

Artigo de Revisão Bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina

A HIPÓTESE DA HIGIENE: SUSTENTAÇÃO CIENTÍFICA

Autores: Rita Pires de Lima Sampaio Peixoto

Orientador: José Manuel Carvalho Tojal Monteiro

Afiliação: Instituto de Ciências Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto
Universidade do Porto

Endereço: Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

RESUMO

Introdução: As doenças alérgicas são muito frequentes nas sociedades modernas e a prevalência ainda tem vindo a aumentar nas últimas décadas. A hipótese da higiene sugere que este aumento seja uma consequência da diminuição do estímulo infeccioso providenciado ao nosso sistema imunológico, tendo crescido para incluir também a exposição a produtos microbianos, animais, antibióticos, vacinas, produtos alimentares, microbiotas alteradas e poluição.

Objectivos: Este trabalho de revisão bibliográfica tem como objectivo a análise da literatura científica disponível para compilar os argumentos a favor e contra esta teoria, procedendo à exploração dos mecanismos imunológicos em jogo e a sua plausibilidade biológica.

Desenvolvimento: Os resultados da literatura revista demonstram uma maior quantidade de argumentos a favor da hipótese da higiene, incluindo meta-análises, artigos de revisão, dados estatísticos, de investigação e de modelos animais.

Conclusão: Apesar dos potenciais vieses inerentes aos diferentes estudos e das contraposições e contra-argumentações que podem ser feitas aos argumentos, sejam eles a favor ou contra esta teoria, a sustentação científica parece ser mais substancial e mais bem-fundamentada no sentido da validade da hipótese da higiene. No entanto, para que se possa aceitar a hipótese da higiene como uma realidade científica, são necessários mais estudos prospectivos, bem delineados e multi-cêntricos.

PALAVRAS-CHAVE

Hipótese da higiene, alergia, atopia, infecção, endotoxina, microbiano, parasita, vírus.

ABSTRACT

Introduction: Allergic diseases are very frequent in modern societies and the prevalence has kept on rising in the last decades. The hygiene hypothesis suggests that this increase is a consequence of the decrease of the infectious stimulus provided to our immune system, having expanded to include the exposure to microbial products, animals, antibiotics, vaccines, dietary products, altered microbiota and pollution.

Objectives: This review has the objective of analyzing the available scientific literature to compile the arguments in favor and against this theory, proceeding to the exploration of the immunological mechanisms involved and their biological plausibility.

Development: the results of the reviewed literature show a higher amount of arguments in favor of the hygiene hypothesis, including meta-analyses, reviews, statistical data, research, and animal models.

Conclusion: Despite the potential biases that are inherent to the different studies and the contrapositions and counter-arguments that can be made the arguments, whether they are in favor or against this theory, the scientific support seems to be more substantial and better reasoned towards the validity of the hygiene hypothesis. However, for the hygiene hypothesis to be accepted as a scientific reality, further prospective studies, well defined and multi-centered, are needed.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

CMV – Citomegalovirus

EBV – Vírus Epstein-Barr

GI – Gastrointestinal

H. pylori – Helicobacter pylori

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

TGF – Factor de Crescimento Transformador

Th – T helper

TLR – Toll-like receptor

Treg – T reguladora

VHA – Vírus da Hepatite A

VSR – Vírus Sincicial Respiratório

I – INTRODUÇÃO

Nas sociedades modernas, até 30% da população sofre de atopia ⁽¹⁾. Estes indivíduos têm uma predisposição hereditária para produzir anticorpos IgE contra alérgenos comuns, sofrendo tipicamente de uma ou mais doenças atópicas ⁽²⁾. Há 40-50 anos, no mundo ocidentalizado, houve um aumento súbito das doenças inflamatórias crónicas – especialmente as doenças atópicas ^(3,4), sendo visível um gradiente Norte-Sul relacionado com o nível socioeconómico ⁽⁵⁾. Actualmente, estamos a atingir um tecto ⁽⁶⁾. A rapidez com que as taxas de prevalência das doenças alérgicas aumentaram sugere uma causa ambiental ⁽⁷⁾, pois o período é curto demais para a ocorrência de um shift genético ⁽⁶⁾.

Em 1989, o Dr. David Strachan publicou um artigo em que observou a relação inversa entre a rinite alérgica e o número de familiares do doente e sugeriu que as infecções na infância precoce - e mesmo pré-natais - e o contacto não higiénico podiam conferir protecção contra o desenvolvimento de doenças alérgicas, sendo este efeito mais forte por cada familiar mais velho existente ⁽⁸⁾. Propôs ainda que a razão pela qual estas exposições ocorrem em menor extensão será a tendência para famílias mais pequenas e melhores condições de vida ⁽⁶⁾. Esta “hipótese da higiene” ⁽⁹⁾ tentou explicar aquela tendência epidemiológica.

Nos anos subsequentes, a hipótese da higiene foi expandida para incluir a exposição reduzida a microrganismos e os seus produtos, e a animais domésticos; o aumento da prescrição de antibióticos e vacinas; a alteração da dieta e da colonização intestinal da criança; e a poluição como factores de risco para desenvolvimento de doenças alérgicas ^(10, 11).

II - DESENVOLVIMENTO

Base imunológica

A hipótese da higiene pode ser explicada através dos mecanismos de acção dos vários subgrupos de linfócitos T helper (Th) ⁽¹²⁾. Estas células diferenciam-se em Th1 ou Th2 de acordo com as citocinas que são produzidas pelas células do sistema imune inato ⁽¹²⁾.

Os linfócitos Th1 são responsáveis pela resposta a ameaças infecciosas virais ou bacterianas, produzindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-12 e IFN γ), estando envolvidos na imunidade celular e auto-imunidade ^(3, 12). Também se encontram aumentadas nos fenómenos alérgicos ⁽¹³⁾.

Os linfócitos Th2, por sua vez, são estimulados por ameaças parasitárias, produzindo citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) e compondo a imunidade humoral; assim sendo, estão implicados nas alergias ^(3, 12). Estas células promovem a mudança

de classe para IgE ⁽¹⁴⁾, imunoglobulina com um papel fundamental na alergia; a actividade eosinofílica ⁽¹⁵⁾; e a produção de muco nas vias aéreas e gastrointestinal ⁽¹⁵⁾.

