

RENATO BARBOZA

**Influência dos receptores do tipo *Toll 2* e *4* no desenvolvimento da
alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em
presença de lipopolissacarídeo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Momthilo Russo

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina R. Bortolucci

São Paulo
2010

RESUMO

Barboza R. Influência dos receptores do tipo *Toll* 2 e 4 no desenvolvimento da alergia pulmonar experimental induzida por *Blomia tropicalis* em presença de lipopolissacarídeo [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A asma é uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação crônica pulmonar das vias aéreas associada com uma obstrução intermitente e hiper-reatividade (AHR). O aumento de caso de asma, principalmente alérgica tem sido explicado pela teoria da higiene. De acordo com esta teoria, existe uma relação inversa entre o aumento de doenças alérgicas e menor exposição microbiana. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do lipopolissacarídeo (LPS) durante a sensibilização com extrato de *Blomia tropicalis*, um prevalente alérgeno presente na poeira doméstica de regiões tropicais. Para induzir a alergia pulmonar experimental, camundongos foram sensibilizados s.c. com o extrato de *B. tropicalis* adsorvido ao alum em presença ou não de LPS nos dias 0 e 7 e desafiados i.n. com o extrato de *B. tropicalis* nos dias 14 e 21. A AHR e inflamação pulmonar foram avaliadas nos dias 15 e 21, respectivamente. Para avaliar as vias de sinalização envolvidas, foram usado animais deficientes na expressão de TLR2, TLR4, CD14, MyD88, IFN γ R e na produção de IFN γ . Os animais controles sensibilizados e desafiados com o extrato de *B. tropicalis* apresentaram intensa inflamação pulmonar eosinofílica, AHR, grande produção de muco, aumento na produção de citocinas do tipo 2 no lavado broncoalveolar (BAL) e aumento de IgE. Quando o LPS foi adicionado, observou-se uma inibição no influxo de eosinófilos e um aumento no influxo de neutrófilos no BAL. O LPS também inibiu IL-4 e IL5 e aumentou IFN γ e IL-17. Surpeendentemente, o LPS não afetou a AHR, nem a produção de IgE. Utilizando animais nocautes de IFN γ , IFN- γ R, TLR2, TLR4, CD14 e MyD88, verificou-se que a inibição do infiltrado eosinofílico induzido pelo LPS é dependente de IFN γ e MyD88 enquanto que o aumento de neutrófilos é independente de IFN γ e dependente da sinalização dos TLR2, TLR4 e CD14. Além disso, na ausência de TLR2, TLR4 ou CD14, o LPS suprimiu a inflamação pulmonar e AHR. Em conclusão, os resultados apresentados indicam que a exposição ao extrato de *B. tropicalis* e LPS induzem um fenótipo de asma não clássico que é dependente da sinalização pelos TLR.

Palavras chaves: Asma. Alergia. Receptores do tipo Toll. *Blomia tropicalis*. LPS. TLR4. TLR2. CD14. MyD88.

ABSTRACT

Barboza, R. Influence of Toll-like receptors 2 and 4 on the development of experimental allergic airway disease induced by *Blomia tropicalis* in the presence of lipopolissacharide. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Asthma is a disorder of the airways characterized by chronic inflammation, reversible airway obstruction and airway hyperactivity (AHR). The increase of allergic asthma has been explained by the Hygiene Hypothesis in which, according to this theory, the increase of allergic disease is inversely proportional to microbial exposition. The aim of this work was to study the effects of endotoxin during sensitization with *Blomia tropicalis* extract, a prevalent house dust mite (HDM) of tropical regions. To induce experimental allergic airways, mice were sensitized s.c. with HDM with or without LPS co-adsorbed onto alum on days 0 and 7, and challenged i.n. with HDM on days 14 and 21. AHR and allergic airway inflammation were evaluated on days 15 and 21, respectively. To address the role of specific signaling pathways we used TLR2-, TLR4-, CD14-, MyD88, IFN γ R or IFN γ -deficient mice. Wild type mice sensitized and challenged with HDM showed eosinophilic lung inflammation, AHR, mucus hyperproduction, increased levels of type 2 cytokines in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, and augmented total IgE. When LPS was added at the sensitization, we observed an inhibition of eosinophil influx and an increase in neutrophil counts in the BAL. Moreover, LPS inhibited IL-4 and IL-5 production and increased IFN- γ and IL-17 production. Surprisingly, LPS did not affect AHR or IgE production. Using IFN γ , TLR2, TLR4, CD14 and MyD88 knockout mice, we found that the eosinophilic inhibition induced by LPS was dependent on IFN γ and MyD88, while the neutrophilic increase was independent of IFN γ and dependent on TLR2, TLR4 and CD14 signaling. Moreover, in the absence of TLR2, TLR4 or CD14, LPS suppressed AAD. In conclusion, our results indicate that HDM and LPS exposure induces a non-classical asthma-like phenotype that is dependent on TLR signaling.

Key words: Asthma. Allergy. Toll-like receptors. *Blomia tropicalis*. LPS. TLR4. TLR2. CD14. MyD88.

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma síndrome respiratória caracterizada por uma inflamação crônica pulmonar associada a uma obstrução intermitente, hiper-reatividade (AHR) e inflamação das vias aéreas que pode ser desencadeada por vários estímulos como alérgenos ambientais ou infecções virais (National Asthma Education and Prevention Program, 2007; National Institutes of Health, 2009). Atingindo cerca de 7-10% da população mundial, em 2005, dados da Organização Mundial da Saúde estimaram cerca de 300 milhões de casos de asma e 255 mil óbitos em decorrência desta doença no mundo inteiro (World Health Organization, 2006). Ainda, de acordo com o relatório da OMS, estima-se que nos próximos anos haverá um acréscimo de 20% na ocorrência de asma na população mundial. No Brasil, segundo dados do SUS, são registrados cerca de 8 óbitos por dia causados por asma. Por ano, são registrados 367 mil internações por este mesmo problema, gerando gastos superiores a AIDS e tuberculose. Juntamente com a pneumonia e a doença pulmonar obstrutiva crônica, a asma produz gastos de cerca de 600 milhões de reais por ano aos cofres públicos (Ministério da Saúde, 2008).

