



Mónica Elisabete Teixeira Gomes

## Uso de Parasitas Helminthas na Terapêutica de Doenças Inflamatórias

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Dra. Maria do Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Mónica Elisabete Teixeira Gomes

# Uso de Parasitas Helmintas na Terapêutica de Doenças Inflamatórias

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Dra. Maria do Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora da Monografia:

Maria do Céu Sousa

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa)

A Aluna:

Mónica Elisabete Teixeira Gomes

(Mónica Elisabete Teixeira Gomes)

## Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	3
Introdução .....	4
1. Modulação Imune pelos Helmintas .....	6
1.1. Indução da proliferação e ativação de linfócitos T <sub>H</sub> 2 .....	8
1.2. Proliferação de células dendríticas .....	8
1.3. Indução da proliferação de células T <sub>REG</sub> .....	8
1.4. Ativação de macrófagos pela via alternativa .....	10
1.5. Modulação da expressão dos recetores Toll-like .....	10
1.6. Citocinas imunossupressoras e moléculas co-inibitórias .....	11
1.7. Produção de Cistatinas .....	11
2. Melhoria da Função Barreira da Mucosa .....	13
3. Parasitas como Terapêutica .....	15
4. Produtos dos Helmintas como Medicamentos Anti-Inflamatórios .....	17
5. Segurança e Perspetivas Futuras .....	20
Conclusão .....	22
Bibliografia .....	24

## Abreviaturas

AAM – macrófagos ativados pela via alternativa

DCs – células dendríticas

ES-62 – derivado dos produtos secretados por *Acanthocheilonema viteae*

FoxP3+ – *forkhead box protein 3*

IBD – doença inflamatória de *Bowel*

IECs – células epiteliais intestinais

IgE – imunoglobulina E

INF $\gamma$  – interferão gama

MS – esclerose múltipla

NK – células natural killer

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

RA – artrite reumatóide

SEA – antígenos dos ovos de *Schistosoma mansoni*

TCR – receptores das células T

TGF- $\beta$  – fator de transformação de crescimento beta

TLRs – receptores Toll-like

TNF – fator de necrose tumoral

T<sub>REG</sub> – células T reguladoras

TRIF – *Toll/IL-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor inducing IFN-beta*

T1D – diabetes mellitus tipo I

## **Resumo**

As doenças inflamatórias autoimunes e alérgicas são uma preocupação em crescente no mundo moderno. É de notar a relação inversa entre o aparecimento destas doenças e a extinção do contacto com os parasitas helmintas devido às alterações de estilo de vida e melhorias na higiene e acesso a cuidados de saúde primários, como evidencia a Teoria da Higiene. Os parasitas helmintas, devido ao seu potencial para modular o sistema imune dos hospedeiros têm vindo a ser muito estudados na tentativa de usá-los como terapêutica das doenças imunitárias emergentes e de compreender os mecanismos inerentes a essa ação de forma a conseguir sintetizar novos agentes terapêuticos mais eficazes e seguros.

## **Abstract**

Autoimmune and allergic inflammatory diseases are a growing worry in the modern world. We should notice the inverse relationship between the appearing of these diseases and the extinction of the contact with helminthic parasites, due to the changes in lifestyle and hygiene improvements and access to primary health care, like proposed in the Hygiene Hypothesis. Helminthic parasites due to their potential to modulate host's immune system have been immensely studied in the attempt of using them as therapy to these emerging immune diseases and understand the mechanisms inherent to them so that we can synthesize new more efficient and safer therapeutic agents.

## Introdução

Os helmintas são seres invertebrados caracterizados por corpos alongados e planos, trematodas e céstodas, ou cilíndricos, os nemátodas. Durante o ciclo de vida apresentam diferentes estádios desde os ovos e estados larvais até à forma adulta, podendo passar por diferentes hospedeiros. A compreensão dos diferentes estádios permite perceber a epidemiologia e patogénese das doenças por helmintas, bem como o diagnóstico e tratamento (1).

Estes parasitas são altamente bem-sucedidos a infetar o Homem, causando alguma morbidade mas raramente a morte. Cerca de um quarto da população mundial está infetada cronicamente e a grande maioria encontra-se nos países em desenvolvimento onde a pobreza não permite o acesso a condições de higiene adequadas, água potável ou cuidados de saúde básicos e medicamentos anti-helmínticos (2).

Nos países desenvolvidos com os crescentes cuidados de higiene e acesso a um leque alargado de medicação, estes parasitas têm vindo a extinguir-se. Contudo, com esta diminuição têm vindo a surgir cada vez em maior número diversos distúrbios inflamatórios e autoimunes (3).

Com base nestes factos epidemiológicos surgiu a Teoria da Higiene que afirma que o aumento das doenças inflamatórias e autoimunes acontece em simultâneo com o decréscimo da ocorrência de infeções, nomeadamente infeções helmínticas. Estes parasitas têm a capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro por forma a conseguirem sobreviver nele durante mais tempo e têm também como que um efeito secundário sistémico o de suprimir a inflamação associada a doenças alérgicas e autoimunes (2). A Teoria da Higiene é suportada por vários dados, como por exemplo a maior prevalência destas doenças em zonas urbanas em detrimento das rurais, o que se verifica inversamente para as infeções helmínticas, ou pelo facto de na Ásia a incidência destas doenças ser bastante mais baixa do que na América do Norte e Europa, mas ter vindo a aumentar nas últimas três décadas, principalmente na China, devido às mudanças de estilo de vida e melhoria económica (4).

Ao longo dos anos inúmeras investigações foram sendo conduzidas para explorar esta questão e hoje sabe-se que os parasitas helmintas são um importante elemento ambiental que condiciona o desenvolvimento do sistema imunitário. Descobriu-se que podem ter carácter preventivo, uma vez que bebés em que houve infeção durante a gravidez ficaram protegidos contra eczemas durante a infância (5). É também sabido que têm poder

terapêutico quando a infecção ocorre após os indivíduos já serem portadores da doença, como se comprova em vários estudos que demonstraram uma melhoria de sintomatologia em doenças como a Colite Ulcerativa, Doença de *Crohn*, Esclerose Múltipla, Artrite Reumatóide, Diabetes tipo I, Asma e diversas alergias (6).



## I. Modulação Imune pelos Helmintas

Atualmente conhecem-se três grandes classes de células produtoras de citocinas: células  $T_H1$ ,  $T_H2$  e  $T_H17$ . As células  $T_H1$  produzem interferão- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) particularmente importante na proteção contra vírus, bactérias intracelulares, fungos e protozoários; as células  $T_H2$  produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 responsáveis pela proteção contra parasitas helmintas e insetos; e as células  $T_H17$  produtoras de IL-17, IL-21 e IL-22 que dão resposta a infecções por bactérias extracelulares e fungos. Existem ainda outras citocinas importantes como a IL-3 e o fator de necrose tumoral (TNF) que são produzidas por mais do que um tipo de células T CD4+ (7).