Pode assim compreender-se como um desequilíbrio no sentido da resposta Th2, pela falta de estimulação da resposta Th1 proporcionada pelas infecções, pode desencadear uma resposta alérgica no hospedeiro. No entanto, este mecanismo não é suficiente para explicar o aumento da atopia por dois motivos. Primeiro, porque também alguns distúrbios auto-imunes mediados por Th1, como a diabetes tipo 1 e doença inflamatória intestinal, mostraram um aumento estável ao longo da segunda metade do séc. XX no mundo ocidental ⁽¹⁶⁾, co-existindo com doenças atópicas em alguns indivíduos ⁽¹⁷⁾ com uma frequência aumentada ⁽¹⁸⁾. Isto poderá ocorrer devido à grande reactividade cruzada das células T, que reagirão de forma descontrolada a agentes infecciosos, a alérgenos e a antígenos do próprio ⁽¹⁶⁾. Segundo, as infecções parasitárias, indutoras de resposta Th2, estão associadas a protecção contra o desenvolvimento de atopia ⁽²⁾.

O que modulará estes processos serão as células T reguladoras (Treg). Estas protegerão o próprio dos efeitos da inflamação decorrente da destruição dos patógenos ⁽³⁾ ao reduzir a resposta imune ⁽¹²⁾, necessitando para isso de uma estimulação precoce por agentes infecciosos ⁽¹⁶⁾. Os doentes alérgicos falharão na estimulação adequada destas células ⁽²⁾. Este enquadramento celular (Th1, Th2 e Treg) confere plausibilidade biológica à hipótese da higiene, sendo este um dos seus pontos mais fortes ⁽⁶⁾.

Outra peça importante é a existência dos receptores Toll-like (TLR) das células dendríticas ⁽³⁾, epiteliais ⁽¹⁵⁾ e B ⁽¹⁵⁾, cuja maturação permite a estimulação das células Th1 ⁽¹⁵⁾ e Treg ⁽³⁾ e a “down-regulation” de algumas respostas alérgicas Th2 ⁽¹²⁾; manter a homeostasia epitelial intestinal ⁽¹⁵⁾; e estabelecer a maturação do sistema imune ⁽¹⁵⁾. Desta forma, existe um equilíbrio contínuo do sistema imunológico ⁽³⁾. Polimorfismos genéticos nestes receptores estão associados a diferentes riscos e severidades de doenças alérgicas ^(15, 19), estando estas variações dependentes do contexto ambiental a que o indivíduo está sujeito ⁽²⁰⁾. De forma semelhante, os superantígenos poderão induzir uma inibição ou activação das células T ⁽¹²⁾.

Para que haja o desenrolar de uma resposta Th2 contra um determinado antígeno, será necessário o sobrevir de um controlo negativo duplo – o das citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) e o das citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF β). Este conjunto de citocinas existe quando o sistema imune é submetido a uma estimulação crónica e recorrente ⁽²¹⁾. Assim, a hiper-actividade Th2 pode ser uma consequência da falta de resposta Th1, da supressão Treg reduzida, ou ambas ⁽¹⁵⁾.

Desenvolvimento do sistema imune

No período neonatal, o sistema imune tende para uma resposta Th2 ⁽²²⁾ para evitar o fenómeno de enxerto contra hospedeiro ⁽²³⁾. Este fenómeno chama-se “desvio imune” ⁽²⁴⁾. A memória das células T que se desenvolverá depende da resposta (Th1 ou Th2) elicitada pelos alergénios a que somos expostos ⁽²⁴⁾.

Durante o período pós-natal, o desvio Th2 é revertido pelo desenvolvimento da resposta Th1 através do estímulo microbiano, equilíbrio esse que será rápido, de forma a evitar o desencadeamento de uma resposta alérgica ^(23, 24). Este mecanismo actuará até aos 5 anos de idade no sentido de atingir os padrões de reactividade imunológica do tipo adulto ⁽²⁴⁾, embora também possa ocorrer ao longo da vida ⁽²⁵⁾. As infecções nos primeiros meses de vida podem, portanto, ter um papel importante na maturação do sistema imune gastrointestinal e no equilíbrio Th1/Th2 ⁽²⁶⁾. Neste sentido, uma falta de estimulação microbiana levará a uma resposta Th inapropriada (Th2) ou desregulada (falta de Treg), resultando em doença atópica ⁽²⁷⁾. As exposições microbianas em idade precoce (antes do aparecimento da doença alérgica) e de forma persistente influenciarão o desenvolvimento da doença alérgica ⁽¹⁹⁾.

A tolerância oral é induzida no Gut-Associated Lymphoid Tissue, através do contacto, desde a vida fetal, com alergénios que induzem as células Th1 e Treg ⁽²³⁾; a composição da microbiota também influencia a maturação das células do sistema imune ⁽²⁸⁾. Esta forma de tolerância poderá ser responsável pela tolerância a antígenos inalados, devido à exposição simultânea ao tracto gastrointestinal que ocorre aquando da inalação de um antígeno ^(28, 29). Desta forma, as perturbações da flora poderão modificar resposta imune respiratória ⁽²⁸⁾.

As infecções por helmintas estimulam selectivamente a resposta imune Th2, comum às alergias, induzindo uma resistência a nemátodes intestinais ⁽²²⁾. As infecções desencadearão uma “down-regulation” compensatória desta resposta, diminuindo assim a incidência das alergias ⁽²²⁾. Este mecanismo ocorrerá por um fenómeno de bloqueio dos receptores de IgE por anticorpos IgE policlonais ⁽⁶⁾; ou pelo efeito imunorregulador das Treg ⁽³⁰⁾ e anti-inflamatório das citocinas ⁽³⁰⁾. A infecção aguda aumentará os sintomas alérgicos pelo desenvolvimento de respostas Th2, enquanto a infecção crónica inibirá as células Th2 ^(14, 31).

Fenómeno evolutivo

Os desencadeantes da resposta imune evoluíram a par do ser humano ⁽³⁾, pertencendo ao conhecimento genómico mas sendo progressivamente removidos do ambiente dos países desenvolvidos nos últimos 40 anos ⁽¹⁶⁾. Uma análise da evolução do ser humano permite-nos compreender facilmente as alterações de condições a que o nosso sistema imune foi sujeito ⁽³⁾.

Na época pré-histórica, as populações seriam pequenas e com esperança de vida baixa, pelo que os patógenos existentes seriam também poucos e de variedade limitada, incluindo microrganismos altamente transmissíveis e pouco imunogénicos ⁽³⁾.

Após o surgimento da agricultura e da pastorícia, e da expansão rápida das populações e da sua longevidade, a flora infectante terá igualmente crescido e diversificado, incluindo patógenos endémicos em grupos maiores de seres humanos e diversas zoonoses ⁽³⁾.

