



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Resumo

Faz-se uma revisão da influência das infecções no aparecimento e na clínica da asma brônquica. Dá-se o relevo que merece à intervenção viral, sobretudo ao rinovírus, pela sua influência nas exacerbações, e ao vírus sincicial respiratório, sobre o qual recai a suspeita de poder ser causa determinante no aparecimento da síndrome asmática. Tentam-se esclarecer os mecanismos da resposta imune à agressão viral em função das debilidades da resposta do asmático e do atópico, sobretudo no período perinatal, salientando-se, ainda, um efeito de potenciação da agressão viral sobre a resposta atópica. Aborda-se a hipótese higiénica e a sua falta de consistência científica, pelo menos no papel que pretende atribuir a um não demonstrado antagonismo das respostas linfocitárias Th₁ e Th₂, apontando-se a importância actual da investigação, não das bactérias mas dos produtos bacterianos, como as endotoxinas, na modulação da asma e da

Abstract

This paper reviews the impact of infections on the onset and clinical course of bronchial asthma. A just emphasis is given to the role viral infections, particularly rhinovirus infections, play in exacerbations, and that played by respiratory syncytial virus, suspected of triggering the asthmatic syndrome. The mechanisms of the immune response to virus attacks are explained, highlighting the asthmatic and allergic patient's weakened response, particularly in the perinatal period. Further stressed is a potentiating effect of viral aggression on the allergic response. The hygiene hypothesis and its lack of scientific consistency is detailed, at least as far as the role it seeks to confer on an unproven antagonism of the Th₁ and Th₂ lymphocyte responses. The current importance of research not into bacteria, but into bacterial products, including endotoxins, on the modulation of asthma and allergy is noted. Studies which, along these lines, show an

¹ Trabalho apresentado no XXIII Congresso de Pneumologia da SPP – Guarda, Novembro 2007 / Paper presented at the XXIII Congresso de Pneumologia da SPP / PSP Pulmonology Congress, Guarda, November 2007

atopia, dando-se relevo aos estudos que, a partir deste modelo, demonstram uma influência do ambiente na secreção génica e, conseqüentemente, no fenótipo. Invocam-se, nas entrelinhas, vários mecanismos que podem explicar a asma neutrofílica que, para muitos, é um paradoxo perante o consagrado domínio do eosinófilo na inflamação asmática.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (5): 647-675

Palavras-chave: Asma e infecção, asma e vírus, endotoxinas.

environmental impact on genetic secretion in the phenotype are underlined. Also discussed in passing are several mechanisms which go towards explaining neutrophilic asthma – for many a contradiction, given eosinophilia's stranglehold on asthmatic inflammation.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (5): 647-675

Key-words: Asthma and infection, asthma and virus, endotoxins.

Hostil e ambígua a relação do Homem com os agentes microbianos! Apesar de ser hoje mais limitado o risco de se repetirem as epidemias que, de um só golpe, arrasaram populações inteiras, ainda hoje a memória deste passado povoa o seu imaginário e cria um subconsciente fóbico em relação às infecções. Receoso, continua a usar antibióticos mal desconfie que um qualquer germen possa esconder-se por detrás do mais tímido sintoma, e julga estar, assim, a levar de vencida o velho inimigo! Pura ilusão, porque os microrganismos aprenderam há muito a produzir antibióticos para combater as estirpes que os ameaçam e a criar mutações que os tornam resistentes a idênticas armas dos concorrentes.

Que as bactérias estavam bem preparadas para os antibióticos, que julgamos ter descoberto, não restam dúvidas! Pareceria mais inteligente que, sem deixar de usar as suas armas à medida do risco que a infecção pro-

Man has always had an antagonistic and ambiguous relationship to germs. While we are at much less risk today of epidemics which wiped out entire populations in one fell swoop, we are still aware of those more dangerous times and our subconscious is riddled with phobias when it comes to infection.

Wary, we continue to take antibiotics as we fear a germ may lie at the root of any seemingly mild symptom and feel in this way we are defeating an age-old enemy. This is pure illusion as microorganisms learnt long ago to produce antibiotics to combat any strains threatening them and to create mutations to make them resistant to their opponent's identical weaponry.

There is no doubt that bacteria were more than ready for antibiotics. An intelligent choice would be that in addition to using weapons befitting the risk the infection brings, mankind finds a way to live in har-

mete, perante algumas bactérias com as quais já conta um longo convívio, o homem encontrasse formas de coabitação pacífica, como já sucede com a flora comensal das suas mucosas, que protege em troca de um importante papel regulador da resposta imune e da estabilidade funcional local que o abuso de antibióticos pode prejudicar.

Mas, mais, a sua intempestiva reacção de pânico perante certas agressões microbianas faz com que, por vezes, sejam tão grandes ou maiores os estragos do gesto de defesa do que os da agressão. Poderá ser o caso das destruições pulmonares na presença do bacilo de Koch. E isto para não falar das doenças autoimunes que, ciclicamente, são julgadas uma consequência de inadequada resposta à presença de bactérias e vírus.

É dentro desta problemática do desajuste da resposta de defesa que se equaciona o papel das infecções na reacção imune/inflamatória alterada que se manifesta pelos fenótipos asma brônquica e atopia. Tema que ganha cada dia novos contornos, por vezes contraditórios, e daí que tenhamos que, após este nosso passeio pela literatura, fiquem mais dúvidas do que certezas.

Vírus, grandes protagonistas

De entre os agentes animados, são claramente os vírus os que reúnem provas mais concludentes de uma interferência moduladora na asma, claramente na sua evolução clínica e, presumivelmente, no seu desencadear^{1,2}. Sem dúvida, são eles os mais potentes e habituais desencadeantes das exacerbações da asma^{3,4} e disso é prova a detecção de vírus durante estes episódios em mais de 80% dos casos em crianças em idade escolar³ e em mais de 60% em adultos⁵. Aliás, os asmáticos que revelam a pre-

mony with some long-standing bacteria. This is the case with the normal human flora of mucous. This is protected in exchange for a vital regulatory role in the immune response and local functional stability which overuse of antibiotics can harm.

Further, a panic response to certain bacterial action means that the damage which defensive causes can be greater than that caused by the attack. This is the case with lung damage and Koch's bacillus. This is in addition to autoimmune diseases which are cyclically judged a consequence of inadequate response to bacteria and viruses.

The role of infection in the changed immune/inflammatory response shown by bronchial and allergic asthma phenotypes is part of the defense overresponse situation. The situation changes on an almost daily basis, sometimes contradicting itself and, as this literature review shows, throws up more questions than answers.

Virus, a leading player

Viruses are the agents playing a weightier role in the modulation of asthma. They impact on its clinical course and its trigger^{1,2}. They are undoubtedly the most powerful and typical triggers of asthma exacerbations^{3,4}, as shown by the fact that a virus is detected during attacks in over 80% of cases involving school-aged children³ and in over 60% of cases involving adults⁵. Asthmatics suffering exacerbation and who have a virus are more likely to be admitted to hospital⁶, and a virus attack here is clearly linked to bronchial hyperresponsiveness⁷

sença de vírus no decurso das exacerbações apresentam um maior índice de hospitalização⁶ e a agressão viral tem neles clara influência no aumento da hiperreactividade brônquica⁷ e na diminuição da permeabilidade das vias aéreas, com as consequentes alterações dos volumes pulmonares⁸ e das trocas gasosas⁹.

Discute-se, ainda, a responsabilidade de infecções virais precoces na persistência de sintomas de asma na infância tardia e na puberdade³ ou, mesmo, na idade adulta¹⁰. Questão não totalmente respondida é, finalmente, a de o vírus poder ser responsável pelo próprio aparecimento de asma. Será ele causa suficiente ou a gota que faz extravasar a água numa situação de particular fragilidade, eventualmente com causa genética? Ou será um mero marcador?

O vírus sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus (RV) são claramente os actores principais neste palco. O segundo o grande responsável pelas exacerbações, e o primeiro o mais prevalente nos três primeiros anos de vida, não se livrando da fama de poder ser capaz de instalar a asma.

Mas não esqueçamos a influência de vírus há muito conhecidos como os *influenza*, parainfluenza, enterovírus e adenovírus², enquanto se procura esclarecer o papel de vírus de mais recente descoberta como o hMPV (*human Metapneumovirus*)¹¹, os coronavírus NLG₃¹² e HKV₁¹³, o bocavírus humano¹⁴ e o vírus troqueteno¹⁵.

Mas o VSR e o RV merecem uma abordagem individualizada, e o enorme volume de publicações que a eles se referem é em grande parte consequência do importante avanço obtido com a utilização de métodos de análise molecular, como o da amplificação enzimática dos ácidos nucleicos virais, através de PCR (*polymerase chain reaction*)¹⁶. Pena é que não seja uma técnica acessível

and decreased airway permeability, with its subsequent lung volume⁸ and gas exchange⁹ alterations.

The role of early viral infections in the persistence of asthma symptoms in late childhood and adolescence³ or even in adults¹⁰ is also a topic of debate. The jury is still out on whether viruses are responsible for the onset of asthma. Is virus on its own the culprit or is it the last straw to break the back of a particularly fragile situation, possibly genetically caused? Or is it a mere marker?

It is clear that respiratory syncytial virus (RSV) and rhinovirus (RV) are the main players on this stage. RV is the main cause of exacerbations and RSV more prevalent in the first three years of life and thought to promote the onset of asthma.

The role played by other and more well know viruses, such as influenza, parainfluenza, enterovirus and adenovirus² must not be forgotten, and research is underway into the importance of more recently discovered viruses, including hMPV (*human Metapneumovirus*)¹¹, coronavirus NLG₃¹² and HKV₁¹³, human parovirus¹⁴ and torquetenovirus¹⁵.

RSV and RV deserve a separate approach, however. There is a huge body of published work on them, mainly stemming from the important gains brought about by molecular analysis methods, including enzymatic amplification of viral nucleic acids using PCR (*Polymerase Chain Reaction*)¹⁶. Countries with limited financial means do not have access to this technique, which is a pity.

Does RSV generate asthma?

RSV is always present during early life. It infects 70% of children aged one and prac-

para estudos epidemiológicos em países de escassos recursos financeiros.

VSR, gerador de asma?

O inevitável VSR é presença obrigatória nos primeiros anos de vida – infecta 70% das crianças no primeiro ano e praticamente 100% ao segundo¹⁷, e é responsável por 70% das hospitalizações por bronquiolite¹⁸. A sua presença nos primeiros anos de vida acompanha-se com muita frequência de sibilâncias, que se podem arrastar, permanecendo a dúvida de se poderá ser causa de asma ou se apenas a irá precipitar em indivíduos predispostos por influências genéticas ou por imaturidade da resposta imunológica ou do desenvolvimento pulmonar².