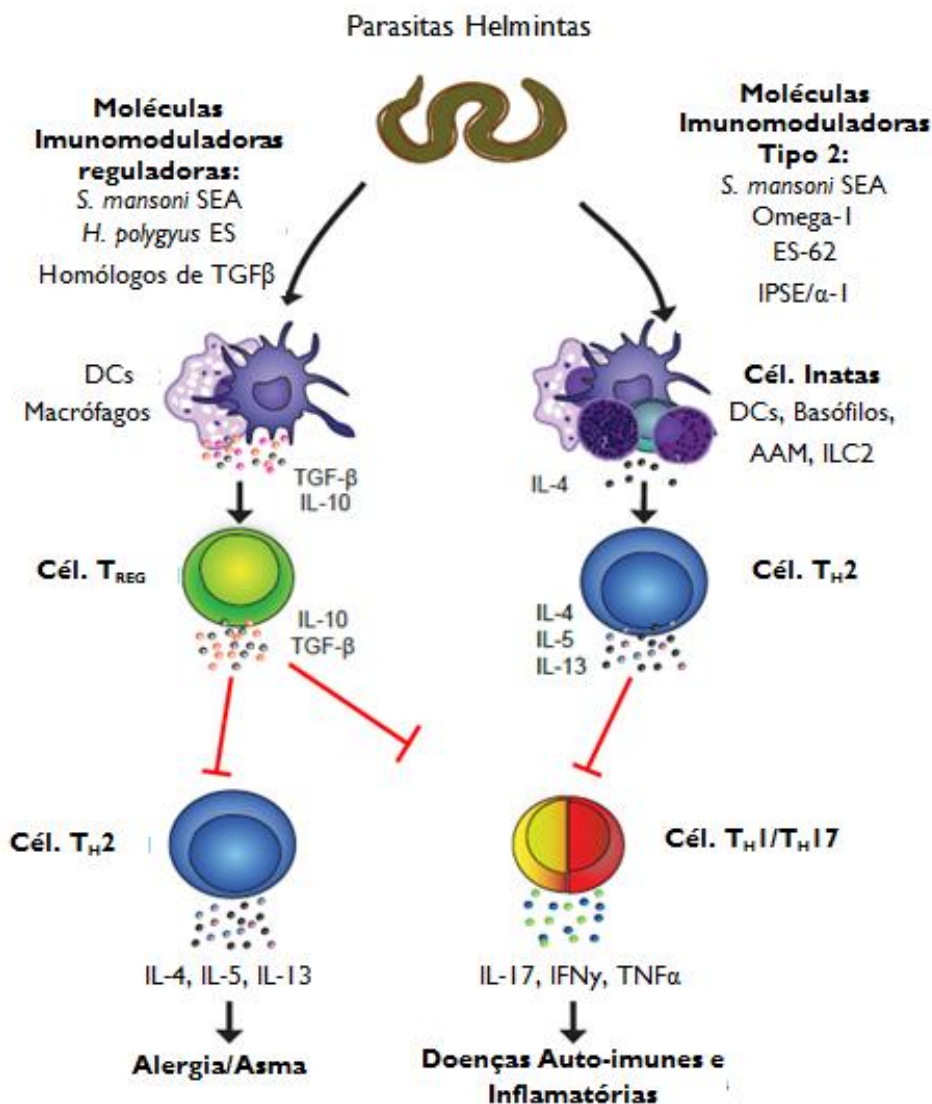
Respostas inadequadas por estas classes de células a auto antígenos ou a antígenos estranhos mas inócuos podem causar diversas doenças. Por exemplo, respostas  $T_H2$  a antígenos ambientais conduzem a diversas alergias, incluindo Rinite Alérgica, Eczema e Asma Atópica; respostas  $T_H17$  a auto antígenos estão associadas à patogênese da Diabetes Mellitus tipo I, Esclerose Múltipla, Doença de Crohn e Artrite Reumatóide; e também as respostas  $T_H1$  a auto antígenos conduzem a doenças como a Sarcoidose e as associadas às respostas com  $T_H17$  referidas anteriormente (7).

As citocinas produzidas por cada um destes tipos de células conseguem suprimir a inflamação induzida por outro tipo, mas a regulação dessa inflamação requer também a presença e influência de um quarto tipo de células T CD4+, as células T reguladoras ( $T_{REG}$ ) que segregam as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  e expressam níveis elevados de CD25 (receptor da IL-2) e do fator de transcrição FoxP3, que desempenham um papel importante na autoimunidade. Embora as células  $T_{REG}$  sejam as de maior importância na regulação da inflamação e autoimunidade outros tipos de células contribuem para esta regulação, tais como as células B reguladoras, as células dendríticas (DCs), as células T CD8+ e as células mieloides (7).

A exposição a parasitas helmintas está associada com a modulação do sistema imune do hospedeiro e um decréscimo na reatividade a outros antígenos não relacionados com o parasita, o que pode ser muito útil no tratamento de doenças autoimunes e imunológicas (8).

Quando há uma infecção aguda por um helminta esta é normalmente eliminada através do turnover epitelial regulado por citocinas do tipo  $T_H2$ , pela contração do músculo liso e pela barreira de muco que conduzem à expulsão do parasita (9). A resposta imune que se

desenvolve inclui o recrutamento de células efetoras como os eosinófilos e mastócitos, a produção de anticorpos IgE e a ativação de linfócitos helper  $T_H2$   $CD4^+$  produtores de IL-4, IL-5 e IL-13 (10), bem como a expansão de células  $T_{REG}$  produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  (6), capazes de suprimir a autoimunidade e alergia, como mostra a Figura 1 (2).



**Figura 1** - Supressão da autoimunidade e alergia pelos helmintas via resposta imune reguladora e resposta imune tipo 2 (adaptado de (2)).

A indução de respostas  $T_H1/T_H17$  é significativamente mais inflamatória e destrutiva do que as respostas  $T_H2$ , danificando as membranas mucosas (2).

Por forma a conseguir manter uma infecção crónica no hospedeiro, que por vezes pode durar largos anos, os helmintas têm inúmeras estratégias de evasão do sistema imune. Mas afinal quais são as alterações que estes parasitas provocam no sistema imunitário?

Existem muitos helmintas diferentes e nem todos atuam pelos mesmos mecanismos, sendo que uma única espécie controla o sistema imune através de vários tipos de citocinas e circuitos reguladores diferentes (11).

### **1.1. Indução da proliferação e ativação de linfócitos T<sub>H2</sub>**

A base do papel dos helmintas na prevenção de doenças autoimunes está na interação T<sub>H1</sub>-T<sub>H2</sub> e nas citocinas produzidas por estas células.

Quando há uma infecção por estes parasitas o organismo responde com a indução de uma resposta T<sub>H2</sub> que limita a sua expansão no hospedeiro ao aumentar a resposta imune humoral que conduz à produção de anticorpos específicos contra os antigénios do invasor.