Também os comportamentos de higiene terão acompanhado a evolução do ser humano ⁽³²⁾. As atitudes que evitavam as devastações microbianas eram evolutivamente vantajosas, permitindo a passagem destes “genes da higiene” às gerações futuras, tornando-se gradualmente instintivas ⁽³²⁾.

Hoje em dia, existe ainda uma discrepância entre os países desenvolvidos e os que estão em vias de desenvolvimento. Nos primeiros, o advento das condições sanitárias e o maior acesso a melhores cuidados de saúde permitiu excluir as doenças infecciosas como principal causa de morte, o que ainda ocorre nos países mais pobres. Estas melhores condições de higiene terão levado também à redução da exposição a antígenos, potencialmente desequilibrando a resposta imune no sentido da atopia ⁽³⁾.

Um exemplo que permite ilustrar esta teoria é o da reunificação da Alemanha em 1990, após a qual se assistiu a um aumento significativo da incidência de rinite alérgica e sensibilização atópica nas crianças da ex-Alemanha de Leste, previamente com taxas mais baixas do que a ex-Alemanha de Oeste, o que levantou a suspeita da influência do estilo de vida ocidental ^(6, 33). Resultados semelhantes foram encontrados na Groenlândia após ocidentalização da população nativa ⁽³³⁾.

Estado actual

Nas últimas décadas, observou-se um aumento do estilo de vida urbano, das famílias menos numerosas e redução do contacto com animais; o advento dos antibióticos e das vacinas profiláticas; e a alteração dos padrões alimentares e de higiene. Todas estas alterações foram apontadas como responsáveis pelo aumento das doenças atópicas devido ao efeito que tiveram no nosso sistema imune ⁽¹¹⁾.

Resultados

No âmbito desta revisão bibliográfica, foram pesquisados na Medline a palavra-chave “hygiene hypothesis” e as combinações desta com “allergy”, “atopy”, “infection”, “endotoxin”, “microbial”, “parasite” e “virus”. Foram revistos artigos publicados entre 1989 e 2010 e

referências, tendo sido excluídos os artigos anteriores a 1999 para a comparação da sustentação científica. Foram privilegiados as meta-análises, os artigos de revisão e os artigos de investigação. Os argumentos que reflectiam teorias não comprovadas foram excluídos, assim como a opinião pessoal de cientistas ou clínicos.

Os resultados selecionados foram estruturados em tabelas (Tabelas I a XV) e separados por exposição e por tipo de argumento (“a favor” ou “contra” a hipótese da higiene). Os argumentos foram hierarquizados por ordem de força de evidência, tendo sido considerados, por ordem decrescente de importância: as meta-análises, as revisões bibliográficas, os trabalhos de investigação ou estatística e os modelos animais. Adicionalmente, os argumentos foram subsequentemente hierarquizados de acordo com o seu grau de certeza, tendo sido considerados, por ordem decrescente de importância: protecção/causalidade, redução/aumento do risco, associação positiva/negativa, diminuição/aumento da incidência ou prevalência, redução/aumento do número de células Th2 e outros critérios epidemiológicos. Os comentários existentes nos artigos referentes aos argumentos foram incluídos.

Finalmente, os argumentos a favor e contra a hipótese da higiene foram contabilizados e organizados numericamente em tabelas (Tabelas XVI e XVII).

HIPÓTESE DA HIGIENE EM GERAL			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Artigos a favor excedem largamente os que são contra. (Sem unanimidade; mecanismos subjacentes não claros) - Variáveis ligadas à exposição de microrganismos influenciam o risco de doença alérgica. - A plausibilidade biológica é uma das suas maiores forças.	34 7 6	Revisão - Manipulação do ambiente pré e pós-natal de crianças de alto risco para alergias não demonstra suporte para hipótese. - Estudos a favor da hipótese são observacionais (transversal e coorte).	36 36
Modelos animais - Alta dose de alérgenos favorece tolerância, baixa dose favorece resposta imune. - Paradigma Th1/Th2 em modelos animais aplicável a humanos.	33 35		

Tabela I – Argumentos relativos à hipótese da higiene em geral.

- Sarampo tem associação negativa com teste cutâneo para ácaros.	45		
- EBV e CMV associação negativa com níveis de IgE.	46		
- Episódios febris antes do 1º ano têm incidência menor de atopia, com diminuição das odds com o seu número.	47		
- Hospitalização com salmonelose tem prevalência menor de alergias do que hospitalização com enterite não-bacteriana.	48		
Modelos animais			
- (revisão) Modelos em ratinhos demonstram capacidade da infecção por BCG estimular resposta Th1 e suprimir resposta Th2; e da infecção por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> de modular doenças pulmonares alérgicas.	49		
- Em ratinhos, administração de alergénio com micobactéria suprime actividade Th2.	50		

Tabela II – Argumentos relativos à infecção por vírus e bactérias.

INFECÇÃO POR HELMINTAS			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão		Investigação / Estatística	
- Tratamento anti-helminta aumenta risco de atopia e asma.	22	- História de <i>Ascaris</i> aumenta risco de asma e testes cutâneos positivos.	64
- Infecção aguda ou crónica associada negativamente a reactividade do teste cutâneo.	22	(Possível viés de recordação)	
- Evidências de diminuição de sensibilização alérgica.	24	- Evidência de <i>Toxocara</i> serológicos aumenta incidência de asma.	65
(Sem evidência de protecção)			
Investigação / Estatística			
- Redução de 72% do risco de teste cutâneo positivo pela infecção.	59		
- Odds teste cutâneo positivo 5 vezes maior nos não infectados, com IgE total maior nos infectados mas IgE específico para alergénios aéreos maior nos não infectados.	60		
- Associação negativa com sibilância induzida	61		

pelo exercício. (Associação dose-resposta não é clara) - Associação negativa com atopia.	62, 63		
Modelos animais - (revisão) Modelos em ratinhos demonstram protecção da infecção contra anafilaxia.	49		
- (revisão) Modelos animais demonstram que baixas doses favorecem Th1 e susceptibilidade e altas doses favorecem Th2 e imunidade.	22		

Tabela III – Argumentos relativos à infecção por helmintas.

AMBIENTE PERINATAL			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise - Amamentação menos de 3 meses apresenta 4 em 4 critérios de causalidade, com odds de 1.5.	66		
Revisão - Exposições diminuem risco mesmo quando ocorrem <i>in utero</i>	15		
- Ordem de nascimento, dieta e tabaco são factores de risco no ambiente materno para atopia subsequente.	6		
Investigação / Estatística - Efeito protector da exposição materna.	67		
- Exposição materna a ambiente rural durante a gravidez modula os padrões de produção de citocinas nos bebés por altura do nascimento.	68		

Tabela IV – Argumentos relativos ao ambiente perinatal.

