deficiency, since heterozygous subjects respond to infections the same way as the ones without the polymorphism [186]. A Toll-like receptor-2 -16933AA promoter human polymorphism was associated with augmented prevalence of gram-positive bacterial cultures and sepsis but not with septic shock or death increase [187]. In accordance, blood monocytes from septic patients had higher TLR2 and CD14 expression than healthy ones, but mortality was associated with downregulation of the same receptors and consequent cytokine induction [188].

These studies lead us to believe that TLR2 is important, if not essential, to control gram positive infections in general, but its absence can be compensated by activation of other receptors in some genera.

Gram negative bacteria

The gram-negative bacterium cell wall contains a thin peptidoglycan layer with pore forming proteins and no teichoic acids, covered by an extra layer of lipopolysaccharides (LPS). LPS is an important TLR ligand present in all gram negative bacteria, with its molecular composition varying among the genera. The variation leads to different receptor activation and subsequent inflammation [189].

Campylobacter, *Bordetella, Shigella, Escherichia*, *Haemophilus, Salmonella, Neisseria, Klebsiella* and *Leptospira* produce the typical LPS, a hexaacylated form capable of activate inflammation through TLR4 [189]. All of the above genera activate TLR2 as whole bacteria or through ligands, but just the last six were studied with infected knockout mice for this receptor. In this context, TLR2 was not essential to infection resolution, while TLR4 played an important role [190-196]. Nevertheless, TLR2 knockout mice presented a higher bacterial burden in the course of infections with *Klebsiella* and *Salmonella*, but without changing survival rates or antibody responses [194,196]. Another approach using double knockout TLR2/TLR4 mice showed that this transgenic was even more susceptible to infection with *Leptospira* and *Klebsiella* than TLR4 knock out only, attesting TLR2 participation in infection resolution at least when LPS is unable to do it, besides reinforcing the redundancy of immune system activation [196,197]. Regarding sepsis animal models, *Escherichia and Salmonella* triggers TLR4 and TLR2 to cause excessive inflammation and consequent mice death. IFN-γ induced by TLR4 drives TLR2 up regulation and increases the immunopathology, reason why TLR4/TLR2 double knockout mice all survived after antibiotic therapy but not single knockouts or wild type mice [198] .

The underacylated forms of LPS are weak inducers of inflammation, some of them capable of competing with typical LPS for TLR4 and therefore act as an anti inflammatory

agent [189]. Gram negative bacteria that present these forms generally evade TLR4 driven immune response and the infected organism has to rely on other receptors to recognize and react to the threat. *Porphyromonas* and *Coxiella* infection resolution are partially dependent on TLR4, with the pro inflammatory cytokine production dependent on TLR2. The chronic establishment of *Porphyromonas* in the host, however, can have TLR2 driven immune response as deleterious [199]. *Chlamidia* murine infections presented pathology related with TLR2 responses too, although TLR2 human polymorphisms were not correlated with the disease [200]. An overwhelming infection with bacteria from *Burkholderia* genera is another example of TLR2 noxious interaction in mice, resulting in decreasing death and pathology in the absence of the receptor [201]. TLR2 can be protective as well, like in murine infection with bacteria from the genera *Legionella, Francisella, Citrobacter* and *Borrelia.* The resolution of these infections or consequent inflammation are not dependent on TLR4, while lack of TLR2 implicates higher bacterial burden [202-204], tissue damage [205] or increased death rate [206,204,203,205]. Knock out TLR2 mice orally infected with *Yersinia* develop a gut barrier defect and diminished intestinal clearance, showing TLR2 dependence for full protection [207].

Overall, TLR2 role in gram negative infections seems to be directly related with the dominant PRR activated by the related bacteria. An excessive bacterial burden frequently increases TLR2 sensitivity and its role in pathology. It is important to note that infection models often use attenuated or heat killed bacteria, which can change the predominant roles of participating PRRs. Accordingly, heat killed *Treponema* signals through TLR2, different from live bacteria that suppress activation by this receptor [199].

All other gram negative bacteria studied for TLR2 interaction were recognized by it, regardless of gram staining group or genera, with induction of TNF-α, IL-6, IL-10 or combinations of these cytokines in phagocytes or even IL-8 induction in mucosal epithelial cells, depending on which cells were evaluated [208-213]. Yet no relation with disease was confirmed [214] or even studied.

BIBLIOGRAPHY

1. West, A.P., Koblansky, A.A. & Ghosh, S. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 409-437 (2006).
2. Gay, N.J. & Gangloff, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 141-165 (2007).
3. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
4. Beutler, B.A. TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399-1407 (2009).
5. Medzhitov, R., PrestonHurlburt, P. & Janeway, C. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *NATURE* **388**, 394-397 (1997).
6. Leulier, F. & Lemaitre, B. Toll-like receptors - taking an evolutionary approach. *Nat Rev*

Genet **9**, 165-178 (2008).

7. Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. & Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 588-593 (1998).
8. Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. & Alexander, C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**, 205-224 (2008).
9. Brzezińska-Błaszczyk, E. & Wierzbicki, M. [Mast cell Toll-like receptors (TLRs)]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **64**, 11-21 (2010).
10. Flo, T.H. et al. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* **69**, 474-481 (2001).
11. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388**, 621-625 (2009).
12. Matsushima, N. et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* **8**, 124 (2007).
13. Jin, M.S. et al. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* **130**, 1071-1082 (2007).
14. Guan, Y. et al. Human TLRs 10 and 1 Share Common Mechanisms of Innate Immune Sensing but Not Signaling. *J Immunol* jimmunol.0901888 (2010).doi:10.4049/jimmunol.0901888
15. Jin, M.S. & Lee, J. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity* **29**, 182-191 (2008).
16. Stewart, C.R. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155-161 (2010).
17. Hashimoto, M. et al. Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in Staphylococcus aureus cell wall components. *Int. Immunol* **18**, 355-362 (2006).
18. Hashimoto, M. et al. Evidence of Immunostimulating Lipoprotein Existing in the Natural Lipoteichoic Acid Fraction. *Infect. Immun.* **75**, 1926-1932 (2007).
19. Liang, S. et al. Ganglioside GD1a Is an Essential Coreceptor for Toll-like Receptor 2 Signaling in Response to the B subunit of Type IIb Enterotoxin. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 7532-7542 (2007).
20. Ikeda, Y. et al. Dissociation of toll-like receptor 2-mediated innate immune response to zymosan by organic solvent-treatment without loss of dectin-1 reactivity. *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **31**, 13-18 (2008).
21. Seo, H.S. & Nahm, M.H. Lipoprotein Lipase and Hydrofluoric Acid Deactivate Both Bacterial Lipoproteins and Lipoteichoic Acids, but Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase Degrades Only Lipoteichoic Acids. *Clin Vaccine Immunol* **16**, 1187-1195 (2009).
22. Funderburg, N. et al. Human β-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 18631-18635 (2007).

23. Curtin, J.F. et al. HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. *PLoS Med* **6**, e1000010 (2009).
24. Scheibner, K.A. et al. Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *J Immunol* **177**, 1272-1281 (2006).
25. Jimenez-Dalmaroni, M.J. et al. Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2. *PLoS ONE* **4**, e7411 (2009).
26. Blumenthal, A. et al. RP105 Facilitates Macrophage Activation by Mycobacterium tuberculosis Lipoproteins. *Cell Host & Microbe* **5**, 35-46 (2009).
27. Liang, S. et al. The A subunit of type IIb enterotoxin (LT-IIb) suppresses the proinflammatory potential of the B subunit and its ability to recruit and interact with TLR2. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **178**, 4811-4819 (2007).
28. Connell, T.D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa, and LT-IIb: the critical role of ganglioside-binding in immunomodulation by Type I and Type II heat-labile enterotoxins. *Expert Rev Vaccines* **6**, 821-834 (2007).
29. Birch, H.L. et al. A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2634-2639 (2010).
30. Ip, W., Takahashi, K., Moore, K., Stuart, L. & Ezekowitz, R. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **205**, 169-181 (2008).
31. Tawaratsumida, K. et al. Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in Staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9147-9152 (2009).
32. Natsuka, M., Uehara, A., Yang, S., Echigo, S. & Takada, H. A polymer-type water-soluble peptidoglycan exhibited both Toll-like receptor 2-and NOD2-agonistic activities, resulting in synergistic activation of human monocytic cells. *INNATE IMMUNITY* **14**, 298-308 (2008).
33. Müller-Anstett, M.A. et al. Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes. *PLoS ONE* **5**, e13153 (2010).
34. Massari, P. et al. Meningococcal Porin PorB Binds to TLR2 and Requires TLR1 for Signaling. *J Immunol* **176**, 2373-2380 (2006).
35. Cervantes-Barragán, L. et al. TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens. *Eur. J. Immunol* **39**, 126-135 (2009).
36. Biswas, A., Banerjee, P. & Biswas, T. Porin of Shigella dysenteriae directly promotes toll-like receptor 2-mediated CD4+ T cell survival and effector function. *Mol. Immunol* **46**, 3076-3085 (2009).
37. Beutler, B. et al. GENETIC ANALYSIS OF HOST RESISTANCE: Toll-Like Receptor Signaling and Immunity at Large. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 353-389 (2006).
38. Gerold, G. et al. A Toll-like receptor 2-integrin [beta]3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat Immunol* **9**, 761-768 (2008).
39. Fonseca, F.L. et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan

from Cryptococcus gattii correlate with polysaccharide diameter. *Infect Immun* (2010).doi:10.1128/IAI.00111-10