O certo é que nas populações não consideradas de risco é normal reagir-se ao VSR como se de uma gripe comum se tratasse, se bem que uma minoria possa fazer bronquiolites. Desta, 25 a 50% (consoante os estudos) vem a apresentar sintomas de asma intermitente (sibilâncias) aquando de infecções virusais de qualquer natureza, mas só um número muito reduzido virá a apresentar sintomas na idade adulta¹⁹.

Não faltam publicações a salientar a influência da infecção por VSR nos primeiros anos de vida na persistência de sibilâncias^{15,20-23}. Mas uma grande parte não se revela convincente em atribuir-lhe um papel diferente do de outros vírus respiratórios^{2,23,24}.

Mas uma análise atenta dos diferentes estudos²⁵ conclui que as bronquiolites graves, que requerem hospitalização, ou seja, as estudadas em meio hospitalar^{20,26}, mais facilmente desenvolverão sibilâncias ou asma atópica na infância tardia, enquanto os estudos populacionais²⁷ que, em princípio, envolvem casos menos graves, não encontra-

ticamente 100% of two year olds¹⁷. It is the cause of 70% of bronchiolitis-related hospital admissions¹⁸. RSV in the one to three year old age range often goes hand-in-hand with wheeze, sometimes long-lived, bringing in its wake the question if this is the cause of asthma or just the trigger in patients predisposed due to genetic influences on immature immunological response or on lung development².

What is clear is that non-risk populations react to RSV as they do to a normal 'flu virus, although the minority can develop bronchiolitis. Of these, 25-50% (it varies from study to study) develops intermittent asthma symptoms (wheeze) in response to any viral infection but only a very small number will develop symptoms at adult age¹⁹.

While many studies underline the role played by RSV infection in early life and the persistence of wheeze^{15,20-23}, the majority are not convinced it plays a different role to that of other respiratory viruses^{2, 23,24}.

A close scrutiny of the raft of studies²⁵ concluded that cases of severe bronchiolitis which needed hospital admission – that it, those studied in a hospital setting^{20,26} –, showed a greater tendency to develop wheeze or allergic asthma in later childhood. This is in contrast to population studies²⁷ which usually involved milder cases and found fewer examples of far-reaching consequences. They sometimes found wheeze, however, which cleared up at 3-5 years and was only rarely prolonged, leading or not to asthma.

Animal research is difficult to extrapolate to man but suggests RSV can induce allergic sensitisation²⁸, increase bronchial and interleukin (IL)-13 hyperresponsiveness, and

rão, na maioria dos casos, consequências remotas, embora algumas vezes descrevam sibilâncias que irão desaparecer aos 3-5 anos e só raramente se prolongam, instalando-se ou não uma asma.

A investigação animal, difícil de transpor para o homem, sugere a capacidade de o VSR induzir sensibilização atópica²⁸, aumento da hiperreatividade brônquica e da interleucina (IL)-13, hipereosinofilia e hiperprodução de muco²⁹, com maiores probabilidades de tal suceder se a infecção for grave²⁶.

Respostas mais concretas poderão surgir quando for possível uma vacinação anti-VSR, ou se se confirmarem as esperanças que alimentam os esforços de síntese de medicações antivirais^{30,31}.

Mas os resultados díspares sobre as potencialidades de o VSR poder ser factor determinante na indução de asma e de atopia não poderão deixar ninguém indiferente à medida que se vão desvendando os mecanismos de defesa antiviral e as suas potenciais fragilidades na infância precoce, sobretudo no período perinatal e, de um modo particular, em crianças em risco de atopia e asma. Não admira que a insuficiência da resposta ao vírus possa passar despercebida em infecções ligeiras e ter consequências indesejáveis nas mais graves. A este assunto voltaremos adiante.

Exacerbações da asma e rinovírus

Poder-se-á dizer, com muitas probabilidades de acertar, que sempre que surge uma exacerbação de asma numa criança até à idade escolar espreguia um RV. É que ele é detectado em 80% dos aspirados nasais colhidos quatro dias após os episódios de sibilâncias^{3,32}, enquanto no adulto colocará o seu carimbo em 60% das exacerbações agudas de asma³³.

stimulate hypereosinophilia and hyperproduction of mucous²⁹. There is high probability of this happening in cases of severe infection²⁶.

More concrete answers will come once an RSV vaccine is available, or if hopes of synthesising anti-virus medications are realised^{30,31}.

The different results on RSV's role in inducing asthma and allergy cannot leave anyone indifferent to the way anti-viral defence mechanisms are marshalled and their limited power in early childhood, particularly the perinatal period, especially in children at risk of allergy and asthma. It is no surprise that an inadequate response to the virus can remain undetected in cases of mild infection and bring about unwished for consequences in cases of more severe infection. This subject is dwelt on hereonin.

Asthma exacerbations and rhinovirus

An RV is almost always at the root of an asthma exacerbation in a pre-schooler. It is seen in 80% of nasal aspirate collected four days after episodes of wheeze^{3,32}, while it is seen in 60% of acute asthma exacerbations in adults³³.

A review of PCR statistics leads us to the same conclusion; RV is seen in 80% of children taken to Emergency Rooms with the virus isolated in 20-41% of this population³⁴. There are less published studies into RSV, also the cause of childhood asthma attacks³³.

As the name of the virus indicates, RV has a propensity for installing itself in the nasal structures. It is also found in the bronchial structures, extending an influence over the epithelium^{34,35} where it does not cause much

Lançando mão do PCR, chegamos à mesma conclusão nas crianças que tiveram mesmo de ir a uma urgência, pois revela-se positivo em 80% dos casos, tendo o próprio vírus sido isolado em 20 a 41% desta população³⁴. Menos publicações a respeito do VSR que também tem sido responsabilizado por ataques de asma na infância³³.

Se, como o nome indica, o RV tem uma apetência particular por se instalar nas estruturas nasais, ele também é encontrado nas brônquicas, exercendo a sua importante interação com o epitélio^{34,35}, onde não causa grandes destruições, e vai ocupar pequenas áreas, em comparação com a vasta destruição do VSR²⁶.

Mesmo assim, os seus efeitos pró-inflamatórios são demonstrados experimentalmente quando a sua inoculação em asmáticos ligeiros produz um aumento da hiperreactividade brônquica, que persiste pelo menos uma semana³⁶, e uma diminuição da permeabilidade das vias aéreas dois dias após a sua introdução³⁷. O RV pode persistir nos tecidos brônquicos durante duas semanas²⁴, induzindo infecções arrastadas que vão comandando uma inflamação progressiva que pode acabar numa exacerbação asmática aguda.

Vírus e atopia

Mantém-se actual a discussão sobre a cumplidade da agressão viral na constituição da atopia, nomeadamente da asma atópica, como deixámos entrever em relação ao VRS. Assunto não encerrado porque, se uns defendem poderem ser os vírus determinantes da sensibilização²⁶, outros negam-na²⁷, e há, até, quem defenda um papel protector da agressão viral³⁸.

O VRS é o mais citado, e aponta-se a sua capacidade de aumentar a expressão dos recep-

damage and occupies only small spaces, unlike the swathe of destruction wreaked by RSV²⁶.

Even so, its pro-inflammatory effects were shown in an experimental model when its inoculation in mildly asthmatic patients induced bronchial hyperresponsiveness lasting at least a week³⁶ and decreased airway permeability two days after it was introduced³⁷. An RV can linger in the bronchial tissues for two weeks²⁴, inducing long-lasting infections which give rise to progressive inflammation that can end in an acute asthma exacerbation.

Virus and allergy

The role of virus attacks in building allergy, particularly allergic asthma, is still under discussion, as we can see in relation to RVS. The matter is still the topic of debate; some argue that viruses causes sensitisation²⁶; others refute this²⁷, and some believe virus attacks play a protector role³⁸.

RVS is the most cited and its ability to increase immunoglobulin (Ig) E receptor expression, a factor which could make sensitisation to allergens easier, is noted. Its role is increasingly suspected by the high rate of RVS infection in early life, when transitory immune system difficulties⁴ could theoretically favour a response to the virus, in line with an allergy model.

It is an open question as current knowledge of anti-viral responses can provide theoretical support. Longitudinal analysis in children aged below two admitted to hospital with viral infection³⁹ and studies into large populations²⁷ find no correlation between early life viral infection and onset of allergic asthma up to the age of thirteen years or later, however.

tores das imunoglobulinas (Ig) E, o que poderia tornar mais fácil a sensibilização perante os alérgenos. E torna-se mais suspeito devido à elevada frequência da infecção por este vírus nos primeiros tempos de vida onde dificuldades transitórias do sistema imune⁴ podem, em teoria, favorecer uma resposta ao vírus segundo um modelo próprio da atopia.

É uma questão em aberto a que os conhecimentos actuais sobre a resposta antiviral poderão dar suporte teórico. Contudo, análises longitudinais em crianças com idades inferiores a dois anos, hospitalizadas por infecção viral³⁹, e estudos em grandes populações²⁷, não conseguem encontrar correlação entre infecção viral precoce e desenvolvimento da asma atópica até à idade de treze anos, ou mais tarde.

Mas do que parece não restar dúvida é do papel amplificador das infecções respiratórias virais sobre as consequências da sensibilização, um efeito sinérgico vírus/atopia²³. E provam-no os estudos experimentais com a concomitância, ou a sequência, de inoculação de RV e provocação alérgica – maior aumento de hiperreactividade brônquica e da infiltração eosinofílica em comparação com qualquer das agressões isolada⁴⁰.

Esta verificação tem a sua correspondente experimental no animal⁴¹ e na clínica quando se juntam a infecção viral e a exposição alérgica⁴², mas em qualquer modelo exige-se a proximidade das duas agressões porque se o intervalo for maior do que uma semana este fenómeno já não terá lugar⁴³.

Esta associação imprimiria uma resposta simultânea T Helper (Th)₁ e Th₂ que se potenciariam mutuamente⁴⁴. O vírus também poderia influenciar o processo de tolerância imunitária a agentes estranhos e aumentar a memória específica, a longo prazo, para os alérgenos contactados durante a infância¹⁰.

There seems little doubt of the amplification role respiratory viral infections play in sensitisation, a virus/allergic synergy²³. Experimental studies prove that there is a greater increase in bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic infiltration with RV inoculation and concomitant or segmental antigen bronchoprovocation and allergenic provocation than with any isolated attack⁴⁰.

This is also seen in experimental animal models⁴¹ and in clinical practice when virus infection is in tandem with exposure to allergens⁴². Both models demand the two forms of attack in conjunction as the phenomena will not occur if the two are at an interval greater than a week⁴³.

