



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

MEDICINA

BIANCA ALMEIDA RIOS

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS APÓS
TERAPIA HELMÍNTICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**Salvador
2021**

Bianca Almeida Rios

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS APÓS
TERAPIA HELMÍNTICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano do curso de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida

Coorientadora: Prof. Dr. Cristina Salles

**Salvador
2021**

Bianca Almeida Rios

Modulação da resposta imune alérgica em camundongos após terapia helmíntica: uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano do curso de Medicina.

Banca Examinadora

Tarcísio Vila Verde de Almeida – Orientador
Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Componente da banca
Titulação/Instituição

Componente da banca
Titulação/Instituição

RESUMO

Rios, BA. Almeida, TVVS. Salles, C. **Modulação da resposta imune alérgica em camundongos após terapia helmíntica: uma revisão sistemática.** Trabalho de conclusão de curso, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Medicina). Salvador, Bahia, 2021.

INTRODUÇÃO: As doenças alérgicas das vias aéreas têm alta prevalência global, mas ainda vêm encontrando desafios na sua resolução terapêutica. Nesse cenário, terapias de origem helmíntica têm surgido como uma alternativa potencial aos tratamentos convencionais. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia das terapias helmínticas na supressão dos marcadores imunes das doenças alérgicas das vias aéreas em modelos murinos. **MÉTODOS:** Trata-se de uma revisão sistemática de estudos em camundongos, utilizando os descritores *respiratory hypersensitivity*, *mice* e *helminths* nos bancos de dados MEDLINE/PubMed, The Cochrane Library, SciELO, LILACS e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Foram incluídos artigos com camundongos entre 5-8 semanas de idade, com modelo de hiper-responsividade das vias aéreas induzido por ovalbumina e em que a intervenção helmíntica foi posterior à fase de sensibilização. A qualidade dos estudos foi avaliada através da ferramenta *SYRCLE's risk of bias tool for animal studies*. **RESULTADOS:** Dos 689 artigos identificados, três foram incluídos na revisão, totalizando uma amostra de 123-131 camundongos, entre 6-8 semanas de idade, das linhagens BALB/c e C57BL/6. Foram encontradas reduções estatisticamente significantes do número total de células, eosinófilos, neutrófilos, células caliciformes, IL-4, IL-13, IgG1, deposição de colágeno, produção de muco e espessamento de vias aéreas no lavado broncoalveolar e em análise histopatológica de sessões pulmonares, em comparação com os controles. **CONCLUSÃO:** A presente revisão demonstrou que as terapias de origem helmíntica são capazes de suprimir alguns dos marcadores das doenças alérgicas das vias aéreas, mas novos estudos em animais ainda são necessários antes que esses resultados sejam traduzidos para humanos.

Palavras-chave: Hipersensibilidade respiratória. Terapias helmínticas. Camundongos.

ABSTRACT

Rios, BA. Almeida, TVVS. Salles, C. **Modulação da resposta imune alérgica em camundongos após terapia helmíntica: uma revisão sistemática.** Trabalho de conclusão de curso, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Medicina). Salvador, Bahia, 2021.

BACKGROUND: Allergic airway diseases have a high global prevalence, but there're still challenges in their therapeutic approach. In this scenario, therapies of helminthic origin have emerged as a potential alternative to conventional treatments. **OBJECTIVE:** To evaluate the effectiveness of helminthic therapies in suppressing immune markers of allergic airway diseases in murine models. **METHODS:** This is a systematic review of studies in mice using the descriptors “respiratory hypersensitivity”, “mice” and “helminth” in MEDLINE/PubMed, The Cochrane Library, SciELO, LILACS and Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) databases. There were included articles with mice between 5 to 8 weeks old, with an ovalbumin-induced model of airway hyperresponsiveness in which helminthic intervention followed the sensitization phase. The quality of the studies was assessed using *SYRCLE's risk of bias tool for animal studies*. **RESULTS:** Amidst the 689 articles identified, three were included in the review, totaling a sample of 123-131 mice, aged 6-8 weeks, from BALB/c and C57BL/6 strains. Statistically significant reductions were found in the total number of cells, eosinophils, neutrophils, goblet cells, IL-4, IL-13, IgG1, collagen deposition, mucus production and airway thickening in the bronchoalveolar lavage fluid and in histopathological analysis of lungs, compared to the controls. **CONCLUSION:** This review demonstrated that therapies of helminthic origin are capable of suppressing some of the markers of allergic airway diseases, but further studies in animals are still needed before these results are translated into humans.

Key words: Respiratory hypersensitivity. Helminthic therapies. Mice.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	Doenças alérgicas das vias aéreas	7
2.2	Teoria da depleção do bioma	8
2.3	Modulação imune em helmintíases	8
3	OBJETIVO	10
4	MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1	Desenho do estudo	11
4.2	Estratégia de busca	11
4.3	Critérios de inclusão e de exclusão	11
4.4	Identificação e seleção de estudos	11
4.5	Extração de dados	12
5	RESULTADOS	13
5.1	Identificação e seleção dos estudos	13
5.2	Características gerais dos estudos selecionados	13
5.3	Estudos selecionados	13
5.4	Risco de viés dos estudos incluídos	19
6	DISCUSSÃO	21
7	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	APÊNDICE A – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS EXPERIMENTAIS PRESENTES NA REVISÃO SISTEMÁTICA	33
	ANEXO A - SYRCLE'S RISK OF BIAS TOOL FOR ANIMAL STUDIES	34

1 INTRODUÇÃO

A despeito dos avanços que a sociedade tem alcançado na medicina, a incidência e a prevalência de algumas doenças têm aumentado, dentre as quais se destacam as doenças alérgicas das vias aéreas, como a asma e a rinite alérgica¹. Tal aumento, entretanto, tem sido visto com maior evidência em países com padrão de vida elevado¹, levantando hipóteses que associam a ascensão das doenças alérgicas às características do estilo de vida, as quais determinam, entre outras coisas, uma vivência com maior ou menor exposição aos organismos que historicamente parasitam a humanidade^{2,3}.

É sabido que parasitas como os helmintos suscitam um padrão de resposta imune que diverge de outras infecções e que tem sido mais associado a um perfil de permanência do nematódeo no organismo, elicitando, de maneira geral, reações menos severas da imunidade⁴. Concomitantemente, foi observado que populações infectadas por determinadas espécies, especialmente em regiões endêmicas, tendem a desenvolver doenças alérgicas em menor número e com sintomas mais brandos, levando ao estabelecimento de uma associação entre tais infecções e uma redução ou alteração da resposta imune em doenças alérgicas⁵.

Os mecanismos pelos quais essa modulação ocorre ainda estão sendo bem estabelecidos e embora essa associação positiva não seja observada em todas as infecções pelos nematódeos, dadas algumas especificidades de cada organismo, esse dado abriu margem para a abordagem das infecções helmínticas como terapêutica ou forma de prevenção das doenças alérgicas^{4,6}. Nesse cenário, pesquisas em todo o mundo tentam determinar quais moléculas, extratos, partículas ou helmintos propriamente ditos podem ser associados com sucesso a marcadores de redução do surgimento ou de gravidade das doenças alérgicas⁶.

Alguns estudos empregando terapias helmínticas em pacientes com doenças inflamatórias e mesmo alérgicas já foram realizados, retratando em sua maioria respostas inconclusivas^{7,8}. Entretanto, a indefinição sobre os elementos exatos que podem ser aplicados com essa finalidade, bem como o fato de que são originários de organismos causadores de doença, orientam uma abordagem cuidadosa do tema^{6,8}, que ainda se beneficia, nesse estágio, de maiores experimentações em modelos animais^{4,9}. Nesse sentido, uma revisão sistemática sobre ensaios em animais se justifica, na medida em que analisa e impõe a esses trabalhos igual rigor metodológico, além de poder apresentar um sumário dos resultados já encontrados, que sugiram aprimoramentos nesse tipo de pesquisa ou a possibilidade de avanços mais concretos para os estudos em humanos^{10,11}.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças alérgicas das vias aéreas

A World Allergy Organization (WAO) descreve a rinite alérgica como uma inflamação da mucosa nasal mediada pela imunoglobulina (Ig) E, anticorpo que também se constitui como fator de risco para o desenvolvimento da asma, pois a responsividade por ele mediada frente a aeroalérgenos comuns é o fator predisponente mais identificável para o acometimento da doença¹. A IgE é uma marca dos processos alérgicos e medeia a ativação dos mastócitos, que estão majoritariamente presentes em tecidos conjuntivos e sob epitélios, explicando porque são nesses tecidos que ocorrem a maior parte das reações de sensibilidade imediata^{12,13}. Clinicamente, as reações alérgicas podem se manifestar de diversas formas, expressando-se, por exemplo, como congestão nasal e constrição brônquica¹⁴.