Assim, as células T<sub>H2</sub> produzem citocinas anti-inflamatórias que contrariam a resposta T<sub>H1</sub> inibindo a diferenciação e ativação destes linfócitos, que estão aumentados em patologias como a Colite Ulcerosa e a Doença de *Crohn*, estando aqui o efeito benéfico da terapia helmíntica nestas doenças (12).

Contudo, os helmintas também conseguem restringir reações alérgicas provocadas por uma resposta T<sub>H2</sub>, pelo que deverão existir outros mecanismos pelos quais atuam (11).

### **1.2. Proliferação de Células Dendríticas**

Pelo seu papel central em direcionar a imunidade adaptativa, as células dendríticas (DCs) são alvos major da imunossupressão induzida por helmintas. A sua função principal é de patrulhar os tecidos à procura de possíveis sinais de perigo, ativando imediatamente as células imunes inatas locais e consequentemente iniciando a resposta imune adaptativa apropriada. As DCs estão equipadas para reconhecer uma grande variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de diversas famílias de recetores reconhedores de padrões (PRRs), entre as quais os recetores Toll-like (TLRs), os recetores NOD-like, os recetores RIG-like e os recetores Lectina tipo C (CLRs) (13).

Produtos como antigénios de ovos de *Schistosoma mansoni* (SEA) e um derivado dos produtos secretados por *Acanthocheilonema viteae* (ES-62) modulam as DCs seletivamente para induzirem células T<sub>H2</sub>, inibindo a resposta das DCs a PAMPs clássicos indutores de T<sub>H1</sub>, bem como a ativação via TLRs (2).

### **1.3. Indução da proliferação de células T<sub>REG</sub>**

Os parasitas helmintas induzem a expansão de células T<sub>REG</sub> na mucosa e nos nódulos linfáticos mesentéricos (6), uma subpopulação imunossupressora de células T helper. A sua

ativação limita a diferenciação das diferentes células T CD4+ efetoras, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17, tendo um papel importante na criação de um ambiente de tolerância imunológica no intestino, o que por um lado facilita a sobrevivência do parasita mas também protege a mucosa da hipersensibilidade.

Existem três grupos principais de T<sub>REG</sub> CD4+: as CD4+CD25+ T<sub>REG</sub>, que inibem as células efetoras por contacto direto e pela produção de citocinas imunossupressoras; as T<sub>R</sub>1, que segregam grandes quantidades de IL-10; e as T<sub>H</sub>3, que produzem maioritariamente o fator de transformação de crescimento beta (TGF-β). As citocinas por elas produzidas inibem as células apresentadoras de antígenos (12).

Uma pequena porção de células T<sub>REG</sub> expressa CD8+ e consegue manter a homeostase da mucosa intestinal ao inibir a proliferação de linfócitos T CD4+ pro-inflamatórios através de contacto direto e interação com a classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC), sem serem necessárias a IL-10 ou o TGF-β para exercerem o seu efeito (11,12).

O papel do TGF-β em promover a expansão das T<sub>REG</sub> é bem conhecido. Em algumas espécies de parasitas, como é o caso de *Heligmosomoides polygyrus*, são segregados homólogos do TGF-β que conseguem estimular a expressão de *forkhead box protein 3* (Foxp3) em células T naive que conferem propriedades expansoras das T<sub>REG</sub> ou tolerogénicas às DCS.

A indução das T<sub>REG</sub> é necessária para que uma infeção crónica se estabeleça e a sua depleção conduz a uma resposta imune protetora e expulsão do parasita (2).

Os helmintas conseguem, assim, suprimir os linfócitos T<sub>H</sub>1 ao provocarem uma resposta imune T<sub>H</sub>2 bem como por induzirem a diferenciação das células T<sub>REG</sub>, sendo que a indução destas últimas beneficia mais o hospedeiro pois previne a imunopatologia mediada por T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 bem como a mediada por T<sub>H</sub>2 (2).

Foi demonstrado que as células T<sub>REG</sub> Foxp3+ ao serem transferidas para animais nunca antes infetados com parasitas, conseguem controlar o avanço de doenças como a colite (6), e a inflamação alérgica das vias respiratórias (14). As células T<sub>REG</sub> Foxp3+ expressam proteínas de superfície como a CTLA-4 e a CD39 que se relacionam com as funções reguladoras das DCs e também com recetores como o CCR5 e CCR9 que lhes permitem migrar rapidamente para os locais de inflamação.

No estudo com o modelo de inflamação alérgica das vias aéreas com o parasita nemátoda *Trichinella spiralis* demonstrou-se que as T<sub>REG</sub> Foxp3+ tanto funcionam na prevenção como no tratamento (14).

#### **I.4. Ativação de macrófagos pela via alternativa**

Outra das funções imunomodulatórias dos helmintas é o impacto na ativação da via alternativa dos macrófagos, que pode ter um efeito anti-inflamatório e imunossupressor (12).

Os macrófagos são células bastante versáteis capazes de iniciar e modular tanto a resposta imune inata como a adaptativa, pois têm um papel central na ativação das células T helper CD4+ através da captação, processamento e apresentação de peptídeos antigénicos nas moléculas MHC classe II, e na produção de citocinas.

Os macrófagos ativados pela via alternativa (AAM) inibem a inflamação via produção de arginase I (15,16). A arginase-I esgota a L-arginina no microambiente dos tecidos o que inibe a função das células T, principalmente das T efectoras que têm turnover metabólico elevado. Estudos demonstraram que células T estimuladas na ausência de L-arginina perdem a expressão da cadeia CD3 $\zeta$ , necessária para a sinalização via recetores das células T (TCR), resultando na supressão da proliferação de células T e da produção de citocinas.

A IL-10 e o TGF- $\beta$  produzidos por AAM inibem a libertação de citocinas pro-inflamatórias induzidas pelo LPS, induzem T<sub>REG</sub> e inibem respostas T<sub>H1</sub> (6).

As citocinas T<sub>H2</sub> (IL-4 e IL-5) e a IL-10 produzidas na presença de helmintas ativam os macrófagos de maneira distinta dos expostos a citocinas T<sub>H1</sub>.

Os macrófagos ativados pela via alternativa expressam o recetor de manose e IL-4Ra nas suas membranas exteriores e sintetizam algumas moléculas únicas como a Arginase-I, RELMa, YmII e algumas chitinases. Produzem pequenas quantidades de IL-12, mas segregam IL-10, TGF- $\beta$  e outros fatores imunomoduladores conhecidos por limitarem a inflamação tipo T<sub>H1</sub> (6).

#### **I.5. Modulação da expressão dos recetores Toll-like**

Os recetores Toll-like têm um papel crucial na regulação da inflamação e reconhecimento de patogénios. Atualmente conhecem-se 13 TLRs dos mamíferos e todos eles são recetores transmembranares presentes na membrana celular exterior ou na membrana de organelos intracelulares (12).

A sobre expressão de TLR2 e TLR4 nas células epiteliais intestinais (IECs) está associada com a doença inflamatória de Bowel (17) e os TLR7 e TLR9 lisossomais desempenham um papel na produção de auto-anticorpos e no desenvolvimento de auto-imunidade (15).