FAMÍLIA GRANDE E ORDEM DE NASCIMENTO			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Entre 16 estudos, 14 encontraram um efeito protector do maior número de irmãos.	69	Revisão - Alterações do tamanho da família dos últimos 30 anos não parecem explicar o aumento da prevalência de asma e rinite alérgica.	75
- Associações negativas encontradas consistentemente em muitos estudos. (Estudos contraditórios tornam evidências	6	- Pouca relação temporal entre alterações do	6

inconclusivas)		tamanho da família e o aumento da atopia.	
Investigação / Estatística		Investigação / Estatística	
- Número maior de irmãos confere mais protecção.	44	- (caso-controlo) Não associado a diminuição do risco de dermatite atópica.	76
- Odds de rinite alérgica é menor com ≥ 2 irmãos. (Viés de recordação possível)	70		
- Com aumento da família, aumento do risco de infecção respiratória baixa e associação inversa com asma .	71		
- Associação inversa robusta entre tamanho da família e doença alérgica mesmo em pessoas nascidas na primeira metade do séc. XX.	72		
- Atopia menos comum em famílias maiores.	44		
- Diminuição da atopia com o aumento da ordem de nascimento.	73		

Tabela V – Argumentos relativos à família grande e ordem de nascimento.

FREQUÊNCIA DE INFANTÁRIO EM IDADE PRECOCE			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão		Investigação / Estatística	
- Protege contra atopia. (Análise da exposição, sem pormenores)	14	- Não associado a diminuição do risco de dermatite atópica.	76
- Redução do risco de asma e sibilância recorrente, mesmo nos de alto risco.	15		
- Evidência prospectiva de relação inversa com dermatite atópica. (Viés possível pela utilização de questionários não validados em vez de diagnóstico médico)	77		
Investigação / Estatística			
- Níveis de IgE mais baixos aos 3 anos de idade nas crianças que frequentaram.	78		

Tabela VI – Argumentos relativos à frequência de infantário em idade precoce.

PRÁTICAS DE HIGIENE			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Níveis altos de higiene aos 15 meses associado a maior risco de atopia aos 42 meses.	79	Revisão - Apesar das novas práticas e produtos de limpeza, os padrões e níveis de contaminação microbiana não sofreram uma grande alteração.	6

Tabela VII – Argumentos relativos às práticas de higiene.

EXPOSIÇÃO A ENDOTOXINAS			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise - Redução de 10% do risco de estigmas alérgicos em crianças vivendo em casas com altos níveis de endotoxinas.	7	Meta-análise - Endotoxinas em altas doses apresentam evidência consistente de causalidade no desenvolvimento de alergias, com odds ratio de até 20.	66
Revisão - Componentes microbianos são mediadores de efeitos preventivos de alergia. - Evidência prospectiva de relação inversa com dermatite atópica. (Viés possível pela utilização de questionários não validados em vez de diagnóstico médico) - Associação frequente a menos manifestações alérgicas. - De 10 critérios epidemiológicos, exposição preenche 7 critérios e sugere 1.	15 77 19 38	Revisão - Factor de risco para asma não atópica, hiperreactividade brônquica e diminuição da função pulmonar. - Dois estudos epidemiológicos observaram maior prevalência de asma com altos níveis de endotoxinas. (Efeito de sino) - Sem coordenação temporal ou geográfica entre a transição para sociedades industriais (com exposições mais baixas) com o período e localização do pico de doenças alérgicas.	14 19 84
Investigação / Estatística - Factor protector major do desenvolvimento de atopia. - Endotoxinas em níveis altos no pó das casas rurais; protector de atopia. - Associação negativa. (Mas aumento da reactividade via aérea)	80 81 82, 83		
Modelos animais - (revisão) Uso de material genético de microrganismos patogénicos para estimulação Th1 e inibição Th2 previne manifestações alérgicas. - (revisão) Em ratinhos, níveis baixos de LPS	49 2		

inalado induzem Th2 e níveis altos níveis induzem Th1; administração de TLRs diminui fenómenos alérgicos.		
---	--	--

Tabela VIII – Argumentos relativos à exposição a endotoxinas.

EXPOSIÇÃO A ANIMAIS			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise - Exposição a animais de estimação na infância reduz o risco alérgico em 14%. - Exposição a animais de quinta na infância reduz em 42% o risco de atopia. Revisão - Evidência prospectiva de relação inversa com dermatite atópica. (Viés possível pela utilização de questionários não validados em vez de diagnóstico médico)	7 7 77	Investigação / Estatística - Relação positiva entre ter porcos e alergia.	85

Tabela IX – Argumentos relativos à exposição a animais.

CRESCER EM AMBIENTE RURAL			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise - Odds de estigmas atópicos diminuído. Revisão - Efeito aparentemente protector. (Estudos contraditórios tornam evidências inconclusivas) - Redução do risco. - Prevalência diminuída de atopia; efeitos mais consistentes na asma atópica que não-atópica. - Prevalência de asma é maior em cidades urbanas. Investigação / Estatística - Diminuição da sensibilização atópica. - Crescer em quintas que criam porcos e que adicionam antibióticos às rações aumenta a prevalência de asma. (O “priming” imune da quinta pode ser	86 6 15 14 81 87 88	Revisão - Taxas de incidência de asma altas em populações desfavorecidas de meios urbanos.	15

ultrapassado pelos antibióticos) -Prevalência diminuída de atopia em crianças com estilo de vida antropológico.	74		
--	----	--	--

Tabela X – Argumentos relativos a crescer em ambiente rural.

EXPOSIÇÃO A ANTIBIÓTICOS EM IDADE PRECOCE			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Uso consistentemente associado a aumento do risco, mesmo quando usado no período pré-natal. - Alteram a composição da microbiota e correlacionam-se com o desenvolvimento de alergias e/ou asma. Investigação / Estatística - Aumentam risco de asma. Modelos animais - (revisão) Modelos em ratinhos demonstram papel dos antibióticos no desenvolvimento de alergia pulmonar.	77 28 89 49		

Tabela XI – Argumentos relativos à exposição a antibióticos em idade precoce.

VACINAÇÃO			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Em 23 estudos, 10 reportam associação inversa entre imunização com BCG e doença atópica. - Associação inversa entre respostas tuberculínicas e atopia.	27 90	Revisão - BCG não está associada negativamente com alergias.	14

Tabela XII – Argumentos relativos à vacinação.