A WAO estima que a prevalência global das doenças alérgicas é tão alta quanto 20-30%, variando por país entre 10-40% da população, e destaca como as alergias relacionadas às vias aéreas são queixas comuns no atendimento primário à saúde¹. Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 339 milhões o número de asmáticos ao redor do mundo, quando ocorreram 417.918 mortes pela doença¹⁵. A European Federation of Allergy informa que, aparentemente, ao menos 60% dos pacientes asmáticos também sofrem de rinoconjuntivite, enquanto 20-30% dos pacientes com rinite alérgica também sofrem de asma¹⁶.

Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI), a asma atinge cerca de 20% das crianças e adolescentes no Brasil e ainda mata cerca de 2 mil brasileiros por ano¹⁷, ela ainda estima que existam entre 3 e 6 milhões de idosos asmáticos no país¹⁸. Já a rinite alérgica tem frequência média de 12,5% em crianças, com incidência se elevando e atingindo até 25% da população na adolescência¹⁹.

Muitas medidas são empregadas no tratamento das alergias, dentre as quais se destacam o uso de anti-histamínicos, glicocorticoides, descongestionantes, broncodilatadores, antileucotrienos e da imunoterapia, com linhas de intervenção já bem estabelecidas, mas novas abordagens terapêuticas têm sido continuamente estudadas¹. Considerando a potencial gravidade, há esforços permanentes na detecção das terapêuticas mais eficazes e úteis a cada caso e que reduzam a ocorrência de crises severas e ameaçadoras à vida, como ocorre na asma com inflamação do tipo 2, o fenótipo mais comum, que pode ser refratária ao uso de corticosteroides inalatórios em altas doses²⁰.

2.2 Teoria da depleção do bioma

Nos vertebrados, a relação entre hospedeiros e parasitas existe há milhões de anos e produziu um sistema imune que favorece as relações simbióticas em detrimento dos organismos patogênicos, mas o que se percebe em sociedades mais modernas e industrializadas é uma redução significativa nessa relação de equilíbrio²¹. Programas de tratamento em massa contra helmintíases nas populações vulneráveis se tornou prática regular e incentivada pela OMS, embora já se tenha mostrado que essa abordagem não resulta em melhorias de saúde ou de qualidade de vida para populações não sintomáticas ou que não tenham altas cargas parasitárias²².

Desde que Strachan publicou um artigo, em 1989, apontando a relação entre a redução dos eventos infecciosos e a instauração de doenças alérgicas²³, o tema tem sido muito debatido. O material foi associado ao termo Hipótese da Higiene (*Hygiene Hypothesis*), cunhado previamente a seu estudo, para defender uma ideia segundo a qual a higiene leva os indivíduos a um contato reduzido ou tardio com organismos infecciosos, o que se associaria ao surgimento de quadros imunes variados²⁴. Essa expressão, embora ainda comumente utilizada, atualmente é discutida sob uma nova perspectiva como a Hipótese dos Velhos Amigos (*Old Friends Hypothesis*) ou a Teoria da Depleção do Bioma (*Biome Depletion Theory*)³, que não responsabiliza somente os hábitos e políticas sanitárias pela menor diversidade de espécies, mas também outras questões da vida moderna.

Essas teorias defendem que a exposição a patógenos no início da vida provoca um desenvolvimento benéfico da imunidade e que sua ausência produziria, portanto, um problema imunorregulatório, facilitando a ocorrência de disfunções da imunidade e mesmo de infecções por microrganismos que, no passado da humanidade, eram só raramente associados a doenças²⁵. Há ainda quem vá mais longe e atribua consequências da depleção do microbioma não só aos indivíduos após o nascimento, como também trace uma associação com a exposição obtida ainda na vida intrauterina²⁶.

2.3 Modulação imune em helmintíases

De maneira geral, os helmintos suscitam um padrão de resposta imune que diverge de outros microrganismos, mostrando-se vulneráveis principalmente à ação dos eosinófilos, células capazes de lisar seu tegumento espesso, o que gera no hospedeiro marcada eosinofilia²⁷. Na imunidade adaptativa, provocam majoritariamente uma maturação das células T auxiliaadoras

naive para o padrão Th2, que secreta as interleucinas (IL) 4 e 5, a primeira estimuladora da produção da IgE e a segunda ativadora de eosinófilos²⁸⁻³². Eles são causadores de infecções crônicas e persistentes por sofrerem uma resposta imune inata relativamente fraca e terem desenvolvido técnicas de imunoevasão, reduzindo sua imunogenicidade, variando seus antígenos, desenvolvendo resistência contra os mecanismos imunes ou mesmo inibindo a resposta imune do hospedeiro^{33,34}.

Uma das formas pelas quais os helmintos modulam a imunidade é através de uma ativação dos macrófagos que favoreça os fenótipos associados à via alternativa, de reparo tecidual e com caráter anti-inflamatório, o que a depender do patógeno se expressa como supressão da IL-12 e da IL-23, ou estímulo à IL-10, ou mesmo induzindo a diferenciação de células regulatórias²⁸. Nesse sentido, a indução da IL-10 têm sido um dos elementos mais associados à regulação imune pelos helmintos, sendo alvo de estudos e de abordagens terapêuticas para patologias inflamatórias, ainda que seu uso isolado não tenha demonstrado resultados significativos^{33,35}.

Outra abordagem recorrente é o direcionamento na diferenciação celular para as espécies regulatórias da imunidade, que exercem controle sobre os processos imunes, pondo também em evidência o fator de transformação do crescimento beta (TGF β), que estimula esse padrão de diferenciação, apresentando ação anti-inflamatória^{4,33}.

Novos estudos, especialmente em modelos animais, revelam progressivamente mais elementos associados à modulação imune pelos helmintos que podem ser analisados para emprego terapêutico futuro, como a regulação exercida sobre as células dendríticas e sobre os receptores do tipo Toll⁴. O uso de antígenos helmínticos também tem sido testado, abordando, além dos aspectos já citados, a modulação humoral, com redução do IgE voltado aos antígenos desencadeadores dos processos alérgicos³⁶.

Uma característica relevante dessa modulação imune é a sua capacidade de ter efeitos sistêmicos, estendendo-se além do local onde os helmintos se estabelecem, o que permite intervenções em sítios não colonizáveis a partir dos focos corriqueiros de infecção helmíntica³³. Entretanto, essa capacidade não é sempre observada e ainda são discutidos os potenciais modulatórios de cada espécie de acordo aos seus sítios de passagem e de instalação²¹. Essas observações vêm abrindo espaço para a análise das terapias helmínticas, seja na forma da infecção com organismos pouco patogênicos ou do uso de extratos de determinadas espécies como intervenção terapêutica para as doenças de perfil inflamatório, como são os processos de hiper-responsividade das vias aéreas⁶.

3 OBJETIVO

Avaliar a eficácia das terapias helmínticas na supressão dos marcadores imunes das doenças alérgicas das vias aéreas em modelos murinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O presente estudo se trata de uma revisão sistemática e está registrado na plataforma *International prospective register of systematic reviews* (PROSPERO)³⁷, sob o número: CRD42020197181.

4.2 Estratégia de busca

As buscas nas fontes de dados eletrônicas MEDLINE/PubMed, The Cochrane Library, SciELO, LILACS e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) foram realizadas por meio da combinação de descritores, incluindo termos do *Medical Subject Headings* (MeSH), dos Descritores em Ciências da Saúde (DECs) e contrações de descritores. A revisão sistemática não se restringiu a publicações em inglês, pois também foram incluídos estudos escritos em português e em espanhol. Foi utilizado o protocolo PRISMA³⁸ como guia para a revisão sistemática. As buscas foram realizadas com os descritores *respiratory hypersensitivity*, *mice* e *helminths*, com as seguintes combinações: ("respiratory hypersensitivity"[MeSH Terms] OR ("respiratory"[All Fields] AND "hypersensitivity"[All Fields]) OR "respiratory hypersensitivity"[All Fields]) AND ("mice"[MeSH Terms] OR "mice"[All Fields]) AND ("helminths"[MeSH Terms] OR "helminths"[All Fields]). Referências presentes nos artigos identificados pela estratégia de busca também foram buscadas, manualmente, com o objetivo de se somarem ao trabalho e à revisão da literatura. Especialistas foram contatados, bem como os autores daqueles estudos ainda não publicados.