This association suggests a simultaneous T Helper (Th)₁ and Th₂ response which is mutually potentiating⁴⁴. The virus can also influence the immune response to foreign agents and heighten specific long-term memory to allergens the patient had contact with in childhood¹⁰.

Virus, the pathways to asthma and allergy

The role of virus is the modulation of asthma and allergy cannot be downplayed. It can intervene on a grand scale in the inflammatory mechanisms which regulate asthma and allergy. It is in fact a thousand piece puzzle which is far from being assembled. We are privy only to a clutch of clues, in themselves seemingly convincing.

Virus is in the front line of innate immunity which is somewhat dormant, in that infection cannot be fought off quickly and lasts for some time. Virus also uses the asthmatic patient's weaknesses, which developed in early life whether he/she is allergic or not^{10,25},

Vírus nos caminhos da asma e da atopia

Na modulação da asma e da atopia é difícil menosprezar o papel dos vírus, tal a sua aptidão para interferir nos mecanismos inflamatórios que comandam aquelas patologias. É um *puzzle* de muitas peças que está muito longe de ser resolvido. Ficar-nos-emos por algumas pistas que julgamos serem, por si só, convincentes.

Interferem, logo, na actuação da primeira tropa de choque, a da imunidade inata que é, de certo modo, adormecida para que a agressão infecciosa não possa ser combatida com rapidez e se prolongue no tempo. Aproveita também as fragilidades do asmático, atópico ou não, acrescidas nos primeiros tempos de vida^{10,25} e que incluem um défice da própria imunidade inata⁴⁵.

Na agressão viral às vias aéreas inferiores, o epitélio é a peça fundamental^{34,45}, e conhece-se o seu papel na libertação de moléculas pró-inflamatórias que activam e atraem células T, CD₄⁺ e CD₈⁺, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos¹⁰.

Se na asma aguda a infecção viral, nomeadamente pelo RV, a mais bem estudada, está associada à inflamação neutrofílica, lise celular e produção de interferões (IFN)⁴⁶, se o meio local for rico em IL-4 a regra passa a ser a produção de IL-5, RANTES (*regulated upon activated T cell expressed and selected*) e eotaxina, a infiltração eosinofílica e a produção de IgE⁴⁷.

Esta mutabilidade dos caminhos da inflamação faz com que não estranhemos que, sendo habitualmente de perfil Th₁ a resposta aos vírus, ela possa fazer-se através de citocinas Th₂ quando se reúnem as devidas circunstâncias, que o VSR parece com frequência promover. Para tal, poderá contribuir uma alteração genética no cromosso-

one of which is an innate immunity deficiency⁴⁵.

In virus attacks the airway below the epithelium is the vital part^{34,45} and its role in the release of pro-inflammatory molecules which activate and attract T, CD₄⁺ and CD₈⁺, cells, neutrophils, eosinophils, macrophages and mastocytes is known¹⁰.

If viral infection in acute asthma, particularly RV – the most studied – is associated with neutrophilic inflammation, cellular lysis and production of interferons (IFNs)⁴⁶ and if the environment is rich in IL-4, the production of IL-5, RANTES (Regulated upon Activated T cell Expressed and Selected), eotaxin, eosinophilic infiltration and IgE production⁴⁷ generally occur.

This change in the inflammation pathways comes as no surprise as, as is usually the case of the Th₁ profile in response to virus, it can be made through Th₂ cytokines under the correct circumstances, of which the RSV seems to be a frequent promoter. As such it can contribute to a genetic alteration in chromosome 5 (gene 589T IL-4 genotype), associated to an hyperexpression of IL-4⁴⁸ in association to RSV production of the G protein which promotes a delayed Th₁ expression (with IFN deficiencies)⁴⁹.

This double inflammatory response route, which in the asthmatic can be traced singly or simultaneously, provides good clues to explain the thoroughly discussed eosinophilic and neutrophilic forms of severe asthma. The latter can respond to other stimulation which will not be listed here. One which must be cited is endotoxin inhalation (50), which is dealt with shortly.

Epithelial stimulation both promotes neutrophil (through IL-8) and eosinophil (IL-16), recruitment and increases produc-

ma 5 (polimorfismo do gene 589T IL-4) que se associa a uma hiperexpressão de IL-4⁴⁸ em associação com a produção pelo VSR de proteína G, que promove um atraso da expressão Th₁ (com um défice de IFN)⁴⁹.

Esta dupla via da resposta inflamatória, que no asmático pode ser percorrida consoante as circunstâncias ou em simultâneo, fornece boas pistas para a explicação das tão discutidas formas eosinofílica e neutrofílica da asma grave. Esta última pode obedecer a outras condicionantes, que não vem a propósito enumerar, mas não poderemos deixar de citar a da inalação de endotoxinas⁵⁰, de que nos ocuparemos adiante.

A estimulação epitelial, além de promover o recrutamento de neutrófilos (através da IL-8) e eosinófilos (IL-16), também aumenta a produção de *tumor growth factor* (TGF)- β e do *vascular endothelial growth factor* (VEGF), abrindo caminho à remodelação das vias aéreas^{1,24}. E é também a partir daqui que se dá o primeiro passo para a resposta ao vírus, a da imunidade inata, inespecífica, através dos *toll-like receptors* (TLR)^{5,51}, em particular do TLR₃, que reconhece os ácidos nucleicos com dupla cadeia⁵².

Também fundamental a estimulação dos TLR de membrana dos macrófagos para a activação destes fagócitos das células infectadas. Antes, porém, este “varrer da cena” dos vírus intracelulares é preparado pela actuação do *tumor necrosis factor* (TNF)- α que expõe os vírus intracelulares às células imunes²⁵, enquanto os IFN- β dão o seu contributo inibindo a replicação viral³⁵.

A prova da importância dos IFN e do TNF- α na luta antiviral está na demonstração de que a forma de evasão que o vírus põe em

tion of Tumor Growth Factor (TGF)- β and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), laying the groundwork for airway remodeling^{1,24}. It is this which gives the first step towards response to virus, and innate non-specific immunity, through the Toll-Like Receptors (TLRs)^{5,51}, in particular the TLR₃ which recognises double-stranded nucleic acids⁵².

TLR stimulation of the macrophage membrane is also vital for activation of these infected cell phagocytes. In fact, this clean sweep of the intracellular viruses is prepared by actuation of the Tumor Necrosis Factor (TNF)- α which exposes the intracellular viruses to the immune cells²⁵ while the IFN- β contributes by inhibiting viral replication³⁵. The importance of IFNs and TNF- α in the fight against viruses is shown by the form of evasion which the virus demonstrates and the production of anti-IFNs and anti-TNF- α ²⁵.

The entire anti-virus defence process is liable to be different in the asthmatic patient. An IFNs deficit, a natural early life occurrence, means the patient cannot fight off a slight attack. This lack can be more deeply felt in the asthmatic patient, a fact not universally accepted, however^{10,53}. It can lead to a reduced clearance due to deficient apoptosis⁵⁴ with increased replication of the viruses which linger longer in the airway.

Innate immunity leads to adaptive and specific immunity, where the dendritic cells play the critical role of introducing the viral antigens to the T, CD₄⁺ and CD₈⁺ cells⁵⁵. Here too asthmatics could have significant constraints, beginning with an inefficient introduction of the viral antigens, cutting the efficacy of the specific response¹.

marcha é a da produção de anti-IFN e anti-TNF- α ²⁵

Todo este processo de defesa antiviral pode estar alterado no asmático, que não consegue dominar uma agressão maciça pelo seu déficit de IFN, natural nos primeiros tempos de vida, e que poderia ser mais acentuado no asmático, factos não aceites por todos^{10,53}. Daqui resultaria uma diminuição da *clearance* por deficiente apoptose⁵⁴ com aumento da replicação dos vírus que permaneceriam mais tempo nas vias aéreas.

Da imunidade inata chega-se à adaptativa, específica, onde cabe às células dendríticas o importante papel de apresentação dos antígenos virais às células T, CD₄⁺ e CD₈⁺⁵⁵. Aqui também poderá haver importantes constrangimentos nos asmáticos, a começar por uma ineficaz apresentação dos antígenos virais, reduzindo a eficácia da resposta específica¹.

Uma das populações das células dendríticas, as chamadas plasmacitóides, conseguem fazer a expansão das células T, mas em menor grau do que as suas parentes, designadas por mielóides. Contudo, enquanto as primeiras podem induzir tolerância para alérgenos, nomeadamente os inalados, as segundas são fortemente imunogénicas e favorecem o perfil Th₂ da resposta imune e a atopia, atenuam o papel das plasmacitóides na secreção de TNF- α e facilitam a proliferação das células CD₈⁺ memória^{3,56}.

A estimulação viral pode originar uma interconversão das células plasmacitóides em mielóides, passando-se, em relação aos alérgenos inalados, de um comportamento tolerogénico para o aumento da resposta, com perfil atópico⁵⁷. Um importante *handicap*, sobretudo para as populações em risco de atopia e de asma.

One of the dendritic cell populations, the plasmacytoids, is able to make T cells expand but to a lesser degree than their parents, the myeloids. While the first can induce tolerance to allergens, particularly inhaled allergens, the second are strongly immunogenic and favour the Th₂ profile in the immune response and allergy, attenuating the role of plasmacytoids in TNF- α secretion and facilitate the proliferation of memory CD₈⁺ cells^{3,56}.

Viral stimulation can cause an interconversion of the plasmacytoids cells into myeloids, passing in terms of inhaled allergens from tolerogenic behaviour to an increased response with allergy profile⁵⁷. This is a significant handicap, particularly for the populations at risk of allergy and asthma.

Viral influence in neurogenic inflammation deserves mentioning, even if is seemingly less important or less studied. If the rupture of the epithelium can lead to the discovery of nervous fibre terminals, the virus stimulates the M₂ receptors and determines the hyperexpression of NK₁, contributing to an increased bronchoconstrictor reflex and inflammation^{29,58}.

This fragility demonstrated by the asthmatic in the face of viral attack makes it easy to understand that defences can be easily breached in severe infections, for example RSV, and the virus's persistence is a decisive influence on the phenotype and the syndrome's clinical course. We must not forget that an ineffectual antiviral response can be a determinant in the onset of allergy and asthma, especially in susceptible patients. This is theoretical and widely accepted today, but awaiting scientific confirmation and validation in clinical reality.

Apesar de aparentemente menos importante, ou menos bem estudada, não deixa de merecer uma palavra a influência viral na inflamação neurogénica. Se a rotura do epitélio pode colocar a descoberto os terminais das fibras nervosas, o vírus estimula os receptores M_2 e determina a hiperexpressão de NK_1 , contribuindo para aumentar o reflexo broncoconstritor e a inflamação^{29,58}.