O despoletar de Células Dendríticas através dos TLRs promove uma resposta pro-inflamatória T<sub>H1</sub> tal como acontece na fase aguda de uma infeção helmíntica. Por outro lado, os linfócitos B circulantes, que durante uma infeção helmíntica expressam TLR2 e TLR4,

promovem e auxiliam uma resposta imune do tipo  $T_H2$  e sintetizam IgE que ataca diretamente o parasita e aciona a desgranulação de basófilos e mastócitos (18).

### **1.6. Citocinas imunossupressoras e moléculas co-inibitórias**

A infecção por helmintas está correlacionada com a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  pelas células do sangue periférico. Estudos nos quais se neutralizaram estas citocinas resultaram em produção aumentada de IL-4 e IFN $\gamma$  o que sugere que os parasitas induzem estas citocinas anti-inflamatórias como forma de evasão da resposta imune.

Os helmintas também atacam moléculas co-inibitórias expressas nas células T e nas células apresentadoras de antígenos por forma a manter a hiporeatividade, algumas dessas moléculas são o CTLA-4 e o PD-1 (12).

### **1.7. Produção de Cistatinas**

A via endossomal/lisossomal tem um papel central em determinar a função das células imunes inatas, e por isso tem sido explorada para desenvolver fármacos anti-inflamatórios com vista ao tratamento de doenças pro-inflamatórias e autoimunes. Uma vez que as moléculas de defesa dos helmintas (HDMs) têm potencial para interagir com esta via, têm sido extensamente estudadas (15).

Os lisossomas são organelos com muitas funções para além da degradação de materiais endocitados, participando em diferentes processos celulares como a secreção, a reparação de membranas celulares, a sensibilização de nutrientes e sinalização celular. Para desempenhar as suas atividades é necessário que exista um pH ácido no interior do lisossoma, ótimo para o funcionamento das suas hidrolases. Entre estas, as mais bem caracterizadas são as catepsinas, proteases de cisteína, e a sua inibição suprime completamente o processamento e apresentação de antígenos *in vivo*.

Também os mecanismos envolvendo TLRs nas proximidades do compartimento endolisossomal (TLR3, TLR7 e TLR9) são afetados pela falta de acidificação, não conseguindo induzir respostas pro-inflamatórias contra vírus ou bactérias.

Os lisossomas conseguem então processar antígenos endocitados e modular a sinalização via TLRs (15).

As cistatinas são uma superfamília de proteínas que inibem as proteínases de cisteína e têm como substratos a asparaginil endopeptidase e as catepsinas L, S e B, entre outros.

Os helmintas produzem cistatinas por forma a controlar as suas proteínases, necessárias para a alimentação e invasão dos tecidos, e também para se protegerem das enzimas

proteolíticas dos hospedeiros (19). Estas moléculas têm um efeito duplo pois também são capazes de participar na imunomodulação ao interferirem na apresentação dos antígenos às células T<sub>HELPER</sub> uma vez que inibem as catepsinas dos lisossomas nas células dendríticas e/ou nos macrófagos.

As cistatinas produzidas pelos helmintas têm ainda um efeito complexo nas células T CD4+, que inclui a modulação da síntese de citocinas em monócitos, especialmente a estimulação da produção de IL-10. Este processo envolve a inibição da expressão de algumas moléculas co-estimulatórias (CD40 e CD80) e MHC classe II (HLA-DR) (12).

## 2. Melhoria da função barreira da mucosa

Uma das respostas do organismo do hospedeiro quando a infecção por um parasita helminta é a alteração da mucosa intestinal, nomeadamente através da produção aumentada de muco na tentativa de expulsar o invasor e reparar a mucosa.

Num estudo com o nemátoda *Trichuris muris*, comprovou-se que a espessura do glicocálix aumenta durante a infecção, devido a um aumento dos níveis das mucinas Muc4 e Muc13 durante a infecção aguda e da Muc17 durante a infecção crónica, sendo no entanto esse aumento muito menos proeminente numa infecção crónica do que aguda (20).

No entanto, a mucina mais frequentemente presente na maioria das infecções por helmintas é a Muc5ac, parte da resposta imune mediada pela IL-13, um potente mecanismo de proteção durante a expulsão do intestino destes parasitas.

Também diferentes fatores de transcrição são expressos de forma distinta quer se trate de uma infecção aguda ou crónica. No primeiro caso estão sobre expressos o *Math-1*, responsável pela diferenciação das células estaminais em secretoras e o *Spdef* que regula a transformação final destas em células *Goblet*. Por outro lado, nas infecções crónicas tal não se verifica, sendo que as células seguem o rumo de diferenciação em enterócitos, uma vez que há um aumento do fator *Hes-1*.

O mesmo estudo demonstra que na porção do intestino onde o parasita se instala, os níveis elevados de IL-13 conduzem a uma expressão aumentada dos recetores GABA- $\alpha$ 3 que modulam a secreção de glicoproteínas para o muco. Propõe, ainda, que este recetor possa vir a ser um novo alvo terapêutico que se possa manipular para induzir a secreção de glicoproteínas durante as infecções crónicas por forma a aumentar a espessura do muco e potencialmente diminuir a inflamação (9,21).

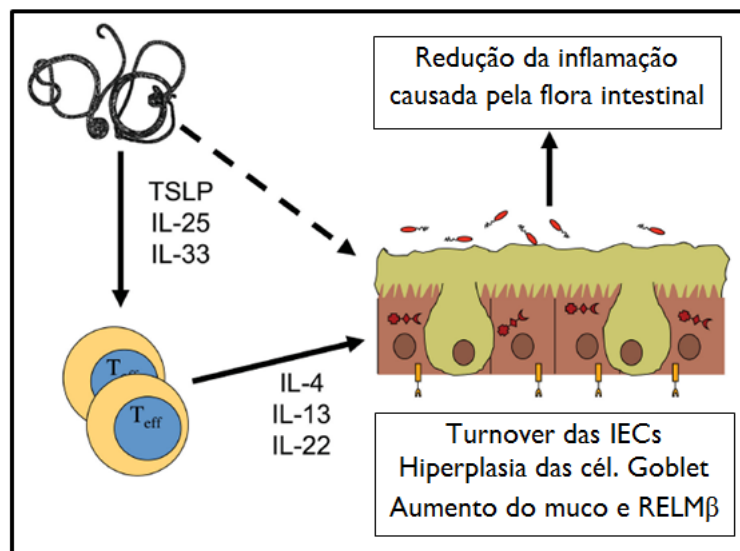
A IL-22, uma citocina importante na defesa contra infecções bacterianas no trato intestinal, desempenha um papel importante na imunidade anti-helmíntica, atuando diretamente nas células *Goblet* e estimulando a secreção de mucinas (10).

O parasita *T. muris* segrega proteases capazes de degradar a Muc2, a mucina mais abundante no intestino em condições normais, mas não eficazes sobre a Muc5ac, que existe em abundância no intestino quando a infecção por este parasita.