Tradicionalmente, a asma tem sido descrita como uma doença atópica que atinge as vias aéreas induzindo inflamação pulmonar eosinofílica mediada por células T CD4⁺ do tipo Th2 com produção das citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, grande produção de muco pelas células caliciformes presente nos brônquios e produção de IgE (Durrant e Metzger, 2010). No entanto, estudos têm mostrado que menos de 50% dos casos de asma apresentam uma padrão de resposta eosinofílico (Douwes et al., 2002; Simpson et al., 2006). Na asma severa, por exemplo, verifica-se um aumento no número de neutrófilos, sendo que este aumento relaciona-se tanto com padrões de resposta do tipo Th1 quanto Th17 (Kim et al., 2010).

A predisposição à asma tem sido vista como uma combinação de fatores genéticos, influências ambientais, hábitos alimentares e estilo de vida. O componente genético da asma pode ser avaliado em mais de uma centena de genes correlacionados com maior ou menor grau de importância (Umetsu et al., 2002; Wilson et al., 2006). Polimorfismos em um único nucleotídeo, encontrados nos genes *ADAM33*, *IL4*, *IL4R*, *TGFβ1* e *CD14*, têm sido

associados com o desenvolvimento da asma (Sandford et al., 2000; Pulleyn et al., 2001; Jongepier et al., 2004). Fatores ambientais como o pólen, fungos, componentes da poeira doméstica, cigarros, poluição, estilo de vida como obesidade e falta de exercício e má nutrição aumentam o risco de desenvolver asma (Prescott, 2003; Lucas e Platts-Mills, 2005; Camargo et al., 2007). É interessante notar que estudos epidemiológicos tem mostrado que os fatores ambientais são importantes tanto para o estabelecimento quanto para a severidade da doença. No caso da asma alérgica, assim como outras doenças atópicas, observa-se uma estreita correlação entre o aumento da incidência da doença e diminuição da exposição a agentes microbianos (Yazdanbakhsh et al., 2002). Embora a forma mais comum de asma seja a de origem alérgica, outros tipos são descritos como a asma induzida por exercício, medicamentos (aspirina), poluição atmosférica, resistente a ação de esteróides e provocada por infecções virais (Carlsen e Carlsen, 2002; Wang et al., 2007; Pichavant et al., 2008; Handoyo e Rosenwasser, 2009; Wang et al., 2010).

1.1 Fisiologia da Asma Alérgica

Embora existam vários outros fenótipos de asma, a forma alérgica é que tem recebido mais atenção por parte dos pesquisadores nos últimos anos. O desenvolvimento da asma alérgica inicia-se pela captação e processamento dos alérgenos por células apresentadoras de antígenos (APC). Após o alérgeno ser processado, ele é apresentado, em pequenos fragmentos peptídicos, pelo MHC de classe II às células T CD4⁺. Esta apresentação leva a ativação e diferenciação das células T CD4⁺ para um perfil Th2. Dentre as APC, as células dendríticas são importantes para a patogênese de doenças alérgicas e estão envolvidas no direcionamento de células T CD4⁺ (Kim et al., 2010). Encontradas nas vias aéreas, bem como nos linfonodos bronquiais, as células dendríticas pulmonares expressam vários tipos de receptores incluindo os TLR e NLR (Lambrecht e Hammad, 2009). Quando ativadas por alérgenos, estas células aumentam a expressão de moléculas co-ativadoras (ex: CD80 e CD86), além de liberar quimiocinas como CCL17 e CCL22. Dessa forma, as

células dendríticas promovem a migração para o pulmão das células T CD4+, eosinófilos e basófilos (Lambrecht e Hammad, 2009). Além das células dendríticas, outras células (como os basófilos, eosinófilos e mastócitos) tem grande importância no direcionamento de respostas alérgicas Th2 (Akuthota et al., 2008; Sokol et al., 2008; Barrett e Austen, 2009; Yoshimoto et al., 2009).

Modelos animais e estudos com humanos sugerem que as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF produzidas por células T, eosinófilos, basófilos e mastócitos são essenciais para o desenvolvimento da asma (Humbert et al., 1997; Grunig et al., 1998; Wills-Karp et al., 1998). Estas citocinas junto com outros mediadores inflamatórios induzem a migração de eosinófilos e alteram a fisiologia pulmonar levando ao remodelamento pulmonar caracterizado por metaplasia brônquica, aumento da musculatura lisa peribronquial e deposição de colágeno. A fisiopatogênese da asma também é caracterizada pela produção de imunoglobulinas anafiláticas como a IgE e IgG1, esta última apenas em camundongos (Oettgen et al., 1994; Mehlhop et al., 1997), sendo que a indução da produção de IgE é feita pelas citocinas IL-4 e IL-13 (Coffman e Carty, 1986; Minty et al., 1993).

A asma apresenta duas etapas com características distintas, a fase imediata e a tardia. A fase imediata se dá após o contato com o alérgeno, com a ligação da IgE aos receptores FcεRI presentes em mastócitos e basófilos fazendo com que mediadores inflamatórios sejam liberados por estas células (Majno et al., 1969; Center et al., 1994). Já a fase tardia da asma é caracterizada pela migração de células inflamatórias (linfócitos ativados e eosinófilos) para o tecido pulmonar. São conseqüências da fase tardia o dano tecidual, hiper-reatividade brônquica e produção de muco. Com o início da fase tardia, forma-se um micro-ambiente inflamatório caracterizado por citocinas do tipo 2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-33, IL-25 e TSLP (Kim et al., 2010). Além, disso há liberação de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento celular (eotaxina, RANTES, MIP-1α e outras) (Gonzalo et al., 1996) e expressão de moléculas de adesão e seus receptores (como VLA-1, VLA-4, α4β7, ICAM-1, VCAM-1) (Anwar et al., 1994; Walsh et al., 1996). Mediadores lipídicos (principalmente PAF, LTB4, LTC4 e PGE2) (Wardlaw et

al., 1986; Walsh et al., 1990; Anwar et al., 1994) e substâncias secretadas por eosinófilos como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), o ânion superóxido e o PAF, também contribuem para o quadro asmático (Postma et al., 1988; Prescott et al., 1990; White et al., 1990; Lundgren et al., 1991; Sarmiento et al., 1995).

Em humanos a estimulação contínua pelo alérgeno leva à asma crônica, fazendo com que, em alguns indivíduos ocorra remodelamento pulmonar, e como resultado um decréscimo da função pulmonar (Lemanske e Busse, 2010).