4.3 Critérios de inclusão e de exclusão

Os critérios de inclusão foram: estudos experimentais em laboratório, realizados com camundongos de qualquer linhagem, machos ou fêmeas, entre 5-8 semanas de vida, mantidos em ambiente laboratorial, em que foi reproduzido modelo experimental de inflamação das vias aéreas induzido por ovalbumina (OVA), e que foram submetidos a alguma modalidade de terapia helmíntica, consistindo o controle em camundongos com o mesmo modelo de doença alérgica, mas sem intervenção ou em que foi aplicado somente o veículo da intervenção terapêutica. Os critérios de exclusão foram: estudos em que os camundongos apresentaram comorbidades e nos quais a aplicação da terapia helmíntica ocorreu antes ou simultaneamente à fase de sensibilização.

4.4 Identificação e seleção de estudos

Duas duplas de autores, independentes, fizeram separadamente a leitura dos títulos e resumos de cada trabalho pré-selecionado para identificar somente os estudos que preenchiam corretamente os critérios de inclusão. Prosseguiu-se com a leitura dos artigos, separadamente, por quatro autores, para assegurar os critérios da revisão sistemática. Quaisquer divergências entre os autores foram resolvidas por discussão e diálogo, na presença de um quinto autor.

4.5 Extração de dados

Três autores coletaram os dados por meio de um formulário de coleta pré-definido. Um quarto autor, independente, revisou os dados extraídos. As características dos estudos extraídos incluem: ano de publicação, origem geográfica, tamanho da amostra, tipo de intervenção, entre outras. Foram registrados dados sobre as espécies de helmintos empregadas, os componentes funcionais utilizados e os efeitos obtidos sobre o padrão imune molecular e de reposta celular. A qualidade de cada estudo foi avaliada pelo *SYRCLE's risk of bias tool for animal studies*³⁹, que consta em anexo, e avalia os seguintes pontos: geração da sequência de alocação, características de base dos grupos, ocultação da alocação, habitação randomizada, cegamento durante a intervenção, randomização da avaliação dos desfechos, cegamento dos avaliadores, informações incompletas do desfecho, publicação seletiva de desfechos e outras fontes de vieses.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação e seleção dos estudos

As buscas nas bases de dados retornaram 688 artigos e um outro foi adicionado manualmente, totalizando 689 artigos. Dentre eles, 388 foram excluídos por não tratarem de estudos experimentais, 43 por não utilizarem camundongos, 217 por não abordarem o tema proposto e 17 por trazerem outras intervenções terapêuticas não helmínticas, restando 24 artigos para leitura integral. Dos 24, 8 foram excluídos pelo modelo alérgico não ser induzido por OVA, 11 pela intervenção com produtos helmínticos ocorrer antes ou simultaneamente à sensibilização, um por não informar sobre a idade dos camundongos⁴⁰ e outro pelo grupo controle não atender ao delimitado⁴¹ (Fluxograma 1).

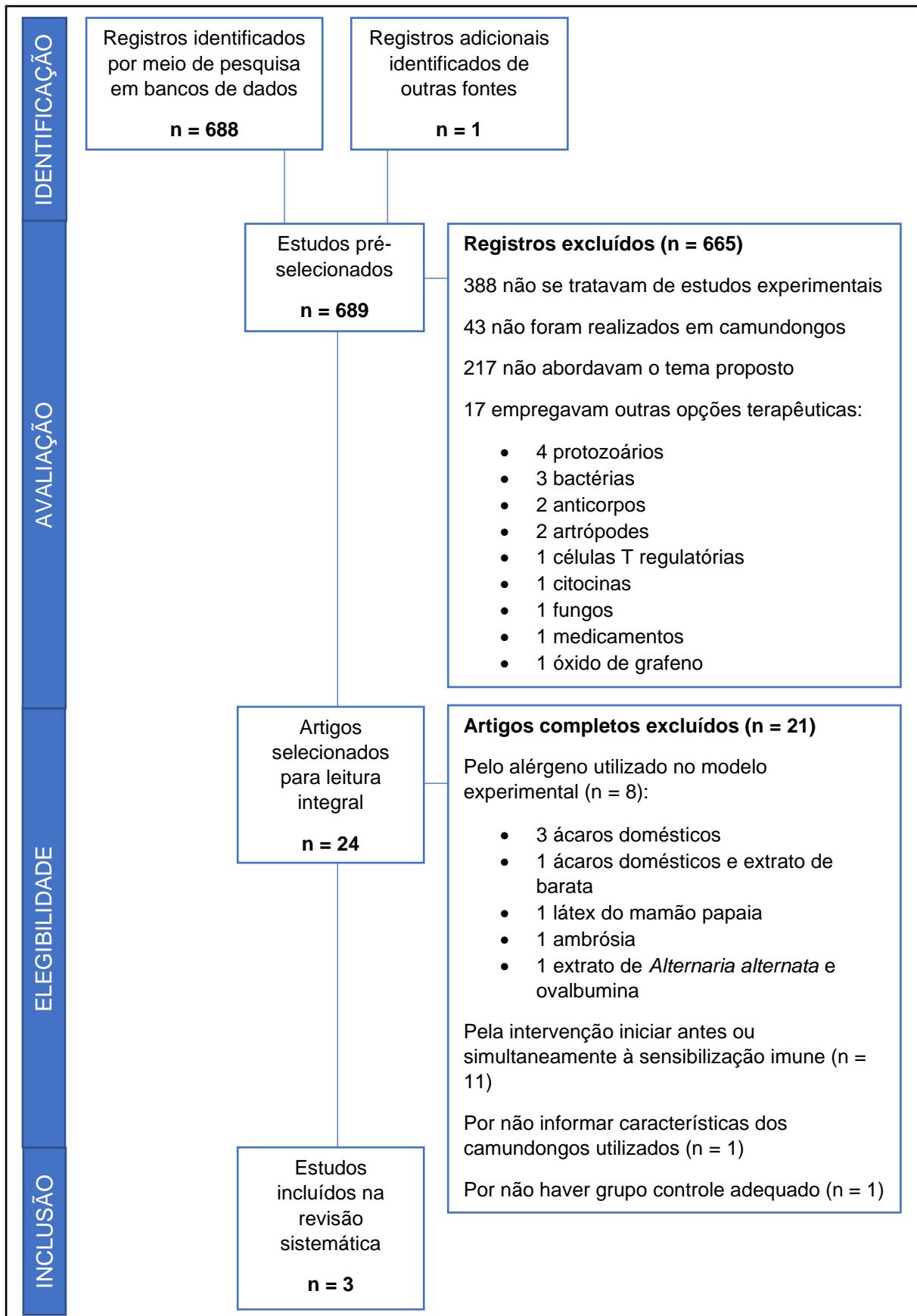
5.2 Características gerais dos estudos selecionados

Os três estudos são europeus e utilizaram camundongos fêmeas com 6-8 semanas de idade, um deles utilizou animais da linhagem BALB/c, enquanto os demais utilizaram os da linhagem C57BL/6. O tamanho das amostras variou de 14 a 60 animais, totalizando 123 a 131 camundongos. Essa variação no total decorre do fato de dois dos artigos não citarem o número exato de camundongos por grupo experimental, apontando em vez disso um intervalo^{42,43}. Dois dos estudos^{43,44} utilizaram somente substâncias extraídas dos helmintos, enquanto o terceiro⁴² utilizou também células linfonodais mesentéricas de camundongos infectados por helmintos. Wilson et al.⁴² e Trujillo-Vargas et al.⁴³ fizeram intervenções pontuais em 1-2 dias, enquanto Coltherd et al.⁴⁴ também realizou intervenções nos intervalos de 22 e 57 dias. Todos os estudos tiveram como grupo controle um conjunto de animais em que foi induzido o modelo alérgico sem ser realizado nenhum tratamento. Essas e outras informações então dispostas no apêndice A.