40. Jouault, T. et al. Candida albicans phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J. Infect. Dis* **188**, 165-172 (2003).
41. Netea, M.G., van der Meer, J.W. & Kullberg, B. Both TLR2 and TLR4 are involved in the recognition of Candida albicans. Reply to "TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to Candida albicans yeasts and hyphae" by Gil and Gozalbo, Microbes and Infection 8 (2006) 2823-2824. *Microbes and Infection* **8**, 2821-2822 (2006).
42. Bonfim, C.V., Mamoni, R.L. & Blotta, M.H.S.L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis. *Medical Mycology* **47**, 722 (2009).
43. Nakamura, K. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with Penicillium marneffei. *Microbes and Infection* **10**, 1223-1227
44. Aravalli, R.N., Hu, S., Woods, J.P. & Lokensgard, J.R. Histoplasma capsulatum yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *J Neuroinflammation* **5**, 30 (2008).
45. Gantner, B., Simmons, R., Canavera, S., Akira, S. & Underhill, D. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **197**, 1107-1117 (2003).
46. Debierre-Grockiego, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from Toxoplasma gondii. *J Immunol* **179**, 1129-1137 (2007).
47. Gowda, D.C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends in Parasitology* **23**, 596-604 (2007).
48. Wong-Baeza, I. et al. The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to Entamoeba histolytica. *J. Biomed. Biotechnol* **2010**, 254521 (2010).
49. Kavoosi, G., Ardestani, S.K., Kariminia, A. & Alimohammadian, M.H. Leishmania major lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. *Experimental Parasitology* **124**, 214-218 (2010).
50. van Riet, E. et al. Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization. *BMC Immunology* **10**, 9 (2009).
51. Ariza, M., Glaser, R., Kaumaya, P.T.P., Jones, C. & Williams, M.V. The EBV-Encoded dUTPase Activates NF-{kappa}B through the TLR2 and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *J Immunol* **182**, 851-859 (2009).
52. Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M. & Barton, G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* **10**, 1200-1207 (2009).
53. Klein Klouwenberg, P., Tan, L., Werkman, W., van Bleek, G.M. & Coenjaerts, F. The role

of Toll-like receptors in regulating the immune response against respiratory syncytial virus. *Crit. Rev. Immunol* **29**, 531-550 (2009).

54. Compton, T. et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **77**, 4588-4596 (2003).
55. Cooper, A., Tal, G., Lider, O. & Shaul, Y. Cytokine Induction by the Hepatitis B Virus Capsid in Macrophages Is Facilitated by Membrane Heparan Sulfate and Involves TLR2. *J Immunol* **175**, 3165-3176 (2005).
56. Chang, S., Dolganiuc, A. & Szabo, G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* **82**, 479-487 (2007).
57. Bieback, K. et al. Hemagglutinin Protein of Wild-Type Measles Virus Activates Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Journal of Virology* **76**, 8729-8736 (2002).
58. Sorensen, L.N. et al. TLR2 and TLR9 Synergistically Control Herpes Simplex Virus Infection in the Brain. *J Immunol* **181**, 8604-8612 (2008).
59. Zhou, S. et al. MyD88 is critical for the development of innate and adaptive immunity during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 822-830 (2005).
60. Querec, T. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med* **203**, 413-424 (2006).
61. Wang, J.P. et al. Varicella-Zoster Virus Activates Inflammatory Cytokines in Human Monocytes and Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **79**, 12658-12666 (2005).
62. Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. & Alexander, C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**, 205-224 (2008).
63. Travassos, L.H. et al. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**, 1000-1006 (2004).
64. Rappleye, C.A., Eissenberg, L.G. & Goldman, W.E. Histoplasma capsulatum α-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1366-1370 (2007).
65. Vanlandschoot, P., Leroux-Roels, G., Cooper, A., Tal, G. & Shaul, Y. The Role of Heparan Sulfate and TLR2 in Cytokine Induction by Hepatitis B Virus Capsids. *J Immunol* **175**, 6253-6255 (2005).
66. Babu, M.M. et al. A Database of Bacterial Lipoproteins (DOLOP) with Functional Assignments to Predicted Lipoproteins. *J. Bacteriol.* **188**, 2761-2773 (2006).
67. Jin, M.S. et al. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* **130**, 1071-1082 (2007).
68. Kang, J.Y. et al. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* **31**, 873-884 (2009).
69. Farhat, K. et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* **83**, 692-701 (2008).
70. Long, E.M., Millen, B., Kubes, P. & Robbins, S.M. Lipoteichoic Acid Induces Unique

Inflammatory Responses when Compared to Other Toll-Like Receptor 2 Ligands. *PLoS ONE* **4**, e5601 (2009).