Além da resposta imune adaptativa, o desenvolvimento asma alérgica tem grande participação da imunidade inata, como será visto mais adiante no texto.

1.2 Asma Alérgica & Hipótese da Higiene

Alergias são reações de hipersensibilidade a antígenos considerados inócuos que ocorrem em indivíduos atópicos. Nas últimas décadas tem aumentado a prevalência de doenças alérgicas no mundo, principalmente em países desenvolvidos. Este aumento têm sido explicado em parte pela “Hipótese da Higiene” (Shaheen et al., 1996; Shirakawa et al., 1997). De acordo com esta hipótese, existe uma associação inversa entre o aumento das doenças alérgicas e a diminuição da exposição microbiana durante os primeiros anos de vida, provavelmente devido um desvio para respostas do tipo Th2 (Bach, 2002; Mucida et al., 2003). No entanto, a diminuição a exposição microbiana na infância também tem sido relacionada ao aumento de doenças autoimunes, como a diabetes mellitus do tipo 1 (Gale, 2002), assim como o aumento da susceptibilidade a Doenças de Crohn (Lashner e Loftus, 2006). Além disso, tem sido mostrado que a falta de estímulos microbianos acarreta prejuízo na formação e estimulação de células T reguladoras (Maizels, 2005; Bernsen et al., 2006).

Estudos epidemiológicos relacionados com exposição à endotoxina bacteriana têm corroborado ou não a teoria da higiene, pois alguns mostram que a exposição pode ser um fator de proteção à asma (von Mutius, 1998; Rodriguez et al., 2003; Williams et al., 2005; Bortolatto et al., 2008) e outros indicam que a exposição pode ser um fator de risco (Michel et al., 1996; Rizzo et al., 1997; Thorne et al., 2005).

A divergência entre os resultados dos trabalhos tem sido explicada, em parte, pela interação entre fatores ambientais e genéticos. No caso dos estudos epidemiológicos, os fatores ambientais incluem tempo e modo de exposição à endotoxina, pré-existência de asma e mutações (Piggott et al., 2005; Hollingsworth et al., 2006). Já, nos estudos experimentais realizados com camundongos, as controvérsias podem ser atribuídas aos protocolos de imunização assim como o fundo genético dos animais (Brewer et al., 1999; Williams et al., 2005).

1.3 Alérgenos da Poeira Doméstica

Fatores ambientais contribuem significativamente para o desenvolvimento e severidade das doenças alérgicas, sejam eles de origem doméstica (ex: poeira doméstica), ocupacional (ex: enzimas) ou do ambiente natural (ex: pólen) (Peden e Reed, 2010). Dentre os alérgenos presentes na poeira doméstica encontramos os provenientes de fungos, artrópodes (ex: ácaros, baratas) e mamíferos (ex: roedores, cães e gatos), entre outros.

Ácaros, em particular, constituem um grupo importante de alérgenos presentes na poeira doméstica e estão claramente associados com o desenvolvimento da asma alérgica (Sears et al., 1989; Platts-Mills, 1990; Platts-Mills et al., 1991; Squillace et al., 1997; Carter et al., 2003). Os ácaros alimentam-se de restos epiteliais de mamíferos que podem ser encontrados em camas e carpetes. Além disso, esses animais dependem de umidade, pois retiram do ar a água para sua sobrevivência. Assim como as baratas, a maior fonte de alérgenos dos ácaros encontram-se em partículas fecais. Devido ao

tamanho destas partículas (10-20mm), elas não ficam suspensas no ar ambiente (Diette et al., 2007; Diette et al., 2008)

O ácaro da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* (Família Pyroglyphidae) é reconhecidamente um dos alérgenos mais importantes para indução de asma. O antígeno principal desta espécie o Der p 1, é capaz de clivar a molécula CD23 (receptor de baixa afinidade para IgE, também conhecido como FcεRIII) presente nas células B (Hewitt et al., 1995; Schulz et al., 1997). O CD23 é importante para a regulação negativa da síntese de IgE *in vivo* e sua clivagem pode bloquear o mecanismo de regulação do IgE, levando a uma intensa produção deste isótipo (Yu et al., 1994). Além disso, o Der p 1 cliva a cadeia α do IL-2R, CD25, na superfície de linfócitos T (Schulz et al., 1998), levando à diminuição da proliferação e da secreção de IFN-γ em resposta ao antígeno anti-CD3. Como o receptor de IL-2 é essencial para expansão da subpopulação de linfócitos Th1, a atividade enzimática do Der p 1 é capaz de direcionar a resposta imune para um padrão do tipo Th2. Além disso, a atividade das proteases de Der p 1 pode ainda degradar junções oclusivas do epitélio pulmonar e liberar citocinas pró-inflamatórias das células epiteliais brônquicas, mastócitos e basófilos (Chapman et al., 2007).

Outro ácaro importante para a indução de alergias pulmonares, principalmente em regiões tropicais, é a *Blomia tropicalis* (Família Echymypodidae) (Naspitz et al., 2004; Takeda et al., 2004). Estudos realizados em Cuba, Venezuela e Taiwan registraram altas frequências de positividade de “prick” teste para *B. tropicalis* (>68%) (Tsai et al., 1998; Sanchez-Borges et al., 2003; Castro Almarales et al., 2006). No caso do Brasil, um estudo de 1997 mostrou que 95% dos pacientes que apresentavam asma e rinite alérgica eram reativos para *B. tropicalis* (Rizzo et al., 1997).

Evidências mostram que os alérgenos encontrados na *B. tropicalis* são distintos dos alérgenos encontrados em *Dermatophagoides sp.*, além de apresentarem baixa reação cruzada (Chew et al., 1999). Já foram descritos pelo menos 11 alérgenos (Blo t 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 e 21) capazes de induzir a produção de IgE-específica em humanos (Gao et al., 2007). Dentre os alérgenos presentes no extrato de *B. tropicalis* encontramos proteases semelhantes as encontradas em extratos de *Dermatophagoides sp.* (cisteíno-

proteases). Estas proteases podem ser importante para alergenicidade de *B. tropicalis*, já que, como descrito para Derp 1, estas enzimas podem exercer atividades como a clivagem de CD23 e CD25.