Esta fragilidade do asmático perante a agressão viral, de que apresentamos ao de leve algumas matrizes, faz compreender que em infecções graves, pelo VSR, por exemplo, as defesas possam ser facilmente ultrapassáveis e a persistência do vírus influa decisivamente no fenótipo e na evolução clínica da síndrome. E não é de excluir que, sobretudo em indivíduos predispostos, a insuficiência da resposta antiviral possa ser determinante no aparecimento da atopia e da asma. Isto em teoria, assumida hoje por muitos, que aguarda a confirmação científica da sua validade na realidade clínica.

E as infecções bacterianas?

Há umas décadas, as preocupações acerca da influência das infecções na modulação da asma centravam-se nas bactérias. Falava-se de “asma infecciosa”, a não atópica, que muitas vezes se manifestava como grave. E reinou também o conceito de “alergia bacteriana” que aconselhava a administração a longo prazo de vacinas por via subcutânea, muitas vezes preparadas a partir das próprias secreções do doente.

Hoje, pouca gente acredita na influência bacteriana na génese da asma brônquica, do modo como ela era descrita. Mas parece evidente que a inflamação produzida pela infecção, e pela resposta imune subsequente, poderão complicar a instabilidade celular já

And what about bacterial infections?

Ten years ago, concern over the role played by infection in asthma revolved around bacteria. Talk was of ‘infectious asthma’ and not allergic asthma and it often onset in a severe form. The concept of ‘bacterial allergy’ was also bandied about, and it advised the long-term administration of SC route vaccines, very often prepared from the patient’s own secretions.

Very few people today believe in a bacterial influence in the genesis of bronchial asthma in the form it was then described. It seems evident, however, that the inflammation caused by infection and the subsequent immune response can complicate the already existing cellular instability. While this is not the place to ask the question, it remains to be discovered if bacteria in themselves are able like viruses to trigger exacerbations or determine the long-term course of asthma. It is not likely that the more common infections such as *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* or *Haemophilus influenzae*¹⁹ could also play this role. Similar questions are being asked of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*. Although there is a lack of evidence, both are believed to be responsible for chronic forms of asthma in children and adults and *Chlamydia* alone for acute forms of asthma^{1,18,59}.

Faced with a lack of better options, macrolid antibiotics are deemed efficacious in clearing up symptoms, in recovering airway permeability and lowering IL-5 expression only in those patients seropositive for those bacteria¹. The design of those studies left a lot of gaps still to be filled and did not take the anti-inflammatory properties of that antibiotic group into account.

instalada. Contudo, não é esta a questão que aqui interessa colocar, mas a de saber se, como os vírus, poderão ser as bactérias capazes, por si só, de desencadear exacerbações ou de determinar a evolução a longo prazo da asma. Parece fora de causa que tal papel possa ser atribuído às infecções mais comuns, como as do *Streptococcus pneumoniae*, do *Streptococcus pyogenes* ou do *Haemophilus influenzae*¹⁹. Mas já o *Mycoplasma pneumoniae* e a *Chlamydia pneumoniae* têm estado no banco dos réus, embora com culpa mal formada. Sugere-se, sem provas suficientes, a sua responsabilidade por formas arrastadas de asma na criança e no adulto e a clamídia, mas não o micoplasma, em formas agudas^{1,18,59}.

Na falta de melhores argumentos, avança-se com a eficácia dos antibióticos macrólidos na melhoria dos sintomas, na recuperação da permeabilidade das vias aéreas e na diminuição da expressão de IL-5 apenas nos seropositivos para aquelas bactérias¹. E se o desenho destes trabalhos deixa muitas dúvidas, também se não têm em conta as potencialidades anti-inflamatórias daquele grupo de antibióticos. Mas justificações não faltam, como a da interferência do processo infeccioso nos circuitos inflamatórios, com produção de mediadores ou indução de défices de IFN ou, ainda, a actuação de proteínas de choque térmico indutoras de alterações inflamatórias tendo como alvo o epitélio brônquico, macrófagos e outras células^{2,25}. Mais do que de afirmação, estamos em fase de pistas para investigação e, como tal, é de aguardar futuros desenvolvimentos.

O efeito protector das bactérias. A hipótese higiénica

As nossas “amigas” bactérias comensais, com as quais ao longo do processo evolutivo, filo

Justifications abound, including the impact of infection on the inflammatory circuits, with production of mediators or induction of deficits in IFNs, or even the performance of heat shock proteins which induce inflammatory abnormalities and whose target is the bronchial epithelium, macrophages and other cells^{2,25}. This is more than a theory: it is the subject of research and so we must await future developments.

The protector role of bacteria. The hygiene hypothesis

Our normal human bacteria with which we have been in more of a trade-off than a co-existence situation throughout the evolutionary process and the phylo- and ontogenetic development process, are now indispensable for our defence system. They give off the strongest signal for the post-natal maturation of innate immunity, with the aid of the TLRs⁵¹, a fundamental process for the prevention of Th₁ and Th₂ diseases and for stimulating memory in adaptive immunity.

Their non-invasive presence in mucous is vital, as a deficiency in this microbial exposure could result in a broad spectrum of immune diseases. It is calculated that in early life there are ten times more bacteria in the mucous, particularly the intestinal mucus and with a genome three times larger than that of the host than there are in the organism as a whole⁶⁰.

What has become known as the hygiene hypothesis has been cited as an explanation of the increase in the rates of asthma and allergy in industrialised countries over the last few decades. This hypothesis blames a lack of early childhood exposure to infec-

e ontogenético, negociamos, mais do que uma convivência, uma verdadeira parceria, tornaram-se indispensáveis para o desenvolvimento da nossa quadrícula defensiva. De-las provém o mais forte sinal para a maturação pós-natal da imunidade inata, com a colaboração dos TLR⁵¹, um processo fundamental para a prevenção das chamadas doenças Th₁ e Th₂ e para a estimulação da memória na imunidade adaptativa.

A sua presença, não invasiva, nas mucosas tornou-se de tal modo vital que um défice desta exposição microbiana poderá conduzir a um largo espectro de doenças imunes. Calcula-se que, nos primeiros anos de vida, existam nas mucosas, com particular relevo para a intestinal, bactérias num número dez vezes superior ao das células de todo o organismo, com um genoma três vezes superior ao do seu hospedeiro⁶⁰.

Procurando uma explicação para o aumento, nas últimas décadas, da atopia e da asma nos países industrializados, a chamada hipótese higiénica pretende responsabilizar um défice de exposição microbiana nos primeiros tempos de vida pelo acréscimo no desenvolvimento da hipersensibilidade atópica e da asma.

Esta suspeita foi levantada pela primeira vez por Strachan, em 1989⁶¹: "A diminuição do tamanho das famílias, a melhoria dos cuidados domésticos e os mais elevados padrões de limpeza pessoal reduziram a possibilidade de infecções nos membros mais novos das famílias. Daqui pode ter resultado uma expressão mais comum das doenças atópicas". Partiu, para esta hipótese, da verificação de uma correlação inversa, em famílias numerosas, entre doenças atópicas e a ordem do nascimento – os mais novos vão-se expondo às infecções dos irmãos mais velhos.

tious agents for the increase in allergy and asthma.

This suspicion was first raised in 1989 by Strachan,⁶¹: '... declining family size, improvements in household amenities, and higher standards of personal cleanliness have reduced the opportunity for cross infection in young families. This may have resulted in more widespread clinical expression of atopic disease'. Springboarding from this hypothesis is the verification of inverse correlation between allergic diseases and position in large families: the younger children are exposed to infection from the older.

In 1998, Peat⁶² supported this supposition, attributing the increased rate of asthma particularly in children and teenagers in industrialised countries to our 'sterile' lifestyle. Martinez⁶³, Liu⁶⁴ and Von Mutius⁶⁵ found an inverse correlation between exposure to germs and asthma onset, while Calvani³⁸ attributed an identical role to viral infections. There are several other studies of this nature, underlining the role played by several aggressors, such as salmonellas, *Helicobacter pylori*, Hepatitis A, *Toxoplasma gondii* and mycobacteria^{1,52,66}; all worth evaluating.

The explanation given for these statements is that the lack of Th₁ stimulation favours the Th₂ arm of the immune response, with IL-4 and IL-13 secretion and IgE synthesis, meaning that on balance, there is an unstable opposing Th₂/Th₁ equilibrium; as one weakens, the other strengthens.

The hygiene hypothesis is far from convincing, however, at least as it stands, but it is at least open to new horizons, which we touch on here.

The greater part of these assumptions are difficult to sustain (64) and no one can affirm that in comparing family size and hy-

Em 1998, Peat⁶² vem em apoio desta suposição quando atribui ao nosso estilo de “vida esterilizada” o aumento da prevalência da asma, sobretudo em crianças e adolescentes, nos países industrializados. Martinez⁶³, Liu⁶⁴ e, também, Von Mutius⁶⁵ encontram relação inversa entre a exposição microbiana e o desenvolvimento da asma, enquanto Calvani³⁸ atribui idêntico papel às infecções virusais. Sucedem-se as referências deste tipo, especificando a responsabilidade de vários agentes agressores, como salmonelas, *Helicobacter pylori*, Hepatite A, *Toxoplasma gondii* e micobactérias^{1,52,66}, a maior parte não resistindo a um primeiro olhar de avaliação crítica.

A explicação levantada para estas verificações é a de que a falta de estimulação Th₁ favorece o braço Th₂ da resposta imune, com secreção de IL-4 e IL-13 e síntese de IgE. Quer dizer que, como se colocadas numa balança de dois pratos, há um equilíbrio instável das vertentes Th₂ e Th₁ que se opõem de modo a que o enfraquecimento de uma robustece a outra.

Mas esta hipótese higiénica, pelo menos na explicação que lhe foi dada, está longe de ser convincente, se bem que tenha tido a virtude de ter aberto novas perspectivas que não deixaremos de desenvolver no decurso deste trabalho.

Na verdade, a maioria destas verificações é dificilmente sustentável⁶⁴ e ninguém pode dizer que comparando tamanho familiar e níveis de higiene estamos a medir directamente a exposição a infecções. Nesta lógica, como se explica o aumento de prevalência da asma nos bairros pobres dos Estados Unidos⁶⁷? Ou, em África e na América Latina, em zonas endémicas de xistosomiase, promotora da secreção Th₂ e da síntese de IgE, que a prevalência daquela parasitose esteja na relação inversa da asma e da atopia⁶⁸? E o maior

giene levels we are directly measuring exposure to infection. If we were, how would one explain the rise in the asthma rate seen in the poorer USA neighbourhoods⁶⁷? Or how in Africa and Latin America, in areas rife with bilharzia, which promotes Th₂ secretion and IgE synthesis, is the prevalence of that parasite in an inverse correlation with asthma and allergy⁶⁸? And the high risk of asthma in children who attend nursery schools, with the greatest amount of infections in the lower respiratory tract⁶⁹?

