

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR – PPGGEv

KARINA ALVES FEITOSA

**EFEITO DO MENTOL E DA MENTONA E SUA COMPLEMENTAÇÃO  
AO PRAZIQUANTEL NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE A  
ESQUISTOSSOMOSE MURINA**

SÃO CARLOS – SP  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR – PPGGEv

KARINA ALVES FEITOSA

**EFEITO DO MENTOL E DA MENTONA E SUA COMPLEMENTAÇÃO  
AO PRAZIQUANTEL NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE A  
ESQUISTOSSOMOSE MURINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia molecular.

**Orientadora:** Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

SÃO CARLOS – SP  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Karina Alves Feitosa, realizada em 28/02/2018:

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niclura  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa  
UNESP

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me dado força, saúde, paciência e fé em todo meu caminho até aqui, não há dúvidas que ELE é o maior mestre que podemos ter.

A minha mãe por ser minha maior incentivadora, por acreditar e vibrar comigo a cada passo conquistado em minha vida; Ao meu irmão e ao meu pai que confiam e torcem para que meus sonhos se concretizem.

A minha orientadora Fernanda Anibal que confiou em mim antes mesmo de me tornar parte da equipe LIDI (Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas). Saiba que sua confiança me torna mais forte, seus conselhos me fazem mais humana e seus ensinamentos contribuem para meu crescimento profissional.

A banca examinadora composta pelo Prof. Dr. João Aristeu da Rosa e Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura por todas as contribuições realizadas no presente trabalho.

A toda equipe LIDI, todos vocês fazem parte disso! Em especial a Débora Neris por ter me ensinado os métodos *in vitro* e por todas as risadas e conselhos; Carol Fattori pela troca de conhecimentos e pelas tardes animadas e de muito trabalho; Joice Rodolpho que sempre se mostrou disposta em me ajudar; Ricardo Correia por toda sua ajuda e contribuição em várias etapas do trabalho; Bruna Fragelli pela ajuda nos experimentos e parceria durante algumas disciplinas; Túlio Cagnazzo pela companhia no congresso de Franca; Elisandra Montija e Sandra Oliveira pela ajuda na parte prática do projeto. Tenho sorte de encontrar em vocês não só parceiros profissionais mas também amigos.

Agradeço mais uma vez ao Ricardo, Joice e Túlio pela disponibilidade em me acompanhar nas viagens relacionadas ao projeto.

A Cynthia Castro por ter me ensinado a técnica ELISA e por sempre estar disposta a esclarecer todas as dúvidas.

A Profa. Dra. Silmara Marques Alegretti, Ms. Tiago Mendes e Dra. Rosimeire Nunes, do Departamento de Biologia Animal, do IB UNICAMP, pela contribuição e parceria na infecção dos animais.

Ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares e a técnica Ana Rocha, do Laboratório de Citopatologia da FMRP-USP pelo auxílio na parte histológica do projeto.

Ao Prof. Dr. Clóvis Oliveira de Souza por disponibilizar seu laboratório em alguns momentos dos experimentos, assim como a ajuda com materiais.

Aos funcionários do DMP.

Aos amigos feitos durante a pós graduação.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pelo auxílio financeiro nas viagens e congresso.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que fizeram parte desse processo!

Obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença infecciosa provocada por helmintos do gênero *Schistosoma*. Mundialmente cerca de 206 milhões de pessoas são atingidas e 200 mil vão a óbito. No Brasil, somente *S. mansoni* é encontrado e causa a esquistossomose mansônica. O tratamento se restringe a apenas um fármaco, o praziquantel (PZQ), que é utilizado há 43 anos. Porém, casos de vermes com perda de sensibilidade ao fármaco foram relatados e a pesquisa por novas alternativas que auxiliem na terapêutica da doença são necessários. Dessa forma, avaliou-se os efeitos da associação de mentol e mentona em composições definidas, 70% e 30% respectivamente, além de sua complementação ao PZQ, no controle da inflamação durante a fase crônica da doença. Foram realizados experimentos *in vitro*, avaliando a citotoxicidade dos compostos e a produção de óxido nítrico (NO), frente a macrófagos (RAW 264.7), além de 2 experimentos *in vivo*, independentes e distintos. O experimento 1, avaliou mentol+mentona, nas doses de 70 mg/kg e 100 mg/kg por 15 dias e o grupo tratado com PZQ (dose única de 400 mg/kg). O tratamento iniciou-se 45 dias após a infecção e a eutanásia dos animais foi realizada no 61º dia. O experimento 2, avaliou o grupo tratado apenas com mentol+mentona (100 mg/kg) por 13 dias, grupo PZQ (dose única de 100 mg/kg) complementado com 13 dias de mentol+mentona (100 mg/kg), além do grupo tratado somente com PZQ (dose única de 100 mg/kg). Os tratamentos iniciaram-se 40 dias após a infecção e a eutanásia dos animais ocorreu no 55º dia pós infecção. Nos experimentos *in vitro* não houve citotoxicidade e nem produção de óxido nítrico. Para o experimento 1, o tratamento com 100 mg/kg de mentol+mentona, promoveu a redução de ovos nas fezes de 14,3%, redução de 37,8% para vermes adultos de *S. mansoni* e 21,7% de redução dos granulomas hepáticos. Ambos os tratamentos com mentol+mentona reduziram significativamente o número de leucócitos sanguíneos e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) e os eosinófilos. Para a citocina IL-4 houve redução significativa dos níveis em todos os grupos tratados em relação ao controle positivo e para IL-10, somente o grupo tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona diminuiu significativamente em relação ao grupo praziquantel. Foi observado um menor número de granulomas no grupo tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona. O parênquima hepático dos grupos tratados com mentol+mentona apresentaram-se mais preservados, em relação ao controle positivo. Para o experimento 2, os resultados obtidos para redução de número de ovos (14,3%) e vermes adultos de *S. mansoni* (70,8%), foram melhores no grupo PZQ complementado aos compostos. Houve redução significativa de eosinófilos sanguíneos e do LCP somente nos grupos que tiveram mentol+mentona em seu tratamento. Para a quantificação de citocinas IL-10 e IL-4 observamos resultados semelhantes aos do experimento 1. Os resultados sugerem que mentol+mentona em composições definidas, inclusive sua complementação ao tratamento convencional (PZQ), demonstraram propriedades antiparasitárias e sobretudo ação anti-inflamatória, promovendo assim, aumento da proteção do indivíduo infectado frente às complicações da fase crônica durante a esquistossomose mansônica.

**Palavras chave:** Terapêutica; *S. mansoni*; Anti-inflamatório; Antiparasitário; *Mentha x piperita* L.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is an infectious disease caused by helminths of *Schistosoma* genus. Around 206 million people worldwide are infected and 200,000 die. In Brazil, only *S. mansoni* is found and causes mansonic schistosomiasis. The treatment is restricted to only one drug, praziquantel (PZQ), which has been used for 43 years. However, cases of worms with loss of drug sensitivity have been reported and the search for new alternatives that aid in the disease's treatment are necessary. In this way, the effects of the association of menthol and menthone in defined compositions, 70% and 30% respectively, were evaluated, in addition to its complementation to the PZQ, in inflammation during the chronic's phase disease. *In vitro* experiments were performed, evaluating the cytotoxicity of the compounds and the ability to induce the production of nitric oxide (NO) against macrophages (RAW 264.7), in addition to two *in vivo* experiments independent and distinct. Experiment 1 evaluated menthol + menthone at doses of 70 mg/kg and 100 mg/kg for 15 days and the PZQ-treated group (single dose 400 mg/kg). Treatment started 45 days after infection and euthanasia was performed at 61 days post infection. Experiment 2 evaluated the group treated with menthol + menthone (100 mg/kg) for 13 days, PZQ group (single dose 100 mg/kg) supplemented with 13 days of menthol + menthone (100 mg/kg) and the group treated with PZQ alone (single dose of 100 mg/kg). Treatment started 40 days after infection and euthanasia was performed at 55 days post infection. In the *in vitro* experiments, there was no cytotoxicity or nitric oxide production. For the experiment 1, the treatment with 100 mg/kg of menthol + menthone promoted the reduction of eggs in the faeces of 14.3%, reduction of 37.8% for adult worms of *S. mansoni* and 21.7% reduction of hepatic granulomas. Both menthol + menthone treatments significantly reduced the number of blood leukocytes and peritoneal cavity lavage (LPC) and eosinophils. For the IL-4 cytokine, there was a significant reduction in levels in all treated groups compared to the positive control and IL-10, only the group treated with 100 mg/kg of menthol + menthone decreased significantly in relation to the praziquantel group. A lower number of granulomas were observed in the group treated with 100 mg/kg menthol + menthone. The hepatic parenchyma of the groups treated with menthol + menthone were more preserved, in relation to the positive control. For experiment 2, the results obtained to reduce number of eggs (14.3%) and adult worms of *S. mansoni* (70.8%) were better in the PZQ group supplemented to the compounds. There was a significant reduction in blood eosinophils and LPC only in the groups that had menthol + menthone in their treatment. The results suggest that menthol + menthone in defined compositions, including its complementation to conventional treatment (PZQ), demonstrated antiparasitic properties and above all anti-inflammatory action, thus promoting increased protection of the infected individual against the complications of the chronic phase during mansonic schistosomiasis.

**Keywords:** Therapeutics; *S. mansoni*; Anti-inflammatory; Antiparasitic; *Mentha x piperita* L.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição da esquistossomose no mundo .....	4
<b>Figura 2.</b> Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil.....	5
<b>Figura 3.</b> Casal de vermes adultos e ovos de <i>S. mansoni</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> Moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> , hospedeiro intermediário de <i>S. mansoni</i> .....	8
<b>Figura 5.</b> Distribuição espacial de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	9
<b>Figura 6.</b> Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> .....	10
<b>Figura 7.</b> Folhas de <i>Mentha x piperita</i> L. (hortelã-pimenta) e a estrutura queseus principais compostos mentol e mentona .....	15
<b>Figura 8.</b> Delineamento experimental 1 .....	22
<b>Figura 9.</b> Delineamento experimental 2 .....	24
<b>Figura 10.</b> MTT 24 horas.. .....	29
<b>Figura 11.</b> MTT 48 horas.. .....	31
<b>Figura 12.</b> MTT 72 horas.. .....	32
<b>Figura 13.</b> Reação de Griess - 24 horas .....	32
<b>Figura 14.</b> Reação de Griess - 48 horas.....	34
<b>Figura 15.</b> Reação de Griess - 72 horas .....	34
<b>Figura 16.</b> Kato-Katz Experimento 1: Quantificação do número de ovos de <i>S. mansoni</i> (ovos/grama) 61 dias pós-infecção .....	36
<b>Figura 17.</b> Perfusão Experimento 1. Número total de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> recuperados 62 dias após a infecção.....	37
<b>Figura 18.</b> Contagem global e diferencial de leucócitos do lavado da cavidade peritoneal após 62 dias de infecção/ Experimento 1 .....	39
<b>Figura 19.</b> Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos após 62 dias de infecção/ Experimento 1 .....	40
<b>Figura 20.</b> Quantificação das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ / Experimento 1 .....	41
<b>Figura 21.</b> Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (H.E 50X) .....	43
<b>Figura 22.</b> Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (H.E 200X).....	43
<b>Figura 23.</b> Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (T.G 50x) .....	44