5.3 Estudos selecionados

Wilson e demais autores⁴², em 2005, induziram diferentes modelos alérgicos em camundongos de duas linhagens e realizaram a intervenção a partir do helminto *Heligmosomoides polygyrus* antes da fase de sensibilização imune, para estabelecer uma relação de proteção, ou após a sensibilização, avaliando a melhora dos marcadores imunes. Os dados, em todo esse trabalho, são relatados por meio de gráficos, sendo informados numericamente no texto apenas o valor de algumas análises estatísticas entre os grupos.

Fluxograma 1 – Processo de seleção dos estudos



Fonte: Produção da autora.

Para o propósito dessa revisão, só foram considerados os experimentos em que o modelo alérgico foi induzido com OVA e a intervenção ocorreu após a sensibilização. Neles os autores fizeram a transferência de células linfonodais mesentéricas (MLNCs) de camundongos previamente infectados, passados 28 dias de infecção. Os camundongos recipientes foram sensibilizados duas vezes, nos dias 0 e 14, sofreram a transferência celular no dia 21 e passaram pelo desafio imune nos dias 28 e 31, sendo sacrificados e analisados no dia seguinte ao último desafio.

Em um dos experimentos, foram inoculadas 5×10^7 MLNCs de camundongos previamente infectados num grupo, enquanto no outro foram transferidas células de camundongos não infectados. Ambos os grupos, no dia seguinte à inoculação, ainda receberam 100 μ g de antígenos de *H. polygyrus*. De cada grupo, incluindo o controle, cinco animais foram analisados quanto ao número total de células e o número de eosinófilos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Segundo os autores, só houve significância estatística na redução do número de eosinófilos do grupo para o qual foram transferidas MLNCs de camundongos infectados e o antígeno do helminto, com $p = 0,04$.

No segundo experimento considerado nessa revisão foram selecionadas células específicas dentre as MLNCs dos camundongos infectados, ocorrendo transferência de 4×10^6 células T regulatórias (Tregs). O primeiro grupo recebeu Tregs CD4+ (92,4% de pureza), enquanto o segundo recebeu Tregs CD4- (94,9% de pureza). O tamanho dos grupos variou entre 8-10 camundongos. Os autores informaram que houve redução estatisticamente significativa do grupo CD4+ quanto ao número total de células e de eosinófilos do BALF, em comparação ao grupo controle, $p = 0,004$ e $p = 0,0001$, respectivamente. Já o grupo CD4- só apresentou redução com significância estatística na contagem de eosinófilos, $p = 0,025$. Os pesquisadores também analisaram os níveis de IgE total e antígeno específico nesses grupos, mas não informaram os valores obtidos e relataram que os números não tiveram significância estatística.

No terceiro experimento foram transferidas a cada grupo 3×10^5 Tregs CD4+, em que um dos grupos era CD25+ (60,6% de pureza) e o outro CD25- (79,6% de pureza). Somente o primeiro grupo obteve redução de marcadores com significância estatística, segundo os autores, com redução da eosinofilia no BALF, $p = 0,02$, e no número de células caliciformes em análise histopatológica de seções pulmonares, $p = 0,05$.

No artigo de Trujillo-Vargas et al.⁴³, em 2007, avaliou-se o uso de produtos excretórios-secretórios de *Nippostrongylus brasiliensis* (NES) principalmente de forma preventiva ao

desenvolvimento de hiper-responsividade de vias aéreas em modelos murinos. Entretanto, um dos grupos teve a inoculação de 50 µg de NES 6 dias após a sensibilização, e nele os autores encontraram $1,7 \pm 0,55 \times 10^6$ eosinófilos/mL de fluido do lavado broncoalveolar, enquanto o valor do grupo controle ficou em $2,02 \pm 0,64 \times 10^6$ eosinófilos/mL, não havendo, portanto, redução estatisticamente significativa. Os autores também informaram não detectar níveis reduzidos de IgG1 ou de IgE alérgeno-específico no sangue desses camundongos, embora os valores não sejam informados. O tamanho dos grupos intervenção e controle variou entre 7-8 camundongos.

Por fim, a pesquisa de Coltherd et al.⁴⁴, em 2016, trabalhou mais especificamente com modelos de asma crônica e utilizou como intervenção o ES-62, uma glicoproteína secretada pelo *Acanthocheilonema viteae*. A sensibilização foi feita nos dias 0, 3 e 6, com desafios ocorrendo semanalmente do dia 11 ao dia 67. O sacrifício ocorreu no dia 69 para análise dos marcadores. Cinco modelos distintos de intervenção foram feitos, todos com a inoculação de 2 µg de ES-62 em 100 µL de PBS. No primeiro, a intervenção foi realizada semanalmente, do dia 11 ao dia 67 (nove vezes); no segundo, semanalmente, do dia 11 ao dia 32 (quatro vezes); no terceiro, semanalmente, do dia 46 ao dia 67 (quatro vezes); no quarto, uma única inoculação foi realizada no dia 67; e no quinto, uma variação da terceira intervenção foi feita com o sacrifício dos animais ocorrendo no dia 48 em vez do dia 69. Assim como Wilson et al.⁴², a grande maioria das variáveis estudadas não teve seus valores numéricos publicados, sendo ilustrados somente com gráficos, mesmo que os autores tenham publicado vários dados de análise estatística.

Numa análise histopatológica com os três primeiros grupos, foram avaliados três camundongos da primeira e da terceira intervenções, cinco da segunda intervenção e oito do grupo controle quanto a quatro parâmetros. O primeiro grupo foi o único a apresentar redução estatisticamente significativa em todos: infiltrado celular ($p < 0,01$), produção de muco ($p < 0,05$), deposição de colágeno ($p < 0,001$) e espessamento de via aérea ($p < 0,01$). O terceiro grupo também apresentou redução nos quatro parâmetros, com $p < 0,05$ na diminuição do infiltrado celular e $p < 0,01$ quanto à produção de muco. Os autores ainda informaram que a redução na deposição de colágeno desse grupo teve significância estatística, mas não revelam nenhum dado a esse respeito, enquanto afirmam que para o espessamento de parede a redução não teve valor estatístico. Com relação ao segundo grupo, foi informado que nenhum parâmetro teve alterações com significância estatística.

Numa outra análise, comparando camundongos da primeira intervenção (três animais) e do grupo controle (cinco animais), observou-se redução no número total de células do BALF e especificamente no número de neutrófilos, com $p < 0,05$ em ambos os casos. Também foi relatada diminuição nos níveis séricos de IgG1 OVA específico ($p < 0,05$), embora os autores afirmem que não houve alteração significativa quanto ao IgG2a e IgE sérico ou no BALF.

O quarto modelo de intervenção não revelou melhora na avaliação histopatológica do infiltrado celular ou da produção de muco, mas teve redução no número de células do infiltrado: $1,995 \pm 0,19 \times 10^5$. Os valores do grupo controle ou a análise estatística a ele relacionada não foram informados. Os autores ainda relataram que esse grupo promoveu redução no número de células do BALF, mas que só houve significância estatística se analisados neutrófilos isoladamente ($p < 0,01$), não revelando os dados para os demais tipos celulares: linfócitos, macrófagos e eosinófilos. O quinto formato de intervenção, interrompido antes da cronificação da doença no modelo murino, trouxe uma análise de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar. Tanto IL-4, quanto IL-13 tiveram seus valores reduzidos em relação ao controle, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. Nessa análise, cada grupo consistiu em cinco camundongos.

Na Tabela 1, a seguir, podem ser encontrados os resultados desses estudos que alcançaram significância estatística.

Tabela 1 – Resultados estatisticamente significantes dos estudos selecionados

Referência	Intervenção	Momento da intervenção	Resultados obtidos*
Wilson et al. ⁴² , 2005	5x10 ⁷ MLNC de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> + 100 µg de antígeno do parasita adulto.	Transferência de células 7 dias após a segunda sensibilização e 7 dias antes do primeiro desafio imune.	Redução no número de eosinófilos do lavado broncoalveolar ($p = 0,04$).
	5x10 ⁷ MLNC de camundongos não infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> + 100 µg de antígeno do parasita adulto.	Inoculação de antígenos 1 dia após a transferência celular.	Sem variações estatisticamente significantes.
	4x10 ⁶ Tregs CD4+ dos MLN de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (92,4% de pureza).	Transferência de células 7 dias após a segunda sensibilização e 7 dias antes do primeiro desafio imune.	Redução no número total de células ($p = 0,004$) e de eosinófilos ($p = 0,0001$) do lavado broncoalveolar.

