

CYRO ALVES DE BRITO

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

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo
2009

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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