1.4 Propriedade Biológica dos alérgenos

Na tentativa de ampliar o entendimento sobre as propriedades intrínsecas dos alérgenos, Kheradmand et al. (2002) propuseram uma classificação dos alérgenos baseado nas suas características funcionais. Estes autores sugerem a divisão dos alérgenos em dois grupos: os do tipo I, que obrigatoriamente necessitam de um adjuvante durante a fase de sensibilização para promover um quadro alérgico; e do tipo II, que, em nenhum momento, necessita de adjuvantes. O principal exemplo de alérgeno do tipo I é a ovalbumina (OVA), que necessita do adjuvante alum (gel de hidróxido de alumínio) durante a fase de sensibilização para induzir alergia; em contraste, o fungo *Aspergillus fumigatus* é capaz de induzir inflamação pulmonar alérgica sem a necessidade de um adjuvante adicional e por isso pode ser classificado com um alérgeno do tipo II.

1.5 Modelos murinos de asma

Os primeiros modelos experimentais de asma foram publicados no início da década de 90 do século passado e, desde então, vários modelos tem sido descritos (Brusselle et al., 1994; Gavett et al., 1994; Kung et al., 1994; Lukacs et al., 1994; Epstein, 2004). No entanto, nenhum modelo é capaz de mimetizar todos os aspectos da asma em humanos. Por exemplo, em humanos observamos AHR mesmo na ausência de sintomas, enquanto que em camundongos a AHR é transiente e geralmente ocorre em resposta a um estímulo broncoconstrictor, como a metacolina. Outro ponto importante é o fato de que, em humanos, os mastócitos e a produção de IgE medeiam tanto a fase imediata quanto a fase tardia. Em camundongos os mastócitos podem ou

não serem necessários, dependendo do modelo utilizado (Williams e Galli, 2000). Além disso, enquanto que a exposição crônica a alérgenos leva a um processo alérgico crônico em humanos, em modelos animais, a exposição crônica leva a supressão da resposta. Mesmo, apresentando estas diferenças, os modelos murinos forneceram grande parte do conhecimento atual sobre a asma (Epstein, 2004).

Modelos murinos são excelente para o estudo, pois são alternativas às restrições legais e éticas de obtenção do lavado broncoalveolar e de tecido pulmonar para análise. Além de tornar possível a avaliação dos processos de sensibilização a alérgenos e de testar novos tratamentos (Epstein, 2004).

A indução de asma experimental inicia-se com a sensibilização dos animais. Os animais podem ser sensibilizados por várias vias (intra-peritoneal, intra-nasal, intra-traqueal ou por instilação) na presença ou não de substâncias adjuvantes, como por exemplo o alum (Wills-Karp et al., 1998; Yu et al., 1999; Jungsuwadee et al., 2002; Mojtabavi et al., 2002; Shinagawa e Kojima, 2003). A sensibilização pode ser feita tanto pelo uso de alérgenos protéicos quanto por células dendríticas ou macrófagos pulsados com antígenos (Lambrecht et al., 2000; Lambrecht et al., 2001; Graffi et al., 2002; Janssen et al., 2002), sendo que o alérgeno mais usado em modelos murinos é a OVA (Kung et al., 1994; Wills-Karp et al., 1998; Jungsuwadee et al., 2002; Mojtabavi et al., 2002). Outros alérgenos usados incluem soro albumina bovina (Kasai et al., 2001), proteínas do schistossoma (Pacífico et al., 2009), clara de ovo coagulada (de Siqueira et al., 1997), pólen de *Ambrosia artemisiifolia* L. (Justice et al., 2002; Cates et al., 2003), alérgenos de barata (Kim et al., 2001) e alérgenos presentes na poeira domestica (O'Brien et al., 1996; Ichinose et al., 1997; Cheng et al., 1998; Yu et al., 1999; Sadakane et al., 2002; Tategaki et al., 2002; Ichinose et al., 2003).

As diferenças de resposta encontradas entre os modelos experimentais, são resultado dos diferentes protocolos utilizados. Via e tempo de exposição ao alérgeno influenciam o direcionamento da resposta. Outro fator importante é a presença de substâncias adjuvantes durante a sensibilização. O alum, por exemplo, é reconhecidamente um indutor de respostas Th2 (Pollock et al., 2003).

Protocolos baseados na utilização de alum, embora possuam limitações, apresentam vantagens para o estudo de respostas alérgicas. Estes modelos tem como característica eosinofilia pulmonar e grande produção de IgE. Desenvolvida por Kung *et al.* (1994) para estudar células, citocinas e vias de sinalização relacionadas com a asma, tipicamente estes modelos apresentam uma fase de sensibilização, que consiste da administração de duas doses de alum (via s.c. ou i.p.) em intervalos de 7 a 14 dias e uma fase de desafio. A primeira faz com que se desenvolva uma resposta sistêmica do tipo Th2, enquanto desafios subsequentes pelas vias aéreas ativam os clones de células T, produzindo inflamação pulmonar.

Além do alum, fatores ambientais como poluentes, cigarro, ozônio, protease exógenas e o LPS podem apresentar propriedades adjuvantes (Platts-Mills *et al.*, 1991; Sporik *et al.*, 1992; Sporik e Platts-Mills, 1992; Munir, 1997; Munir *et al.*, 1997; Gern, 2010). Dentre os fatores ambientais, o LPS, uma molécula amplamente distribuída no ambiente, é o que mais tem gerado resultados controversos, já que se tem mostrado tanto sua função na exacerbação (Michel *et al.*, 1996; Rizzo *et al.*, 1997; Thorne *et al.*, 2005) quanto na inibição das respostas alérgicas (von Mutius *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005; Bortolatto *et al.*, 2008).

Outros trabalhos mostram, no entanto, que o LPS pode ter um papel no direcionamento da resposta alérgica. Assim, animais sensibilizados com OVA, mostraram que baixas concentrações de LPS induzem uma resposta pulmonar alérgica (Th2) (Eisenbarth *et al.*, 2002). Já quando os animais são sensibilizados na presença de altas concentrações de LPS, ocorre uma mudança no perfil de resposta com predomínio de neutrófilos e células mononucleares, típicas do padrão Th1. Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores, utilizando protocolo semelhante, mostrou que os níveis de LPS podem determinar o tipo da inflamação (predomínio de células Th2 ou Th1), porém nos dois casos os animais apresentam um quadro semelhante à asma com hiper-reatividade brônquica (AHR) (Kim *et al.*, 2007). Trabalho realizado por Bortolatto *et al.* (2008), utilizando um modelo murino de alergia pulmonar, mostram que o LPS adicionado no momento da sensibilização pode exercer uma regulação negativa sobre o desenvolvimento de alergia pulmonar,

sendo que esta regulação é dependente de TLR4 e da molécula MyD88, mas não TRIF.