<b>Figura 24.</b> Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (T.G 200x).....	<b>44</b>
<b>Figura 25.</b> Kato-Katz Experimento 2: Quantificação do número de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> (ovos/grama) 54 dias pós-infecção .....	<b>47</b>
<b>Figura 26.</b> Perfusão Experimento 2. Número total de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> recuperados 55 dias após a infecção.....	<b>48</b>
<b>Figura 27.</b> Contagem global e diferencial de leucócitos do lavado da cavidade peritoneal após 55 dias de infecção/ Experimento 2.....	<b>50</b>
<b>Figura 28.</b> Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos após 55 dias de infecção/ Experimento 2. ....	<b>51</b>
<b>Figura 29.</b> Quantificação das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ / Experimento 2 .....	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos Experimentais com camundongos Balb/c – Experimento 1 .....	<b>22</b>
<b>Tabela 2.</b> Grupos Experimentais com camundongos Balb/c- Experimento 2.....	<b>23</b>
<b>Tabela 3.</b> Percentagem da eficácia total na infecção dos camundongos- Experimento 1 .....	<b>35</b>
<b>Tabela 4.</b> Percentagem de Redução da carga parasitária (Ovos) – Experimento 1 .....	<b>38</b>
<b>Tabela 5.</b> Percentagem de Redução da carga parasitária (Vermes adultos)- Experimento 1 ..	<b>38</b>
<b>Tabela 6.</b> Quantidade ovos no tecido hepático/ Experimento 1. ....	<b>45</b>
<b>Tabela 7.</b> Quantidade de granulomas no tecido hepático/ Experimento 1. ....	<b>45</b>
<b>Tabela 8.</b> Percentagem da eficácia total na infecção dos camundongos – Experimento 2.....	<b>46</b>
<b>Tabela 9.</b> Percentagem de Redução da carga parasitária (Ovos) – Experimento 2 .....	<b>49</b>
<b>Tabela 10.</b> Percentagem de Redução da carga parasitária (Vermes adultos) – Experimento 2 .....	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Balb/c**- Camundongo albino de linhagem isogênica

**BSA**- *Bovine Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovino)

**C (-)** - Controle negativo

**C (+)** - Controle positivo

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**DGE** - Departamento de Genética e Evolução

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético

**ELISA** - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

**EO** – Óleo essencial

**FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz

**FMRP** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**H.E** – Hematoxilina/Eosina

**IB** – Instituto de Biologia

**IFN- $\gamma$**  – *Interferon gama*

**IL** – Interleucina

**LCP** – Lavado da Cavidade Peritoneal

**LPS** - Lipopolíssacarídeo

**MA** - Mentona

**MO** - Mentol

**MO+MA 100** - Grupo de camundongos submetidos ao tratamento com 100 mg/kg de mentol+mentona por 15 dias no experimento 1 e por 13 dias no experimento 2

**MO+MA 70** - Grupo de camundongos submetidos ao tratamento com 70 mg/kg de mentol+mentona por 15 dias no experimento 1

**MO+MA - 70%** de mentol associado a 30% de mentona

**MTT**- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólio

**NO** - Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub> (-)** - Nitritos

**iNOS** - Isoforma óxido nítrico sintase induzida

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PBS** – *Phosphate buffered saline* (salino tampão fosfato)

**PZQ** – Praziquantel

**PZQ 100** - Grupo de camundongos submetidos ao tratamento com dose única de 100 mg/kg de praziquantel

**PZQ/MO+MA 100** - Grupo de camundongos submetidos ao tratamento com dose única de 100 mg/kg de praziquantel e mais 13 dias de tratamento com 100 mg/kg de mentol+mentona no experimento 2

**SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio (Extran®)

**SEA** – *Soluble Egg Antigen* (Antígenos solúveis dos ovos)

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SEM** – *Standart error mean* (Erro padrão da média)

**T.G** - Tricrômico de Gomori

**TMB** – Tetrametilbenzidina

**WHO** - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contextualização.....	1
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 Esquistossomose .....	3
2.2 Esquistossomose mansônica no Brasil .....	4
2.3 O agente etiológico da esquistossomose mansônica: <i>Schistosoma mansoni</i> .....	5
2.4 O hospedeiro intermediário de <i>Schistosoma mansoni</i> : Moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	7
2.5 Ciclo de transmissão da esquistossomose mansônica.....	9
2.6 Imunopatologia da esquistossomose mansônica.....	11
2.7 Praziquantel (PZQ) .....	13
2.8 <i>Mentha x piperita</i> L. e seus principais constituintes: mentol e mentona.....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 Objetivo geral .....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 Obtenção do mentol e mentona .....	18
4.1.1 Preparo das soluções para tratamento <i>in vitro</i> .....	18
4.2 Experimentos <i>in vitro</i> .....	18
4.2.1 Cultivo de macrófagos (RAW 264.7) .....	18
4.2.2 Teste do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) .....	19
4.2.3 Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante - Reação de Griess .....	19
4.3 Experimentos <i>in vivo</i> .....	20
4.3.1 Animais .....	20
4.3.2 Infecção dos camundongos com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
4.3.3 Tratamento dos camundongos .....	21
4.3.4 Delineamento experimental: Experimento 1 e Experimento 2 .....	21
4.3.5 Quantificação dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Kato-Katz) .....	24

4.3.6	Obtenções do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP).....	25
4.3.7	Quantificação dos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
4.3.8	Grau de redução da carga parasitaria: Ovos e vermes adultos.....	26
4.3.9	Contagem total e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) e do sangue .....	26
4.3.10	Quantificação de citocinas – ELISA ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ) ..	26
4.3.11	Extrações de órgãos.....	27
4.3.12	Estudos histológicos.....	28
<b>5.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
6.1	Resultados <i>in vitro</i> .....	29
6.1.1	Citotoxicidade celular <i>in vitro</i> dos compostos mentol e mentona .....	29
6.1.2	Análise da produção de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos (RAW 264.7) – Determinação de Nitritos (NO <sub>2</sub> -).....	32
6.2	Resultados <i>in vivo</i> - Experimento 1 .....	35
6.2.1	Infecção dos camundongos com <i>S. mansoni</i> .....	35
6.2.2	Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes dos camundongos .....	36
6.2.3	Quantificação de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	37
6.2.4	Grau de redução da carga parasitaria: Ovos e vermes adultos.....	38
6.2.5	Contagem global e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> tratados ou não tratados .....	39
6.2.6	Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos dos camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> tratados ou não tratados.....	40
6.2.7	Quantificação de citocinas do plasma.....	41
6.2.8	Análise histológica do fígado após 62 dias após infecção .....	42
6.3	Resultados <i>in vivo</i> - Experimento 2 .....	46
6.3.1	Infecção dos camundongos com <i>S. mansoni</i> .....	46
6.3.2	Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes dos camundongos .....	47
6.3.3	Quantificação de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	48
6.3.4	Grau de redução da carga parasitaria: Ovos e vermes adultos.....	49

6.3.5 Contagem global e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> tratados ou não tratados .....	50
6.3.6 Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos dos camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> tratados ou não tratados.....	51
6.3.7 Quantificação de citocinas do plasma .....	52
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Contextualização

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta cerca de 206 milhões de pessoas distribuídas em 78 países, sendo que 92% dessas vivem no continente africano. Mundialmente as complicações da esquistossomose levam a óbito cerca de 200 mil pessoas por ano. A doença pode ser encontrada na forma intestinal e urogenital, sendo as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. guineensis* e *S. intercalatum* causadores da forma intestinal e *S. haematobium*, causador da forma urogenital (WHO, 2017). Porém, no Brasil encontramos somente a espécie *S. mansoni*, que além das condições ambientais propícias, encontrou aqui seu hospedeiro intermediário, os moluscos do gênero *Biomphalaria*, sobretudo *B. glabrata*. Esses fatores contribuíram para a disseminação da esquistossomose mansônica no país (KATZ; ALMEIDA 2003; NEVES, 2005; ABATH et al, 2006).

A esquistossomose mansônica afeta cerca de 6 milhões de brasileiros. Dados dos anos de 1996 a 2015 do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS), revelam que 10.628 pessoas vieram a óbito em decorrência das complicações da doença. A doença é considerada endêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado) (COURA; AMARAL, 2004; WHO, 2008a; BRASIL, MS, 2014).

O único fármaco recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o Praziquantel (PZQ), que já é utilizado há 43 anos no tratamento da doença. Apesar de possuir boas taxas de redução da carga parasitária, PZQ não previne reinfecções, não é eficaz na fase aguda da doença e o intenso uso contribui com o surgimento de cepas de vermes com perda de sensibilidade. Dessa forma, a busca por tratamentos alternativos que auxiliem no controle da esquistossomose torna-se necessário (FALLON; DOENHOFF, 1994; RASO et al., 2004; FREZZA, 2013; CIOLI et al., 2014).

A utilização de plantas para o tratamento de doenças é uma prática milenar e transmitida de geração a geração. Alguns estudos demonstraram que *Mentha x piperita* L., conhecida popularmente como hortelã pimenta, possui inúmeras propriedades medicinais, como: antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladoras, analgésicas, anti-inflamatório, anticancerígeno, antiviral, antialérgico e antitumoral (McKAY; BLUMBERG, 2006; TREVISAN et al., 2017). Além dessas, nosso grupo de pesquisa mostrou que o extrato de

*Mentha x piperita* L. e o óleo essencial em cápsula, composto por mentol e mentona, possuem efeitos contra *S. mansoni* no modelo murino (DEJANI et al., 2014; ZAIA et al., 2016; FEITOSA et al., 2018).

Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito de uma formulação constituída somente de mentol e mentona, com concentrações definidas, 70% e 30% respectivamente, durante a fase crônica da esquistossomose murina e também em estudos *in vitro* sobre sua citotoxicidade. Além do mais, buscamos avaliar o potencial anti-inflamatório que esses compostos possuem e que podem complementar o efeito do tratamento convencional realizado com praziquantel. Ao promover uma redução dos processos inflamatórios crônicos, o indivíduo infectado estará menos sujeito a sofrer complicações mais graves devido a doença e que podem leva-lo a óbito.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

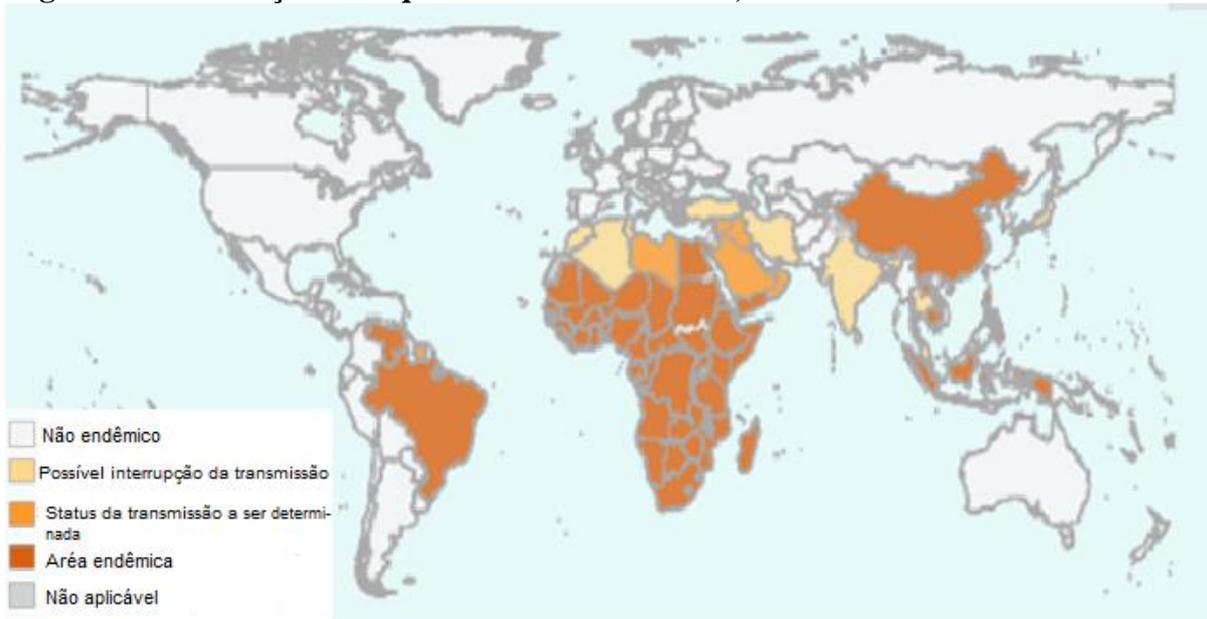
### 2.1 Esquistossomose

Em 1852, Bilhartz descreveu um parasito intravascular ao qual denominou de *Distomum haematobium*, dessa forma a doença ficou conhecida como Bilharzia ou Bilharziose (KATZ; ALMEIDA, 2003). Entretanto, foi em 1858 que Weinland denomina o gênero desse parasita de *Schistosoma*, devido a morfologia do macho dessa espécie que apresenta o corpo fendido, assim, “schito” (fenda) e “soma” (corpo) (NEVES, 2005). O caso mais antigo da doença data de 5 mil anos atrás, pois pesquisadores encontraram ovos de *Schistosoma haematobium* em múmias egípcias, além de encontrarem antígenos do parasita e lesões nos tecidos. Ovos da mesma espécie citada, foram também encontrados em rins de múmias egípcias de cerca de 3 mil anos atrás. Da mesma forma, ovos de *S. japonicum* foram encontradas em múmias chinesas de cerca de 2.100 anos (RUFFER, 1910; GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2003).