Any remaining illusions should be put to rest by the failure of treatment which converts Th₁ responses in asthmatics into Th₂ with no clinical effect whatsoever⁷⁰.

We need new arguments as the Th₁/Th₂ dichotomy is no longer accepted. How would the parallel increase in auto-immune inflammatory diseases, Th₁ expression and asthma and allergy⁷¹ or the fact that auto-immune diseases are higher in asthmatics⁶⁴ be explained on that basis?

Human and murine studies confirm that there may even be a synergism in both cytokine profiles that goes hand in hand in many types of immune response, especially allergic response⁷². This is particularly evident in allergic and viral attacks which combine Th₁ and Th₂ expressions^{73,74}. RSV attack, inducing Th₁ response, occurs in a previously Th₂ environment and does not upset the lymphocyte balance. Rather it contributes to exacerbating the inflammatory type already installed^{42,43,72}. In murine models this dual exposure results in a strong response of both cytokine profiles, suggesting that an efficient Th₁ response is important for adequate Th₂⁷³.

In 2003, Holtzman⁷⁵ unveiled a theory that could be true in some cases: the asthmatic

risco de asma em crianças que frequentam infantários, com maior número de infecções do tracto respiratório inferior⁶⁹?

Se restassem ilusões, bastaria assinalar o fracasso de intervenções terapêuticas que converteram respostas Th₂ em Th₁ em asmáticos sem qualquer eficácia clínica⁷⁰.

Temos de arranjar outros argumentos, já que se não aceita hoje a relação dicotómica Th₁/Th₂. Como se explicaria, naquela base, o aumento paralelo da prevalência das doenças inflamatórias autoimunes, de expressão Th₁, e de asma e atopia⁷¹, ou o facto de as doenças autoimunes terem elevada prevalência nos asmáticos⁶⁴?

Aliás, os estudos em modelos humanos e murinos confirmam que pode, até, haver um efeito sinérgico de ambos os perfis citocínicos que concorrem de mão dada em muitos tipos de resposta imune, nomeadamente na atópica⁷². Isto é bem evidente quando se sucedem as agressões alérgica e viral que combinam as expressões Th₁ e Th₂^{73,74}. A agressão pelo VSR, indutora de resposta Th₁, acontecendo num ambiente previamente Th₂, não desvia o balanço linfocitário, antes contribui para a exacerbação do tipo inflamatório já instalado^{42,43,72}. Em modelos murinos, desta dupla exposição resulta uma resposta forte de ambos os perfis citocínicos, sugerindo-se, mesmo, que uma resposta eficaz Th₁ pode ser importante para uma Th₂ adequada⁷³.

Em 2003, Holtzman⁷⁵ expõe uma teoria que, pelo menos em algumas situações, poderá corresponder à realidade – o fenótipo asmático desenvolve-se pela activação concomitante de mecanismos atópico e anti-viral. Seria uma resposta de ampliação mútua Th₁/Th₂ que levaria à inflamação crónica, à hiperreactividade brônquica e à remodelação.

phenotype develops via concomitant activation of allergic and anti-viral mechanisms. A mutual Th₁/Th₂ amplification leads to chronic inflammation, bronchial hyperresponsiveness and remodulation.

Those two types of response seem to fight for the same ground. The immunology battle field is an open and interactive one, allowing multiple combinations of tactics to be selected, and weapons of choice befitting every situation. Regulatory T cells stand up to choose the most fitting solutions^{45,76,77} and as such, those seeking to understand the intricacies of the immune response should study them. Romagnani⁷⁸ feels any explanation of the hygiene hypothesis has to pass through the altered immunity situation caused by alteration of the regulatory T cells.

The role of these cells, whose promotion may well start in the intestinal microbial flora⁷⁹, is becoming increasingly complex as the choices at its disposal are ever-widened by the discovery of new aids to immunology. An example is the recent discovery of the Th₁₇ profile⁸⁰ which acts through the IL-17 and will fill some gaps in knowledge of the immune/inflammatory phenomena.

Unlike the Th₁ and Th₂ profile, the Th₁₇ profile mediates tissue inflammation, promoting neutrophil recruitment and survival and is likely to be a participant in auto-immune diseases as its neutralisation prevents tissue inflammation in these types of diseases. It is another clue in severe neutrophilic asthma where suspicion is cast from time to time on auto-immune intervention.

The set of variables acting in the immune response is large and complex. It is conditioned by genetic susceptibility (genotypes)

Definitivamente, vamos deixar de colocar aqueles dois tipos de resposta num quarto fechado, a disputar o mesmo espaço. O campo de batalha imunológico é aberto e interactivo, permitindo múltiplas combinações de escolhas tácticas, seleccionando as armas para cada situação. Para gerir a escolha das melhores soluções candidatam-se as células T reguladoras^{45,76,77}, para as quais se devem dirigir as atenções de quem pretender compreender a intrincada rede da resposta imune. Romagnani⁷⁸ entende que qualquer explicação para os factos apresentados pela hipótese higiénica tem de passar por fenómenos de desvio imune por alteração das células T reguladoras. E o papel destas células, cuja promoção pode partir da flora microbiana intestinal⁷⁹, afigura-se cada vez mais complexo, na diversidade das escolhas ao seu dispor, com a descoberta de novos braços armados da imunidade. Exemplo é a recente descoberta do perfil Th₁₇⁸⁰ que actua através da IL-17 que vem preencher alguns hiatos na explicação dos fenómenos imunes/inflamatórios. Ao contrário de Th₁ e de Th₂, o perfil Th₁₇ medeia a inflamação nos tecidos, promovendo o recrutamento e a sobrevivência dos neutrófilos, sendo um provável participante nas doenças autoimunes, já que a sua neutralização previne as lesões tecidulares deste tipo de doenças. Mais uma pista para as asma graves neutrofílicas, onde se tem ciclicamente vindo a lançar a suspeita de intervenção autoimune. É grande a complexidade de todas as variáveis que intervêm no desenvolvimento da resposta imune, sujeita a factores de susceptibilidade genética (o mundo dos polimorfismos) e, no período perinatal, a muitas variáveis. A começar pelas decorrentes da gravidez, incluindo as infecções da mãe⁸¹, e continuando com a relação do momento da agressão

and by many variables in the perinatal period. These begin with occurrences in pregnancy, such as maternal infection⁸¹, continue with the relationship to the moment of attack and the stage of maturity of the immunologic system and the lung structures. Here there are moments when the patient comes under external attack which takes advantage of transitory vulnerabilities with results which are difficult to explain *a posteriori*.

Bacterial products

Despite criticisms, the epidemiological effort which went into the hygiene hypothesis was extremely worthwhile in that it opened up a new perspective of asthma modulation which promises to bring forth much which is new and vital.

We move from microbial infection to non-viable bacterial products such as endotoxins, able to influence the immune response so the rate of asthma and allergy is altered⁸²⁻⁸⁶. Their performance brings about several sets of consequences, depending on when exposure occurs (important in early life), the amount and frequency of stimulation and any cross-exposure. This is all conditioned by genetic variability.

The majority of epidemiological studies conclude that children which are rural born and bred, in contact with farmyards and hay in haylofts, have a lesser rate of asthma and allergy than neighbouring urban populations. This is seen more the earlier the exposure⁸⁵.

Some conditioning factors are certain life styles, such as those of some Hindustan peninsula communities which have a great deal of domestic contact with large animals

com o estado de maturidade do sistema imunológico e das estruturas pulmonares. Dentro deste contexto, surgem janelas de acessibilidade para agressões externas que exploram vulnerabilidades transitórias com resultados difíceis de explicar *a posteriori*.

Os produtos bacterianos

Pesem, embora, todas as objecções que lhe queiramos colocar, foi de grande mérito o esforço epidemiológico que levou à teoria higiénica porque estendeu a passadeira a uma nova perspectiva da modulação da asma que promete trazer muito de novo e importante.

Já não se trata aqui da infecção microbiana mas de produtos bacterianos não viáveis, como as endotoxinas, que teriam a capacidade de influenciar a resposta imune de modo a alterar a prevalência da asma e da atopia⁸²⁻⁸⁶. A sua actuação, com mais do que um tipo de consequências, dependerá da altura da exposição (importante a precoce), da dose e frequência do estímulo, de co-exposições, tudo isto dependendo de uma clara variabilidade genética.

De entre as inúmeras referências a estudos epidemiológicos, avultam as que concluem que crianças, nascendo e crescendo em quintas, em contacto com currais e feno acumulado em palheiros, vêm a revelar menos asma e atopia do que populações vizinhas com estilo de vida mais próximo do urbano, efeito tanto mais nítido quanto mais precoce a exposição⁸⁵.

Algumas especificidades são as de certos estilos de vida, como acontece em algumas comunidades da península hindustânica, onde é íntimo o contacto doméstico com animais, de grande porte ou gatos durante a noite, que levariam a que as crianças desen-

or cats during the night, leading the children to develop less asthma, rhinitis and allergy^{87,88}. The same is seen for the habitual consumption of non-pasteurised milk⁸⁵.

While children at risk at allergic asthma have long been told to avoid contact with these animals, it is concluded that prolonged early life exposure to Feld-1 induces a form of immune tolerance specific to that allergen⁸⁹. This effect cannot be explained by an increase in the exposure to endotoxins⁹⁰. It is evident that this does not overrule the need for avoidance in patients sensitised to these animals. Here unanimous opinion states that children at risk should avoid them in early life.

In addition to the lipopolysaccharides (LPS) of gram negative bacteria walls (the largest component of endotoxins) other bacterial products have been responsible for this protector effect. These include muramic acid, composed of proteoglycans present in the wall of most bacteria. This influence works in proportion to the concentration, in the beds of rural houses, of LPS and muramic acid⁸⁷.

Explanations of this have emerged over the years but are still not totally clear. What seems clear is that they cannot reside in the now clarified Th₁/Th₂ balance as children living where there is high exposure to endotoxins have a decreased secretion of both Th₁ and Th₂ cytokines when their leucocytes were re-stimulated with LPS via the TLR₄⁸⁴. It is natural that the regulatory T cell role emerges to the fore again, probably through a suppressor effect in the allergic response^{83,91}. Repeated exposure to endotoxins and other bacterial products leads to a refractory situation in response to re-exposure. Romagnani⁹² argues for an effect of

volvessem menos asma, rinite e atopia^{87,88}. O mesmo para o consumo habitual de leite não pasteurizado⁸⁵.