É também evidente que as células *Goblet* segregam outros fatores associados com a resistência a estes helmintas como a *Resistin-Like Molecule* (RELM $\beta$ ) e a indolamina, que aumentam o turnover epitelial contribuindo para a expulsão dos parasitas.



As citocinas  $T_H2$  e a IL-22 provocam grandes alterações nas funções das células epiteliais do cólon, desde conduzirem à diferenciação em células *Goblet* e de *Paneth* produtoras de muco e peptídeos antimicrobianos como REG3 $\beta/\gamma$ , que podem estar associados com mudanças na flora intestinal, até à ativação de circuitos anti-apoptóticos. Além disso, as células acessórias recrutadas e ativadas por citocinas do tipo 2, principalmente os macrófagos, conseguem promover a cicatrização da mucosa, e a IL-13 e IL-22 aumentam também o turnover dos IECs que tem o efeito duplo de expulsão dos parasitas e cicatrização da mucosa.



**Figura 2:** Modelo mecanístico da melhoria da função barreira da mucosa pelos helmintas (adaptado de (22)).

Assim sendo, a resposta imune que se desencadeia para expulsar os parasitas gastrointestinais, que inclui a produção aumentada de muco, modificações na sua composição e turnover aumentado das células epiteliais (Figura 2), tem um efeito benéfico de repor a função barreira da mucosa intestinal que pode reduzir a inflamação causada pela flora intestinal associada a doenças como é o caso da Colite Ulcerosa e Doença de *Crohn* (22).

Mas as alterações na barreira de muco têm influência sobre a microflora intestinal, alterando as populações de bactérias e o seu acesso ao epitélio intestinal. O microbioma aqui presente tem um papel muito importante na imunidade do intestino e na saúde do organismo em geral, sendo que algumas bactérias desempenham um papel chave na estimulação e modulação de processos imunológicos. Estudos demonstram que os helmintas alteram a flora intestinal do íleon, jejuno e cólon, mesmo quando o parasita se instala somente no duodeno. As alterações principais são uma maior abundância de *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae* (20).

## Parasitas como Terapêutica

Os países desenvolvidos têm vindo a sofrer um aumento de distúrbios imunológicos tais como alergias e doenças autoimunes, representando patologias crescentes logo atrás das doenças cardiovasculares, cancro e distúrbios metabólicos (13).

Uma vez que a etiologia das doenças autoimunes é multifatorial, não existe uma terapêutica específica, eficaz e segura, sendo que os tratamentos atuais são sintomáticos em vez de curativos, e a sua eficácia depende de uma imunossupressão global. Por exemplo, as terapias atuais para a artrite reumatóide (RA) são anticorpos (infliximab, etanercept ou adalimumab) contra o fator de necrose tumoral (TNF), produzido por macrófagos, sendo que seria preferível bloquear a sua síntese modulando a atividade destas células (15).

Com base na Teoria da Higiene, imensa investigação tem sido desenvolvida para estudar o efeito dos helmintas no nosso sistema imune e como aproveitá-los a nosso favor de forma a usá-los como terapêutica e/ou prevenção das doenças inflamatórias.

Vários ensaios clínicos envolvendo tratamentos com helmintas vivos ou com os seus ovos já foram iniciados e alguns já terminaram. Os estudos mais avançados até hoje foram conduzidos em doentes com doença inflamatória de *Bowel* (IBD) usando ovos de *Trichuris suis*, um parasita exclusivo do porco, que não se reproduz no homem e causa uma colonização auto-limitada *in vivo*, mantendo-se confinado no trato gastrointestinal. Por este motivo, os ovos são administrados por via oral a cada 2 semanas (2).

Os ovos podem ser obtidos sob condições livres de patógenos, armazenados até dois anos e se houver colonização prolongada inesperada esta pode ser eficazmente eliminada com recurso a agentes anti-helmínticos orais (22).

Os ovos de *T. suis* são um tratamento probiótico já demonstrado seguro e eficaz na IBD, e estudos apontam que estas infeções helmintas podem também ter um efeito imunomodulador na Esclerose Múltipla (23).

A infeção com *Necator americanus* também já foi estudada na terapia de IBD no Homem. Este parasita é administrado através da pele e pode viver até cinco anos no hospedeiro humano e por isso não é necessário repetir a dose (22). Foi demonstrada a sua eficácia, mas contrariamente ao que acontece com a administração de ovos de *T. suis*, alguns efeitos secundários foram observados, entre os quais dor intestinal transitória, diarreia, flatulência, tosse, dispneia, eosinofilia sistémica, anemia por défice de ferro e erupção cutânea maculopapular pruriginosa. Uma vez que o Homem é o hospedeiro natural deste parasita, a

janela terapêutica é bastante estreita entre conseguir a modulação eficaz do sistema imune e efeitos adversos inaceitáveis. A dose eficaz ronda as 10 larvas, um número extremamente pequeno quando comparado com os 2500 ovos de *T. suis* administrados (22). O nemátoda *N. americanus* também já foi demonstrado benéfico na Doença Celíaca (2).

Alguns estudos desenvolvidos demonstram eficácia na redução da esclerose múltipla (MS) com *T. trichiura*, *Hymenolepis nana* e *Ascaris lumbricoides* (2).

Embora ainda só se tenha realizado ensaios clínicos para as doenças acima referidas, inúmeros ensaios em modelos animais indicam que infeções por *H. polygyrus* e *T. spiralis* são promissores no tratamento de diabetes mellitus tipo I (T1D) enquanto que por *N. brasiliensis*, *S. mansoni* e *S. japonicum* demonstram eficácia na RA (2).

Apesar dos resultados positivos, o uso de parasitas helmintas para tratar doenças autoimunes não é o ideal, uma vez que a adesão à terapêutica é normalmente baixa e a infeção causa efeitos indesejáveis devido ao parasita estar a alimentar-se e a migrar no corpo do hospedeiro.

Os estados larvais têm de ser produzidos em mamíferos o que não permite a produção em escala, e além disso, há risco de contaminação cruzada, isto porque por exemplo as larvas de “hookworm” são isoladas das fezes de indivíduos infetados. A alternativa, *T. suis*, é um parasita exclusivo do porco não conseguindo infetar o Homem, mas é necessária uma dose oral de vários milhares de ovos de 2 em 2 semanas, e a dose ideal não consegue ser calculada porque muitos dos ovos não se desenvolvem.

Assim, à semelhança de outras terapêuticas imunossupressoras, o tratamento com parasitas vivos é pouco específico e a imunidade normal é comprometida (15).

## Produtos dos helmintas como medicamentos anti-inflamatórios

Os parasitas segregam produtos de excreção-secreção (ES), normalmente glicosilados, que se encontram na corrente sanguínea dos hospedeiros e são capazes de induzir respostas imunes funcionais particulares, como a produção de citocinas  $T_H2$  (IL-4 e IL-5) e a expansão de células reguladoras  $T_{REG}$ ,  $B_{REG}$  e AAM que aumentam a secreção de IL-10 podendo por isso substituir o parasita vivo (24).