Os maiores grupos afetados pela esquistossomose são populações com condições sanitárias precárias, para as quais o acesso ao saneamento básico adequado não existe ou ainda está em desenvolvimento. Os riscos de contaminação aumentam em pessoas que entram em contato com águas contaminadas com cercárias do parasita, devido às atividades rotineiras agrícolas, domésticas, ocupacionais ou recreativas, além da higiene inadequada. Ademais, pessoas imunodeprimidas, ou seja, que já estão afetadas por doenças como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), neoplasias ou insuficiência renal, são mais suscetíveis à infecção e desenvolvem quadros graves da doença por ter seu sistema imune comprometido (REY, 2008; PALMEIRA et al., 2010; SHOLTE et al., 2014; BRASIL, MS, 2014; WHO, 2017).

Um fator que colabora para a incidência da doença são as migrações para áreas urbanas, movimentos populacionais e o número crescente de turistas, que acabam introduzindo a doença em novas áreas. A doença é endêmica em 78 países, e a forma intestinal da doença atinge áreas como África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela, Suriname, China, Indonésia, Filipinas e Distritos do Camboja. A forma urogenital está presente na África, Médio Oriente e Córsega (França) (WHO, 2017). O mapa de distribuição da esquistossomose pelo mundo, pode ser observado na Figura 1:

**Figura 1- Distribuição da esquistossomose no mundo, 2016**



Mapa mundial da distribuição geográfica da esquistossomose. O mapa aborda locais não endêmicos, locais que necessitam de confirmação da interrupção na transmissão da doença, locais com o status de transmissão da doença não determinado e locais endêmicos para a esquistossomose. Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

## 2.2 Esquistossomose mansônica no Brasil

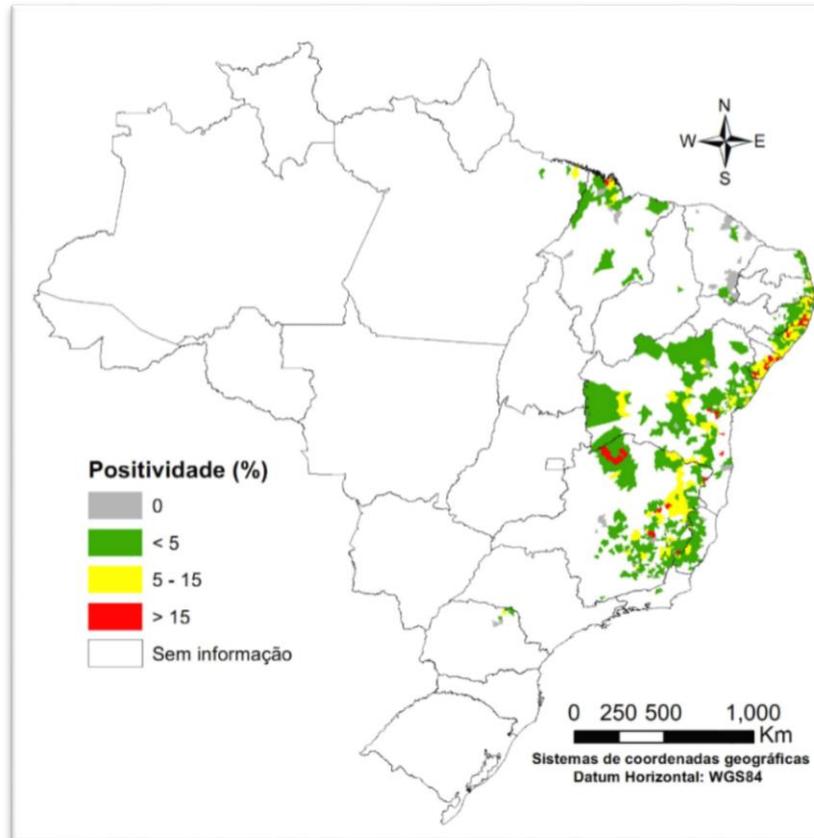
Acredita-se que durante o tráfico de escravos e imigrantes orientais e asiáticos, as espécies *S. mansoni*, *japonicum* e *haematobium* chegaram às Américas. Entretanto, somente *S. mansoni* adaptou-se ao Brasil devido as condições ambientais e ao encontro de seu hospedeiro intermediário, os moluscos do gênero *Biomphalaria*. O *Schistosoma mansoni* foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1908 pelo médico Pirajá da Silva (KATZ; ALMEIDA 2003; NEVES, 2005; ABATH et al, 2006).

No Brasil, cerca de 6 milhões de pessoas encontram-se afetadas pela esquistossomose mansônica (WHO, 2008). Foram registrados pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN), 129.509 casos, entre os anos de 2007 a 2015. Em 2009, dados da Secretária do Estado da Saúde de São Paulo (SESSP) revelaram que a esquistossomose mansônica causa mais óbitos que a dengue, leishmaniose visceral e malária no Brasil (SESSP, 2009).

A doença é considerada endêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). Focos são encontrados em Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no

Distrito Federal (COURA; AMARAL, 2004). A Figura 2 mostra a distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil.

**Figura 2- Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil**



O mapa apresenta a distribuição da esquistossomose mansônica de acordo com a faixa de positividade por município. Fonte: OMS, 2015.

### 2.3 O agente etiológico da esquistossomose mansônica: *Schistosoma mansoni*

A espécie *Schistosoma mansoni* foi descrita e nomeada pelo médico inglês Louis Sambon em 1907. Este nome foi uma homenagem a Patrick Manson, importante médico que fez grandes descobertas na parasitologia (KATZ; ALMEIDA, 2003; COURA; AMARAL, 2004).

O parasito *S. mansoni* é um platelminto classificado como trematódeo intravascular (classe Trematoda), subclasse Digenea e família Schistosomatidae. Apresentam sexos separados e um acentuado dimorfismo sexual, o que os distingue das outras espécies pertencentes a Digenea (REY, 2008).

O macho é de cor branca, mede aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,11 cm de largura. Enquanto a fêmea tem um corpo mais longo e mais fino que o do macho, mede em

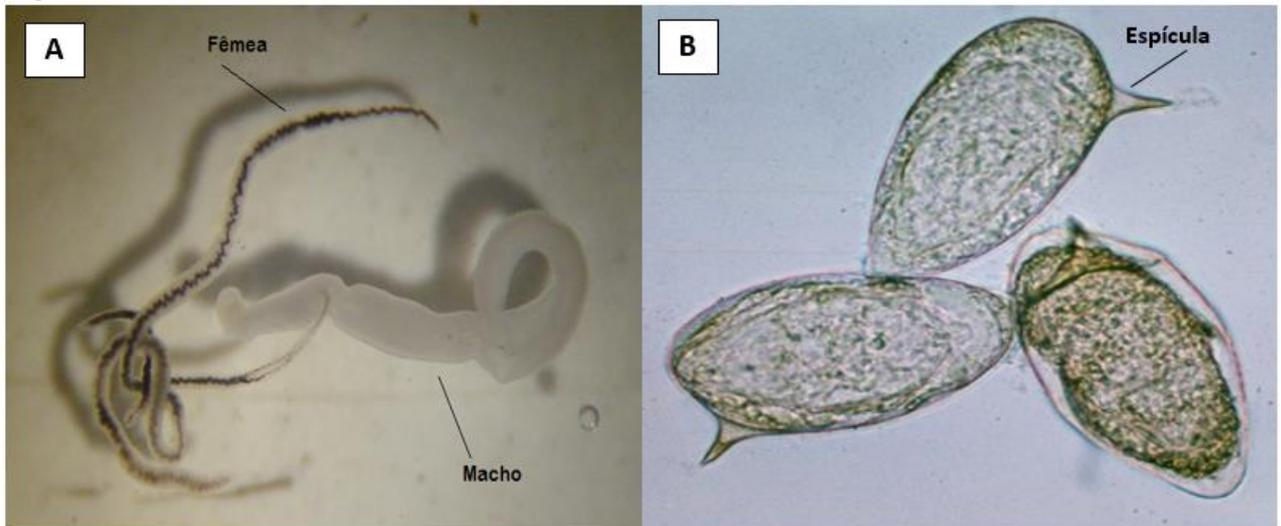
média 1,2 cm de comprimento e 0,016 cm de largura. As fêmeas apresentam coloração acinzentada, mais escura que o do macho (REY, 2008). O corpo do macho possui um sulco, denominado, canal ginecóforo, onde a fêmea se aloja (GRYSSELS et al, 2006; REY, 2008).

Os vermes adultos possuem tegumento como revestimento externo, que se apresenta, sobretudo nos machos, em vários e pequenos tubérculos, que se faz mais abundante na superfície dorsal (REY, 2008). O tegumento está envolvido em diversos processos metabólicos como a nutrição, regulação osmótica e ainda como barreira ao sistema imune do hospedeiro (VAN HALLEMOND et al., 2006). Através do tegumento e por transporte passivo algumas proteínas do hospedeiro são incorporadas ao verme, que assim pode passar despercebido do sistema imune de seu hospedeiro (BRASCHI et al., 2006).

A nutrição ocorre por meio do sangue e globulinas, porém, para carboidratos e aminoácidos, a nutrição ocorre por absorção no tegumento, onde se encontram transportadores de nutrientes. O tubo digestivo do *S. mansoni* é incompleto, ou seja, suas excretas são regurgitadas no sangue do hospedeiro (REY, 2008; GRYSSELS et al, 2006).

Os ovos da espécie *S. mansoni* são característicos por possuírem uma espinha lateral, denominada espícula e medem de 110 a 180 µm de comprimento por 45 a 70 µm de largura. As fêmeas ovipõem cerca de 300 ovos por dia, das quais a maioria é eliminado junto as fezes do hospedeiro, porém alguns ficam retidos na mucosa instestinal e nos capilares do sistema portal do mesmo (VAN DER WERF et al, 2003; REY, 2008). Os vermes adultos de *S. mansoni*, assim como os ovos, podem ser observados na Figura 3-A e 3-B.

**Figura 3- Casal de vermes adultos e ovos de *S. mansoni***



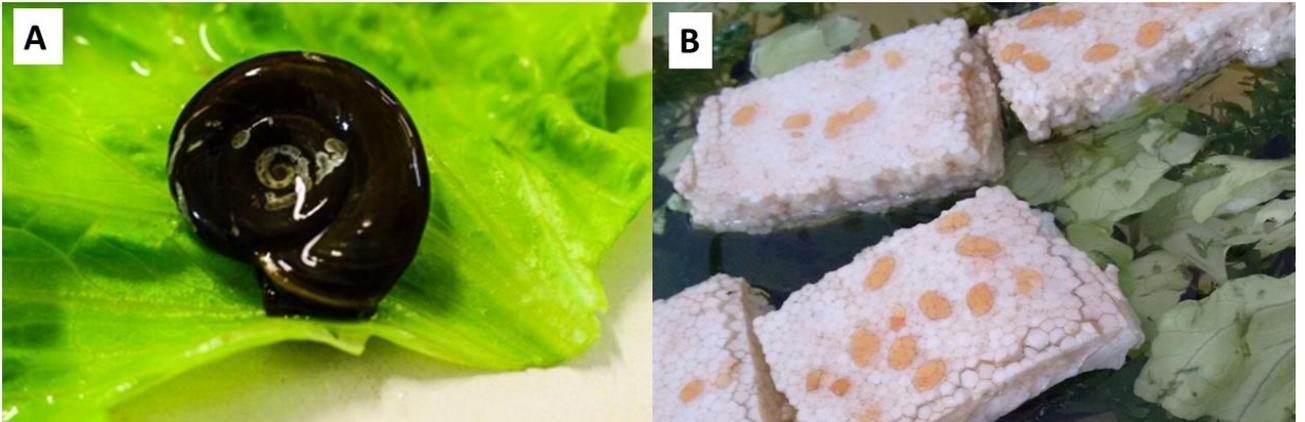
A espécie *S. mansoni* apresenta acentuado dimorfismo sexual, assim, a fêmea apresenta-se maior e mais fina quando comparada ao macho e com coloração acinzentada, já o macho apresenta-se menor, com coloração branca e presença do chamado canal ginecóforo, onde a fêmea se aloja. Os ovos são característicos da espécie devido à presença da espícula lateral. **A:** Fêmea e macho de *S. mansoni*. **B:** Ovos de *S. mansoni*. Fonte: CDC images e Banco de imagens Xistose.