(continua)

Referência	Intervenção	Momento da intervenção	Resultados obtidos*
Wilson et al.⁴², 2005	4x10 ⁶ Tregs CD4- dos MLN de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (94,9% de pureza).	Transferência de células 7 dias após a segunda sensibilização e 7 dias antes do primeiro desafio imune.	Redução no número de eosinófilos do lavado broncoalveolar (p = 0,025).
	3x10 ⁵ Tregs CD4+ CD25+ dos MLN de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (60,6% de pureza).		Redução no número de eosinófilos do lavado broncoalveolar (p = 0,02) e no número de células caliciformes em análise histopatológica de seções pulmonares (p = 0,05).
	3x10 ⁵ Tregs CD4+ CD25- dos MLN de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (79,6% de pureza).		Sem variações estatisticamente significantes.
Trujillo-Vargas et al.⁴³, 2007	50 µg dos extratos secretórios e excretórios de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> (NES)	Inoculação 6 dias após a etapa de sensibilização.	Sem variações estatisticamente significantes.
Coltherd et al.⁴⁴, 2016	02 µg de ES-62, extraído de <i>Acanthocheilonema viteae</i> , em 100 µL de PBS.	Injeção semanal, do dia 11 ao dia 67 do experimento.	Redução no número total de células (p < 0,05), neutrófilos (p < 0,05) e IgG1 (p < 0,05) do lavado broncoalveolar. Redução no infiltrado celular (p < 0,01), produção de muco (p < 0,05), deposição de colágeno (p < 0,001) e espessamento de via aérea (p < 0,01) em análise histopatológica de seções pulmonares.
		Injeção semanal, do dia 11 ao dia 32 do experimento.	Sem variações estatisticamente significantes.
		Injeção semanal, do dia 46 ao dia 67 do experimento.	Redução no infiltrado celular (p < 0,05) e produção de muco (p < 0,01) em análise histopatológica de seções pulmonares.

(conclusão)

Referência	Intervenção	Momento da intervenção	Resultados obtidos*
Coltherd et al. ⁴⁴ , 2016	02 µg de ES-62, extraído de <i>Acanthocheilonema viteae</i> , em 100 µL de PBS.	Injeção no dia 67 do experimento.	Sem variações estatisticamente significantes.
		Injeção no dia 46 do experimento.**	Redução no número de neutrófilos ($p < 0,01$), IL-4 ($p < 0,05$) e IL-13 ($p < 0,01$) do lavado broncoalveolar.

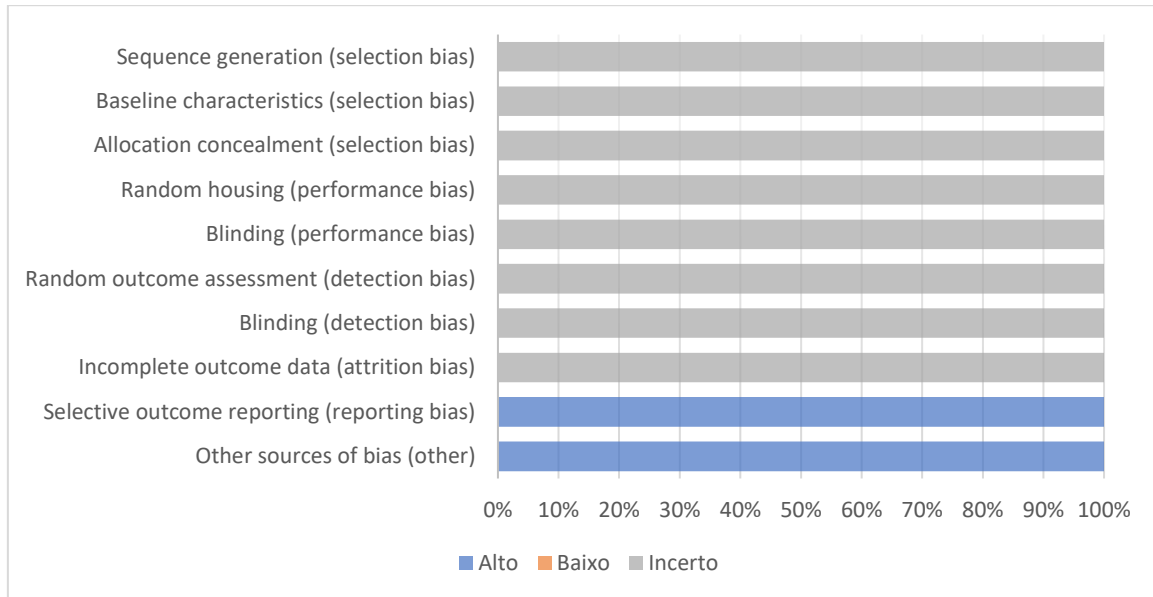
Fontes: Wilson et al.⁴², Trujillo-Vargas et al.⁴³ e Coltherd et al.⁴⁴

*Inclui somente os resultados com significância estatística demonstrada pelo valor de p ; **grupo experimental em que a análise foi realizada no dia 48 em vez do dia 69. MLNC: células linfonodais mesentéricas; Tregs: células T regulatórias; MLN: linfonodos mesentéricos. PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino).

5.4 Risco de viés dos estudos incluídos

Quanto ao viés de seleção, nenhum dos estudos informou sobre a sequência de alocação, deixando esse ponto obscuro, e embora as características de base dos animais tenham sido informadas em relação à linhagem, o sexo e a idade, não é informado se a alocação dos grupos foi feita antes ou após a indução do modelo alérgico, além de que, da mesma forma, não é informado se os responsáveis pela alocação dos camundongos sabiam qual seria a intervenção realizada sobre cada grupo. Sobre o viés de performance, não há informações suficientes em nenhum dos artigos para avaliar diferenças no alojamento dos camundongos em relação aos grupos estudados e nada é informado a respeito do cegamento dos pesquisadores a cargo das intervenções ou do controle. Quanto ao viés de detecção, nenhum dos estudos informou se a seleção para avaliação do desfecho, dentre os animais de cada grupo, foi randômica ou não e não foi relatado um cegamento dos avaliadores. A respeito do viés de atrito, nenhum dos artigos informa se todos os animais selecionados foram utilizados, impossibilitando uma análise sobre dados incompletos de desfecho. Quanto ao viés de publicação, nenhum dos artigos informou protocolo de estudo e todos trouxeram em sua metodologia um conjunto de variáveis cujas informações não aparecem para todos os grupos submetidos aos experimentos, os autores inclusive citam algumas das variáveis que foram omitidas. Outros vieses podem estar presentes pelo número pequeno das amostras em cada experimento e pela falta de informações e de dados exatos. Uma sumarização do risco de vieses segundo a ferramenta *SYRCLE's risk of bias tool*³⁹ está disponível no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Risco de viés apresentado como porcentagem dos estudos revisados, de acordo aos parâmetros da SYRCLE's risk of bias tool



Fonte: Produção da autora.

6 DISCUSSÃO

A presente revisão sistemática identificou três estudos, totalizando uma amostra com intervalo de 123 a 131 camundongos, em que foram realizadas intervenções utilizando helmintos e seus produtos para avaliação da supressão de marcadores imunes em modelos murinos de hiper-responsividade das vias aéreas. Foram observadas reduções estatisticamente significantes no número de células, citocinas, imunoglobulinas, na produção de muco e em marcadores de remodelamento tecidual, em análise histopatológica e do BALF.

Os resultados apontam uma redução tanto no número total de células^{42,44}, quanto em tipos celulares específicos, como neutrófilos⁴⁴, em comparação com os controles, ocorrendo ainda significativa redução de eosinófilos⁴², células efetoras da lesão tecidual nos quadros alérgicos³². Também foi observada diminuição de células caliciformes⁴², produtoras de muco, e redução da produção de muco em si⁴⁴, em análise histopatológica. A produção de muco é um fenômeno importante na fisiopatologia da asma, associando-se à obstrução das vias aéreas⁴⁵ e sendo estimulada pela IL-13⁴⁶⁻⁴⁹. Essa citocina foi avaliada em um dos experimentos⁴⁴, exibindo redução, assim como IL-4. Ambas as citocinas são produzidas pelas células T auxiliares foliculares (Tfh) e atuam induzindo a troca de classe de imunoglobulina no linfócito B para o isotipo IgE^{31,50,51}. Embora todos os autores tenham informado ter sido realizada mensuração de IgE em seus estudos, nenhum dado foi revelado a esse respeito, exceto que não foi alcançada variação com significância estatística.