Contudo, ainda não se conhece nenhuma molécula ES que seja comum à maioria dos helmintas e das conhecidas nenhuma tem poder regulador sobre o sistema imune tão eficaz como o parasita inteiro (6).

Apresentam-se na Tabela I alguns exemplos de produtos derivados dos helmintas que promovem respostas  $T_H2$ .

O ES-62, segregado pelo *Acanthocheilonema viteae*, é um dos produtos ES de helmintas mais bem conhecidos e é um homólogo dos ES produzidos por parasitas do homem. Trata-se de uma glicoproteína tetramérica que já foi clonada, sequenciada e sujeita a análise biofísica e bioquímica, o que permitiu identificar 4 potenciais locais de N-glicosilação. Modificações translacionais adicionam um grupo fosforilcolina (PC) e é este que confere atividade imunomodulatória ao ES-62.

A infecção em ratos por ES-62 purificado é suficiente para mimetizar os efeitos gerais de uma infecção helmíntica, particularmente uma forte resposta humoral  $T_H2$  com IgG1, e afeta os recetores TLR4, TLR2 e TLR9 (24).

Alguns estudos em modelos animais de artrite reumatóide mostram que o ES-62 pode ser eficaz a suprimir o desenvolvimento da doença e reduzir a inflamação das articulações e a erosão das cartilagens, resultado da atenuação da resposta  $T_H1$  e diminuição da produção de IL-17.

A IL-17 parece ser um regulador bastante importante das respostas pro-inflamatórias nas doenças alérgicas e autoimunes, o que despertou o interesse da indústria farmacêutica, sendo que diversas terapêuticas que têm como alvo esta citocina encontram-se já em estudos de fase II e III, como o ixekizumab, brodalumab e secukinumab. No entanto, a IL-17 é uma citocina importante na defesa contra bactérias e fungos nas mucosas, pelo que bloqueá-la pode conduzir a taxas elevadas de infecção, daí que a capacidade do ES-62 para modular a resposta IL-17 sem imunocomprometer o hospedeiro se traduz numa alternativa vantajosa.

**Tabela I** – Efeito dos produtos excretórios-secretórios (ES) de helmintas na resposta imune (adaptado de (2, 6, 15, 24, 25)).

<b>Produto</b>	<b>Parasita</b>	<b>Efeito</b>
<b>Omega-I</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Liga-se ao recetor de manose através dos seus glicanos, conseguindo induzir as DCs para uma resposta $T_H2$ <i>in vivo</i> mesmo na ausência de IL-4.
<b>IPSE/<math>\alpha</math>-I</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Induz a produção de IL-4 dependente de IgE pelos basófilos.
<b>LNFP III</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	Liga-se ao TLR4, recetor de manose e <i>dendritic-cell-specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> induzindo respostas $T_H2$ , produção de IL-10 e expansão das células $T_{REG}$ Foxp3+.
<b>ES-62</b>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	Consegue induzir as DCS para respostas $T_H2$ .
<b>2-Cys peroxiredoxina</b>	<i>Fasciola hepatica</i>	Expande as células $T_H2$ ao promover ativação da via alternativa dos macrófagos com produção de IL-4.
<b>FhHDM-I</b>	<i>Fasciola hepatica</i>	Tem uma estrutura semelhante aos peptídeos catelicidina dos mamíferos (peptídeos antimicrobianos, AMPs) e interage seletivamente com os macrófagos, sem afetar células B ou T, inibindo a atividade das v-ATPases e suprimindo a acidificação das vesículas lisossomais.
<b>Calreticulina</b>	<i>H. polygyrus bakeri</i> e <i>Necator americanus</i>	Liga-se ao recetor scavenger do tipo A das DCs provocando uma resposta $T_H2$ .

O ES-62 consegue bloquear a produção de IL-17 pelas células T, impedindo a autoimunidade e alergias, mas não é capaz de impedir a produção pelas células NK, uma vez que não expressam TLR4, ficando estas disponíveis para defender o hospedeiro (24).

A glicoproteína ES-62 também foi eficaz em modelos de Asma ao suprimir o fenótipo  $T_H2$  e as respostas  $T_H17$ , reduzir a eosinofilia e os níveis de IL-4 e diminuir a infiltração de

células nos pulmões, principalmente de neutrófilos, associados a elevada severidade da doença (26).

No entanto, tratamentos prolongados com esta molécula ES-62, uma proteína estranha ao corpo, podem causar imuno-patogenicidade. Deste modo, o mesmo grupo de investigação liderado por RZEPECKA (27) fez o *screening* de uma biblioteca de 65 pequenas moléculas análogas de ES-62 (SMAs), contendo o mesmo grupo fosforilcolina. Dois desses análogos, ES-62-SMA I 1a e ES-62-SMA I 2b, foram investigados em várias linhas celulares e modelos animais de doença asmática e mostraram-se capazes de mimetizar os efeitos do produto helminta. Conseguiram inibir a desgranulação de mastócitos, a infiltração de eosinófilos e neutrófilos nos pulmões e a inflamação associada a respostas  $T_H2$ . O ES-62-SMA I 1a foi também demonstrado eficaz na prevenção da Artrite induzida por colagénio.

Assim, estes derivados do ES-62 representam um ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos para as alergias e doenças autoimunes, na procura de terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos nefastos do que as atuais (27,28).

## Segurança e perspectivas futuras

O uso de parasitas helmintas e os seus derivados na terapêutica de doenças inflamatórias e autoimunes apresenta resultados promissores. No entanto, existem inúmeras barreiras a serem ultrapassadas para que consigam chegar ao mercado. Desde logo levantam-se problemas éticos com a administração de parasitas vivos ao Homem. Outro impedimento é a dificuldade de produzi-los em grande escala e a preço adequado, bem como a incompatibilidade com as Boas Práticas de Fabrico (2). Além de tudo isto infindas preocupações com a segurança destes tratamentos ainda inquietam os investigadores.

Tratamentos com *T. suis* não têm potencial patogénico conhecido nem têm revelado efeitos secundários, há no entanto receio de que possa migrar para outros órgãos em doentes imunodeprimidos.

Nos estudos com *N. americanus* observou-se diarreia e dor abdominal durante a infeção aguda e anemia ferropénica em infeções de longa duração (11).

As respostas imunes protetoras induzidas pelos helmintas podem facilitar a disseminação dos agentes patogénicos na corrente sanguínea e causar septicémia, que se pode traduzir inicialmente no Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SIRS) com lesões nos tecidos, falha de órgãos e eventualmente a morte. Por tudo isto, muitos afirmam que se deve tentar prevenir a inflamação exacerbada sem danificar o sistema imune do hospedeiro (16).

Também as alterações provocadas por estes parasitas na mucosa intestinal e no microbioma do intestino podem ser prejudiciais ao aumentar a exposição a bactérias entéricas e causar maior inflamação, bem como aumentando as infeções bacterianas, fúngicas e virais ao facilitar a entrada destes agentes externos (20).