#### **2.4 O hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*: Moluscos *Biomphalaria* sp**

Para completar o ciclo biológico de *S. mansoni* é indispensável seu hospedeiro intermediário: moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, das 10 espécies descritas na literatura, são encontradas três espécies suscetíveis à infecção natural por *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Os *Biomphalaria*s podem atingir 40 mm de diâmetro e 11 mm de largura, são os maiores moluscos da família Planorbídeos e vivem em águas paradas ou com fraca correnteza (BEZERRA, 2000; REY, 2008).

A espécie *B. glabrata* (Figura 4-A) é amplamente distribuída no território brasileiro, possibilitando assim a grande difusão da esquistossomose pelo território nacional, além disso, é dita como a mais adaptada ao helminto *S. mansoni* devido a altas taxas de infecção e eficiência na transmissão (CARVALHO et al, 2008). Durante a reprodução, os moluscos, depositam cápsulas contendo os ovos envoltos em uma substância gelatinosa de cor amarelada transparente (Figura 4-B). Em cada cápsula podemos encontrar de 1 a mais de 100 ovos que em temperatura média de 26°C, eclodem em sete dias, e em torno de 30 dias após a eclosão, alcançam a maturidade sexual. São hermafroditas e possuem capacidade de entrar em estágio fisiológico vegetativo em períodos de seca. Essas são características que possibilitam a expansão e preservação da espécie para outros habitats (TUAN, 2009).

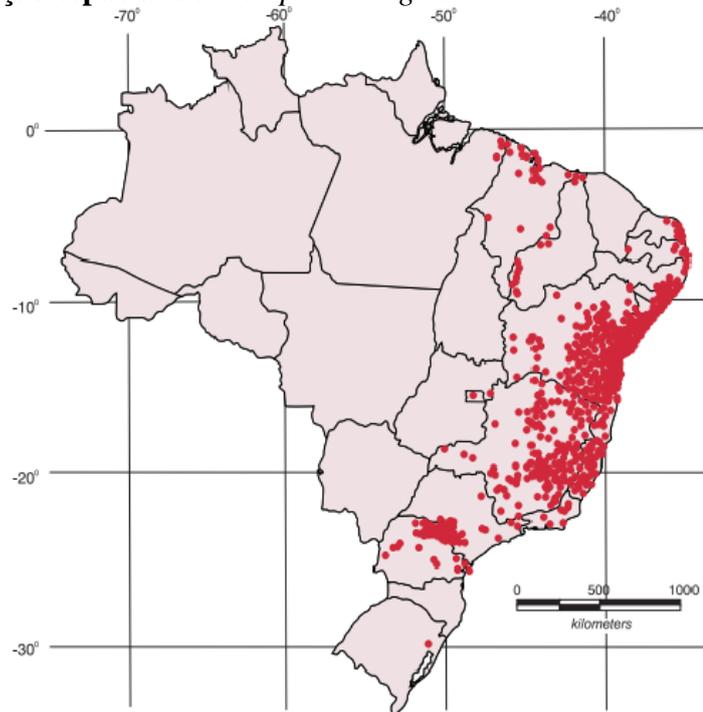
**Figura 4-** Moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *S. mansoni*



*B. glabrata* é a espécie mais adaptada à infecção natural ao *S. mansoni*. Vivem em águas paradas ou com fraca correnteza. **A:** Exemplar da espécie *B. glabrata*; **B:** Cápsulas contendo ovos envoltos em uma substância gelatinosa de cor amarelada transparente. Fonte: Arquivo pessoal.

O molusco *B. glabrata* ocorre em locais com incidência da esquistossomose mansônica (Figura 5). A distribuição da espécie *B. glabrata* abrange uma ampla faixa em várias áreas: Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe, linha costeira, além do Distrito Federal (BEZERRA, 2000; CARVALHO et al, 2008).

**Figura 5- Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata***

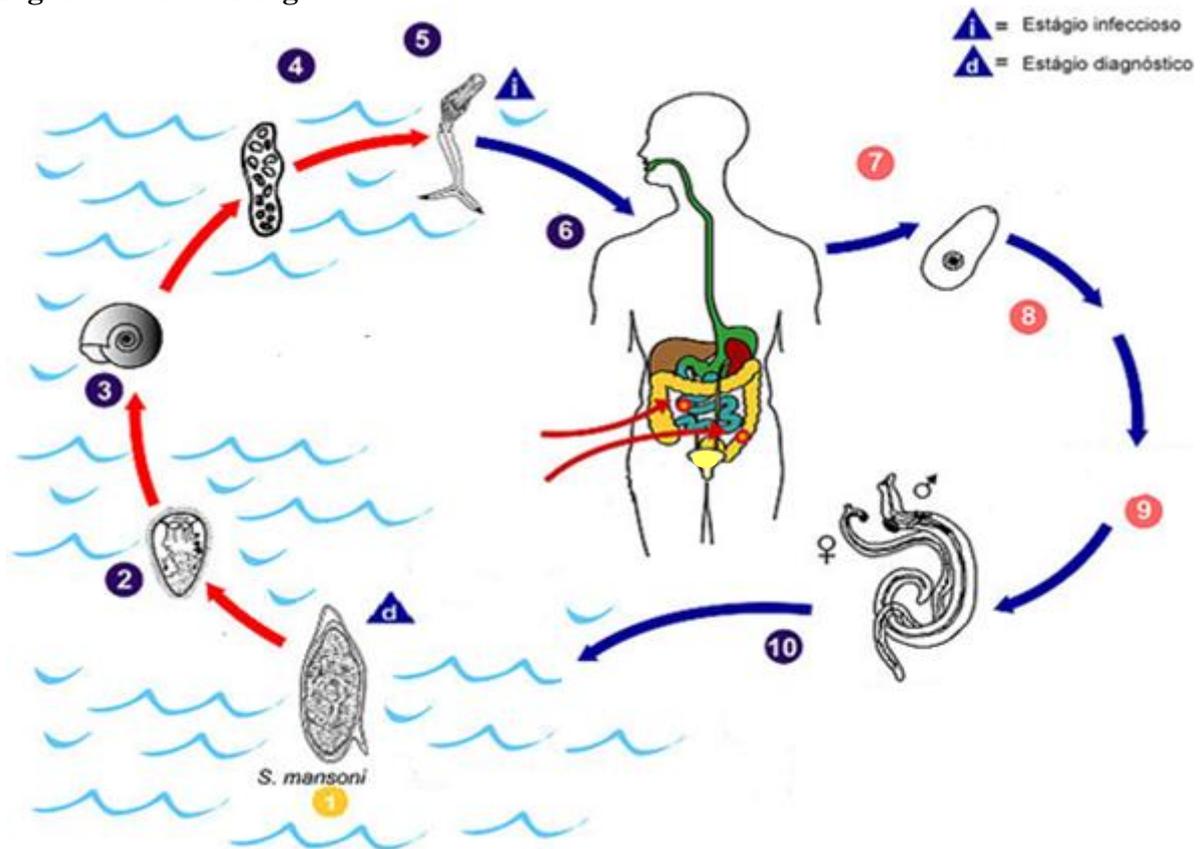


As áreas de distribuição de *B. glabrata* coincidem com os locais endêmicos e focos para a esquistossomose mansônica no Brasil. Fonte: Carvalho et al., 2004.

## 2.5 Ciclo de transmissão da esquistossomose mansônica

O ciclo biológico do *S. mansoni* (Figura 6) é do tipo heteroxênico, ou seja, é necessário um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo (ABATH et al, 2006). Envolve cinco formas e estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*: ovos, miracídio, esporocisto (desenvolve no hospedeiro invertebrado), cercária (forma infectante ao hospedeiro vertebrado), esquistossômulo e vermes adultos (macho e fêmea) (NEVES, 2005).

Figura 6- Ciclo biológico do *S. mansoni*



(1) Os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo. (2) Os miracídeos eclodem dos ovos e nadam livremente em busca do hospedeiro intermediário; (3) Os miracídeos penetram no molusco de gênero *Biomphalaria* sp. (4) No molusco, os miracídeos sofrem alterações morfológicas e multiplicam-se. (5) Cercárias são eliminadas do hospedeiro intermediário, sendo a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. (6) Cercárias penetram ativamente na pele do hospedeiro definitivo. (7) Durante a penetração, as cercárias perdem sua cauda bifurcada e são denominadas de esquistossômulos. (8) Os esquistossômulos ganham a circulação e migram para diferentes órgãos, como pulmão, intestino e fígado. (9) Após aproximadamente cinco semanas os esquistossômulos transformam-se em vermes adultos no sistema porta-hepático. (10) Os casais de vermes migram para as veias mesentéricas, onde inicia-se a oviposição. Parte dos ovos ganham a circulação do hospedeiro, enquanto outros, são eliminados em suas fezes. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Os caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, sobretudo *B. glabrata*, possibilitam a reprodução assexuada do helminto formando a cercária, fase infectante para o homem, que é o principal hospedeiro definitivo do parasita, possibilitando a sua reprodução de forma sexuada (OLIVEIRA; SANTOS, 2002;)

A transmissão inicia-se quando o hospedeiro definitivo elimina em suas fezes ovos do *S. mansoni* na água, permitindo assim que as larvas ciliadas denominadas miracídeos eclodam

(CIMERMAN; CIMERMAN, 2010). Essa é a forma infectante para o hospedeiro intermediário.

Os miracídios, então, nadam ativamente e penetram nos moluscos e após 48h, perdem sua mobilidade, ao perder seus cílios, e transformam-se em esporocistos primários. Este origina os esporocistos secundários que se reproduzem por divisão binária. Após 25 a 35 dias, esses esporocistos dão origem as cercárias. Um miracídio gera aproximadamente 100.000 cercárias (SOUZA et al., 2011). A cercária é a forma infectante para o hospedeiro definitivo.

As cercárias saem do tecido mole do molusco, ganhando o ambiente aquático. Nesse ambiente, elas podem sobreviver por até dois dias. Ao encontrar o hospedeiro definitivo penetram ativamente através da pele, perdendo sua cauda bifurcada e transformando-se em esquistossômulos, assim, inicia-se o processo infeccioso (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; PARISE-FILHO; SILVEIRA, 2001).

Os esquistossômulos migram via circulação sanguínea e linfática para o coração, pulmão, fígado e veias mesentéricas, onde alcançam a maturidade em 28 a 48 dias após a penetração. No fígado ocorre o processo de maturação sexual, onde o macho e fêmea copulam e após, migram para as veias mesentéricas inferiores onde a fêmea inicia a oviposição (COUTINHO; DOMINGUES, 1993; CARVALHO et al., 2005). O ciclo biológico se completa quando após aproximadamente 45 dias o hospedeiro definitivo passa a eliminar ovos em suas fezes (PARISE-FILHO; SILVEIRA, 2001).