71. DePaolo, R.W. et al. TLR6 drives differentiation of tolerogenic DC and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe* **4**, 350-361 (2008).
72. Buwitt-Beckmann, U. TLR1- and TLR6-independent Recognition of Bacterial Lipopeptides. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 9049-9057 (2005).
73. Triantafilou, M. et al. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 31002-31011 (2006).
74. Patel, S.N. et al. Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. *J. Immunol* **178**, 3954-3961 (2007).
75. Hoebe, K. et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-527 (2005).
76. Nakata, T. et al. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cell Microbiol* **8**, 1899-1909 (2006).
77. Gerold, G. et al. A Toll-like receptor 2-integrin [beta]3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat Immunol* **9**, 761-768 (2008).
78. Drage, M.G. et al. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Immunology* **258**, 29-37 (2009).
79. Liu, X., Wetzler, L.M. & Massari, P. The PorB porin from commensal Neisseria lactamica induces Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice and is a potential immune adjuvant. *Vaccine* **26**, 786-796 (2008).
80. Massari, P. et al. Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-Like Receptor 2 and MyD88 Dependent. *J Immunol* **168**, 1533-1537 (2002).
81. Eddie Ip, W.K., Takahashi, K., Alan Ezekowitz, R. & Stuart, L.M. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunological Reviews* **230**, 9-21 (2009).
82. Stuart, L.M. et al. Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* **170**, 477-485 (2005).
83. Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B., Netea, M.G. & Adema, G.J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular Microbiology* **10**, 2058-2066 (2008).
84. Raby, A. et al. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J. Immunol* **183**, 506-517 (2009).
85. Dulay, A.T. et al. Soluble TLR2 Is Present in Human Amniotic Fluid and Modulates the Intraamniotic Inflammatory Response to Infection. *J Immunol* **182**, 7244-7253 (2009).
86. Watters, T.M., Kenny, E.F. & O'Neill, L.A.J. Structure, function and regulation of the Toll//IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* **85**, 411-419 (2007).
87. Dunne, A. et al. IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination and

degradation of MyD88 adapter-like (MAL). *Journal of Biological Chemistry* (2010).doi:10.1074/jbc.M109.098137

88. Albrecht, V., Hofer, T., Foxwell, B., Frankenberger, M. & Ziegler-Heitbrock, L. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC Immunology* **9**, 69 (2008).
89. Liljeroos, M. et al. Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. *Cellular Signalling* **19**, 625-633 (2007).
90. Dietrich, N., Lienenklaus, S., Weiss, S. & Gekara, N.O. Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLoS ONE* **5**, e10250 (2010).
91. O'Neill, L.A. When Signaling Pathways Collide: Positive and Negative Regulation of Toll-like Receptor Signal Transduction. *Immunity* **29**, 12-20 (2008).
92. Gringhuis, S.I. et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-[kappa]B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* **10**, 203-213 (2009).
93. Ghosh, T.K. et al. TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF-[alpha]. *International Immunopharmacology* **7**, 1111-1121 (2007).
94. Wenink, M.H. et al. TLR2 Promotes Th2/Th17 Responses via TLR4 and TLR7/8 by Abrogating the Type I IFN Amplification Loop. *J Immunol* **183**, 6960-6970 (2009).
95. Netea, M.G. et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur. J. Immunol* **34**, 2052-2059 (2004).
96. Grabiec, A. et al. Human but Not Murine Toll-like Receptor 2 Discriminates between Tri-palmitoylated and Tri-lauroylated Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48004-48012 (2004).
97. Rehli, M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology* **23**, 375-378 (2002).
98. Corr, S. & O'Neill, L. Genetic Variation in Toll-Like Receptor Signalling and the Risk of Inflammatory and Immune Diseases. *JOURNAL OF INNATE IMMUNITY* **1**, 350-357 (2009).
99. von Herrath, M.G. & Nepom, G.T. Lost in translation: barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity. *J. Exp. Med* **202**, 1159-1162 (2005).
100. Thompson, J.M. & Iwasaki, A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev* **60**, 786-794 (2008).
101. Muller, U. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921 (1994).
102. Szomolanyi-Tsuda, E., Liang, X., Welsh, R.M., Kurt-Jones, E.A. & Finberg, R.W. Role for TLR2 in NK Cell-Mediated Control of Murine Cytomegalovirus In Vivo. *J. Virol.* **80**, 4286-4291 (2006).
103. Joffre, O., Nolte, M.A., Spörri, R. & Sousa, C.R.E. Inflammatory signals in dendritic cell

activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews* **227**, 234-247 (2009).

104. Koyama, S., Ishii, K.J., Coban, C. & Akira, S. Innate immune response to viral infection. *Cytokine* **43**, 336-341 (2008).
105. Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M. & Barton, G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol* **10**, 1200-1207 (2009).
106. Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Direct TLR2 Signaling Is Critical for NK Cell Activation and Function in Response to Vaccinia Viral Infection. *PLoS Pathog* **6**, (2010).
107. Quigley, M., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* **113**, 2256-2264 (2009).
108. Juckem, L.K., Boehme, K.W., Feire, A.L. & Compton, T. Differential Initiation of Innate Immune Responses Induced by Human Cytomegalovirus Entry into Fibroblast Cells. *J Immunol* **180**, 4965-4977 (2008).
109. WANG, J. et al. Circulating Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C. *Apmis* **118**, 261-270 (2010).
110. Riordan, S. et al. Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: Correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflammation Research* **55**, 279-285 (2006).
111. Brown, R. et al. R753Q Single-Nucleotide Polymorphism Impairs Toll-Like Receptor 2 Recognition of Hepatitis C Virus Core and Nonstructural 3 Proteins. *TRANSPLANTATION* **89**, 811-815 (2010).
112. Krug, A. et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433-1437 (2004).
113. Zhou, S. et al. Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) infection of CNS glial cells results in TLR2-MyD88/Mal-dependent inflammatory responses. *J Neuroimmunol* **194**, 70-82 (2008).
114. Wenink, M.H. et al. TLR2 Promotes Th2/Th17 Responses via TLR4 and TLR7/8 by Abrogating the Type I IFN Amplification Loop. *J Immunol* **183**, 6960-6970 (2009).
115. Guo, B., Chang, E.Y. & Cheng, G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest* **118**, 1680-1690 (2008).
116. Rizzardi, G.P. et al. Tumour necrosis factor (TNF) and TNF-related molecules in HIV-1+ individuals: relationship with in vitro Thl/Th2-type response. *Clin Exp Immunol* **114**, 61-65 (1998).
117. Hernandez-Pando, R. & Rook, G.A. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* **82**, 591-595 (1994).
118. University of South Carolina School of Medicine Microbiology and Immunology On-line. at <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/intro-vir.htm>
119. DePaolo, R.W. et al. Toll-Like Receptor 6 Drives Differentiation of Tolerogenic Dendritic