Vários estudos já demonstraram que as infeções por helmintas podem também suprimir a imunidade gerada pela vacinação e existe já alguma informação que estabelece uma ligação entre estas infeções e a inibição de respostas imunes contra tumores e promoção de desenvolvimento de cancro (2).

Há no entanto divergência de opiniões entre os investigadores e alguns defendem que a terapia helmíntica é benéfica quando comparada com os riscos das terapias atuais que incluem corticosteroides, moduladores imunes e agentes anti-citocinas (11).

Como tentativa de contornar alguns dos problemas associados ao uso dos parasitas vivos e tornar a resposta imune mais específica, foram-se identificando produtos derivados

dos helmintas, entre os quais o mais bem estudado é o ES-62, que no entanto também tem limitações porque a exposição repetida a uma proteína estranha pode induzir respostas anafiláticas.

Assim sendo, os produtos de excreção-secreção destes parasitas serão mais apropriados como modelos para o *design* de novos fármacos que apresentem estrutura química semelhante, como é o caso do grupo PC presente no ES-62 e que para o qual já existem bibliotecas de compostos sob *screening* (24).

Espera-se que os resultados com estas moléculas sejam promissores, podendo representar uma solução para tantas doenças inflamatórias para as quais não há terapêuticas eficazes.



## Conclusão

Com a evolução da sociedade, a melhoria da qualidade de vida e condições de higiene, foram surgindo novas doenças do foro alérgico, inflamatório e autoimune que se tornaram uma preocupação no mundo moderno. Dados epidemiológicos conduziram à formulação da Teoria da Higiene, que relaciona o aparecimento destas doenças com a diminuição do contacto com parasitas helmintas, que durante toda a nossa história infetaram o Homem influenciando o desenvolvimento do seu sistema imune.

Diversos estudos foram desenvolvidos para comprovar esta teoria e perceber os mecanismos pelos quais estes parasitas atuam por forma a modular o nosso sistema imune. De fato as diferentes espécies de helmintas existentes atuam por mecanismos distintos e uma única espécie pode controlar o sistema imune através de vários tipos de citocinas e circuitos reguladores diferentes.

A indução de linfócitos  $T_H2$  e produção de citocinas anti-inflamatórias é um dos mecanismos pelo qual atuam, contrariando as respostas  $T_H1$  exacerbadas em doenças como a Colite Ulcerosa e a Doença de *Crohn*. Também conseguem modular as células dendríticas para respostas  $T_H2$ , inibindo a sua resposta a PAMPs clássicos indutores  $T_H1$  bem como a sua activação via TLRs, e induzem a expansão de células imunossupressoras  $T_{REG}$ , que condicionam a diferenciação de células T efectoras ( $T_H1$ ,  $T_H2$  e  $T_H17$ ), produzem IL-10 e TGF- $\beta$  que inibem as células apresentadoras de antígenos e são responsáveis por um ambiente de tolerância imunológica no intestino.

Outro mecanismo é a ativação da via alternativa dos macrófagos produtores de arginase-1, que inibe a proliferação de células T e a produção de citocinas, e de IL-10 e TGF- $\beta$ , que inibem a libertação de citocinas pro-inflamatórias, induzem  $T_{REG}$  e inibem respostas  $T_H1$ .

Estes parasitas conseguem também modular a expressão dos TLRs que quando aumentada está associada a algumas doenças autoimunes, e produzem pequenas moléculas, entre as quais as cistatinas, capazes de interromper o processamento e apresentação de antígenos pelos macrófagos e células dendríticas, ao interferirem com o funcionamento do lisossoma.

Para além da modulação imunológica, os helmintas também exercem efeitos na barreira da mucosa intestinal aumentando o turnover epitelial, a diferenciação das células *Goblet* e a produção de muco, diminuindo a inflamação causada pela flora intestinal.

A capacidade dos helmintas e dos seus produtos de excreção para interagir com as células do sistema imune e modular as suas funções torna-os alvo de investigação para encontrar moléculas com aplicação na profilaxia e tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes.

Inúmeros ensaios em modelos animais apontam para a eficácia do uso destes parasitas no tratamento de T1D, RA e MS, e ensaios clínicos com ovos de *Trichuris suis* e larvas de *Necator americanus* demonstraram resultados promissores na IBD. No entanto, problemas éticos, preocupações com a segurança e dificuldades de produção são algumas barreiras que impedem que estes tratamentos cheguem ao mercado e levam os investigadores a tentar identificar produtos derivados dos helmintas que contornem estes problemas.

Ainda não se conhece nenhuma molécula ES comum a todos os helmintas e das conhecidas nenhuma tem poder regulador sobre o sistema imune tão eficaz como o parasita inteiro, mas tornam a resposta imune mais específica e segura.

O produto derivado destes parasitas mais bem estudado é o ES-62, segregado pelo *Acanthocheilonema viteae*, uma glicoproteína tetramérica com grupos fosforilcolina que lhe conferem atividade imunomodulatória demonstrada em modelos de artrite reumatóide, pela atenuação da resposta  $T_H1$  e diminuição da produção de IL-17, bem como em modelos de asma, ao suprimir as respostas  $T_H2$  e  $T_H17$ , reduzir a eosinofilia e os níveis de IL-4 e diminuir a infiltração de neutrófilos nos pulmões.

No entanto, tratamentos prolongados com esta molécula ES-62, uma proteína estranha ao corpo, podem causar imuno-patogenicidade, daí que estes produtos de excreção-secreção serão mais apropriados como modelos para o *design* de novos fármacos que apresentem estrutura química semelhante, sendo que alguns já foram identificados. ES-62-SMA 11a e ES-62-SMA 12b, pequenas moléculas análogas do ES-62 possuidoras do grupo fosforilcolina, já investigadas em várias linhas celulares e modelos animais mostraram-se capazes de mimetizar os efeitos do produto helminta.

Encontrou-se assim um ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos para as alergias e doenças autoimunes, na procura de terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos nefastos do que as atuais.