1.6 Os Receptores do tipo Toll e a modulação da asma

A descoberta dos receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) em mamíferos esta diretamente relacionada com a descoberta da proteína Toll em moscas do gênero *Drosophila ssp.* Nestas moscas, o Toll foi reconhecido como o receptor da proteína Spätzel e relacionado com a via de sinalização que controla a polaridade dorso ventral do embrião (Hashimoto et al., 1988). A geração de mutantes, mostrou no entanto, que além de sua função no desenvolvimento embrionário, a mutação funcional no gene *toll* torna estes animais susceptíveis a infecções por fungo (Lemaitre et al., 1996). Surpreendentemente esta mutação não influencia a resposta a infecções bacterianas. Pouco tempo após esta descoberta, o primeiro homólogo da proteína Toll foi identificado e caracterizado (Medzhitov et al., 1997), porém só mais tarde foi nomeado como receptor do tipo Toll 4 (TLR4).

A análise da sequência do gene *toll* mostra que este gene codifica uma proteína que possui um grande domínio extracelular, composto por 19-23 cópias tandem de repetições. Cada repetição consiste de 24 a 29 aminoácidos numa sequência rica em leucina, sendo que estas repetições consistem numa fita β e uma α -hélice. Já a porção citoplasmática é formada por um domínio similar ao domínio citoplasmático do receptor da Interleucina-1 (IL-1R), chamado de domínio TIR. Tanto o domínio do *Toll* quanto o do IL-1R induzem uma via de transdução que leva a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B. Em mamíferos a ativação de NF- κ B leva a produção de vários peptídeos com atividade microbicida.

O TLR4, assim como em *Drosophila ssp.*, mostrou-se capaz de ativar a via do NF- κ B, induzindo uma ampla variedade de citocinas e moléculas co-estimulatórias críticas para indução de respostas adaptativas.

Na década de 70 do século passado, já havia sido publicado que camundongos C3H/HeJ apresentavam prejuízo na resposta imune induzida por LPS (Russo e Lutton, 1977), mas só em 1998 foi publicado um trabalho mostrando que camundongos que apresentam uma mutação no gene *tlr4* não respondem ao LPS e, portanto, são resistentes ao choque endotóxico (Poltorak et al., 1998). Este trabalho foi o primeiro a evidenciar a correlação entre o TLR4 e a imunidade inata, sendo que trabalhos posteriores estabeleceram o LPS como o ligante de TLR4 (Hoshino et al., 1999; Qureshi et al., 1999).

O TLR4, no entanto, não é a única proteína envolvida no reconhecimento do LPS. Antes de ativar o TLR4, o LPS interage com uma proteína presente chamada “proteína ligadora de LPS” (LBP, do inglês *Lipid binding protein*), que é responsável por levar o LPS a um receptor presente em macrófagos e células B, o CD14. Além disso, é necessário outra proteína, a MD-2, que intermedeia o reconhecimento do LPS pelo TLR4. Enquanto que o TLR4 e a MD-2 são constitutivamente associados, o CD14 é recrutado após a ligação com o LPS.

Após ativado, o TLR4 recruta a proteína adaptadora MyD88 que é associada a IRAK. A ligação e ativação da MyD88 se dá pelo domínio TIR, que é a porção citoplasmática do TLR, de forma semelhante a ligação de IL-1 ao seu receptor, pois a molécula MyD88 também possui um domínio TIR que interage com o IL-1R. Em sua outra extremidade, a MyD88 possui um domínio que medeia interações proteína-proteína. Como este domínio foi identificado em proteínas envolvidas com a morte celular programada, ele ficou conhecido como “domínio de morte”. Por este domínio, a MyD88 interage com os domínios de morte da quinase serina-treonina IRAK 4. A IRAK4 se associa com IRAK1, induzindo a fosforilação de IRAK1. Após fosforilada, IRAK1 associa-se a proteína adaptadora TRAF-6. IRAK1 fosforilada e TRAF6 dissociam-se do receptor e formam um complexo com TAK1, TAB1 e TAB2. Ocorre, então a fosforilação de TAB2 e TAK1. A IRAK por sua vez é degradada na membrana. O complexo remanescente TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2, transloca-se para o citossol e se associa com UBC13 e UEV1A. Isso leva a ubiquitinação de TRAF6 que, por sua vez, ativa TAK1. Isso leva a ativação tanto de MAP3K quanto do complexo IKK (I κ B quinase 1 (IKK1) e

IKK2 e NEMO). Este complexo forma um dímero que fosforila I κ B no resíduos de serina. A I κ B é uma proteína inibidora que esta acoplada ao NF- κ B. Ao ser fosforilada, a I κ B se dissocia do NF- κ B e é, então, degradada no citossol por proteomas. Após sua dissociação, o NF- κ B migra para o núcleo e induz a ativação transcricional de vários genes envolvidos com a reposta inflamatória (Medzhitov e Janeway, 2000). Além dos genes inflamatórios, NF- κ B também ativa o gene *ikb*, que é rapidamente sintetizado e secretado, inativando o sinal de NF- κ B.

Os TLR têm sido relacionados com várias nas resposta imunes associadas ao pulmão. Camundongos deficientes na expressão de TLR2, por exemplo, quando infectados i.p. com o bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (BCG) apresentam um aumento expressivo no número de bactérias no pulmão (Heldwein et al., 2003). O TLR2 também é importante para a melhora da asma induzida por *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2001). Já, o TLR4 tem sido relacionado com o eliminação do vírus respiratório sincicial (RSV, do inglês, *respiratory syncytial virus*) (Kurt-Jones et al., 2000; Haynes et al., 2001; Fenhalls et al., 2003).