Cells and Contributes to LcrV-Mediated Plague Pathogenesis. *Cell Host & Microbe* **4**, 350-361 (2008).

120. McKenzie, C.G.J. et al. Contribution of Candida albicans Cell Wall Components to Recognition by and Escape from Murine Macrophages. *Infect. Immun.* **78**, 1650-1658 (2010).
121. Chai, L.Y.A., Netea, M.G., Vonk, A.G. & Kullberg, B. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med. Mycol* **47**, 227-236 (2009).
122. Hohl, T.M., Rivera, A. & Pamer, E.G. Immunity to fungi. *Current Opinion in Immunology* **18**, 465-472 (2006).
123. Zak, D.E. & Aderem, A. Systems biology of innate immunity. *Immunol Rev* **227**, 264-282 (2009).
124. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**, 11-24 (2004).
125. Li, M., Chen, Q., Shen, Y. & Liu, W. Candida albicans phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp. Dermatol* **18**, 603-610 (2009).
126. Netea, M.G. et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol* **172**, 3712-3718 (2004).
127. Gil, M.L., Fradelizi, D. & Gozalbo, D. TLR2: for or against Candida albicans? *Trends in Microbiology* **13**, 298-299 (2005).
128. Hise, A.G. et al. An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen Candida albicans. *Cell Host & Microbe* **5**, 487-497 (2009).
129. Blasi, E. et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with Candida albicans. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY* **44**, 69-79 (2005).
130. Gil, M.L. & Gozalbo, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to Candida albicans yeasts and hyphae. *Microbes Infect* **8**, 2299-2304 (2006).
131. Tessarolli, V. et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with Candida albicans. *Med. Mycol* 1-12 (2009).doi:10.3109/13693780902964339
132. Villamón, E. et al. Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to Candida albicans in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes Infect* **6**, 542-548 (2004).
133. Chai, L.Y.A. et al. Modulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Responses by Aspergillus fumigatus. *Infect. Immun.* **77**, 2184-2192 (2009).
134. Netea, M.G. et al. Aspergillus fumigatus evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J. Infect. Dis* **188**, 320-326 (2003).
135. Chignard, M., Balloy, V., Sallenave, J. & Si-Tahar, M. Role of Toll-like receptors in lung innate defense against invasive aspergillosis. Distinct impact in immunocompetent and immunocompromized hosts. *Clinical Immunology* **124**, 238-243 (2007).
136. Kesh, S. TLR1 and TLR6 Polymorphisms Are Associated with Susceptibility to Invasive

Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1062**, 95-103 (2005).

137. Loures, F.V., Pina, A., Felonato, M. & Calich, V.L.G. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *The Journal of Immunology* **183**, 1279-1290 (2009).
138. Calich, V.L.G. et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **53**, 1-7 (2008).
139. Nakamura, K. et al. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, Cryptococcus neoformans. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **47**, 148-154 (2006).
140. Nakamura, K. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with Penicillium marneffei. *Microbes Infect* **10**, 1223-1227 (2008).
141. Lin, J., Huang, J., Hung, L., Wu, S. & Wu-Hsieh, B.A. Distinct roles of complement receptor 3, Dectin-1, and sialic acids in murine macrophage interaction with Histoplasma yeast. *J Leukoc Biol* **88**, 95-106 (2010).
142. Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J. & Gow, N.A.R. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. *Nat Rev Micro* **6**, 67-78 (2008).
143. Heinsbroek, S.E.M. et al. Stage-Specific Sampling by Pattern Recognition Receptors during Candida albicans Phagocytosis. *PLoS Pathog* **4**, e1000218 (2008).
144. Chignard, M., Balloy, V., Sallenave, J. & Si-Tahar, M. Role of Toll-like receptors in lung innate defense against invasive aspergillosis. Distinct impact in immunocompetent and immunocompromized hosts. *Clin. Immunol* **124**, 238-243 (2007).
145. Hirata, N. et al. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Molecular Immunology* **45**, 2734-2742 (2008).
146. Sacks, D. & Sher, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* **3**, 1041-1047 (2002).
147. Almeida, I.C. & Gazzinelli, R.T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* **70**, 467-477 (2001).
148. Erdman, L.K. et al. CD36 and TLR Interactions in Inflammation and Phagocytosis: Implications for Malaria. *J Immunol* **183**, 6452-6459 (2009).
149. Greene, J.A. et al. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic populations. *Malar. J* **8**, 50 (2009).
150. Khor, C.C. et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* **39**, 523-528 (2007).
151. Mun, H. et al. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against