DIETA			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise - Redução de ômega-3 apresenta 2 em 4 critérios de causalidade com evidência consistente, com odds de 2. - Beber leite não-pasteurizado na infância reduz em 32% o risco alérgico.	66 7		

Tabela XIII – Argumentos relativos à dieta.

FLORA GI			
A FAVOR	REF.	CONTRA	REF.
Revisão - Efeito protector dos probióticos no desenvolvimento de doenças atópicas. - De 10 critérios epidemiológicos, exposição preenche 6 critérios e sugere 3. - Composição diferente entre atópicos e não-atópicos e entre países industrializados e não-industrializados.	49 38 28		

Tabela XIV – Argumentos relativos à flora gastrointestinal.

POLUIÇÃO				
A FAVOR		REF.	CONTRA	REF.
Meta-análise			Revisão	
- Consumo de tabaco pelos pais apresenta 4 em 4 critérios de causalidade com evidência consistente, com odds de 1.3.		66	- Em alguns estudos a associação não foi confirmada ou foi a oposta.	35
Revisão				
- Poluição tipo II (nações industrializadas) associada a prevalência aumentada de doenças alérgicas.		35		
- Os produtos de exaustão do diesel e do fumo do tabaco desviam a resposta imune no sentido Th2.		91		

Tabela XV – Argumentos relativos à poluição.

EXPOSIÇÃO	Protecção*	Redução do risco**	Associação negativa [†]	Diminuição incidência/prevalência [‡]	Redução número de células Th2 [¥]	Critérios epidemiológicos e outros	TOTAL
Hipótese higiene geral	-	1	-	-	-	4	5
Infecção vírus e bactérias	3	4	5	2	2	4	20
Infecção por helmintas	1	3	3	-	1	1	9
Ambiente perinatal	2	1	-	-	-	1	4
Família e ordem nascimento	2	1	3	2	-	1	9
Infantário em idade precoce	1	1	1	-	-	1	4
Práticas higiene	-	1	-	-	-	-	1
Endotoxinas	2	2	3	-	2	1	10
Animais	-	2	1	-	-	-	3
Crescer em ambiente rural	1	2	-	4	-	1	8
Antibióticos	1	2	1	-	-	-	4
Vacinas	-	-	2	-	-	-	2
Dieta	1	1	-	-	-	-	2
Flora GI	1		-	-	-	2	3
Poluição	1	-	-	1	1	-	3
TOTAL	16	21	19	9	6	16	87

* causalidade, no caso dos antibióticos e poluição;

** aumento do risco, no caso dos antibióticos e práticas de higiene;

[†] associação positiva, no caso dos antibióticos;

[‡] aumento da prevalência, no caso da poluição e da adição de antibióticos à ração dos porcos;

[¥] aumento, no caso da poluição

Tabela XVI – Resumo dos argumentos a favor da hipótese da higiene.

EXPOSIÇÃO	Causalidade	Aumento do risco	Associação positiva	Aumento da incidência / prevalência	Aumento número células Th2	Outros	TOTAL
Hipótese higiene geral	-	-	-	-	-	2	2
Infecção vírus e bactérias	2	1	3	2	1	5	14
Infecção por helmintas	-	1	-	1	-	-	2
Ambiente perinatal	-	-	-	-	-	-	-
Família e ordem nascimento	-	-	-	-	-	3	3
Infantário em idade precoce	-	-	1	-	-	1	2
Práticas higiene	-	-	-	-	-	1	1
Endotoxinas	1	1	-	1	-	1	4
Animais	-	-	-	-	-	-	-
Crescer em ambiente rural	-	-	-	-	-	1	1
Antibióticos	-	-	-	-	-	-	-
Vacinas	-	-	-	-	-	1	1
Dieta	-	-	-	-	-	-	-
Flora GI	-	-	-	-	-	-	-
Poluição	-	-	-	-	-	1	1
TOTAL	3	3	4	4	1	16	31

Tabela XVII – Resumo dos argumentos contra a hipótese da higiene.

Discussão

Colocam-se várias dificuldades na avaliação dos efeitos de exposições infecciosas na atopia, nomeadamente: as diferentes definições de atopia utilizadas nos diferentes estudos ⁽²⁷⁾; o uso de sintomas como sinónimos da doença ⁽⁹²⁾; e o tipo de estudos e seus inerentes viéses - retrospectivos com viés de recordação que é eliminado nos estudos prospectivos ⁽²⁴⁾, estudos observacionais mais propensos a variáveis confundidoras ⁽⁴⁹⁾ e uso de questionários não validados em vez de diagnóstico clínico ⁽⁴⁹⁾. Tendo este aspecto em mente, a validade dos diversos estudos deve ser sempre tida em conta, assim como a força dos respectivos argumentos ⁽²⁴⁾. Note-se, ainda, uma medida de associação não equivale a um potencial de associação não-enviesado ⁽⁴⁹⁾.

Neste contexto, a dependência dos dados epidemiológicos, que por si são difíceis de obter retrospectivamente, provoca uma inclusão reduzida de infecções minor ou sub-clínicas, que poderão ter um efeito prevalente na protecção contra atopia ⁽⁶⁾, podendo não ser encontrado esse efeito nas infecções clínicas ⁽⁴¹⁾.

A falta de associação temporal entre as mudanças epidemiológicas das sociedades e a alteração da incidência das doenças alérgicas poderia ser explicada por um efeito tardio entre a exposição e o resultado ⁽⁶⁾.

O efeito das exposições a endotoxinas e alergénios poderá ser dose-dependente ^(27, 6), correspondendo a um efeito de sino ⁽¹⁾. Assim, a exposição a doses altas ou crónicas será mais eficaz na diminuição do risco de atopia (indução de tolerância pela maturação de um centro germinativo ⁽¹⁾) do que as exposições baixas, esporádicas e intermitentes (aumento da reacção alérgica ⁽³³⁾ por falta de memória B ⁽¹⁾).

A carga total de exposição ⁽⁶⁾, o nível total de moléculas imunoestimuladoras no ambiente ⁽⁷⁾ e o grau de exposição eficaz (e não somente a quantidade existente no meio) ⁽⁸⁴⁾ serão outros determinantes da resposta atópica.

Importa referir que os indivíduos atópicos poderão ter um limiar mais baixo para sibilância induzida pelas endotoxinas ⁽²⁴⁾, podendo estes resultados ser responsáveis pela ausência de efeito protector em alguns estudos.