A relação entre agonistas de TLRs e o desenvolvimento de asma alérgica tem sido avaliada em vários estudos (Velasco et al., 2005; Da Silva et al., 2008; Page et al., 2009; Phipps et al., 2009; Trompette et al., 2009). Além dos trabalhos citados anteriormente mostrando a influência do LPS sobre a asma, outros ligantes de TLR também têm sido relacionado com o desenvolvimento da asma. Por exemplo, foi mostrado que o ácido lipoteitóico, um ligantes de TLR2, aumenta a suscetibilidade à asma alérgica (Cleveland et al., 1996), enquanto outros diminuem (Velasco et al., 2005). Já o CpG, um ligante de TLR9, foi descrito como um inibidor da inflamação pulmonar alérgica em camundongos (Akdis et al., 1998; Raby et al., 2002; Lewkowich et al., 2005). Recentemente foi descrito que a administração sistemática de ligantes de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR7 inibe tanto quadros alérgicos quanto respostas autoimunes (Aumeunier et al., 2010).

Pelo apresentado acima, fica claro que a modulação e o desenvolvimento da asma tem origem multifatorial e que o entendimento dos mecanismo envolvidos nesse processo é fundamental para a criação de

estratégias terapêuticas para esta síndrome. Desta forma, a hipótese desse projeto foi de que a interação entre o alérgeno e ativadores do sistema imune é importante para o desenvolvimento da asma alérgica. Para verificar essa possibilidade, este estudo foi avaliou a ação do LPS, um importante fator ambiental, no desenvolvimento da asma. Para tanto, foi um utilizado um modelo experimental de alergia pulmonar induzido pelo ácaro da espécie *B. tropicalis*.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A sensibilização *s.c.* com a *Blomia tropicalis* e alum induz uma resposta alérgica pulmonar eosinofílica do tipo Th2. Porém, em presença de LPS, o extrato de *B. tropicalis* induz uma resposta alérgica neutrofílica com elevada produção de IFN- γ , IL-17 e IgE.
- A inibição eosinofílica induzida pelo LPS é dependente de IFN γ e MyD88.
- A molécula adaptadora MyD88 não é necessária para o estabelecimento da alergia pulmonar experimental.
- Os TLR2, TLR4 CD14 e MyD88 são essenciais para o estabelecimento da inflamação neutrofílica induzida pelo LPS.
- Na ausência de TLR2, TLR4 ou CD14, o LPS suprime a alergia pulmonar experimental.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample reference. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):98-106.

Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*. 2008 Aug;38(8):1254-63.

Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1185-7.

Anwar AR, Walsh GM, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4). *Immunology*. 1994 Jun;82(2):222-8.

Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, Pham Van L, Bardel E, Gomez Alcala A, et al. Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One*. 2010;5(7):e11484.

Bach JF. Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2001 May;16(3):347-53.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):911-20.

Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*. 2003 Jun;97(6):726-33.

Barrett NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):425-37.

Bernsen RM, Nagelkerke NJ, al-Ramadi BK. Does paternal antigen-induced secretion of interleukin-10 by T regulatory cells mediate the birth order effect? *Med Hypotheses*. 2006;67(4):740-3.

Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Modulation of airway inflammation and resistance in mice by a nicotinic receptor agonist. *Eur Respir J*. 2005 Jul;26(1):21-7.

Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. IL-18 modulates chronic fungal asthma in a murine model; putative involvement of Toll-like receptor-2. *Inflamm Res*. 2001 Nov;50(11):552-60.

Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun 25;38(10):1668-79.

Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6448-54.

Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. 1996 Sep;26(9):2062-6.

Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1150-6.

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy*. 1994 Jan;24(1):73-80.

Camargo CA, Jr., Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2007 Mar;85(3):788-95.

Carlsen KH, Carlsen KC. Exercise-induced asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2002 Jun;3(2):154-60.

Carter PM, Peterson EL, Ownby DR, Zoratti EM, Johnson CC. Relationship of house-dust mite allergen exposure in children's bedrooms in infancy to bronchial hyperresponsiveness and asthma diagnosis by age 6 to 7. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003 Jan;90(1):41-4.

Castro Almarales RL, Mateo Morejon M, Naranjo Robalino RM, Navarro Viltre BI, Alvarez Castello M, Ronquillo Diaz M, et al. Correlation between skin tests to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2006 Jan-Feb;34(1):23-6.

Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, et al. Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 May;111(5):1076-86.

Center DM, Kornfeld H, Wu MJ, Falvo M, Theodore AC, Bernardo J, et al. Cytokine binding to CD4+ inflammatory cells: implications for asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Nov;150(5 Pt 2):S59-62.

Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;111(6):1293-8.

Chapman MD, Wunschmann S, Pomes A. Proteases as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007 Sep;7(5):363-7.

Cheng KC, Lee KM, Krug MS, Watanabe T, Suzuki M, Choe IS, et al. House dust mite-induced sensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Jan;101(1 Pt 1):51-9.

Chew FT, Yi FC, Chua KY, Fernandez-Caldas E, Arruda LK, Chapman MD, et al. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy.* 1999 Jul;29(7):982-8.

Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun.* 1996 Jun;64(6):1906-12.

Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol.* 1986 Feb 1;136(3):949-54.

Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):4279-86.

de Siqueira AL, Russo M, Steil AA, Facincone S, Mariano M, Jancar S. A new murine model of pulmonary eosinophilic hypersensitivity: contribution to experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Sep;100(3):383-8.

Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N, Pons F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy.* 2004 Nov;34(11):1789-95.

Diette GB, Hansel NN, Buckley TJ, Curtin-Brosnan J, Eggleston PA, Matsui EC, et al. Home indoor pollutant exposures among inner-city children with and without asthma. *Environmental health perspectives.* 2007 Nov;115(11):1665-9.

Diette GB, McCormack MC, Hansel NN, Breyse PN, Matsui EC. Environmental issues in managing asthma. *Respir Care.* 2008 May;53(5):602-15.

Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 2002 Jul;57(7):643-8.

Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003 Feb 25;2003(171):re3.

Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):526-49.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1645-51.

Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Jan;133(1):84-100.

Fenhalls G, Squires GR, Stevens-Muller L, Bezuidenhout J, Amphlett G, Duncan K, et al. Associations between toll-like receptors and interleukin-4 in the lungs of patients with tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jul;29(1):28-38.

Fernandez-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy*. 1993 Apr;23(4):292-7.

Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3353-61.

Gao YF, Wang de Y, Ong TC, Tay SL, Yap KH, Chew FT. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jul;120(1):105-12.