Toxoplasma gondii infection. *Int. Immunol.* **15**, 1081-1087 (2003).
152. Debierre-Grockiego, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from Toxoplasma gondii. *J Immunol* **179**, 1129-1137 (2007).
153. Yarovinsky, F. et al. TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science* **308**, 1626-1629 (2005).
154. Ju, C., Chockalingam, A. & Leifer, C.A. Early Response of Mucosal Epithelial Cells during Toxoplasma gondii Infection. *J Immunol* **183**, 7420-7427 (2009).
155. Campos, M.A. et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol* **172**, 1711-1718 (2004).
156. Bafica, A. et al. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in Trypanosoma cruzi Infection. *J Immunol* **177**, 3515-3519 (2006).
157. Poncini, C.V. et al. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by Trypanosoma cruzi. *Molecular Immunology* **47**, 1981-1988 (2010).
158. Monteiro, A.C. et al. Cooperative Activation of TLR2 and Bradykinin B2 Receptor Is Required for Induction of Type 1 Immunity in a Mouse Model of Subcutaneous Infection by Trypanosoma cruzi. *J Immunol* **177**, 6325-6335 (2006).
159. Lotter, H. et al. Natural Killer T Cells Activated by a Lipopeptidophosphoglycan from Entamoeba histolytica Are Critically Important To Control Amebic Liver Abscess. *PLoS Pathog* **5**, (2009).
160. Vargas-Inchaustegui, D.A. et al. Distinct roles for MyD88 and TLR2 during Leishmania braziliensis infection in mice. *Infect. Immun.* IAI.00154-09 (2009).doi:10.1128/IAI.00154-09
161. Maizels, R.M. & Yazdanbakhsh, M. Immune Regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* **3**, 733-744 (2003).
162. Correale, J. & Farez, M. Helminth Antigens Modulate Immune Responses in Cells from Multiple Sclerosis Patients through TLR2-Dependent Mechanisms. *J Immunol* **183**, 5999-6012 (2009).
163. van der Kleij, D. et al. A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 48122 -48129 (2002).
164. Kane, C.M., Jung, E. & Pearce, E.J. Schistosoma mansoni Egg Antigen-Mediated Modulation of Toll-Like Receptor (TLR)-Induced Activation Occurs Independently of TLR2, TLR4, and MyD88. *Infect. Immun.* **76**, 5754-5759 (2008).
165. Deak, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur. J. Immunol.* NA-NA (2010).doi:10.1002/eji.200939455
166. Silhavy, T.J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, (2010).
167. Ryu, Y.H. et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to

their lipoteichoic acids. *International Immunopharmacology* **9**, 127-133 (2009).

168. Takeuchi, O., Hoshino, K. & Akira, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J. Immunol* **165**, 5392-5396 (2000).
169. Takeuchi, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).
170. Torres, D. et al. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of Listeria monocytogenes infection. *Infect. Immun* **72**, 2131-2139 (2004).
171. Love, W., Dobbs, N., Tabor, L. & Simecka, J.W. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine Mycoplasma. *PLoS ONE* **5**, e10739 (2010).
172. Leendertse, M. et al. TLR2-Dependent MyD88 Signaling Contributes to Early Host Defense in Murine Enterococcus faecium Peritonitis. *The Journal of Immunology* **180**, 4865 -4874 (2008).
173. Bafica, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med* **202**, 1715-1724 (2005).
174. Verstraelen, H. et al. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae. *J. Reprod. Immunol* **79**, 163-173 (2009).
175. Yim, J. et al. The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. *GENES AND IMMUNITY* **7**, 150-155 (2006).
176. Yim, J., Kim, H., Kwon, O. & Koh, W. Association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and nontuberculous mycobacterial lung disease in a Korean population. *HUMAN IMMUNOLOGY* **69**, 572-576 (2008).
177. Dessing, M.C., Florquin, S., Paton, J.C. & van der Poll, T. Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. *Cell. Microbiol* **10**, 237-246 (2008).
178. Han, F. et al. Role for Toll-Like Receptor 2 in the Immune Response to Streptococcus pneumoniae Infection in Mouse Otitis Media. *Infect. Immun.* **77**, 3100-3108 (2009).
179. Letiembre, M., Echchannaoui, H., Ferracin, F., Rivest, S. & Landmann, R. Toll-like receptor-2 deficiency is associated with enhanced brain TNF gene expression during pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol* **168**, 21-33 (2005).
180. Mullaly, S.C. & Kubes, P. The Role of TLR2 In Vivo following Challenge with Staphylococcus aureus and Prototypic Ligands. *The Journal of Immunology* **177**, 8154 - 8163 (2006).
181. Moens, L. et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease. *MICROBES AND INFECTION* **9**, 15-20 (2007).
182. Yuan, F. et al. Clinical relevance of TLR2, TLR4, CD14 and Fc gamma RIIA gene polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. *IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY* **86**, 268-270 (2008).