## **2.6 Imunopatologia da esquistossomose mansônica**

A esquistossomose pode ser classificada em fase aguda e fase crônica. É durante a fase aguda que podem ocorrer as alergias, urticárias e lesões maculopapulosas, as chamadas dermatites cercariana, causadas pela penetração via cutânea das cercárias, essas manifestações são típicas em uma infecção primária, comum em turistas e imigrantes (KATZ; ALMEIDA, 2003; BURKE et al, 2009). Porém, a fase aguda pode se apresentar de forma assintomática, e ser confundida com outras patologias, principalmente em casos de reinfecção (GRYSEELS et al., 2006).

A fase crônica, inicia-se aproximadamente seis meses após infecção, e pode durar vários anos. Relaciona-se principalmente com a localização dos vermes e a quantidade de ovos que ficam presos aos tecidos, principalmente no fígado, levando a hipertensão portal e processos fibróticos (BARBOSA, 2001; CIMERMAN; CIMERMAN, 2010).

A fibrose decorre dos processos granulomatosos, que por sua vez, são resultados de antígenos secretados pelos próprios ovos (SEA-Soluble Egg Antigen). Os granulomas destroem os ovos, porém esta reação leva à formação de fibras de colágeno e o seu acúmulo resulta na chamada fibrose (ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006). Os granulomas são compostos principalmente por macrófagos, eosinófilos e linfócitos (CHEEVER et al., 2002). Além da fibrose hepática e hipertensão portal, complicações como hepatoesplenomegalia e ascite relacionam-se com a morbidade da esquistossomose mansônica (VAN der WERF et al., 2003).

O estágio inicial da infecção é caracterizado por resposta imunológica tipo Th1, produzindo citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-6, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que agem principalmente contra a migração dos esquistossômulos e das formas imaturas do verme. Devido a oviposição e aos antígenos liberados pelos ovos, a resposta Th1 é modulada e predomina uma resposta tipo Th2, produzindo citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (MACDONALD, 2002; BURKE et al., 2009; CHUAH et al., 2014). A citocina IL-4 possui papel importante, pois induz a diferenciação de linfócitos B, para que esses produzam IgG e IgE que são anticorpos que atuam na resposta imunológica anti-helmíntica (SILVEIRA-LEMO, 2008; SOMMER; WHITE, 2010). É relacionada à reação granulomatosa e pode regular a deposição de ovos nos tecidos (FALLON, 2000).

Após a fase inicial crônica, a resposta Th2 deve ser modulada, para que os processos fibróticos e a morbidade crônica não se intensifiquem (PEARCE; MACDONALD, 2002). A IL-13 é a principal citocina responsável pelo desenvolvimento das formas graves de fibrose (FALLON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Assim, a produção de IL-10 possui um importante papel durante esquistossomose, esta é descrita como protetora, pois impede a progressão da doença em formas mais graves, regulando o tamanho e a formação dos granulomas (SOUZA et al., 2011).

As respostas imunes tipo Th1 e Th2, regulam-se reciprocamente, pois a citocina IL-4 inibe produção de citocinas Th1, enquanto a citocina IFN- $\gamma$  inibe produção de citocinas Th2. Esse balanço entre as respostas é importante, pois o predomínio de somente um dos perfis pode ser prejudicial e letal para o hospedeiro (PEARCE; MACDONALD, 2002).

## 2.7 Praziquantel (PZQ)

Praziquantel é um fármaco pertencente à classe das pirazinoisoquinolonas. A empresa farmacêutica Merck da Alemanha foi a responsável pela sua síntese. Inicialmente, em 1970, PZQ seria destinado ao uso como calmante e tranquilizante. Nessa mesma década, em 1975, as propriedades antihelmínticas do PZQ foram confirmadas pela Bayer. E em 1978, PZQ passou a ser comercializado internacionalmente com o nome de Biltricide (THOMAS; GONNERT, 1977; XIAO; CATTO; WEBSTER, 1985).

PZQ tem sido amplamente utilizado contra trematódeos e cestóides e é o único fármaco recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para o tratamento da esquistossomose. Isso deve-se ao seu baixo custo, por ser um tratamento realizado em uma única dose e por ser ativo contra as cinco espécies causadoras da esquistossomose. Além disso, possui poucas reações adversas e é considerado seguro quando usado por mulheres grávidas ou que estão amamentando (CHAI, 2013; CIOLI et al., 2014).

O mecanismo de ação do PZQ contra o verme decorre de alterações morfológicas e fisiológicas como, aumento da atividade motora, seguido de contrações musculares e formação de vesículas no tegumento, devido a capacidade do medicamento em alterar o equilíbrio de íons de cálcio nas células do verme e através da desregulação de bombas de sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) (XIAO; CATTO; WEBSTER, 1985). As contrações musculares fazem com que os vermes percam a capacidade de fixação, e assim são arrastados para o fígado, onde reações inflamatórias ocorrem. A formação de vesículas, desestabilizam o tegumento do verme e faz com que morram imediatamente ou que haja exposição de seus antígenos, levando o sistema imune do hospedeiro a reconhecê-los e eliminá-los (GREENBERG, 2005; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; CHAI, 2013).

A OMS recomenda uma dose única de 40 mg/kg de PZQ para o tratamento contra *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. intercalatum* e uma dose única de 60 mg/kg para *S. japonicum* e *S. mekongi* (WHO, 2017; WHO, 2008b). Em modelos experimentais murinos, costuma-se utilizar a dose de 400 mg/kg de PZQ devido ao intenso metabolismo dos roedores, essa dose foi utilizada para o experimento 1, entretanto, para o experimento 2, escolhemos uma dose menor (100 mg/kg) pois assim, seria possível avaliar a ação da complementação da associação dos compostos mentol e mentona ao tratamento com PZQ.

Em 2016, foram 88 milhões de pessoas tratadas para a esquistossomose no mundo, entretanto, esse número representa apenas 35,6% de toda população que necessita de tratamento (WHO, 2017; WHO, 2008b). Quando usado corretamente, o tratamento com PZQ

possui uma taxa de cura de 60-90% contra *S. mansoni* e de 75-85% para *S. haematobium* (RASO et al., 2004; CIOLI et al., 2014).

Apesar de suas vantagens, algumas limitações do praziquantel devem ser levadas em consideração. O Praziquantel não possui uma boa eficácia quando administrado nos primeiros dias de infecção, por não agir ou agir pouco sobre as formas imaturas do verme (GRYSEELS et al. 2001). O uso recorrente do tratamento, principalmente em áreas endêmicas para a doença, leva a outro problema, casos de linhagens com perda de sensibilidade ao fármaco (FALLON; DOENHOFF 1994; FREZZA, 2013). O tratamento de infectados com PZQ no surto de esquistossomose mansônica em Senegal, revelou taxas de curas reduzidas, entre 18% a 36%. No Egito, foram relatados casos sem cura, mesmo após três doses de PZQ (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

## **2.8 *Mentha x piperita* L. e seus principais constituintes: mentol e mentona**

A utilização de plantas medicinais é uma alternativa à medicina tradicional, é uma prática popular, já que os conhecimentos sobre o uso das plantas ou partes da mesma, para o tratamento ou prevenção de doenças, é passado de geração em geração (ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012).

Vários estudos científicos buscam nas plantas medicinais propriedades que possam auxiliar na terapêutica da esquistossomose. O estudo *in vitro* de De Almeida et al (2016) demonstra as propriedades contra vermes adultos de *S. mansoni* dos extratos brutos de *Artemisia absinthium* e *Tanacetum parthenium*. O estudo *in vivo* de El-Deen, Brakat e Mohamed (2017) mostrou a ação antifibrótica do extrato de folhas de alcachofra, além da redução no tamanho dos granulomas hepáticos. Além dessas plantas, *Eremanthus goyazesis*, *Milletia thoningi* e *Berheya speciosa* mostraram bons resultados na terapêutica contra esquistossomose (CASTRO et al., 2013).

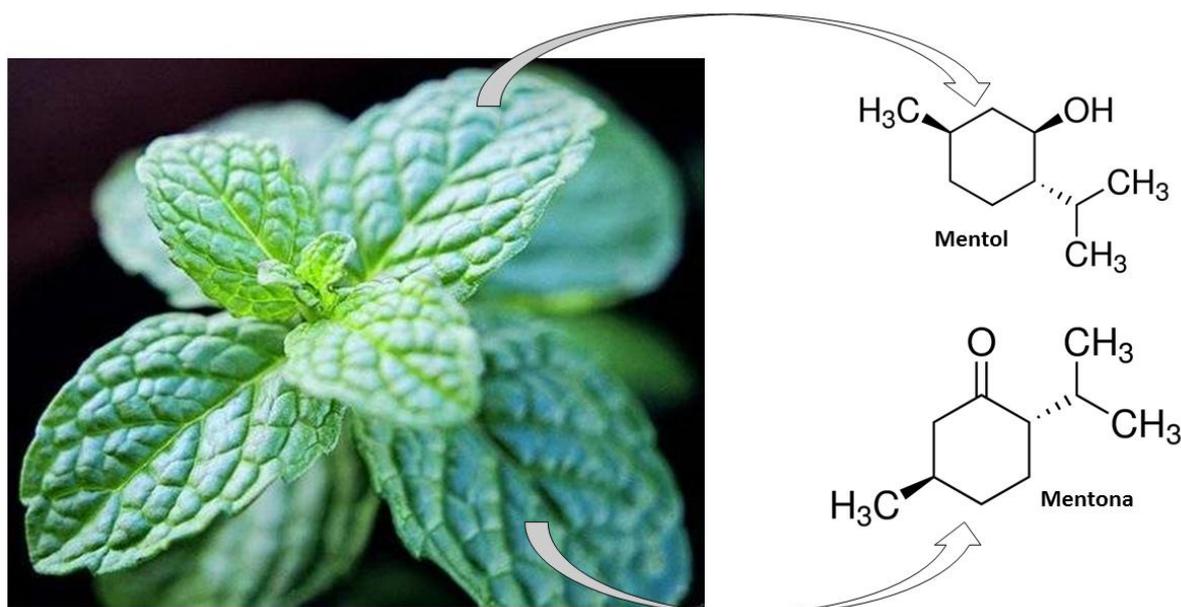
O gênero *Mentha* compreende a aproximadamente 30 espécies diferentes de plantas, que são conhecidas popularmente no Brasil, como hortelãs ou mentas. Pertencem à família *Lamiaceae* e ordem *Tubiflorae* (DORMAN et al., 2003). São distribuídas em todo mundo e possuem como origem, a Europa meridional e a região do Mediterrâneo (LORENZI; MATOS, 2002).

As espécies mais utilizadas popularmente são: *Mentha spicata* L., *Mentha rotundifolia*, *Mentha citrata*, *Mentha crispa* L.; *Mentha arvensis* e a *Mentha x piperita* L., a mais famosa das hortelãs. Essas espécies se diferenciam através de sua morfologia e pela

quantidade e composição dos óleos essenciais (OE) produzidos (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA et al., 2006).

*Mentha x piperita* L. é uma planta conhecida popularmente como hortelã-pimenta, menta ou hortelã-apimentada (Figura 7). Seu uso medicinal é recomendado para o tratamento de náuseas, cólicas gastrointestinais, flatulências, cálculos biliares, icterícia, ansiedade, expectoração e expulsão de vermes intestinais (LORENZI; MATOS, 2002). Propriedades antinociceptivos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, anticancerígenos, antiviral, antialérgico e antitumoral, demonstram a utilidade de *M. x piperita* para o tratamento ou prevenção de diversas doenças (TREVISAN et al., 2017). Além dessas características, nosso grupo por meio de Dejana (2014), em modelo murino infectado com *S. mansoni*, demonstrou as propriedades imunomoduladoras e antiparasitárias do extrato bruto de *Mentha x piperita* L.

**Figura 7- Folhas de *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta) e a estrutura química de seus principais compostos mentol e mentona**



*Mentha x piperita* L é a espécie do gênero *Mentha*, com maior percentual de mentol e mentona em seu óleo essencial. Fonte: Adaptado de: <https://thenutritioncoach.wordpress.com/2009/06/18/oleo-de-menta-peppermint-ou-mentha-piperita-l/>. Acesso em 05 de janeiro de 2018.