Em relação aos gatos, rompendo com uma longa tradição de evicção destes animais por crianças em risco de asma atópica, concluiu-se que a elevada exposição precoce a Feld-1 induz uma forma de tolerância imunitária que é específica daquele alérgeno⁸⁹, efeitos que, contudo, não podem ser explicados por um aumento da exposição a endotoxinas⁹⁰. É evidente que tal não contraria a exigência de evicção em indivíduos tornados sensíveis a estes animais, e mesmo, aqui sem unanimidade de opiniões, em crianças de risco, passados os primeiros anos de vida.

Para este efeito protector, para além dos lipopolissacáridos (LPS) das paredes das bactérias gram negativas (o maior componente das endotoxinas), outros produtos bacterianos também têm sido responsabilizados, como o ácido murâmico, composto de proteoglicanos presente na parede da maioria das bactérias. Esta actuação moduladora exerce-se proporcionalmente à concentração, nas camas das casas rurais, de LPS e ácido murâmico⁸⁷.

As explicações para este fenómeno não foram logo evidentes, nem hoje são transparentes, mas pareceu claro que não podiam estar no já desmistificado balanço Th₁/Th₂ porque crianças vivendo em ambientes de elevada exposição a endotoxinas apresentavam uma secreção diminuída de citocinas, tanto Th₁ como Th₂, quando os seus leucócitos eram reestimulados com LPS através dos TLR₄⁸⁴. Naturalmente que o papel das células T reguladoras volta a emergir, provavelmente através de um efeito supressor na resposta atópica^{83,91}. A exposição repetida a endotoxinas e outros produtos bacterianos conduzirá a uma situação refractária na resposta às reexposições. Romagnani⁹² de-

those cells in simultaneous suppression of Th₁ and Th₂ response.

Attention naturally returns to the cellular receptors of the bacterial products and with surprising results in the environment/genome interaction field^{93,94}. The CD14 gene is the key here. It is the gene which codifies a co-receptor for multiple TLRs which recognise in addition to the virus – as stated above –the lipopolysaccharides and proteoglycans of the bacterial membranes⁹⁵.

The white blood cells of farm born and bred children have more CD14 and TLR receptors than those of city children, in the absence of any infectious attack worth noting⁹⁶.

Epidemiology studies in this field have abounded over the last few years with conclusions which are sometimes very different⁹⁷; different methodologies make it hard to establish cause-effect relationships. One apparent contradiction are the conclusions which in some epidemiological studies, in spite of an inverse correlation with allergy, see increased risk of wheeze⁹⁸ or non-allergic asthma⁹⁹ with exposure to endotoxins.

We have known for some time of the negative impact endotoxins have on the respiratory system, particularly when exposure is occupational. This has led to the description of 'endotoxin-sensitisation asthma'^{100,101}, with neutrophil type inflammatory reaction⁵⁰.

This phenomenon has been put to the test in inhalatory challenge tests which could bring on asthma episodes or exacerbations in children and adults^{82,102}, but, to test this seeming paradox, it is not necessary to resort to these arguments as in a German study⁸², the degree of early life exposure to domestic endotoxins was in direct correla-

fende um efeito daquelas células na supressão simultânea das respostas Th₁ e Th₂.

E a atenção voltou-se, logicamente, para os receptores celulares dos produtos bacterianos e com surpreendentes resultados no campo da interacção ambiente/genoma^{93,94}. E a chave utilizada para abrir estas portas é a do gene CD14 que codifica um co-receptor para múltiplos TLR que reconhecem, além de vírus, como já foi citado, os lipopolissacáridos e proteoglicanos das membranas bacterianas⁹⁵. Ora, os glóbulos brancos de crianças que nasceram e vivem em fazendas manifestam uma maior quantidade de receptores CD14 e TLR do que as que vivem em zonas urbanas, na ausência de agressões infecciosas dignas de registo⁹⁶.

Os estudos epidemiológicos, neste campo, multiplicaram-se nestes últimos anos, com conclusões por vezes muito diferentes⁹⁷, a que não serão estranhas vicissitudes metodológicas que tornam difícil estabelecer relações de causa-efeito. Uma aparente contradição são as conclusões que, nas circunstâncias de alguns estudos epidemiológicos, apesar de uma associação inversa com a atopia, há aumento do risco de sibilâncias⁹⁸ ou de asma não atópica⁹⁹ com a exposição a endotoxinas.

Mas já é do nosso velho conhecimento o efeito negativo das endotoxinas sobre o aparelho respiratório, nomeadamente em meio ocupacional, que levou à descrição de uma suposta “asma por sensibilização às endotoxinas”^{100,101}, com reacção inflamatórias de tipo neutrofilico⁵⁰.

Este fenómeno está bem testado em provas de provocação inalatória que podem provocar episódios de asma em crianças, ou a exacerbação da síndrome, em crianças e adultos^{82,102}, mas, para testar este aparente paradoxo, não é necessário recorrer a estes argumentos de inalação de

tion to the increase in the rate of respiratory and cutaneous symptoms between 6 and 12 months. Another longitudinal study showed that a higher degree of exposure to endotoxins at birth was linked to a higher risk of early life asthma¹⁰³.

What is the path out of this crossroads? Various research units across the world are studying endotoxin receptors and the polymorphisms of their genes. The final results of this multi-polarised scientific effort, with epidemiological studies into geographically distant populations with different ethnicities, could provide enormous advantages as it represents a wide genetic diversity.

As expected, bacteria have been indicated for the polymorphisms of gene CD14 having a dominant position in the complex of LPS receptors but also of RSV, particularly the TLRs, located on chromosome 5q31, a region associated with markers of asthma⁸⁴. The relevant results in so far are particularly useful for the light they shed on this dense and vast matter which will be hard to solve and give rise to fundamentally opposing positions.

Mononucleotide polymorphisms of that gene are the ideal target. We will start with CD14/-260, whose C allele is associated to higher levels of total and specific IgE in patients in regular contact with pets but which has an inverse correlation in patients in regular contact with farm animals¹⁰⁴. Another example is the TT homozygotic of CD14/-159 which correlates with a greater sensitisation to dog allergens and a lesser rate of allergic eczema¹⁰⁵.

Another paradigmatic reference states that CD14/-1721 when in homozygotic AA, and to a lesser degree in GG, is linked to an inverse correlation between non-pasteurised

doses maciças porque, num estudo alemão⁸², o grau de exposição precoce a endotoxinas no ambiente doméstico está directamente correlacionado com o aumento da prevalência de sintomas respiratórios e cutâneos entre os 6 e os 12 meses. Num outro estudo longitudinal, um maior grau de exposição a endotoxinas, à nascença, estaria ligado a um maior risco de asma no primeiro ano de vida¹⁰³.

Como sair desta encruzilhada? Espalhados por todo o Mundo, centros de investigação lançaram-se na pista dos receptores das endotoxinas e do polimorfismo dos seus genes. Esta multipolarização do esforço científico, com estudos epidemiológicos em populações muito afastadas geograficamente, com distintas etnias, poderá trazer enormes vantagens quando se fizerem as contas finais, pela diversidade genética que pode representar.

E, como seria de prever, as baterias foram apontadas para os polimorfismos do gene CD14 que tem uma posição dominante no complexo de receptores dos LPS, mas também do VSR, com destaque para os TLR, e que está localizado no cromossoma 5q31, uma região que tem sido conotada com marcadores da asma⁸⁴. Os relevantes resultados já conseguidos valem sobretudo pelas clareiras que abrem numa densa e vasta floresta que vai custar a desbravar e que virá trazer motivos para uma infundável e salutar polémica. São alvo privilegiado os polimorfismos uninucleotídicos daquele gene e vamos apontar, como primeiro exemplo, o do CD14/-260, cujo alelo C estará associado a níveis mais elevados de IgE totais e específicas em indivíduos que têm contacto regular com animais domésticos, mas apresenta uma associação inversa nos que contactam regularmente com estábulos de animais¹⁰⁴. Outro exemplo é o da homozigotia TT do CD14/-159 que

milk consumption and allergic sensitisation¹⁰⁶. Non-treated components in milk can modify expression of CD14, at the level of position -1721.

The difficulties of these genetic studies are well-known, particularly in the choice of quality phenotypes and genotypes and the impossibility of eliminating all confusing factors¹⁰⁷. It is impossible to list all the studies, but mention is made of the Braun-Fahrlander/von Mutius and Fernando Martinez results. These remarkable teams have learned from the past that incongruent results often lead to the largest leaps in scientific knowledge.

In 1999, the F. Martinez team¹⁰⁸ described the existence of an oligonucleotide polymorphism at position -159 of gene CD14, located on chromosome 5q31 and to which are attributed responsibilities in asthma phenotypes. It is also of interest in that it is present in monocyte, macrophage and neutrophil membrane and could be an intermediary in the performance of microbial products¹⁰⁹ and probably of RSV¹¹⁰.

Two alleles (C and T) of CD14/-159 have been studied. Their homozygote could be important in allergic sensitisation ability. The early studies of the Martinez team were confirmed by some but not all researchers. The Braun-Fahrlander team falls into the latter, with their wide-based study which cited the influence of more than a position of CD14 and various forms of environmental exposure. Another example is the ALEX (ALLergy and EndotoXin) study⁸³. The closeness of these two groups, an example of scientific rigour in terms of protocols and the analysis of divergent results, led to understandably provisional conclusions in this thorny field^{84,104}.

se correlaciona com uma menor sensibilização a alérgenos de cão e uma menor prevalência de eczema atópico¹⁰⁵.

Outra referência paradigmática reporta-se ao CD14/-1721 que, quando em homozigotia AA, e em menor grau em GG, está ligado a uma relação inversa entre o consumo de leite não pasteurizado e a sensibilização alérgica¹⁰⁶. Sugere-se que componentes existentes no leite não tratado são capazes de modificar a expressão do gene CD14, a nível da posição -1721.

São reconhecidas as dificuldades destes estudos genéticos, nomeadamente na escolha de fenótipos e genótipos de qualidade e na impossibilidade de eliminar todos os factores de confusão¹⁰⁷, mas, na impossibilidade de citação exaustiva, ficamos-nos pela breve enunciação dos resultados dos grupos de Braun-Fahrlander/von Mutius e de Fernando Martinez. Estas notáveis equipas aprenderam com a história que é da incongruência dos resultados que muitas vezes se parte para as maiores conquistas científicas.

Em 1999, a equipa de F. Martinez¹⁰⁸ descreve a existência de um polimorfismo oligonucleotídico na posição -159 do gene CD14, situado no cromossoma 5q31, ao qual têm sido atribuídas responsabilidades nos fenótipos da asma e igualmente interessante pelo facto de estar presente na membrana de monócitos, macrófagos e neutrófilos e poder ser intermediário da actuação dos produtos microbianos¹⁰⁹ e, provavelmente, do VSR¹¹⁰.