183. Liadaki, K. et al. Toll-Like Receptor 4 Gene (TLR4), but Not TLR2, Polymorphisms Modify the Risk of Tonsillar Disease Due to Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenzae. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 217-222 (2011).
184. Moore, C., Segal, S., Berendt, A., Hill, A. & Day, N. Lack of association between toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by Staphylococcus aureus. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* **11**, 1194-1197 (2004).
185. Wochrle, T. et al. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during Candida sepsis in humans. *CYTOKINE* **41**, 322-329 (2008).
186. von Aulock, S. et al. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *INFECTION AND IMMUNITY* **72**, 1828-1831 (2004).
187. Sutherland, A., Walley, K. & Russell, J. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *CRITICAL CARE MEDICINE* **33**, 638-644 (2005).
188. Schaaf, B. et al. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn Pathol* **4**, 12 (2009).
189. Munford, R.S. & Varley, A.W. Shield as Signal: Lipopolysaccharides and the Evolution of Immunity to Gram-Negative Bacteria. *PLoS Pathog* **2**, e67 (2006).
190. Spiller, S. et al. Cellular Recognition of Trimyristoylated Peptide or Enterobacterial Lipopolysaccharide via Both TLR2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13190 - 13198 (2007).
191. Fedele, G. et al. Bordetella pertussis commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS ONE* **5**, e8734 (2010).
192. Pore, D., Mahata, N., Pal, A. & Chakrabarti, M.K. 34 kDa MOMP of Shigella flexneri promotes TLR2 mediated macrophage activation with the engagement of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling. *Mol. Immunol* **47**, 1739-1746 (2010).
193. Lorenz, E., Chemotti, D.C., Jiang, A.L. & McDougal, L.D. Differential involvement of toll-like receptors 2 and 4 in the host response to acute respiratory infections with wild-type and mutant Haemophilus influenzae strains. *Infect. Immun* **73**, 2075-2082 (2005).
194. Seibert, S.A., Mex, P., Köhler, A., Kaufmann, S.H.E. & Mittrücker, H. TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Immunol. Lett* **127**, 126-134 (2010).
195. Sjolinder, H., Mogensen, T.H., Kilian, M., Jonsson, A. & Paludan, S.R. Important Role for Toll-Like Receptor 9 in Host Defense against Meningococcal Sepsis. *Infect. Immun.* **76**, 5421-5428 (2008).
196. Host defense during Klebsiella pneumonia relies on hematopoietic expressed TLR4 and TLR2.(2010).at <http://erj.ersjournals.com/content/early/2010/07/22/09031936.00076510.abstract>
197. Chassin, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the

bacterial pathogen, Leptospira interrogans. *J. Immunol* **183**, 2669-2677 (2009).

198. Spiller, S. et al. TLR4-induced IFN- production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2177-2177 (2008).
199. Shin, J.E., Kim, Y.S., Oh, J., Min, B. & Choi, Y. Treponema denticola suppresses expression of human {beta}-defensin-3 in gingival epithelial cells through inhibition of the toll-like receptor 2 axis. *Infect. Immun* **78**, 672-679 (2010).
200. Karimi, O. et al. TLR2 haplotypes in the susceptibility to and severity of Chlamydia trachomatis infections in Dutch women. *Drugs Today* **45 Suppl B**, 67-74 (2009).
201. Wiersinga, W.J. et al. Toll-like receptor 2 impairs host defense in gram-negative sepsis caused by Burkholderia pseudomallei (Melioidosis). *PLoS Med* **4**, e248 (2007).
202. Archer, K.A. & Roy, C.R. MyD88-dependent responses involving toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of Legionella pneumophila in a mouse model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun* **74**, 3325-3333 (2006).
203. Dickinson, G.S. et al. Toll-like receptor 2 deficiency results in impaired antibody responses and septic shock during Borrelia hermsii infection. *Infect. Immun* **78**, 4579-4588 (2010).
204. Abplanalp, A.L., Morris, I.R., Parida, B.K., Teale, J.M. & Berton, M.T. TLR-dependent control of Francisella tularensis infection and host inflammatory responses. *PLoS ONE* **4**, e7920 (2009).
205. Gibson, D.L. et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during Citrobacter rodentium-induced colitis. *Cell. Microbiol* **10**, 388-403 (2008).
206. Fuse, E.T. et al. Role of Toll-like receptor 2 in recognition of Legionella pneumophila in a murine pneumonia model. *J. Med. Microbiol* **56**, 305-312 (2007).
207. Dessein, R. et al. Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3β expression and intestinal clearance of Yersinia pseudotuberculosis. *Gut* **58**, 771 -776 (2009).
208. Matera, G. et al. The Janus face of Bartonella quintana recognition by Toll-like receptors (TLRs): a review. *Eur. Cytokine Netw* **19**, 113-118 (2008).
209. Peek, R.M., Fiske, C. & Wilson, K.T. Role of Innate Immunity in Helicobacter pylori-Induced Gastric Malignancy. *Physiological Reviews* **90**, 831 -858 (2010).
210. Slevogt, H. et al. Moraxella catarrhalis is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell. Microbiol* **9**, 694-707 (2007).
211. Hildebrand, D., Heeg, K. & Kubatzky, K. The Pasteurella multocida toxin (PMT) induced differentiation of haematopoietic progenitor cells in macrophages and B cells. *Cell Communication and Signaling* **7**, A47 (2009).
212. Lee, B.C., Kim, M.S., Choi, S.H. & Kim, T.S. Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF-kappaB pathway in Vibrio vulnificus-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells. *Int. J. Mol. Med* **25**, 581-591 (2010).
213. Quevedo-Diaz, M.A. et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in cell responses to Rickettsia akari. *J Leukoc Biol* jlb.1009674 (2010).doi:10.1189/jlb.1009674