Quanto ao espessamento das vias aéreas e a deposição de colágeno, variáveis que indicam o remodelamento tecidual no contexto da asma^{52,53}, houve redução em análise histopatológica de seções pulmonares realizada num dos grupos experimentais⁴⁴. Em outro grupo, submetido ao mesmo produto, mas sob diferente regime de intervenção, foi verificada diminuição de IgG1⁴⁴, imunoglobulina associada à antígenos proteicos solúveis, e que pode ser induzida por alguns alérgenos⁵⁴.

Somente um dos grupos estudados apontou diminuição em todas as variáveis estudadas, aquele que recebeu maior número de inoculações do ES-62⁴⁴. O grupo que recebeu apenas uma inoculação ao final dos 67 dias, por sua vez, não apresentou alterações significativas em nenhuma dessas mesmas variáveis. No experimento em que houve apenas uma inoculação do mesmo composto, ao dia 46, foi avaliado um conjunto de marcadores diferente dos demais, o que impossibilita uma comparação mais objetiva mesmo entre os grupos de intervenção única. Comparando os resultados dos conjuntos em que ocorreram quatro inoculações da substância,

aquele em que a intervenção foi concentrada no início do experimento também não reportou melhora dos parâmetros analisados. Isso pode apontar que, embora haja possibilidade de melhora dos marcadores através da intervenção com o ES-62, ela não teria caráter duradouro, falhando do ponto de vista preventivo. Por outro lado, o grupo em que as quatro inoculações foram realizadas após algumas etapas de desafio imune teve sucesso na diminuição de duas variáveis, infiltrado celular e produção de muco, ainda que não tenha produzido alterações nos marcadores de remodelamento tecidual. Dentre os experimentos com transferência celular⁴², também obtiveram sucesso na redução de dois marcadores, incluindo eosinofilia no BALF, aqueles que utilizaram Tregs CD4+ e Tregs CD4+ CD25+.

Ainda que esses estudos defendam a eficácia das intervenções realizadas, isso não pode ser afirmado de maneira ampla. Wilson e colaboradores⁴² debatem que a população de Tregs elicítada pelas helmintíases suprime os marcadores alérgicos e Coltherd et al.⁴⁴ que há prevenção da cronificação da asma através do uso do ES-62, imunomodulador de *A. viteae*. Mas, poucos dados foram objetivamente informados. Ademais, os estudos reportam uma variação nos marcadores analisados por grupo, o que revela certa heterogeneidade na escolha do que seria avaliado a cada experimento, e que também revela um viés de publicação, reforçado pelos marcadores que foram citados nos artigos sem ter seus valores revelados. Trujillo-Vargas et al.⁴³, por sua vez, tiveram como foco, essencialmente, intervir antes da fase de sensibilização, trazendo somente um grupo com análise pós-sensibilização, que não revelou supressão dos marcadores citados.

Há estudos que abordam⁵⁵⁻⁵⁸ uma intervenção com produtos helmínticos anterior ou simultaneamente à fase de sensibilização, com o intuito de estabelecer uma associação preventiva. A sensibilização corresponde ao primeiro contato com o alérgeno, que leva ao desenvolvimento da imunidade contra ele^{45,59}. No contexto do desenvolvimento da doença em humanos, essa é uma etapa que raramente provoca alguma manifestação clínica⁴⁵. Assim, do ponto de vista terapêutico, seria mais adequada a intervenção realizada após o desafio imune, quando a resposta imune alérgica já está bem consolidada, e pode provocar o estado de doença percebido clinicamente pelos humanos mediante reexposição ao alérgeno^{45,60}, entretanto, há poucos estudos nesse formato. E mesmo objetivando prevenção, seria inviável desenvolver uma vacina que só funcionaria se aplicada anteriormente aos primeiros contatos com os alérgenos, ou seja, antes da sensibilização, pois não é possível definir quando isso ocorre, já que tais alérgenos estão dispersos pelo ambiente em que as pessoas naturalmente vivem. Dessa forma, mesmo para uma abordagem preventiva, os estudos com intervenção posterior à fase de

sensibilização têm maior aplicabilidade potencial do que aqueles em que ela ocorre anteriormente a essa fase.

O alérgeno utilizado nos modelos murinos foi a ovalbumina, a proteína principal da clara do ovo. Ela não tem caráter imunogênico intrínseco, precisando ser injetada diversas vezes na presença de adjuvantes, normalmente alumínio, para provocar a sensibilização^{61,62}. É possível que se deva à essa ausência de imunogenicidade o fato desses experimentos não terem detectado variações significativas de IgE, expressando um modelo de hiper-responsividade possivelmente não atópico. Ainda assim, após um desafio com OVA, os modelos obtidos apresentam muitas das características patológicas da asma, configurando-se em modelos bem estabelecidos e bastante difundidos para o estudo dessa doença⁶¹. Existem outros modelos de indução de hiper-responsividade de vias aéreas, utilizando alérgenos como ácaros domésticos, extratos de barata, pólen ou látex, que se aproximariam mais dos alérgenos de fato observados na indução das doenças alérgicas em humanos^{60,62,63}. Entretanto, como há grande diversidade quanto a quais alérgenos provocam doença alérgica, ou em que intensidade, a depender de características das pessoas ou dos modelos murinos^{64,65}, o uso de OVA se mostra bastante justificável por produzir achados inflamatórios condizentes com aqueles vistos na asma⁶¹.

Quanto à aplicabilidade, os resultados obtidos através da transferência celular de espécimes infectados⁴², embora promissores, levando em conta a redução eosinofílica observada, trazem pouca viabilidade, mesmo porque esse método envolve o adoecimento dos espécimes para coleta das células, o que não poderia ser realizado em humanos por motivos éticos. O uso de extratos ou de proteínas recombinantes dos parasitas, por sua vez, tem maior possibilidade de aplicação prática. Nesse sentido, Coltherd e colaboradores⁴⁴ ainda abordam em seu estudo compostos análogos àqueles extraídos do helminto, o que facilitaria a logística de produção do tratamento.

Outro aspecto da abordagem de Coltherd et al.⁴⁴ e que talvez tenha um papel nos dados observados é a utilização de parasitas murinos, o que pode ser um dos elementos na gênese dos bons resultados obtidos. Afinal, a resposta imune se desenvolve de maneiras diferentes a depender da adaptação entre hospedeiro e parasita, como também observado por Amaral et al.⁶⁶ Adicionalmente, a espécie utilizada se constitui num filarídeo, levantando a possibilidade de que a passagem sanguínea o leve a um padrão molecular com maior impacto sistêmico e modulatório, o que produziria melhores resultados.

A escolha dos helmintos é um aspecto pouco debatido nesses estudos. Não é explorado se ela se baseia em parâmetros de segurança, testando parasitas de outras espécies, se a escolha é feita de acordo ao local de circulação, ou se ela se baseia em dados de estudos observacionais, entre outros critérios possíveis. Lembrando que ainda há algumas divergências na literatura quanto a determinadas espécies de helmintos, se elas se comportam de fato como supressores das doenças alérgicas, se não há interação significativa, ou se, pelo contrário, exacerbam as doenças alérgicas^{8,9,67}. Há, assim, uma grande diversidade de estudos em animais, ou mesmo em humanos, com as mais variadas espécies de parasitas, dificultando a análise do conjunto. A diversidade de variáveis estudadas também se coloca como um empecilho à análise, pois embora a maioria induza um modelo com ovalbumina, o que determina certas características inflamatórias de base, os dados coletados ou publicados não se sobrepõem na mesma medida.

Há algumas limitações nos estudos. Os procedimentos experimentais poderiam ter descrições mais completas, já que a ausência de informações sobre a alocação dos animais entre os grupos, sobre as condições de alojamento, se houve cegamento dos pesquisadores em diversas etapas, entre outros quesitos, compromete a interpretação dos dados, na medida em que pequenas variações, como uma exposição maior ou menor à ventilação, a depender de onde eram acomodados os camundongos, já é suficiente para produzir alterações que mudam o desfecho para aqueles espécimes. Além disso, os estudos, que já possuem um número reduzido de animais nas amostras, ainda demonstram ter sido feita seleção dos camundongos que tiveram seus números analisados e/ou divulgados dentro dos subgrupos delineados, contribuindo para a existência de vieses. No aspecto da publicação, também se interpõe como obstáculo que a maior parte dos dados tenha sido apresentada através de gráficos ou de valores da análise estatística, havendo pouca disponibilização dos números exatos obtidos a cada variável.