É importante distinguir o fenótipo asmático atópico do não atópico. A asma *alérgica* relaciona-se com a história da criança e familiar de doenças atópicas, enquanto a asma *não alérgica* se relaciona com infecções respiratórias recorrentes na infância, apresentando um quadro mais leve e transitório ⁽⁸⁾. Algumas exposições microbianas poderão exacerbar um tipo de asma (não-atópica) mas proteger contra o outro ⁽¹⁹⁾. O maior número de casos hospitalizados por asma severa em que se isolaram o VSR e o Rhinovirus poderá advir da maior susceptibilidade intrínseca às infecções respiratórias, nos indivíduos asmáticos ⁽⁹³⁾, do

facto de as infecções serem um marcador de asma, e não uma causa ⁽²⁴⁾, do facto de o VSR poder ser um dos muitos vírus associados a sibilância persistente não atópica ^(14, 8) e do facto de este vírus poder desmascarar a predisposição alérgica subjacente, em vez de causar a doença ⁽⁸⁾.

Países com alta prevalência de tuberculose tendem a ter números mais baixos de atopia, que pode reflectir o favorecimento da resposta Th1 pela bactéria ^(6, 12), ou um viés pela resposta Th1 aumentada característica da população ⁽⁶⁾.

Nos países industrializados, a exposição leve ou ocasional a helmintas poderá agravar os sintomas respiratórios ⁽³¹⁾, dado que as infecções endémicas dos países em desenvolvimento estarão fortemente associadas a uma diminuição da atopia ⁽¹⁴⁾. Em oposição, foi levantada a hipótese de a atopia conferir uma vantagem evolutiva ao conceder uma protecção contra a infecção parasitária ⁽²²⁾.

A protecção da amamentação prolongada é aparentemente paradoxal, dado que o leite materno previne infecções intestinais e respiratórias, apesar de transmitir algumas infecções víricas ⁽⁶⁾. No entanto, a composição da flora intestinal das crianças amamentadas, mais rica em bactérias lácticas, poderá ser o mecanismo protector ^(28, 94).

O efeito do aumento do tamanho da família na protecção das doenças atópicas poderá ser válido apenas nas crianças com património atópico, tendo a predisposição genética um papel nas restantes ⁽⁶⁾.

A frequência de infantários poderá tornar-se o factor chave por contrariar a diminuição do tamanho das famílias ^(6, 12) e das exposições em ambiente rural ⁽⁸⁴⁾.

O aumento do risco de dermatite atópica em crianças com níveis mais elevados de higiene pessoal pode estar sujeito ao viés de que estes cuidados podem irritar a pele já seca ⁽⁹⁵⁾.

A relação positiva observada entre ter porcos e a alergia poderá ser um efeito colateral do uso de antibióticos na ração dos animais, que são emitidos durante as operações de alimentação ⁽⁸⁸⁾.

A observação de que ter animais de estimação reduz o risco alérgico pode ser explicado pela indução de uma tolerância alérgico-específica ou modulação do sistema imune pela exposição à sua microflora ⁽¹⁵⁾ e a endotoxinas respiráveis ⁽¹⁹⁾. No entanto, esta associação negativa poderá eventualmente ser explicado pelo “efeito do dono saudável”, em que apenas as pessoas com sintomas alérgicos toleráveis têm animais ⁽³³⁾.

O timing da exposição tanto aos animais de estimação ⁽⁹⁶⁾ quanto aos outros alérgenos ^(14, 8) parece crítico, sendo as exposições precoces (aquando da maturação do sistema imune) aparentemente protectoras e as tardias exacerbadoras de sintomas atópicos.

Os antibióticos influenciam a flora intestinal, possivelmente eliminando espécies simbiotes ⁽²⁰⁾. A perda de moléculas bacterianas imunomoduladoras levará a uma superprodução de citocinas Th2 e início de distúrbios atópicos ⁽²⁰⁾. De referir que é difícil distinguir entre a própria infecção e os antibióticos como factor de exposição na variação das taxas de atopia ⁽⁶⁾ e que o uso de antibióticos em crianças pode estar associado à asma pelo seu uso mais comum nesta patologia ⁽²⁹⁾.

As vacinas, tal como as infecções, actuarão como estímulos imunológicos das células Th1 ⁽⁹⁷⁾.

A diminuição da ingestão de gordura animal, nomeadamente de peixe (rico em ómega-3-PUFA) ⁽⁹⁴⁾ levará ao aumento das alergias ⁽⁹⁸⁾. O leite não pasteurizado, mais rico em probióticos e gordura animal, poderá ser responsável pela modulação da microflora e da expressão de citocinas ⁽⁶⁸⁾, influenciando as observações da exposição “crescer em ambiente rural” ⁽⁷⁾. De acordo com Strachan, a exposição ao ambiente rural poderá programar a flora intestinal ⁽⁶⁾ e as endotoxinas efectuarão o “priming” intestinal ⁽⁶⁾.

Finalmente, o aumento da incidência de doenças atópicas em regiões de estatuto sócio-económico mais baixo poderá ser explicado pela ocidentalização mais recente destas camadas sociais ⁽⁹⁹⁾.

III - CONCLUSÃO

Após a revisão da bibliografia seleccionada e respectiva discussão, é evidente que algumas exposições parecem estar mais concretamente envolvidas na redução da atopia, tal como as infecções bacterianas e víricas, as infecções parasitárias, o maior tamanho da família e as endotoxinas; enquanto noutras, os argumentos são poucos e/ou mais fracos.

Apesar dos potenciais vieses inerentes aos diferentes estudos e das contraposições e contra-argumentações que podem ser feitas aos argumentos, sejam eles a favor ou contra esta teoria, a sustentação científica parece ser mais substancial e mais bem-fundamentada no sentido da validade da hipótese da higiene.