Gavett SH, Chen X, Finkelman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Jun;10(6):587-93.

Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Blumchen K, Wahn U, Hamelmann E. Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(1):25-34.

Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T, et al. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jul;110(1):110-6.

Gern JE. The Urban Environment and Childhood Asthma study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Mar;125(3):545-9.

- Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 1996 Nov 15;98(10):2332-45.
- Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):205-17.
- Graffi SJ, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Systemic administration of antigen-pulsed dendritic cells induces experimental allergic asthma in mice upon aerosol antigen rechallenge. *Clin Immunol.* 2002 May;103(2):176-84.
- Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2261-3.
- Hadeiba H, Corry DB, Locksley RM. Baseline airway hyperreactivity in A/J mice is not mediated by cells of the adaptive immune system. *J Immunol.* 2000 May 1;164(9):4933-40.
- Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med.* 2009 Apr;15(4):410-6.
- Handoyo S, Rosenwasser LJ. Asthma phenotypes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009 Nov;9(6):439-45.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988 Jan 29;52(2):269-79.
- Hashimoto T, Akiyama K, Kobayashi N, Mori A. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;137 (Suppl 1):51-4.
- Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10730-7.
- Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 2003 Aug;74(2):277-86.
- Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):42-50.

Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1537-44.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun;38(6):872-97.

Hollingsworth JW, Whitehead GS, Lin KL, Nakano H, Gunn MD, Schwartz DA, et al. TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5856-62.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, et al. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 May;99(5):657-65.

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Yanagisawa R, Sagai M. Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology*. 1997 Oct 19;122(3):183-92.

Ichinose T, Takano H, Sadakane K, Yanagisawa R, Kawazato H, Sagai M, et al. Differences in airway-inflammation development by house dust mite and diesel exhaust inhalation among mouse strains. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Feb 15;187(1):29-37.

Janssen EM, Wauben MH, Nijkamp FP, van Eden W, van Oosterhout AJ. Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Aug;27(2):257-64.

Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):757-60.

Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice. *Clin Immunol*. 2002 Feb;102(2):145-53.

Justice JP, Borchers MT, Lee JJ, Rowan WH, Shibata Y, Van Scott MR. Ragweed-induced expression of GATA-3, IL-4, and IL-5 by eosinophils in the lungs of allergic C57BL/6J mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Feb;282(2):L302-9.

Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I. T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the tissue. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125 (Suppl 1):59-66.

Kaye J, Gillis S, Mizel SB, Shevach EM, Malek TR, Dinarello CA, et al. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J Immunol.* 1984 Sep;133(3):1339-45.

Kheradmand F, Kiss A, Xu J, Lee SH, Kolattukudy PE, Corry DB. A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5904-11.

Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2010 Jul;11(7):577-84.

Kim J, Merry AC, Nemzek JA, Bolgos GL, Siddiqui J, Remick DG. Eotaxin represents the principal eosinophil chemoattractant in a novel murine asthma model induced by house dust containing cockroach allergens. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2808-15.

Kim YK, Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):5375-82.

Kim YS, Hong SW, Choi JP, Shin TS, Moon HG, Choi EJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a key mediator in the development of T cell priming and its polarization to type 1 and type 17 T helper cells in the airways. *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):5113-20.

Kolls JK, Kanaly ST, Ramsay AJ. Interleukin-17: an emerging role in lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):9-11.

Kung TT, Jones H, Adams GK, 3rd, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, et al. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994 Sep;105(1):83-90.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):398-401.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol.* 2010 Oct;11(10):928-35.

Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity.* 2009 Sep 18;31(3):412-24.

Lambrecht BN, Hoogsteden HC, Pauwels RA. Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Apr;124(4):432-46.

Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St Groth B. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol*. 2000 Mar 15;164(6):2937-46.

Lashner BA, Loftus EV, Jr. True or false? The hygiene hypothesis for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2006 May;101(5):1003-4.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20;86(6):973-83.

Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S95-102.

Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*. 2005 Dec 5;202(11):1549-61.

Linden A, Adachi M. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy*. 2002 Sep;57(9):769-75.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Lucas SR, Platts-Mills TA. Physical activity and exercise in asthma: relevance to etiology and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):928-34.

Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 May;10(5):526-32.

Lundgren JD, Davey RT, Jr., Lundgren B, Mullol J, Marom Z, Logun C, et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Mar;87(3):689-98.

Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 2005 Dec;17(6):656-61.

Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol*. 1969 Sep;42(3):647-72.

Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews*. 2000 Feb;173:89-97.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, et al. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1344-9.

Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1641-6.

Ministério da Saúde M. MS assina acordo com Sociedade de Pneumologia para prevenção de doenças respiratórias. 2008 [cited 2008 29/09/2008]; Available from:

http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=44317

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*. 1993 Mar 18;362(6417):248-50.

Mojtabavi N, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4788-96.

Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Sep;108(3):430-8.

Mucida DS, de Castro Keller A, Fernvik EC, Russo M. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 Jun;2(2):187-95.

Munir AK. Allergens and environmental factors in allergic respiratory diseases. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 1997;16:17-8.

Munir AK, Kjellman NI, Bjorksten B. Exposure to indoor allergens in early infancy and sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Aug;100(2):177-81.

Naspitz CK, Sole D, Aguiar MC, Chavarria ML, Rosario Filho N, Zuliani A, et al. [Phadiatop in the diagnosis of respiratory allergy in children: Allergy Project--PROAL]. *J Pediatr (Rio J)*. 2004 May-Jun;80(3):217-22.

National Asthma Education and Prevention Program N. Expert panel report 3: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Publication no 07-4051 2007 [cited 2009 June 8]; Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma>

National Institutes of Health N. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). 2009 [cited 2009 June 8]; Available from: <http://www.ginasthma.org>

O'Brien R, Ooi MA, Clarke AH, Thomas WR. Immunologic responses following respiratory sensitization to house dust mite allergens in mice. *Immunol Cell Biol.* 1996 Apr;74(2):174-9.

Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature.* 1994 Aug 4;370(6488):367-70.

Pacifico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun.* 2009 Jan;77(1):98-107.

Page K, Ledford JR, Zhou P, Wills-Karp M. A TLR2 agonist in German cockroach frass activates MMP-9 release and is protective against allergic inflammation in mice. *J Immunol.* 2009 Sep 1;183(5):3400-8.