Para o visado CD14/-159 estudaram-se dois alelos (C e T), cuja homozigotia pode ser relevante na capacidade de sensibilização atópica. Os estudos iniciais da equipa de Martinez, confirmados por alguns investigadores, não o eram por outros, nomeadamente pela equipa de Braun-Fahrlander no estudo de

A study of peripheral leucocytes concluded that in the CC homozygote when there is a low degree of exposure to endotoxins there was a high risk of allergic sensitisation, while when there was a high degree of exposure, the risk of sensitisation was minimal. On the contrary, when there was a TT homozygote there was protection in relation to allergic sensitisation when the levels of exposure were low and a great risk when they were high.

Martinez⁸⁴ was the first to show a correlation between phenotypic expression and dose dependant environmental factors on gene secretion. It is believed that this type of phenomenon can have an important impact on phylogenetic evolution and the ontogenetics of the immune system¹¹¹.

We await the results of studies underway into CD14 and other gene polymorphisms which may have an influence on endotoxin receptors and other outside agents, particularly viruses, which are increasingly seen as important in the expression of allergic and asthmatic phenotypes.

Another strand in the argument came in a recent issue of the Journal of Immunology, where a Korean team used a human and murine model¹¹². After concluding that severe asthmas are often of neutrophilic expression, with increased IFN- γ (Th₁) expression, they later verified in an animal model that inhalation of low endotoxin doses induces Th₂ response phenotypes, bronchial hyperresponsiveness and induction of IgE secretion. In contrast, high endotoxin doses induce neutrophilic inflammation and bronchial hyperresponsiveness with a Th₁ profile in rats. This does not happen in animals deficient in IFN- γ .

grande amplitude, incidindo sobre mais de uma posição do CD14 e vários tipos de exposição ambiental, o estudo ALEX (ALLergy and EndotoXin)⁸³. A aproximação destes dois grupos, um exemplo de seriedade científica no confronto de protocolos e na análise de resultados divergentes, levou a conclusões, naturalmente provisórias, neste campo de tão difícil abordagem^{84,104}.

O estudo em leucócitos periféricos concluiu que, na homozigotia CC, quando havia um baixo grau de exposição a endotoxinas, era elevado o risco de sensibilização atópica, enquanto se o grau de exposição fosse elevado o risco de sensibilização era mínimo. Pelo contrário, quando existia uma homozigotia TT havia uma protecção em relação à sensibilização atópica quando eram baixos os níveis de exposição e um grande risco quando esta era elevada.

Para Martinez⁸⁴, ter-se-á demonstrado pela primeira vez uma relação da expressão fenotípica com a influência do ambiente (dependente da dose) sobre a secreção génica. Presume-se que fenómenos deste tipo poderão ter tido importante papel na evolução filogenética e na ontogenia do sistema imune¹¹¹.

Aguardam-se os resultados dos estudos em curso sobre outros polimorfismos do CD14 e de outros genes que possam ter algo a ver com receptores das endotoxinas e de outros agentes externos, nomeadamente vírus, que parece estarem a ganhar grande relevância na expressão dos fenótipos atópico e asmático.

Uma outra acha para a fogueira foi lançada por uma publicação recente no *Journal of Immunology* por uma equipa coreana que utilizou modelos humano e murino¹¹². Depois de concluírem que as asma graves são com frequência de expressão neutrofílica, com aumento da expressão de IFN- γ (Th₁),

Martinez⁸⁴ stated that asthma and allergic phenotypes are only rarely purely 'genetic' or 'environmental'. He proposed that they are almost always the result of inadequate genetically determined responses to environmental situations in which, depending on the context, the latter can predispose towards disease, prevention or even neutral results in the environment/phenotype correlation.

Developments are eagerly awaited and will shortly cascade. There is a heavy current investment in animal research, as in addition to the difficulties in epidemiological research starting from the genome already discussed, there are important ethical barriers which will not be easily overcome.

Practical conclusions

In the midst of so much confusion, is it possible to reach any conclusions on asthma and allergy prevention which are applicable to the here and now? Will we have to change the way we lead our lives?

It is obvious, and no one would say otherwise, that it is not possible or desirable to turn back the clock on advances in quality of life which hygiene measures have brought to populations. This is of course not a defence of those urging an obsessively sterile lifestyle, which is sometimes advocated by pressure groups with financial interests in those areas.

But this is already calling into question advice to which we have all been privy, and which is sometimes taken too much to heart by parents of allergic and/or asthmatic children, or children at risk of these diseases, to keep the house clean and avoid animals in early life. Can genetic studies, such as those

verificam, depois, no animal, que a inalação de doses baixas de endotoxinas induzem fenótipos de resposta Th₂, hiperreactividade brônquica e indução da secreção de IgE. Em contraste, o uso de doses altas de endotoxinas induzem no rato inflamação neutrofílica e hiperreactividade brônquica, com um perfil Th₁, situação que não acontece no animal deficiente em IFN- γ .

Para Martinez⁸⁴, os fenótipos asma e atopia só raramente poderão ser “genéticos” ou “ambientais” puros. Propõe que sejam, quase sempre, o resultado de respostas inadequadas, geneticamente determinadas, a situações ambientais, onde, dependendo do contexto, estas últimas tanto podem predispor para a doença, para a prevenir, ou, ainda, para resultados neutros na correlação ambiente/fenótipo.

Pressente-se na literatura médica impaciência quanto aos desenvolvimentos que, neste domínio, vão surgir em catadupa e que conhecem actualmente um forte investimento na investigação animal, já que ir mais longe na avaliação de modelos humanos, para além das já referidas dificuldades na investigação epidemiológica com ponto de partida no genoma, compreende importantes obstáculos de ordem ética que dificilmente poderão ser ultrapassados.

Conclusões práticas

Será que de tanta contradição, de que fizemos eco, é possível retirar consequências para o quotidiano na procura da prevenção da asma e da atopia? Será que temos de mudar os nossos padrões de vida?

É evidente, e ninguém o defende, que não é possível nem desejável voltar atrás no progresso que as medidas higiénicas trouxeram à qualidade de vida das populações. Mas, claro, isto não significa apoiar certos fundamentalismos

already carried out into endotoxins, provide future guidance?

A somewhat logical option, part of the initial hygiene hypothesis, is the use of orally administered probiotics, something which even today provides the backbone of food-stuff industry marketing strategy. Existing studies are inconclusive, however^{60,114}, and attempts to blame early life antibiotic use for the increased rate of asthma were not encouraged¹¹⁵.

The synthesis of anti-viral vaccines, particularly anti-RSV and anti-RV, or anti-viruses suitable for administering in early life may be a useful way to go, and bring something to knowledge of asthma modulation by virus.

While it is good in the field of asthma, as in other medical science fields, to hope for discovery of environment/genotype/phenotype correlations and easy access markers to characterise them, we are all aware that fresh scientific knowledge does not appear at the speed we would hope. That said, hope remains of future clarification of such cloudy areas as asthma, particularly in its modulation by infections.

de obsessão por uma sociedade esterilizada, com excessos normativos que, muitas vezes, não deixam de ter por detrás grupos de pressão com interesses financeiros nestas áreas.

Mas já são de por em causa conselhos que todos nós vimos dando, por vezes levados a um extremo de rigor pelos pais de crianças atópicas e/ou asmáticas, ou em risco de o serem, na limpeza da casa ou evicção de animais desde os primeiros meses de vida. Será que os estudos genéticos, como os feitos para as endotoxinas, nos poderão orientar futuramente?

Uma opção mais ou menos lógica, dentro da versão inicial da hipótese higiénica, seria o uso de probióticos por via oral, visão que continua ainda hoje a orientar estratégias de *marketing* na indústria alimentar. Mas os estudos realizados revelaram-se inconsistentes^{60,114}, nem foram encorajadoras as tentativas de responsabilizar a administração de antibióticos em idades precoces pelo aumento da prevalência da asma¹¹⁵.

Poderá ter interesse, e tê-lo-á por certo para o conhecimento da modulação da asma por vírus, a síntese de vacinas antivirais, nomeadamente anti-VSR e anti-RV, ou de antivirais viáveis para administração nos primeiros tempos de vida.

Se bem que, no campo da asma como no de outros sectores da ciência médica, se alimentem todas as esperanças nas relações ambiente/genótipo/fenótipo e no achado de marcadores de fácil acesso para as caracterizar, todos estamos conscientes de que a passagem à prática de novos conhecimentos científicos não se faz à velocidade da nossa esperança que, no entanto, se mantém viva e confiante na clarificação futura de nebulosas tão densas como são as da asma, nomeadamente na sua modulação pelas infecções.

Bibliografia / Bibliography

1. Pelaia A, Vatrella R, Galleli L. *et al.* Respiratory infections and asthma. *Respir Med* 2006; 100:775-84.
2. Lemanske RF. Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1023-26.
3. Johnston SL, Pattermore Pk, Sanderson G, *et al.* Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 years old children. *BMJ* 1995; 1225-29.
4. Copenhauer Cc, Gern Ge, Li Z, *et al.* Cytokine response patterns, exposure to viruses and respiratory infection in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:175-80.
5. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory virus and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-86.
6. Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 267-73.
7. Empey DW, Laitinen LA, Jacobs L, *et al.* Mechanics of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am Rev Respir Dis* 1976;113:131-39.
8. Stokes GM, Milner AD, Hodges IGC, Grobbins RC. Lung function abnormalities after acute bronchiolitis. *J Pediatr*, 1981; 98:871-74.
9. Haal CB, Halol WJ, Gala CL, *et al.* Long-term prospective study of children after respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1984; 105:358-64.
10. Martin JG, Diddiqui S, Hassan M. Immune responses to viral infections: relevance for asthma. *Ped Respir Rev* 2006; 75: S125-S127.
11. Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719-24.
12. Van der Hoek L, Pyrc K, Jerbink MF, *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368-73.
13. Woo PC, Lau SK, Chu SM, *et al.* Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKV1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005; 79:884-95.
14. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12891-6.
15. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, *et al.* Associations between torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis* 2005; 192:1141-8.

16. Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, *et al.* Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1997; 8:31-40.
17. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 2004; 5 (Suppl. A): 223-38.
18. Lemanske RF. Is asthma an infectious disease? *Chest* 2003; 3: S385-S390.
19. Weinberger M. Respiratory infections and asthma: current treatment strategies. *Drug Discovery Today* 2004; 9: 831-7.
20. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1501-7.
21. Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:76-82.
22. Holt PG, Sly PD. Interactions between RSV infection, asthma and atopy. Unraveling the complexities. *J Exp Med* 2005; 196:1271-5.
23. Husel MMH, De Klerk NH, Kebabze T, *et al.* Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1105-10.
24. Hersoug L-G. A reformulation of the hygiene hypothesis: maternal infectious diseases confer protection against asthma in the infant? *Medical Hypothesis* 2006; 27: 717-20.
25. Darkham A, Mok Lee Y, Gelfand EW. Virus-induced airway dysfunction. Pathogenesis and biomechanisms. *Ped Infect Dis J* 2005; 24(Suppl):S159-S169.
26. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, *et al.* Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:137-41.
27. Stein R, Sherrill D, Morgan W, *et al.* Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age of 13 years. *Lancet* 1999; 354:541-45.
28. Graham BS, Bunton LA, Wright PF, Karzon DT. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory virus in mice. *J Clin Invest* 1991; 88:1026-33.
29. Dakhama A, Park JW, Taube C, *et al.* Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following syncytial virus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005; 228: L761-L770.
30. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory virus by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; 11:50-5.
31. Zhang W, Yang H, Kong X, *et al.* Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 2005; 11:56-62.
32. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, *et al.* Rhinovirus illness during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 116: 571-7.
33. Tan WC. Virus in asthma exacerbations. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11:21-6.
34. Almström K, Pitkäranta A, Carpen O, *et al.* Human rhinovirus in bronchial epithelium of infants with recurrent respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:591-6.
35. Holgate ST. Rhinovirus in the pathogenesis of asthma: the bronchial epithelium as a major disease target. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:587-90.
36. Cheung D, Dick EC, Timmers MC, *et al.* Rhinovirus inhalation causes long-lasting excessive airway narrowing in response to methacholine in asthmatic subjects in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1490-6.
37. Grunberg K, Timmers MC, De Klerk EP, *et al.* Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1375-80.
38. Calvani M, Alessandri C, Bonci E. Fever episodes in early life and the development of atopy in children with asthma. *Eur Respir J* 2002; 20:391-6.
39. Korppi M, Piippo-Savolainen E, Korhonen K, Remess S. Respiratory morbidity 20 years after SRV in infancy. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38:155-60.
40. Calhoun WJ, Dick EC, Schwartz LB, Busse WW. A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J Clin Invest* 1994; 94: 2220-8.
41. Schwarze J, Gelfand EW. Respiratory viral infections as promoters of allergic sensitization and asthma in animal models. *Eur Respir J* 2002; 19:341-9.
42. Makela MJ, Tripp R, Dakhama A, *et al.* Prior airway exposure to allergen increases virus-induced airway hyperresponsiveness.

- perresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 861-9.
43. Schaller M, Hogaboam CM, Wkaks N, Kunkez SL. Respiratory viral infections drive chemokine expression and exacerbate the asthmatic response. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:295-302.
44. Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, *et al.* Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 1999; 162: 23755-83.
45. Umetsu DT, Abkari V, Dekruyff R. Regulatory T cells control of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 117:480-7.
46. Lee RM, White MR, Hartshorn KL. Influenza A viruses upregulate neutrophil Toll-like Receptor 2 expression and function. *Scandinavian J Immunol* 2006; 63: 81-9.
47. Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, *et al.* Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Eur Respir J* 2002; 20: 370-82.
48. Choi EH, Lee HJ, Yoo T, Chanock ST. A common haplotype of interleukin 4 gene is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children. *J Infect Dis* 2002; 186:1207-11.
49. Jackson M, Scott R. Distinct patterns of cytokine induction in cultures of respiratory syncytial (RS) virus-specific human Th cell lines following stimulation with RS virus and RS virus proteins. *J Med Virol* 1996; 49:161-9.
50. Cochran JR, Khan AM, Elidmir O, *et al.* Influence of LPS exposure on airway function and allergic responses in developing mice. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34:267-77.
51. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17:1-4.
52. Henson CA, Jardine A, Edwards MR, *et al.* Toll-like Receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005; 79:12 273-9.
53. Schaub B, Lavener R, Von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:967-77.
54. Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F, *et al.* Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 210:937-47.
55. Van Rijt LS, Van Kessel G, Boogaard I, Lambrecht BN. Respiratory viral infections and asthma pathogenesis: a critical role for dendritic cells? *J Clin Virol* 2005; 34:161-9.
56. Mazzoni A, Leifer CA, Mullen GE, *et al.* Cutting edge: histamine inhibits IFN. alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170:2269-73.
57. Zuniga EI, Mc Gavern DB, Pruneda-Paz JL ET, *et al.* Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* 2004; 5:1227-34.
58. Kalina WW, Gershwin LJ. Progress in defining the role of RSV in allergy and asthma. *Clin Rev Immunol* 2004; 11:113-9.
59. Remes ST, Korppi M. On roots of childhood asthma: the role of respiratory infections. *Ann Med* 2005; 37:26-32.
60. Prescott SL, Björkstén G. Probiotic for the prevention of treatment or allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:255-62.
61. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989; 299:1259-60.
62. Peat J, Björkstén B. Primary and secondary prevention of allergic asthma. *Eur Respir J* 1988; 27 (Suppl): 28S-34S.
63. Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354 (Suppl 2): 112-5.
64. Liu AH, Murphy JR. Hygiene hypothesis: fact or fiction? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:471-8.
65. Von Mutius, Illi S, Hirsch T, *et al.* Frequency of infections in the first years of life and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness among schoolage children. *Eur Respir J* 1999; 14:4-11.
66. Linehan MF, Frank TL, Hazell ML, *et al.* Is the prevalence of wheeze in children altered by neonatal BCG vaccination? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1079-85.
67. Aligne CA, Auinger P, Byrd RS, Weitzman M. Risk factors for pediatric asthma. Contributions of poverty, race and urban residence. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 873-7.
68. Yazdanbakhsh M, Kretsner PG, Van Ree R. Allergy, parasites and hygiene hypothesis. *Science* 2000; 296: 490-4.
69. Tantisara KG, Weiss ST. Childhood infections and asthma: at the crossroad of the hygiene and Barker hypothesis. *Respir Res* 2001; 2:324-7.

70. Bryan SA, O'Connor BJ, Chung KF, *et al.* Effects of an antileukin-12 on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic reaction. *Lancet* 2000; 356:2148-53.
71. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.
72. Hansen G, Berry G, De Kruiff R, Umetsu D. Allergen-specific Th1 cells fails to counterbalance Th2 cell induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103:175-83.
73. Dahl ME, Dabbagh K, Liggit D, *et al.* Viral-induced T helper type1 responses enhance allergic disease by effects of lung dendritic cells. *Nat Immunol* 2004; 5:337-43.
74. Jeon SG, Oh S-Y, Park H-K, *et al.* Th2 and Th1 lung inflammation induced by airway allergen sensitization with low and high dose of double. stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:803-12.
75. Holtzman NJ, Morton JD, Shornick LP, *et al.* Immunity, inflammation, and remodeling in the airway epithelial barrier: epithelial-viral. allergic paradigm. *Physiol Rev* 2002; 82: 19-46.
76. Bachetta R, Gambineri E, Roncarolo M-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:227-35.
77. Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest* 2007; 132: 1607-14.
78. Romagnani S. Coming back to a missing immune deviation as the main exploratory mechanisms for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1511-13.
79. Canonica G, Ciprandi G, Pesce G, *et al.* ICAM-1 on epithelial cells in allergic subjects: a hallmark of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 99-102.
80. Chmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. Th17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:247-54.
81. Hersoug L-G. A reformulation of the hygiene hypothesis: maternal infectious diseases confer protection against asthma in the infant? *Medical Hypotheses* 2006; 27:717-20.
82. Gehring U, Bolte G, Borte M, *et al.* Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 847-54.
83. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, *et al.* The Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-77.
84. Martinez FD. CD14, endotoxin and asthma risk. Actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 221-25.
85. Riedler J, Eder W, Schrever M, *et al.* Early life exposure to farming provides protection against the development of asthma and allergy. *Lancet* 2001; 358:129-33.
86. Von Mutius E. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc Am Thoracic Soc* 2007; 4:212-6.
87. Molson T, Bronchi L, Hessen J, *et al.* Asthma and indoor environment in Nepal. *Thorax* 2001; 56: 477-81.
88. Vedantham PK, Maesh PA, Vedanthan R, *et al.* Effect of animal contact and microbial exposures in the prevalence of atopy and asthma in urban vs rural children in India. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96: 571-8.
89. Reefer AJ, Carneiro RM, Custis NJ, *et al.* A role for IL-10 mediated HLA. DR7 – restricted T-cell-dependent events in the development of the modified Th2 response to cat allergen. *J Immunol* 2004; 172: 2763-72.
90. Platts-Mills JA, Custis NJ, Woodcock A, Platts-Mills TAE. Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implication for cat specific tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 384-9.
91. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, *et al.* Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+ CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 175: 8051-9.
92. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004; 112:352-63.
93. Simpson A, John SL, Jury F, *et al.* Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease. An association between genes and the environment. *Am J Resp Crit Care Med* 2006; 174:386-92.
94. Hopelman GH. Gene environment interaction in allergic disease: more questions, more answers? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1266-8.
95. Kaisho T, Alkira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 979-87.
96. Lavener RP, Birchler T, Adamski J, *et al.* Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers and non-farmers children. *Lancet* 2002; 360: 465-6.

97. Ege MJ, Frei R, Bieli C, *et al.* (Parsifal Study). Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1140-7.
98. Eder W, Von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:113-7.
99. Portegen L, Preller L, Tielen M, *et al.* Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:482-8.
100. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:379-92.
101. Reed CE, Milton DK. Endotoxin-stimulated innate immunity: a contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:157-66.
102. Douwes J, Pearce N, Heederik D. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax* 2002; 57:86-90.
103. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, *et al.* House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:322-8.
104. Eder W, Klimeri W, Yu L, *et al.* The Allergy and Endotoxin (ALEX) Study Team. Opposite effects of CD14/260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 601-7.
105. Gern JE, Reardon CL, Hoffman A, *et al.* Effects of dog ownership and genotype in immune development and atopy in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 307-14.
106. Bieli C, Eder W, Frei M, *et al.* A polymorphism in cd14 modified the effect of farm milk consumption on allergic disease and CD14 gene expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:1308-15.
107. Weiss ST. Association studies in asthma genetics. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2014-5.
108. Baldini M, Lohman Ic, Halonen M, *et al.* A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and total serum IgE. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 976-83.
109. Los H, Koppelman GH, Postma DS. The importance of genetic influences in asthma. *Eur Respir J* 1999; 14:1210-27.
110. Ulevitch RJ, Tobias PS. Dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:437-57.
111. Pigliucci M, Schlichting C. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc 1996.
112. Kim Y-K, Oh S-Y, Jeon SG, *et al.* Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol* 2007; 178: 5375-82.
113. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, *et al.* Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled study. *Lancet* 2003; 361: 1869-71.
114. Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, *et al.* Lack of association between antibiotic use in the first year of life and asthma, allergic rhinitis, or eczema at age of 5 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 72-5.