## Bibliografia

- (1) CASTRO, G. A. - **Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development.** In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>
- (2) FINLAY, C. M., WALSH, K.P., MILLS, K. H. G. - **Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases.** Immunol Rev. 259, 1 (2014) 206-30.
- (3) TAGHIPOUR, N., AGHDAEI, H. A., HAGHIGHI, A., MOSSAFA, N., TABAEI, S. J., ROSTAMI-NEJAD, M. - **Potential treatment of inflammatory Bowel disease: a review of helminths therapy.** Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 7, 1 (2014) 9-16.
- (4) MOLODECKY, N. A., SOON, I. S., RABI, D. M., GHALI, D. A., FERRIS, M., CHERNOFF, G., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., S. G., BARKEMA, H. W., KAPLAN, G. G. - **Increasing incidence and prevalence of the inflammatory Bowel diseases with time, based on systematic review.** Gastroenterology. 142 (2012) 46-54.
- (5) MAIZELS, R. M., MCSORLEY, H. J., SMYTH, D. J. - **Helminths in the hygiene hypothesis: Sooner or later?** Clinical and Experimental Immunology. 177 (2014) 38-46.
- (6) ELLIOTT, D. E., WEINSTOCK, J. V. - **Helminth-host immunological interactions: Prevention and control of immune-mediated diseases.** Annals of the New York Academy of Sciences. 1247 (2012) 83-96.
- (7) FINKELMAN, F. D. - **Worming their way into the pharmacy: Use of worms and worm products to treat inflammatory diseases.** Arthritis and Rheumatism. 64, 10 (2012) 3068-3071.
- (8) INCE, M. N., ELLIOTT, D. E., SETIAWAN, T., METWALI, A., BLUM, A., CHENI, H., URBAN, J. F., FLAVELL, R. A., WEINSTOCK, J. V. - **Role of T cell TGF- $\beta$  signaling in**

**intestinal cytokine responses and helminthic immune modulation.** European Journal of Immunology. 39:7 (2009) 1870-1878.

(9) HASNAIN, S. Z., EVANS, C. M., ROY, M., GALLAGHER, A. L., KINDRACHUK, K. N., BARRON, L., DICKEY, B. F., WILSON, M. S., WYNN, T. A., GRENCIS, R. K., THORNTON, D. J. - **Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes.** The Journal of experimental medicine. 208, 5 (2011) 893-900.

(10) TURNER, J. E.; STOCKINGER, B.; HELMBY, H. - **IL-22 Mediates Goblet Cell Hyperplasia and Worm Expulsion in Intestinal Helminth Infection.** PLoS Pathogens. 9, 10 (2013) 1-7.

(11) WEINSTOCK, J. V., ELLIOT, D. E. - **Translatibility of helminth therapy in inflammatory Bowel disease.** International journal for parasitology. 43, 0 (2014) 245-251.

(12) SZKUDLAPSKI, D., LABUZEK, K., POKORA, Z., SMYLA, N., GONCIARZ, M., MULARCZYK, A., MALUCH, P., OKOPIEN, B. - **The emerging role of helminths in treatment of the inflammatory Bowel disorders.** The Journal of Physiology and Pharmacology. 65, 6 (2014) 741-751.

(13) SMITS, H. H., EVERTS, B., HARTGERS, F. C. - **Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes.** Current Allergy and Asthma Reports. 10 (2010) 3-12.

(14) KANG, S. A., PARK, M. K., CHO, M. K., PARK, S. K., JANG, M. S., YANG, B. G., JANG, M. H. KIM, D. H., YU, H. S. - **Parasitic Nematode-Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T Cells Can Ameliorate Allergic Airway Inflammation.** PLoS Neglected Tropical Diseases. 8, 12 (2014) e3410.

(15) ALVARADO, R., O'BRIEN, B., TANAKA, A., DALTON, J. P., DONNELLY, S. - **A parasitic helminth-derived peptide that targets the macrophage lysosome is a novel therapeutic option for autoimmune disease.** Immunobiology. 220, 2 (2015) 262-269.

- (16) GONDORF, F., BERBUDI, A., BUERFENT, B. C., AJENDRA, J., BLOEMKER, D., SPECHT, S., SCHMIDT, D., NEUMANN, A. L., LAYLAND, L. E., HOERAUF, A., HÜBNER, M. P. - **Chronic Filarial Infection Provides Protection against Bacterial Sepsis by Functionally Reprogramming Macrophages.** *PLOS Pathogens*. 11, 1 (2015) e1004616.
- (17) KIVIT, S., TOBIN, M. C., FORSYTH, C. B., KESHAVARZIAN, A., LANDAY, A. L. - **Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: Implications for pro- and prebiotics.** *Frontiers in Immunology*. 5 (2014) 1-7.
- (18) LUDWIG-PORTUGALL, I., LAYLAND, L. E. - **TLRs, Treg, and B cells, an interplay of regulation during helminth infection.** *Frontiers in Immunology*. 3 (2012) 1-7.
- (19) DZIK, J. M. - **Molecules released by helminth parasites involved in host colonization.** *Acta Biochimica Polonica*. 53 (2006) 33-64.
- (20) GRENCIS, R. K., HUMPHREYS, N. E., BANCROFT, A. J. - **Immunity to gastrointestinal nematodes: Mechanisms and myths.** *Immunological Reviews*. 260 (2014) 183-205.
- (21) HASNAIN, S. Z., THORNTON, D. J., GRENCIS, R. K. - **Changes in the mucosal barrier during acute and chronic *Trichuris muris* infection.** *Parasite Immunology*. 33 (2011) 45-55.
- (22) WOLFF M. J., BROADHURST M. J., LOKE P. - **Helminthic therapy: improving mucosal barrier function.** *Trends in parasitology*. 28, 5 (2012) 187-194.
- (23) ROSCHE, B., WERNECKE, K. D., OHLRAUN, S., DÖRR, J. M., PAUL, F. - ***Trichuris suis* ova in relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome (TRIOMS): study protocol for a randomized controlled trial.** *Trials*. 14, 112 (2013).
- (24) PINEDA, M. A., AL-RIYAMI, L., HARNETT, W., HARNETT, M. M. - **Lessons from helminth infections: ES-62 highlights new interventional approaches in rheumatoid arthritis.** *Clinical and Experimental Immunology*. 177 (2014) 13-23.

(25) MCSORLEY, H. J., HEWITSON, J. P., MAIZELS, R. M. - **Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators.** *International Journal for Parasitology.* 43, 3-4 (2013) 301-310.

(26) RZEPECKA, J., Siebeke, I., Coltherd, J. C., Kean, D. E., Steiger, C. N., Al-Riyami, L., McSharry, C., Harnett, M. M., Harnett, W. - **The helminth product, ES-62, protects against airway inflammation by resetting the Th cell phenotype.** *International Journal for Parasitology.* 43, 3-4 (2013) 211-223.

(27) RZEPECKA, J., COATES, M. L., SAGGAR, M., AL-RIYAMI, L., COLTHERD, J., TAY, H. K., HUGGAN, J. K., JANICOVA, L., KHALAF, A. I., SIEBEKE, I., SUCKLING, C. J., HARNETT, M. M., HARNETT, W. - **Small molecule analogues of the immunomodulatory parasitic helminth product ES-62 have anti-allergy properties.** *International Journal for Parasitology.* 44, 9 (2014) 669-674.

(28) AL-RIYAMI, L., PINEDA, M. A., RZEPECKA, J., HUGGAN, J. K., KHALAF, A. I., SUCKLING, C. J., SCOTT, F. J., RODGERS, D. T., HARNETT, HARNETT, M. M., W. - **Designing anti-inflammatory drugs from parasitic worms: a synthetic small molecule analogue of the *Acanthocheilonema viteae* product ES-62 prevents development of collagen-induced arthritis.** *Journal of medicinal chemistry.* 56, 24 (2013) 9982-10002.