7 CONCLUSÃO

As terapias helmínticas são capazes de suprimir o número total de células, de eosinófilos, de neutrófilos e de células caliciformes, assim como IL-4, IL-13, IgG1, a deposição de colágeno, a produção de muco e o espessamento de vias aéreas, no lavado broncoalveolar e em análise histopatológica de sessões pulmonares de modelos murinos das doenças alérgicas. Entretanto, estudos em animais com maior rigor metodológico ainda são necessários antes que esses resultados sejam traduzidos para humanos com maior segurança e possibilidade de sucesso terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. World Allergy Organization. WAO White Book on Allergy [Internet]. 1st ed. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF, editors. United Kingdom; 2011 [cited 2020 May 31]. 220 p. Available from: https://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WAO-White-Book-on-Allergy_web.pdf
2. Bloomfield SF, Rook GA, Scott EA, Shanahan F, Stanwell-Smith R, Turner P. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspect Public Health* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 10];136(4):213–24. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1757913916650225?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub_0www.ncbi.nlm.nih.gov
3. Parker W. The “hygiene hypothesis” for allergic disease is a misnomer. *BMJ* [Internet]. 2014 Aug 26 [cited 2020 May 31];349. Available from: <https://www.bmj.com/content/349/bmj.g5267.long>
4. Wuhao L, Ran C, Xujin H, Zhongdao W, Dekumyoy P, Zhiyue L. Parasites and asthma. *Parasitol Res* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2020 Feb 29];116(9):2373–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-017-5548-1>
5. Rezende MRLT. Asma e rinite alérgica em área rural endêmica para esquistossomose [Internet]. Belo Horizonte; 2009 [cited 2020 Mar 1]. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-689317>
6. Helmbj H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunol* [Internet]. 2015 Mar 26 [cited 2020 Mar 1];16(12). Available from: <https://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12865-015-0074-3>
7. Garg SK, Croft AM, Bager P. Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2014 Jan 20 [cited 2020 May 10];(1). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009400.pub2/full?highlightAbstract=helminth>
8. Croft AM, Bager P, Garg SK. Helminth therapy (worms) for allergic rhinitis [Internet]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Wiley; 2012 [cited 2020 Mar 15]. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009238.pub2/full>
9. Evans H, Mitre E. Worms as therapeutic agents for allergy and asthma: Understanding why benefits in animal studies have not translated into clinical success. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 May 10];135(2):343–53. Available from: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(14\)00960-9/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(14)00960-9/fulltext)
10. De Vries RBM, Wever KE, Avey MT, Stephens ML, Sena ES, Leenaars M. The Usefulness of Systematic Reviews of Animal Experiments for the Design of Preclinical and Clinical Studies. *ILAR J* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jul 4];55(3). Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276599/>
11. Ritskes-Hoitinga M, Leenaars M, Avey M, Rovers M, Scholten R. Systematic Reviews of Preclinical Animal Studies can Make Significant Contributions to Health Care and More Transparent Translational Medicine. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2014 Mar 28 [cited 2020 Jul 4];(3). Available from: <https://doi.org/10.1002/14651858.ED000078>
 12. Abraham SN, St. John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2021 Mar 25];10(6):440–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20498670/>
 13. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* [Internet]. 2012 May [cited 2021 Mar 25];18(5):693–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22561833/>
 14. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* [Internet]. 2008 Jul 24 [cited 2021 Mar 25];454(7203):445–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18650915/>
 15. World Health Organization. Asthma [Internet]. 2020 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
 16. European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Association. Livro da EFA sobre alergias respiratórias: sensibilizar a opinião pública, aliviar o fardo [Internet]. Valovirta E, editor. 2011 [cited 2020 Jun 2]. 59 p. Available from: <https://www.efanet.org/images/2012/07/EFA-Book-on-Respiratory-Allergy-Portuguese.pdf>
 17. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. A asma ainda mata cerca de 2 mil brasileiros por ano [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <http://asbai.org.br/a-asma-ainda-mata-cerca-de-2-mil-brasileiros-por-ano/>
 18. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. Brasil tem entre 3 e 6 milhões de idosos com asma [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <http://asbai.org.br/brasil-tem-entre-3-e-6-milhoes-de-idosos-com-asma/>
 19. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. Rinite alérgica pode começar na infância [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <http://asbai.org.br/rinite-alergica-pode-comecar-na-infancia/>
 20. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 14]. Available from: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final-_wms.pdf
 21. Sobotková K, Parker W, Levá J, Růžková J, Lukeš J, Jirků Pomajbíková K. Helminth Therapy – From the Parasite Perspective. *Trends Parasitol* [Internet]. 2019 Jul 1;35(7):501–15. Available from: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(19\)30085-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(19)30085-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1)

- 471492219300856%3Fshowall%3Dtrue
22. Taylor-Robinson DC, Maayan N, Donegan S, Chaplin M, Garner P. Public health deworming programmes for soil-transmitted helminths in children living in endemic areas (Review). *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 2];(11). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000371.pub7/pdf/CD000371/CD000371.pdf>
 23. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* [Internet]. 1989 [cited 2020 Jun 2];299:1259–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1838109/?page=2>
 24. Barker DJP, Osmond C, Golding J, Wadsworth MEJ. Acute appendicitis and bathrooms in three samples of British children. *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1988 [cited 2020 Jun 2];296:956–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2545433/?page=1>
 25. Rook GAW. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Darwinian medicine and the ‘hygiene’ or ‘old friends’ hypothesis. In: *Clinical & Experimental Immunology* [Internet]. British Society for Immunology; 2010 [cited 2020 Jun 2]. p. 70–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2010.04133.x>
 26. Abrahamsson TR, Wu RY, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: The importance of the pregnancy period. *Pediatr Res* [Internet]. 2015 Jan 10 [cited 2020 Jun 2];77(1):214–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2014165.pdf>
 27. Williams AR, Dige A, Rasmussen TK, Hvas CL, Dahlerup JF, Iversen L, et al. Immune responses and parasitological observations induced during probiotic treatment with medicinal *Trichuris suis* ova in a healthy volunteer. *Immunol Lett* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 May 10];188:32–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247817301438?via%3Dihub>
 28. Steinfelder S, O’regan NL, Hartmann S. Diplomatic Assistance: Can Helminth-Modulated Macrophages Act as Treatment for Inflammatory Disease? *PLOS Pathog* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 10];12(4). Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005480>
 29. Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. In: *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. The Rockefeller University Press; 2009 [cited 2021 Mar 25]. p. 2059–66. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757871/>
 30. Dorhoi A, Kaufmann SH. Fine-tuning of T cell responses during infection. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2021 Mar 25];21(4):367–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19646852/>
 31. Finkelman FD, Katona IM, Urban Jr. JF, Holmes J, Ohara J, Tung AS, et al. IL-4 is