Os principais constituintes do OE do gênero *Mentha* são: mentona, metil acetato, mentol, pulegona, 1,8 cineol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -canofileno,  $\beta$ -pineno, geraniol, limoneno e L-linalol. Entretanto, mentol e mentona são os componentes considerados de maior importância e *M. x piperita* recebe destaque como uma das maiores produtoras desses compostos (LORENZI; MATOS, 2002; KUMAR et al., 2011).

O sítio da biossíntese dos óleos essenciais em *Mentha x piperita* L. está localizado especificamente nas células secretoras dos tricomas glandulares. Os óleos essenciais extraídos da *Mentha x piperita* L. são constituídos principalmente de mentol (30-55%), mentona (14-32%), baixos teores de pulegona (4%), mentofurano (1-9%) e de acetato de mentila (2,8-10%) (SCRAVONI et al., 2006; PEGORARO et al., 2010; BEHN et al., 2010).

Mentol e mentona são classificados como monoterpenos. Através da ação da enzima citoplasmática mentona redutase, mentol é originado a partir da mentona (DAVIS et al., 2005; CROTEAU et al., 2005; PATEL et al., 2007). Mentol está incluso em produtos cosméticos, de limpeza, farmacêuticos, alimentícios e de higiene pessoal. Porém, também possui propriedades medicinais, como atividade antibacteriana, analgésica, antifúngica e até anticancerígena. A mentona é muito utilizada na indústria de perfumes e aromatizantes e também está inclusa em produtos de limpeza, higiene, remédios e alimentos (PATEL et al., 2007; PAULUS et al., 2007; ALANKAR, 2009; KAMATOU et al., 2013).

Alguns estudos vêm demonstrando os potenciais efeitos e usos de mentol e mentona. O estudo de Cortellini (2017), mostra resultados promissores no uso de mentol como tratamento tópico para neuropatia periférica, provocada pela quimioterapia nos tratamentos contra o câncer; O estudo de Wright et al (2017), demonstra o uso de mentol como analgésico nos tratamentos que utilizam terapia fotodinâmica; Xue et al (2015), mostra o potencial efeito antidepressivo da mentona *in vivo*; e nosso grupo por meio de Zaia et al (2016) demonstraram que a cápsula de óleo essencial de *Mentha x piperita* L., composta apenas por mentol e mentona, possui propriedades anti-inflamatórias e seu tratamento prolongado pode auxiliar no tratamento da esquistossomose mansônica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar a citotoxicidade da associação de mentol e mentona e a produção ou não de óxido nítrico pelos macrófagos (RAW 264.7) pós exposição aos compostos. Além de, avaliar o efeito da associação dos compostos, assim como sua complementação ao tratamento com praziquantel para o controle da inflamação durante esquistossomose mansônica murina (Balb/c).

#### 3.2 Objetivos específicos

##### 1º) Experimentos *In vitro*

- Realização do ensaio de citotoxicidade em macrófagos frente à exposição ao mentol + mentona em diversas concentrações;
- Avaliação do efeito na produção de óxido nítrico pelos macrófagos pós exposição a diversas concentrações de mentol + mentona.

##### 2º) Experimentos *In vivo*

- Avaliação da carga parasitária em camundongos submetidos ou não aos diferentes tratamentos (contagem de ovos nas fezes e contagem de vermes adultos no sistema porta-hepático e mesentérico);
- Contagem celular total e diferencial do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP);
- Quantificação das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no plasma dos camundongos;
- Avaliação do infiltrado celular e deposição de colágeno no fígado dos animais tratados ou não através de análise histológica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção do mentol e mentona**

Os compostos Mentol (Lote BCBK8909V) e mentona (Lote MKBQ7806V), utilizados na parte *in vitro* e *in vivo* do presente estudo, foram obtidos a partir da Sigma Aldrich. Todos os tratamentos foram realizados buscando uma composição final de 70% de mentol e 30% de mentona.

#### **4.1.1 Preparo das soluções para tratamento *in vitro***

Foi preparado uma solução mãe na concentração de 15.000 µg/mL constituída de 70% de mentol diluído em 5% de DMSO e 30% de mentona, sendo o volume final de 5 mL ajustado com meio de cultura DMEM. A partir da solução mãe foram realizadas as concentrações de: 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL. Sendo que a concentração máxima de DMSO utilizada nas concentrações testadas *in vitro* foi de menos de 1%.

### **4.2 Experimentos *in vitro***

#### **4.2.1 Cultivo de macrófagos (RAW 264.7)**

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando macrófagos de camundongos Balb/c da linhagem RAW 264.7. Os macrófagos foram escolhidos por serem considerados primeira linha de defesa do nosso organismo frente à uma inflamação, participam ativamente da fagocitose, são apresentadores de antígenos (AG), secretam citocinas pró inflamatórias e produzem óxido nítrico (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

A linhagem RAW 264.7 foi cultivada em garrafas para cultivo celular, contendo meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Estreptomicina/Penicilina (0,1 g/L), em estufa sob tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. O meio foi trocado de acordo com a necessidade celular, assim como a realização do repique celular, até obter quantidade suficiente de células para a realização dos testes.

#### 4.2.2 Teste do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano (*Global Trade Technology*) onde foram distribuídos 200µL (concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço) de células (macrófagos RAW 264.7) dispersas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina (Sigma-Aldrich).

As placas foram incubadas em estufa sob tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a aderência dos macrófagos, esses foram expostos a diferentes concentrações da solução de mentol e mentona: 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL dispersos em meio de cultura. Também foram feitos poços para o controle negativo (células + meio de cultura), controle positivo (SDS 10%) e DMSO (meio de cultura + 1% de DMSO), além de poços com macrófagos expostos a 100ng/mL de LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co, EUA) para o teste de reação de Griess. O teste foi realizado em sextuplicata e as placas incubadas por 24, 48 e 72hs a 37°C, em estufa sob tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>.

O sobrenadante foi descartado e foram adicionadas 100µL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich) a 1mg/mL em meio DMEM sem suplementação e incubadas nas mesmas condições anteriores por três horas. O sobrenadante foi descartado e a cada poço foi adicionado 100µL de álcool isopropílico para a solubilização dos cristais de formazana formados. A leitura da densidade óptica (absorbância) foi determinada em leitora de placas (TP-Reader NM) em comprimento de onda de 540nm, com filtro de referência de 620nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade (MOSMANN, 1983).

#### 4.2.3 Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante - Reação de Griess

O óxido nítrico foi quantificado indiretamente pelo acúmulo de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no meio de cultura e utilizando o reagente de Griess, contendo nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) como padrão, de acordo com literatura (GREEN et al., 1982). Os testes foram realizados em triplicata.

Foram retiradas do teste de MTT, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes de cada poço contendo concentrações diferentes das soluções de mentol e mentona, controle negativo e controle positivo LPS, que foi usado como agente estimulante para a produção de óxido

nítrico. Os sobrenadantes foram transferidos para outra placa e então adicionado a cada poço 50 µL de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%. Após 10 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV /Visível de microplacas com comprimento de onda de 540nm (TP-Reader NM). A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares de NaNO<sub>2</sub> em meio DMEM incompleto.

### **4.3 Experimentos *In vivo***

#### **4.3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, pesando entre 15 e 18 gramas, provenientes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Todo o delineamento experimental desse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, protocolo nº 5576230616 (anexo).

Os animais foram alocados com livre acesso a água e ração para roedores no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

#### **4.3.2 Infecção dos camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni***

A infecção foi realizada a partir de cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH (oriunda de Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil) retiradas de caramujos *Biomphalaria glabrata* mantidos no moluscário do Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp, sob responsabilidade da Profa. Dra. Silmara Marques Alegretti.

Camundongos de linhagem Balb/c fêmeas, foram infectados com aproximadamente 80 cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH utilizando a técnica de imersão caudal durante duas horas com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28°C, de acordo com o protocolo descrito por Olivier & Stirewalt (1952). Após duas horas de exposição da cauda de cada animal à 80 cercárias previamente contadas, foram realizadas novas contagens com auxílio de uma lupa estereoscópica, que nos permitiram definir quantas cercárias penetraram ativamente nos camundongos.

### **4.3.3 Tratamento dos camundongos**

A média de peso e a quantidade de animais de cada grupo foi utilizada para os cálculos das doses de cada tratamento, que foi realizado via gavagem, sendo o método de aplicação de substâncias líquidas de forma oral (TURNER et al., 2011). Para isso, foi utilizada uma cânula de aço-inoxidável apropriada acoplada a uma seringa, sendo administrado um volume final de 200 µL das soluções, todos os dias durante o tratamento, sempre no mesmo horário. A alimentação (água e ração) foram previamente retiradas dos camundongos uma hora antes da execução dos tratamentos, visto que o volume estomacal dos camundongos é reduzido.

O Praziquantel foi obtido a partir de comprimidos do medicamento Tenil® Vet, 50 mg (Laboratório ATRAL, S.A. Portugal), que foram macerados, pesados em balança semianalítica e diluídos com DMSO a 3%, a fim de obter a dose de 400 mg/kg (conforme protocolo terapêutico recomendado pela Organização Mundial da Saúde – OMS), para o experimento 1 ou obter a concentração de 100 mg/kg para o experimento 2, uma concentração menor que a recomendada, para que a ação da complementação com o mentol e mentona pudesse ser observada. O PZQ foi administrado em dose única.

Para as soluções de mentol e mentona foram feitos cálculos para as doses de 70 mg/kg e 100 mg/kg. As soluções foram feitas utilizando 70% de mentol diluído em 3% de DMSO + 30% de mentona, sendo o volume final de 2 mL ajustado com água filtrada. As soluções de mentol e mentona foram realizadas diariamente durante o tempo de experiência, sendo 15 dias para o experimento 1 e 13 dias para o experimento 2.

### **4.3.4 Delineamento experimental: Experimento 1 e Experimento 2**

Foram realizados dois experimentos diferentes e independentes, ditos como amostral.

#### **a) Experimento 1**

O experimento 1, foi realizado para a triagem e escolha da dose mais adequada de mentol e mentona, entre de 70 mg/kg e 100 mg/kg.