214. Oliveira, S.C., de Oliveira, F.S., Macedo, G.C., de Almeida, L.A. & Carvalho, N.B. The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection* **10**, 1005-1009 (2008).

7.2 ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO 1

7.3 ANEXO C: ARTIGO PUBLICADO 2

7.4 ANEXO D : CÓPIA DAS APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/13/2010

São Paulo, 11 de março de 2010.

Ilmo(a). Sr(a)
Laura de Oliveira Nascimento
Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
FBT

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 8 de março de 2010, tomou ciência do projeto "Estudo dos efeitos da proteína porina sobre o sistema imune" (Protocolo CEUA nº 270) apresentado por Vossa Senhoria, devendo o parecer do Comitê de Ética da Universidade de Boston, MA. USA, bem como a sua tradução, ser apresentado no ato do depósito da tese.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 - Fax (11) 3091-3677 - e-mail: majo@usp.br

Documento 1. Comprovação de Ciência do Comite de Ética no Uso de Animais da FCF USP em relação à aprovação do comitê da Universidade de Boston, instituição de realização dos experimentos.

Animal Protocol Report 1

Compare

Animal Research Protocol

Status: Approved
Initial Submit Date: 3/18/2003
Approval Period: 5/12/2009 - 2/24/2010

Category of Experiment: B C D E Multiple (to be filled out by Veterinarian)

Category Detail: N/A

Section Aa: Title & PI

Protocol Number: AN-14155.2009.02

A1. Protocol Title(s):
IMMUNOPOTENTIATING ABILITY OF NEISSERIAL PORINS;NEISSERIAL PORINS AND ANTIGEN PRESENTING CELLS; SPECIFIC FOR GRANT 2R01AI040944

A2. Principal Investigator
ID: 502155
Name: LEE WETZLER
School: MEDICINE (MED)
Department: MEDICINE
Section: INFECTIOUS DISEASES
Center: None
Administration Office: Phone: (617) 414-4394
E-mail: LWETZLER@BU.EDU Fax: (617) 414-5280
Does PI have direct contact with animals?: Yes

A3. PI's Administrative Contact
ID: 512808
Name: PATRICIA-LEE ACHORN
Administration Office: Phone: (617) 414-5280
E-mail: PACHORN@BU.EDU Fax: [617] 414-5282

A4. Sponsored Personnel
None

Section Ab: General Information

A5. Additional Research Personnel
ID: 501951
Name: PAOLA MASSARI
Title:
School: MEDICINE (MED)
Department:
Section:
Administration Office: Phone: 617-414-4807
E-mail: PMASSARI@BU.EDU Fax: 617-414-5280

ID: Non-BUMC
Name: LAURA NASCIMENTO
Institution: BUSM
Address: EBRC X-630 Phone: 617-414-5224
E-mail: laura.nascimento@bmc.org Fax: 617-414-5280

ID: Non-BUMC
Name: XIU PING LIU-BERGERON
Institution: BMC
Address: EBRC X-630 Phone: 617-414-5211

https://braan.bumc.bu.edu/esp1/reports/Animal/Protocol.asp?protocol=753092 October 13, 2009 2:51:59 PM

Documento 2. A figura acima é copia da página do projeto onde se evidencia a aprovação pelo comitê de Ética de animais da Universidade de Boston, as páginas posteriores não foram anexadas por se tratarem apenas da descrição do projeto, já feito no texto da tese.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/27/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Porinas e suas ações dependentes de TLR2**" (Protocolo CEUA/FCF/308), de responsabilidade da pesquisadora **Laura de Oliveira Nascimento,** sob a orientação do Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Documento 3. . Comprovação de aprovação do Comite de Ética no Uso de Animais da FCF USP em relação à parte esperimental animal realizada no Brasil.