- required to generate and sustain in vivo IgE responses - PubMed. *J Immunol* [Internet]. 1988 [cited 2021 Mar 25];141(7):2335–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2459206/>
32. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2006 [cited 2021 Mar 25];24:147–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16551246/>
 33. Lopes F, Matisz C, Reyes JL, Jijon H, Al-Darmaki A, Kaplan GG, et al. Helminth Regulation of Immunity: A Three-pronged Approach to Treat Colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 10];22(10):2499–512. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/22/10/2499/4561831>
 34. Freitas EO de, Leoratti FM de S, Freire-de-Lima CG, Morrot A, Feijó DF. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral Leishmaniasis. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Apr 22 [cited 2021 Mar 25];7(153):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840207/>
 35. Buruiana FE, Solà I, Alonso-Coello P. Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn’s disease. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010 Nov 10 [cited 2020 Mar 15];(11). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005109.pub3/full>
 36. Cardoso LS, Oliveira SC, Góes AM, Oliveira RR, Pacífico LG, Marinho F V., et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Jun 2];160(2):266–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857950/>
 37. National Institute for Health Research. PROSPERO [Internet]. [cited 2020 Jul 14]. Available from: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>
 38. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* [Internet]. 2009 Jul 21 [cited 2020 Jun 9];6(7). Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
 39. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* [Internet]. 2014 Mar 26 [cited 2020 Dec 1];14:9. Available from: <https://bmcmedresmethodol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2288-14-43>
 40. McSorley HJ, O’Gorman MT, Blair N, Sutherland TE, Filbey KJ, Maizels RM. Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2020 Oct 11];42:2667–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916998/>
 41. Kim SE, Kim JH, Min BH, Bae YM, Hong ST, Choi MH. Crude extracts of *Caenorhabditis elegans* suppress airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2020 Sep 22];7(4):1–10. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3338843/>
42. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CAM, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* [Internet]. 2005 Nov 7 [cited 2020 Nov 3];202(9):1199–212. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16275759/>
 43. Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2020 Nov 3];175:336–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17122383/>
 44. Coltherd JC, Rodgers DT, Lawrie RE, Al-Riyami L, Suckling CJ, Harnett W, et al. The parasitic worm-derived immunomodulator, ES-62 and its drug-like small molecule analogues exhibit therapeutic potential in a model of chronic asthma. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jan 14 [cited 2020 Oct 11];6(19224). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4725896/>
 45. British Society for Immunology. Allergy [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: <https://www.immunology.org/policy-and-public-affairs/briefings-and-position-statements/allergy>
 46. Alevy YG, Patel AC, Romero AG, Patel DA, Tucker J, Roswit WT, et al. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Dec 3 [cited 2021 Mar 25];122(12):4555–68. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/64896>
 47. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Mar 25];41(12):1747–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22092504/>
 48. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 [cited 2021 Mar 25];103(6):779–88. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC408149/>
 49. Grünig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* (80-) [Internet]. 1998 Dec 18 [cited 2021 Mar 25];282(5397):2261–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9856950/>
 50. Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants [Internet]. Vol. 140, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 1988 [cited 2021 Mar 25]. p. 4193–418. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2967330/>
 51. Punnonen J, Yssel H, De Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to

- human IgE synthesis induced by activated CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Mar 25];100(6 Pt 1):792–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9438489/>
52. Awadh N, Müller NL, Park CS, Abboud RT, FitzGerald JM. Airway wall thickness in patients with near fatal asthma and control groups: Assessment with high resolution computed tomographic scanning. *Thorax* [Internet]. 1998 [cited 2021 Mar 25];53(4):248–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741365/>
 53. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Mar 25];32(1):61–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321931/>
 54. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 22];5(520). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4202688/>
 55. Sun S, Li H, Yuan Y, Wang L, He W, Xie H, et al. Preventive and therapeutic effects of *Trichinella spiralis* adult extracts on allergic inflammation in an experimental asthma mouse model. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2019 Jun 28 [cited 2020 Sep 22];12(326). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6599242/>
 56. Zhang W, Li L, Zheng Y, Xue F, Yu M, Ma Y, et al. *Schistosoma japonicum* peptide SJMHE1 suppresses airway inflammation of allergic asthma in mice. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Sep 22];23(11):7819–29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6815837/>
 57. Parande Shirvan S, Ebrahimy A, Dousty A, Maleki M, Movassaghi A, Borji H, et al. Somatic extracts of *Marshallagia marshalli* downregulate the Th2 associated immune responses in ovalbumin-induced airway inflammation in BALB/c mice. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2017 May 12 [cited 2020 Sep 22];10(233). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5427607/>
 58. Obieglo K, Schuijs MJ, Ozir-Fazalalikhani A, Otto F, van Wijck Y, Boon L, et al. Isolated *Schistosoma mansoni* eggs prevent allergic airway inflammation. *Parasite Immunol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Oct 11];40(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175163/>
 59. Yoo Y, Perzanowski MS. Allergic Sensitization and the Environment: Latest Update. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2014 Oct [cited 2021 Feb 22];14(10):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6421846/>
 60. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: Acute and chronic allergen challenge. *DMM Dis Model Mech* [Internet]. 2008 [cited 2021 Feb 22];1(4–5):213–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2590830/>
 61. Kumar R, Herbert C, Foster P. The “Classical” Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2008 Jun 3 [cited 2021 Feb

- 22];9(6):485–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18537587/>
62. Creative Biolabs. Ovalbumin-Induced Asthma Model [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/ovalbumin-induced-asthma-model.htm>
 63. Aun MV, Saraiva-Romanholo BM, Almeida FM de, Brüggemann TR, Kalil J, Martins M de A, et al. Sensibilização por via subcutânea é superior à intraperitoneal na indução de asma por ácaro em modelo murino. *Einstein (Sao Paulo)* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Feb 22];13(4):560–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082015000400560&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 64. Akerman M, Valentine-Maher S, Rao M, Taningco G, Khan R, Tuysugoglu G, et al. Allergen sensitivity and asthma severity at an Inner City Asthma Center. *J Asthma* [Internet]. 2003 [cited 2021 Feb 22];40(1):55–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12699212/>
 65. Giavina-Bianchi P, Kalil J, Rizzo LV. Development of an animal model for allergic conjunctivitis: influence of genetic factors and allergen concentration on immune response. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 2008 Aug 26 [cited 2021 Feb 22];86(6):670–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0420.2007.01134.x>
 66. Amaral KB, Silva TP, Dias FF, Malta KK, Rosa FM, Costa-Neto SF, et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(9):1–20. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184696>
 67. Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RWR, Pickup J. Too clean, or not too clean: The Hygiene Hypothesis and home hygiene. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2006 Apr [cited 2020 Oct 11];36(4):402–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448690/>

APÊNDICE A – Características gerais dos estudos experimentais presentes na revisão sistemática

Autores	País	Ano	Tamanho da amostra	Linhagem	Faixa de idade	Sexo	Duração da intervenção	Intervenção	Controle
Wilson et al.	Reino Unido (Escócia)	2005	54-60*	BALB/c	6-8 semanas	F	1 ou 2 dias**	Células dos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> e antígeno de espécimes adultos do helminto.	Sem tratamento.
Trujillo-Vargas et al.	Alemanha	2007	14-16*	C57BL/6	6-8 semanas	F	1 dia	Produtos excretadores e secretadores de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .	Sem tratamento.
Coltherd et al.	Reino Unido (Escócia)	2016	55	C57BL/6	6-8 semanas	F	1, 22 ou 57 dias**	ES-62, imunomodulador de <i>Acanthocheilonema viteae</i> .	Sem tratamento.

Fontes: Wilson et al.⁴², Trujillo-Vargas et al.⁴³ e Coltherd et al.⁴⁴

* Presença de grupos com tamanho informado como intervalo; ** varia de acordo ao grupo de intervenção. F: camundongos fêmea.

ANEXO A - SYRCLE's risk of bias tool for animal studies

Item	Type of bias	Domain	Description of domain	Review authors judgment
1	Selection bias	Sequence generation	Describe the methods used, if any, to generate the allocation sequence in sufficient detail to allow an assessment whether it should produce comparable groups.	Was the allocation sequence adequately generated and applied?
2	Selection bias	Baseline characteristics	Describe all the possible prognostic factors or animal characteristics, if any, that are compared in order to judge whether or not intervention and control groups were similar at the start of the experiment.	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?
3	Selection bias	Allocation concealment	Describe the method used to conceal the allocation sequence in sufficient detail to determine whether intervention allocations could have been foreseen before or during enrolment.	Was the allocation adequately concealed?
4	Performance bias	Random housing	Describe all measures used, if any, to house the animals randomly within the animal room.	Were the animals randomly housed during the experiment?
5	Performance bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind trial caregivers and researchers from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?
6	Detection bias	Random outcome assessment	Describe whether or not animals were selected at random for outcome assessment, and which methods to select the animals, if any, were used.	Were animals selected at random for outcome assessment?
7	Detection bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind outcome assessors from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Was the outcome assessor blinded?
8	Attrition bias	Incomplete outcome data	Describe the completeness of outcome data for each main outcome, including attrition and exclusions from the analysis. State whether attrition and exclusions were reported, the numbers in each intervention group (compared with total randomized animals), reasons for attrition or exclusions, and any re-inclusions in analyses for the review.	Were incomplete outcome data adequately addressed?

(conclusão)

Item	Type of bias	Domain	Description of domain	Review authors judgment
9	Reporting bias	Selective outcome reporting	State how selective outcome reporting was examined and what was found.	Are reports of the study free of selective outcome reporting?
10	Other	Other sources of bias	State any important concerns about bias not covered by other domains in the tool.	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?