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais conforme Tabela 1:

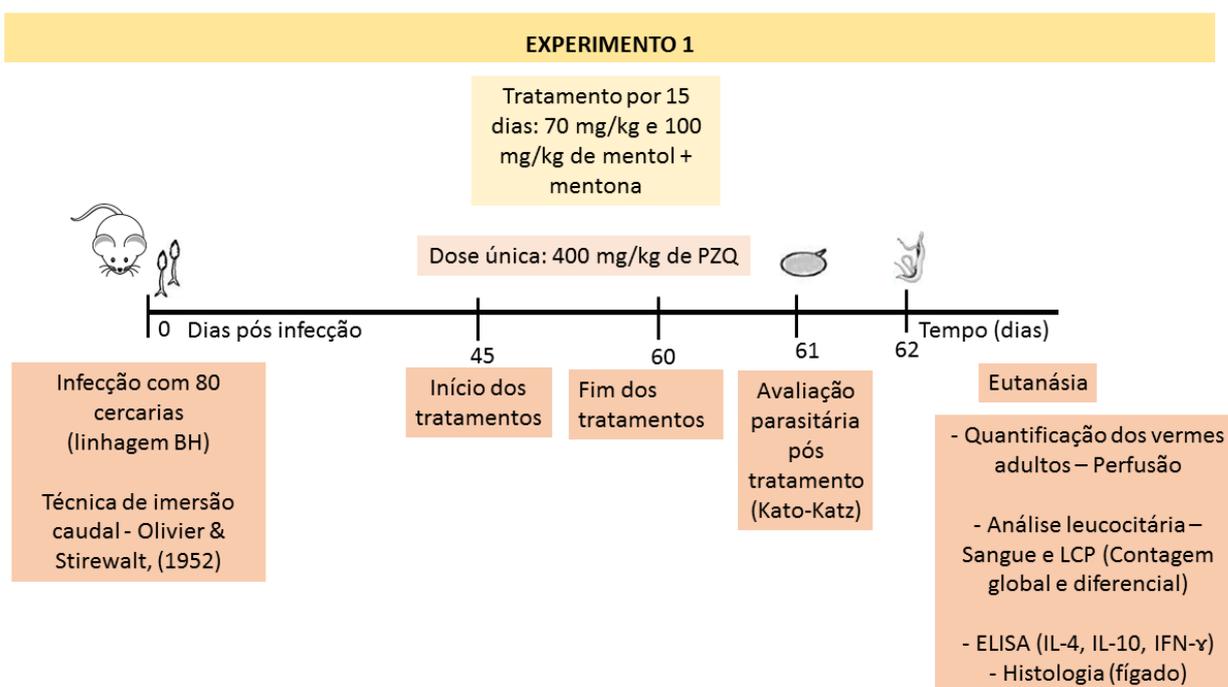
**Tabela 1- Grupos Experimentais com camundongos Balb/c – Experimento 1**

Grupos	Número de camundongos	Tratamento: Dose administrada
1- Controle negativo (C-)	4	-
2- Controle positivo (C+) *	6	-
3- PZQ *	5	400 mg/kg/0,2 mL (praziquantel)
4- MO+MA 70 *	6	70 mg/kg/0,2 mL (mentol + mentona)
5- MO+MA 100 *	6	100 mg/kg/0,2 mL (mentol + mentona)

\*Camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni*

O experimento 1 seguiu o desenho experimental da Figura 8:

**Figura 8- Delineamento experimental 1**



O experimento 1 avaliou as doses de 70 mg/kg e 100 mg/kg de mentol+mentona, após 45 dias de infecção, pelo tempo de 15 dias. O tratamento com praziquantel (400 mg/kg) foi realizado no mesmo dia, porém em dose única. A avaliação parasitaria foi realizada após 61 dias e a eutanásia após 62 dias do dia inicial (dia zero).

### b) Experimento 2

O experimento 2 foi realizado utilizando a doses escolhida no experimento 1, de 100 mg/kg da solução de mentol e mentona. Assim, uma concentração menor do praziquantel (PZQ 100 mg/kg) recebeu a complementação terapêutica com mentol e mentona (MO+MA 100 mg/kg).

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais conforme tabela 2:

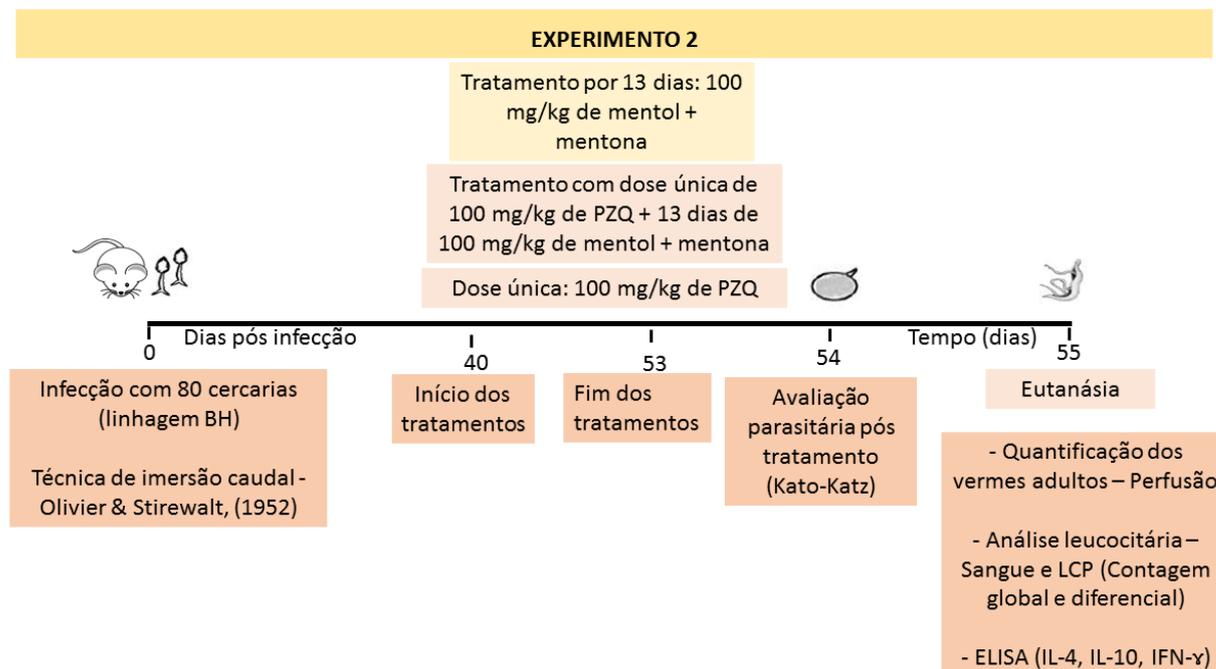
**Tabela 2- Grupos Experimentais com camundongos Balb/c- Experimento 2**

<b>Grupos</b>	<b>Número de camundongos</b>	<b>Tratamento: Dose administrada</b>
<b>1- Controle negativo (C-)</b>	5	-
<b>2- Controle positivo (C+) *</b>	3	-
<b>3- PZQ 100*</b>	5	Dose única com 100 mg/kg/0,2 mL (praziquantel)
<b>4- PZQ/MO+MA 100*</b>	6	Dose única com 100 mg/kg/0,2 mL de PZQ + 13 dias com 100 mg/kg/0,2 mL (mentol + mentona)
<b>5- MO+MA 100*</b>	3	13 dias de tratamento com 100 mg/kg/0,2 mL (mentol + mentona)

\*Camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni*

O experimento 2 seguiu o desenho experimental da Figura 9:

**Figura 9- Delineamento experimental 2**



O experimento 2 avaliou as doses de 100 mg/kg de mentol+mentona, e tratamento com dose única de 100 mg/kg de PZQ complementado com mentol+mentona na dose de 100 mg/kg, após 40 dias de infecção, pelo tempo de 13 dias. O tratamento com praziquantel (100 mg/kg) foi realizado no mesmo dia, porém em dose única. A avaliação parasitaria foi realizada após 54 dias e a eutanásia após 55 dias do dia inicial (dia zero).

#### 4.3.5 Quantificação dos ovos de *Schistosoma mansoni* (Kato-Katz)

A contagem de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos animais infectados foi realizada por meio do método adaptado de Kato-Katz, e utilizado o Kit Helm Teste, comercializado pelo Laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (KATZ; PEIXOTO, 2000).

Todos os animais dos diferentes grupos foram alojados em caixas individuais, dessa forma, obtidas as fezes para a confecção da lâmina. As fezes foram peneiradas em tela de nylon e utilizadas para preenchimento total de um orifício com diâmetro conhecido, posteriormente colocada sobre uma lâmina parasitológica (50 x 76 mm). Após, as fezes foram recobertas e pressionadas com uma lamínula de papel celofane previamente impregnada com solução de verde malaquita (solução diafanizadora), que permite o clareamento e preservação do material. Foi realizada uma lâmina por animal e a leitura realizada em microscópio óptico.

Para o experimento 1, o método Kato-Katz foi realizado no 61º dia, após 15 dias de tratamento. Para o experimento 2, o método foi realizado no 54º dia, após 13 dias de tratamento. Para assim, avaliar o efeito dos tratamentos sobre a carga parasitária dos animais infectados e tratados.

O número de ovos por grama de fezes foi determinado através da fórmula padronizada pelo Kit Helm Teste, Bio-Manguinhos: número de ovos contados x 24 = ovos/grama de fezes.

#### **4.3.6 Obtenções do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP)**

No dia 62 (Experimento 1) e dia 55 (Experimento 2) após infecção, os animais foram previamente anestesiados utilizando câmara de CO<sub>2</sub>, para obtenção do sangue, e logo após ocorreu a eutanásia por sangria total. Foi obtido o lavado da cavidade peritoneal (LCP) e o sangue dos animais de todos os grupos estudados.

A coleta de sangue dos animais foi realizada pela técnica de punção da veia braquial esquerda (YOUNG; CHAMBERS, 1973) e foi utilizado como anticoagulante o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), na concentração aproximada de 1M. O sangue foi utilizado para a contagem global e diferencial de leucócitos e para posterior análise do plasma.

Para a coleta do LCP, foi utilizado uma solução de PBS (*Phosphate Buffer Saline*), contendo 0,5 % de citrato de sódio (PBS/Citrato). Foi injetado 3 mL desse tampão no peritônio dos animais, a região foi homogeneizada 10 vezes e colhido aproximadamente 3 mL de material biológico com auxílio de seringa e agulha. O LCP foi utilizado para contagem global e diferencial dos leucócitos.

#### **4.3.7 Quantificação dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni***

Todos os animais foram submetidos ao processo de perfusão. Os vermes localizados no sistema porta-hepático e mesentéricos dos animais foram recuperados mediante técnica de perfusão (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956; DUVALL; DEWITT, 1967). Após recuperação, os vermes foram contados em casais (fêmeas + machos), fêmeas separadas e machos separados, e assim quantificando o número total de vermes encontrados em cada tratamento.

#### 4.3.8 Grau de redução da carga parasitária: Ovos e vermes adultos

O grau de redução da carga parasitária foi determinado pela comparação entre a média do número de vermes ou ovos recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle, de acordo com a fórmula:

$$GR = \frac{RGC - RGE}{RGC} \times 100$$

Onde GR é grau de redução, RGC é a média de recuperação no grupo controle positivo e RGE, a média da recuperação no grupo experimental (FONSECA et al., 2004).

#### 4.3.9 Contagem total e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) e do sangue

##### a) Contagem Global

O número total de leucócitos/mm<sup>3</sup> no sangue e LCP foram determinados utilizando solução de Turk para a lise das hemácias na diluição 1:20. As amostras foram colocadas em câmara de Neubauer e a contagem foi realizada em quatro quadrantes utilizando microscópio óptico (Microscópio Nikon YS2) com aumento de 400x.

##### b) Contagem Diferencial

A contagem diferencial das células do sangue foi realizada pela confecção de lâminas através da técnica de esfregaço sanguíneo. Para a contagem diferencial do LCP as lâminas foram feitas através de citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem) a 1500 rpm por 3 minutos. As lâminas de LCP e sangue foram corados com corante Panótico-Laborclin (Laborclin-LB - Lote 40513040) e contadas 100 células, utilizando microscópio óptico (Microscópio Nikon YS2) em aumento de 1000x. Os dados mostrados referem-se somente aos eosinófilos sanguíneos e do LCP.

#### 4.3.10 Quantificação de citocinas – ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Foi utilizado para o ELISA, Kits BD Biosciences® para as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ . A quantificação das citocinas encontradas no plasma dos camundongos tratados ou não, seguiu os procedimentos de acordo com o fabricante.

Para a dosagem, foi realizado um *pool* de amostras e testadas em triplicata, foi utilizado placas de microtitulação de 96 poços. Essas placas foram sensibilizadas com 100 µl/poço de solução contendo o anticorpo de captura de cada citocina diluído no tampão correspondente a cada citocina. O fator de diluição de cada citocina seguiu o catálogo do fabricante. As placas foram incubadas por até 18 horas a 4°C. Após esse período as placas foram lavadas três vezes em lavadora de placas com solução 0,05% Tween 20 em PBS. Foram adicionadas as placas 200 µl/poço de solução contendo 10% de lactose (leite desnatado em pó) + PBS para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas quatro vezes. A seguir foi adicionado o padrão (curvas) com as respectivas diluições das citocinas e as amostras (100 µl/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas, foi realizada a lavagem das placas por três vezes e adicionado 100 µl de anticorpo de detecção com streptoavidina conjugado com a enzima peroxidase (HRP) ficando incubadas em temperatura ambiente por 1 hora e meia, ao abrigo de luz. As placas foram lavadas e, foram adicionados 100 µl de Tetrametilbenzidina (TMB- Revelador), posteriormente incubadas por até 30 minutos (de acordo com as amostras). A reação completa foi bloqueada adicionando 50µl/poço de Solução Stop (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A curva foi interrompida assim que houve a observação de sua revelação.