No entanto, para que se possa aceitar a hipótese da higiene como uma realidade científica, são necessários mais estudos prospectivos, bem delineados e multi-cêntricos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Aalberse RC, Platts-Mills TA (2004). How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective. *J Allergy Clin Immunol* 113(5):983-6.
- 2 - Prioult G, Nagler-Anderson C. (2005). Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev* 206:204-18.
- 3 - Sironi M, Clerici M (2010). The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective. *Microbes Infect.* (6):421-7.
- 4 - de Vries A, Howie SE (2009). Diet and asthma--can you change what you or your children are by changing what you eat? *Pharmacol Ther* 122(1):78-82
- 5 - Bach JF (2005). Six questions about the hygiene hypothesis. *Cell Immunol* 233(2):158-61.
- 6 - Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RW, et al. (2006). Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clin Exp Allergy* 36(4):402-25.
- 7 - Tse K, Horner AA (2008). Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited., *Curr Allergy Asthma Rep.* 8(6):475-83.
- 8 - von Mutius E (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* 212(6):433-9.
- 9 - Strachan DP (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis.". *Thorax*;55(suppl 1):S2-10.
- 10 - Yu LC. (2009). The epithelial gatekeeper against food allergy. *Pediatr Neonatol.* 50(6):247-54.
- 11 - Gold DR, Wright R. (2005). Population disparities in asthma. *Annu Rev Public Health* 26:89-113.
- 12 - Patki A. (2007). Eat dirt and avoid atopy: the hygiene hypothesis revisited. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73(1):2-4.
- 13 - Hadley EA, Smillie FI, Turner MA, et al. (2005). Effect of *Mycobacterium vaccae* on cytokine responses in children with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 140(1):101-8.
- 14 - Schaub B, Lauener R, von Mutius E. (2006). The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol.* 117(5):969-77
- 15 - Garn H, Renz H, (2007) Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis, *Immunobiology* 212 441-452
- 16 - Gale EA. (2002). A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 45(4):588-94.
- 17 - Maziak W. (2005). The asthma epidemic and our artificial habitats. *BMC Pulm Med* 5:5.
- 18 - Edwards CJ, Goswami R, Goswami P, et al. (2006). Growth and infectious exposure during infancy and the risk of rheumatoid factor in adult life. *Ann Rheum Dis.* 65(3):401-4.
- 19 - Liu AH, Leung DY. (2006). Renaissance of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 117(5):1063-6.
- 20 - Vercelli D. (2006). Mechanisms of the hygiene hypothesis--molecular and otherwise. *Curr Opin Immunol* 18(6):733-7.
- 21 - Romagnani S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112(3):352-63.
- 22 - Elston DM. (2006). The hygiene hypothesis and atopy: bring back the parasites? *J Am Acad Dermatol* 54(1):172-9.
- 23 - Vighi G, Marcucci F, Sensi L, et al. (2008). Allergy and the gastrointestinal system. *Clin Exp Immunol* 153 Suppl 1:3-6.
- 24 - Kemp A, Björkstén B. (2003). Immune deviation and the hygiene hypothesis: A review of the

epidemiological evidence. *Pediatr Allergy Immunol* 14: 74–80.

25 – Yeatts K, Sly P, Shore S, et al. (2006). A brief targeted review of susceptibility factors, environmental exposures, asthma incidence, and recommendations for future asthma incidence research. *Environ Health Perspect* 114(4):634-40.

26 - Seiskari T, Kondrashova A, Viskari H, et al. (2007). Allergic sensitization and microbial load--a comparison between Finland and Russian Karelia. *Clin Exp Immunol* 148(1):47-52.

27 - Obihara C.C., Bardinw P. G. (2008). Hygiene hypothesis, allergy and BCG: a dirty mix? *Clin Exp Allergy*. 38(3):388-92.

28 - Noverr MC, Huffnagle GB. (2004). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 12(12):562-8.

29 – de Lara C, Noble A. (2007). Dishing the dirt on asthma: What we can learn from poor hygiene. *Biologics* 1(2):139-50.

30 – Romagnani S. (2007). Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 119(6):1511-3.

31 –Ndiaye M, Bousquet J. (2004). Allergies and parasitoses in sub-Saharan Africa. *Clin Rev Allergy Immunol* 26(2):105-13.

32 - Curtis VA. (2007). A natural history of hygiene. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 18(1):11-4.

33 - Linneberg A. (2008). Are we getting enough allergens? *Int Arch Allergy Immunol* 147(2):93-100.

34 - Bresciani M, Parisi C, Manghi G, et al. (2005). The hygiene hypothesis: does it function worldwide? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5: 147–151.

35 - McGeady SJ. (2004). Immunocompetence and allergy. *Pediatrics* 113(4 Suppl):1107-13.

36 - van Schayck CP, Knottnerus JA. (2004). No clinical evidence base to support the hygiene

hypothesis. *Prim Care Respir J* 13(2):76-9; discussion 80-2.

37 - Randi G, Altieri A, Chatenoud L, et al. (2004). Infections and atopy: an exploratory study for a meta-analysis of the 'hygiene hypothesis'. *Rev Epidemiol Sante Publique* 52: 565–574.

38 – Liu AH, Murphy JR, (2003). Hygiene hypothesis: Fact or fiction?, *J Allergy Clin Immunol*;111:471-8

39 - Schwarze J, Gelfand EW. (2000). The role of viruses in development or exacerbation of atopic asthma., *Clin Chest Med*. 21(2):279-87.

40 - Hamid Q., Shannon J., Martin J.,(2005). Physiologic basis of respiratory disease. PMPH-USA.

41 -Zutavern A, von Klot S, Gehring U, et al. (2006). Pre-natal and post-natal exposure to respiratory infection and atopic diseases development: a historical cohort study. *Respir Res* 7:81.

42. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al. (2000). Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 320:412-7.

43 - Janson C, Asbjornsdottir H, Birgisdottir A, et al. (2007). The effect of infectious burden on the prevalence of atopy and respiratory allergies in Iceland, Estonia, and Sweden. *J Allergy Clin Immunol*. 120(3):673-9..

44 - Cullinan P, Harris JM, Newman Taylor AJ et al. (2003). Can early infection explain the sibling effect in adult atopy? *Eur Respir J* 22:956-61

45- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, et al. (1996). Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 347:1792-6.

46 - Nilsson C, Linde A, Montgomery SM, et al. (2005). Does early EBV infection protect against IgE sensitization? *J Allergy Clin Immunol* 116:438-44.

47 - Williams LK, Peterson EL, Ownby DR, et al. (2004). The relationship between early fever and

allergic sensitization at age 6 to 7 years. *J Allergy Clin Immunol* 113:291-6.

48 - Pelosi U, Porcedda G, Tiddia F, et al. (2005). The inverse association of salmonellosis in infancy with allergic rhinoconjunctivitis and asthma at school-age: a longitudinal study. *Allergy* 60:626-30.

49 - Teixeira MZ. (2005). The hygiene hypothesis revisited. *Homeopathy* 94(4):248-51.

50 - Sano K, Haneda K, Tamura G, et al. (1999). Ovalbumin (OVA) and *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells towards a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1260-7.

51 - Martinez FD (2000). Viruses and atopic sensitization in the first years of life. *Am J Respir Crit Care Med*. 162(3 Pt 2):S95-9.

52 - Adler UC. (2005). The influence of childhood infections and vaccination on the development of atopy: a systematic review of the direct epidemiological evidence. *Homeopathy* 94: 182-195.

53 - Pearce N, Duwes JT. (2006). The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? *J Paediatr* 82:319-21.