Peden D, Reed CE. Environmental and occupational allergies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S150-60.

Phipps S, Lam CE, Kaiko GE, Foo SY, Collison A, Mattes J, et al. Toll/IL-1 signaling is critical for house dust mite-specific Th1 and Th2 responses. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 15;179(10):883-93.

Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med.* 2008 Feb 18;205(2):385-93.

Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA, et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):459-67.

Platts-Mills TA. Allergens and asthma. *Allergy Proc.* 1990 Nov-Dec;11(6):269-71.

Platts-Mills TA, Ward GW, Jr., Sporik R, Gelber LE, Chapman MD, Heymann PW. Epidemiology of the relationship between exposure to indoor allergens and asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;94(1-4):339-45.

Pollock KG, Conacher M, Wei XQ, Alexander J, Brewer JM. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. *Immunology.* 2003 Feb;108(2):137-43.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.

Postma DS, Renkema TE, Noordhoek JA, Faber H, Sluiter HJ, Kauffman H. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):57-61.

Prescott SL. Early origins of allergic disease: a review of processes and influences during early immune development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;3(2):125-32.

Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem*. 1990 Oct 15;265(29):17381-4.

Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet*. 2001 Dec;109(6):623-7.

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):615-25.

Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Dec 1;166(11):1449-56.

Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Nov;114(5):997-1008.

Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Mimica I, Sole D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997 Aug;8(3):121-6.

Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):1001-8.

Russo M, Lutton JD. Decreased in vivo and in vitro colony stimulating activity responses to bacterial lipopolysaccharide in C3H/HeJ mice. *Journal of cellular physiology*. 1977 Aug;92(2):303-7.

Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 May;24(5):518-26.

Sadakane K, Ichinose T, Takano H, Yanagisawa R, Sagai M, Yoshikawa T, et al. Murine strain differences in airway inflammation induced by diesel exhaust

particles and house dust mite allergen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Jul;128(3):220-8.

Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Fernandez-Caldas E. Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 Jun;90(6):664-8.

Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, et al. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40.

Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol.* 1995 Aug 15;155(4):2211-21.

Schnyder-Candrian S, Togbe D, Coullin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2715-25.

Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med.* 1998 Jan 19;187(2):271-5.

Schulz O, Sutton BJ, Beavil RL, Shi J, Sewell HF, Gould HJ, et al. Cleavage of the low-affinity receptor for human IgE (CD23) by a mite cysteine protease: nature of the cleaved fragment in relation to the structure and function of CD23. *Eur J Immunol.* 1997 Mar;27(3):584-8.

Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 1989 Jul;19(4):419-24.

Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet.* 1996 Jun 29;347(9018):1792-6.

Shakib F, Schulz O, Sewell H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunol Today.* 1998 Jul;19(7):313-6.

Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Oct 15;168(8):959-67.

Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science.* 1997 Jan 3;275(5296):77-9.

Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE, et al. Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Aug 15;174(4):386-92.

Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2008 Mar;9(3):310-8.

Sporik R, Chapman MD, Platts-Mills TA. House dust mite exposure as a cause of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1992 Oct;22(10):897-906.

Sporik R, Platts-Mills TA. Epidemiology of dust-mite-related disease. *Exp Appl Acarol.* 1992 Nov;16(1-2):141-51.

Squillace SP, Sporik RB, Rakes G, Couture N, Lawrence A, Merriam S, et al. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Dec;156(6):1760-4.

Takeda F, Arakawa T, Toma H, Ishii A, Sato Y. Intranasal sensitization with *Blomia tropicalis* antigens induces allergic responses in mice characterized by elevated antigen-specific and non-specific serum IgE and peripheral blood eosinophil counts. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004 Jan-Feb;46(1):1-8.

Tategaki A, Kawamoto S, Okuda T, Aki T, Yasueda H, Suzuki O, et al. A high-molecular-weight mite antigen (HM1) fraction aggravates airway hyperresponsiveness of allergic mice to house dusts and whole mite cultures. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Nov;129(3):204-11.

Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Structural biology of allergens. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Sep;5(5):388-93.

Thorne PS, Kulhankova K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ, Jr., Zeldin DC. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Dec 1;172(11):1371-7.

Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):585-8.

Tsai JJ, Wu HH, Shen HD, Hsu EL, Wang SR. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998 Feb;115(2):144-9.

Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):715-20.

Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature.* 2002 Jul 25;418(6896):426-30.

Velasco G, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RS, et al. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Mar;32(3):218-24.

von Mutius E. [Asthma and infection: risk or prevention?]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1998 Nov 21;128(47):1833-9.

von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy.* 2000 Sep;30(9):1230-4.

Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology.* 1990 Oct;71(2):258-65.

Walsh GM, Symon FA, Lazarovits AL, Wardlaw AJ. Integrin alpha 4 beta 7 mediates human eosinophil interaction with MAdCAM-1, VCAM-1 and fibronectin. *Immunology.* 1996 Sep;89(1):112-9.

Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. *Curr Drug Targets.* 2010 Aug;11(8):957-70.

Wang XS, Wu AY, Leung PS, Lau HY. PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leucotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy.* 2007 Jun;62(6):620-7.

Wardlaw AJ, Moqbel R, Cromwell O, Kay AB. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1701-6.

Wenink MH, Santegoets KC, Broen JC, van Bon L, Abdollahi-Roodsaz S, Popa C, et al. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):6960-70.

White SR, Ohno S, Munoz NM, Gleich GJ, Abrahams C, Solway J, et al. Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. *Am J Physiol.* 1990 Oct;259(4 Pt 1):L294-303.

Williams CM, Galli SJ. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med.* 2000 Aug 7;192(3):455-62.

Williams LK, Ownby DR, Maliarik MJ, Johnson CC. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 Mar;94(3):323-32.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.

Wilson DH, Adams RJ, Tucker G, Appleton S, Taylor AW, Ruffin RE. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. *Med J Aust.* 2006 Mar 6;184(5):226-9.

World Health Organization W. Asthma. 2006 [cited 2007; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>]

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):490-4.

Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol.* 2000 Aug;1(2):132-7.

Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):706-12.

Yu CK, Shieh CM, Lei HY. Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jul;104(1):228-36.

Yu P, Kosco-Vilbois M, Richards M, Kohler G, Lamers MC. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature.* 1994 Jun 30;369(6483):753-6.