54 - Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F et al. (1999). Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. *J Clin Virol* 13(3):131-9.

55 - Paunio M, Heinonen OP, Virtanen M, et al. (2000). Measles history and atopic diseases: a population-based cross-sectional study. *JAMA* 283(3):343-6.

56 - Graham BS, Johnson TR, Peebles RS (2000). Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology* 48(3):237-47.

57 - Ståbel Benn C, Melbye M, Wolfahrt J, et al. (2004). Cohort study of sibling effect, infectious

disease, and risk of atopic dermatitis during the first 18 months of life. *BMJ* 328:1223-26.

58 - Culley FJ, Pollot J, Openshaw PJM. (2002). Age at first viral infection determines the pattern of T cell-mediated disease during reinfection in adulthood. *J Exp Med* 196:1381-6.

59 - van den Biggelaar AH, Lopuhaa C, van Ree R, et al. (2001). The prevalence of parasite infestation and house dust mite sensitization in Gabonese schoolchildren. *Int Arch Allergy Immunol* 126:231-8.

60 - Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, et al. (2000). Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol* 123:145-8.

61 - Cooper PJ, Chico ME, Bland M, et al. (2003). Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 168:313-7.

62 - Nyan OA, Walraven GE, Banya WA, et al. (2001). Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities. *Clin Exp Allergy* 31:1672-8.

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

64 - Palmer LJ, Celedon JC, Weiss ST, et al. (2002). *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1489-93.

65 - Chan PW, Anuar AK, Fong MY, et al. (2001). *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. *Pediatr Int* 43:350-3.

66 - Peat JK, Li J. (1999). Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 103(1 Pt 1):1-10.

67 - Riedler JB-FC, Eder W, Schreuer M, et al. (2001). Early life exposure to farming provides protection against the development of asthma and allergy. *Lancet* 358:1129-33.

- 68** - Pfefferle PI, Büchele G, Blümer N, et al. (2010). Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol* 125(1):108-15.e1-3.
- 69** - Karmaus W, Botezan C. (2002). Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *J Epidemiol Community Health* 56(3):209-17.
- 70** - Marshall AH, Owen V, Jones NS. et al. (2002). More siblings, less hay fever: more evidence. *Clin Otolaryngol* 27:352-8.
- 71** - Cardoso MR, Cousens SN, de Goes Siqueira LF, et al. (2004). Crowding: risk factor or protective factor for lower respiratory disease in young children? *BMC Public Health* 4:19.
- 72** - Kinra S, Davey Smith G, Jeffreys M, et al. (2006). Association between sibship size and allergic diseases in the Glasgow Alumni Study. *Thorax* Jan;61(1):48-53.
- 73** - Gibbs S, Surridge H, Adamson R, et al. (2004). Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: a case-control study. *Int J Epidemiol* 33:199-207.
- 74** - Alm JS, Swartz J, Lilja G, et al. (1999). Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 353(9163):1485-8.
- 75** - Strachan DP (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 (Suppl 1):S2-S10
- 76** - A. Zutavern, T. Hirschw, W. Leupoldz, et al. (2005). Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study, *Clin Exp Allergy*; 35:1301-1308
- 77** - Flohr C, Pascoe D, Williams HC (2005). Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true. *Br J Dermatol* 152: 202-216.
- 78** - Rothers J, Stren DA, Spangenberg A, et al. (2007). Influence of early day-care exposure on total IgE levels through age 3 years. *J Allergy Clin Immunol* 120:1201-7.
- 79** - Sherriff A, Golding J, The Alspac Study Team (2002). Hygiene levels in a contemporary population cohort are associated with wheezing and atopic eczema in preschool infants, *Arch Dis Child* 87:26-29
- 80** - Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, et al. (2002). Allergy and Endotoxin Study Team., Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children., *N Engl J Med*. 347(12):869-77.
- 81** - El Sharif N (2003). Domestic Environment & Lifestyle Determinants of Asthma in Palestinian Children: A Contribution for Asthma Epidemiology in Children. Leuven University Press.
- 82** - Douwes J, Le Gros G, Gibson P, et al. (2004). Can bacterial endotoxin exposure reverse atopy and atopic disease? *J Allergy Clin Immunol* 114:1051-4.
- 83** - Portengen L, Preller L, Tielen M, et al. (2005). Endotoxin exposure and atopic sensitization in adult pig farmers. *J Allergy Clin Immunol* 115:797-802.
- 84** - Wjst M. (2005). Another explanation for the low allergy rate in the rural Alpine foothills. *Clin Mol Allergy* 3:7.
- 85** - Chai SK, Nga NN, Checkoway H, et al. (2004). Comparison of local risk factors for children's atopic symptoms in Hanoi, Vietnam. *Allergy* 59:637-44.
- 86** - Tse K, Horner AA (2008). Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases. *Semin Immunopathol* 30:53-62.
- 87** - Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, et al. (2007). *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowshed possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 119:1514-21.
- 88** - Merchant JA, Naleway AL, Svendsen ER, et al. (2005). Asthma and farm exposures in a cohort of

rural Iowa children. *Environ Health Perspect* 113:350-6.

89 - Cohet C, Cheng S, MacDonald C, et al. (2004). Infections, medication use, and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema in childhood. *J Epidemiol Community Health*;58:852-7.

90 - Isolauri E, Walker W. A., (2004). Allergic diseases and the environment. Karger Publishers.

91 – Bush RK, Peden DB. (2006). Advances in environmental and occupational disorders. *J Allergy Clin Immunol* 117(6):1367-73.

92 – Maziak W. (2009). The triumph of the null hypothesis: epidemiology in an age of change. *Int J Epidemiol.* 38(2):393-402.

93 – Beisswenger C, Bals R. (2008). Interaction of allergic airway inflammation and innate immunity: hygiene and beyond. *J Occup Med Toxicol.* 3 Suppl 1:S3.

94 – Kim JH, Ellwood PE, Asher MI. (2009). Diet and asthma: looking back, moving forward. *Respir Res* 10:49.

95 – Flohr C, Pascoe D, Williams HC. (2005). Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? *Br J Dermatol*152(2):202-16.

96 – Naleway AL. (2004). Asthma and atopy in rural children: is farming protective? *Clin Med Res.* 2(1):5-12.

97 – Schneeweiss B, Pfeleiderer M, Keller-Stanislawski B. (2008). Vaccination safety update. *Dtsch Arztebl Int.* 105(34-35):590-5.

98 –Lack G. (2008). Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 121(6):1331-6.

99 - Matricardi PM, Bouygue GR, Tripodi S. (2002). Inner-city asthma and the hygiene hypothesis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89(6 Suppl 1):69-74.