O diluente utilizado durante todo processo e utilizado para os brancos foi uma solução de 1% de albumina (BSA Sigma). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 450nm em leitora de microplacas (TP-ReaderNM). As concentrações foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL.

#### **4.3.11 Extração dos órgãos**

Com auxílio de instrumentos cirúrgicos removeu-se os fígados dos animais, brevemente, os órgãos retirados foram armazenados em formol tamponado a 10%, evitando assim o processo de autólise celular e impedindo a destruição do tecido e endurecimento do material para melhor capacidade de coloração do material.

#### 4.3.12 Estudos histológicos

As lâminas foram confeccionadas pela técnica Ana Maria da Rocha do laboratório de Anatomia Patológica, do Departamento de Patologia da FMRP –USP, sob à responsabilidade do Prof. Dr. Edson Soares Garcia

Os fígados foram removidos dos camundongos dos diferentes grupos, 62 dias (Experimento 1) após infecção, e mantidos em formol tamponado 10% até a confecção das lâminas histológicas. Inicialmente esses tecidos foram desidratados com banhos de álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 90%, 95%, 100% por 4 vezes, com intervalos de uma hora), clareado (2 vezes) com xilol. Após clareamento, foram mantidos em parafina (60° C) por 4 horas e por fim, foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em cortes de 5 micrômetros, através de um micrótomo.

As lâminas foram coradas sob duas colorações: H.E (Hematoxilina/Eosina) para análises da inflamação, granulomas, ovos e composição celular e pela coloração de Tricrômico de Gomori (T.G) para a análise de deposição de colágeno nos órgãos. Os ovos íntegros e granulomas foram contados nos cortes das lâminas coradas com H.E. Três cortes de fígado foram analisados em sua totalidade.

As lâminas foram escaneadas no Equipamento Multi-Usuário (EMU) da FAPESP (2014/50256-4) *Pannoramic Desk* (3D Histech), alocado no Laboratório de Imunologia Aplicada, no Departamento de Genética e Evolução – DGE, da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra. As imagens foram feitas no programa *Pannoramic Viewer* 1.15.4 (3D Histech).

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os dados obtidos, foi aplicado o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov, através do software *SigmaStat*. Os resultados paramétricos foram analisados utilizando o teste *One-way ANOVA* (*One-Way analysis of variance*), pós-teste pelo Método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste pelo método de Dunns (*Compare all pairs of columns*). Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0, 2005 (San Diego, Califórnia) para a análise e gráficos. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  e expressos com média  $\pm$  EPM. Nos ensaios de citotoxicidade, a % de viabilidade das células foi calculada usando a média do controle (-) como 100% de viabilidade.

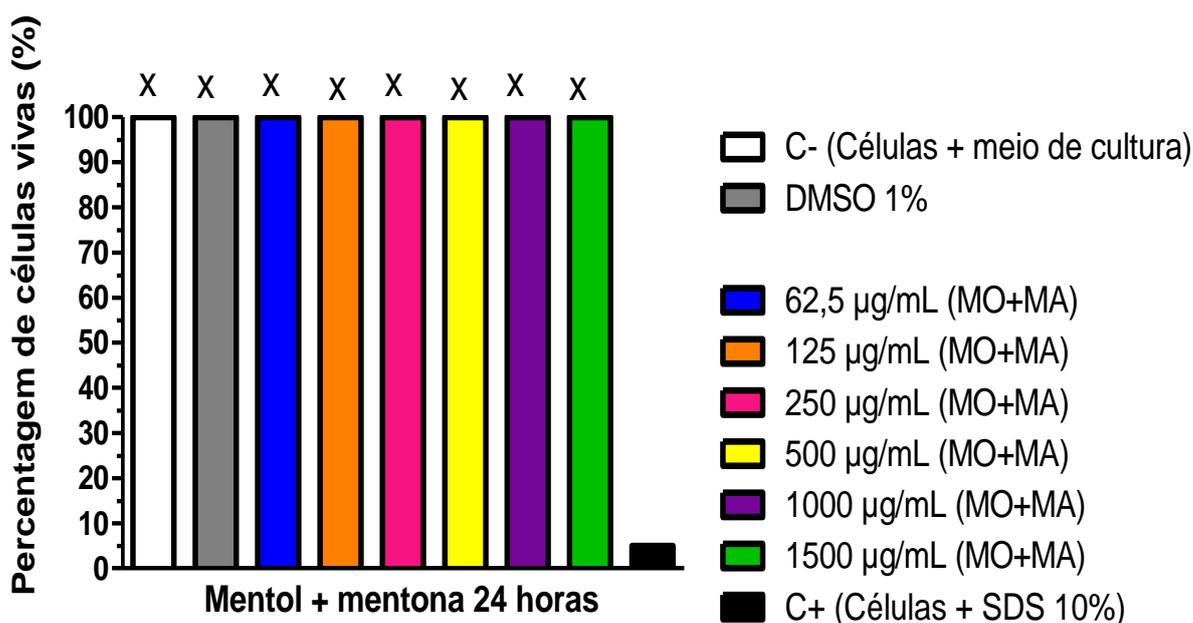
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Resultados *in vitro*

#### 6.1.1 Citotoxicidade celular *in vitro* dos compostos mentol e mentona

A percentagem de células vivas no teste de MTT com a duração de 24 horas, mostrou que todas as concentrações testadas com as soluções de mentol (MO) e mentona (MA), não foram citotóxicas frente a macrófagos (RAW 264.7). A viabilidade celular apresentou-se com mais de 70% de células, correspondendo ao mínimo de % células vivas (Figura 10). Todas as concentrações testadas de mentol+mentona, C- e DMSO 1% foram significativas quando comparadas ao grupo C+ (SDS 10%).

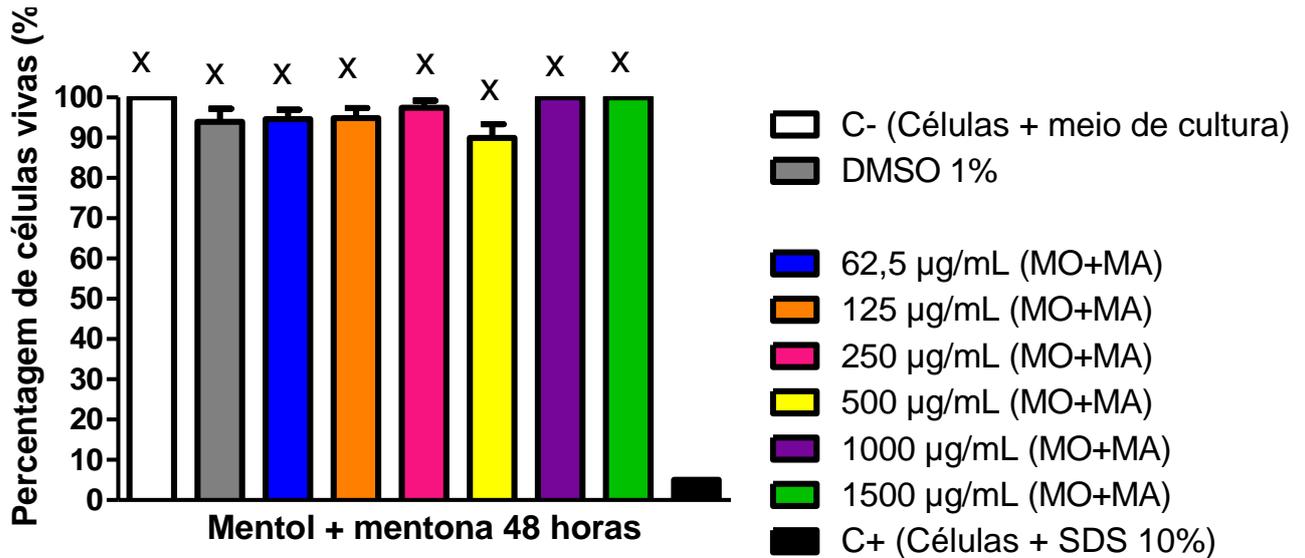
Figura 10- MTT 24 horas



A percentagem da viabilidade dos macrófagos (RAW 264.7) no tempo de 24 horas foi calculada usando a média do C- (células + meio de cultura) como 100% de viabilidade. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, do controle negativo (células + meio de cultura) e do DMSO 1%, quando comparados com o grupo controle positivo (Células + SDS 10%). A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste pelo Método de Dunns. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

O teste MTT realizado com 48 horas de duração, também mostrou que todas as concentrações testadas não foram citotóxicas e atenderam ao mínimo de % de células vivas, que corresponde a 70% (Figura 11). Todas as concentrações testadas de mentol + mentona, C- e DMSO 1%, foram significativas quando comparadas ao grupo C+ (SDS 10%).

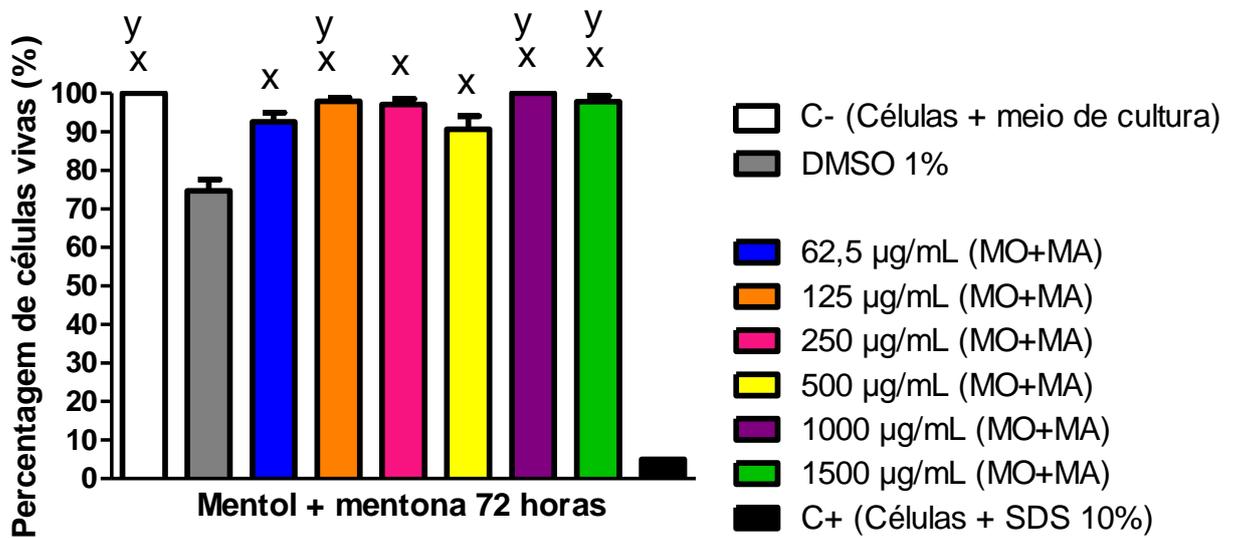
**Figura 11- MTT 48 horas**



A percentagem da viabilidade dos macrófagos (RAW 264.7) no tempo de 48 horas foi calculada usando a média do C- (células + meio de cultura) como 100% de viabilidade. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, do controle negativo (células + meio de cultura) e do DMSO 1%, quando comparados com o grupo controle positivo (Células + SDS 10%). A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste pelo Método de Dunns. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

O teste MTT realizado com a duração de 72 horas (Figura 12) mostra que as concentrações testadas não foram citotóxicas. A percentagem de células vivas corresponde ao mínimo considerável (70%). Todas as concentrações testadas de mentol + mentona e o C- foram significativas quando comparadas ao grupo C+ (SDS 10%). As concentrações de 125, 1000 e 1500  $\mu\text{g/mL}$  da solução de mentol + mentona e o C- (células + meio de cultura), foram significativos em relação ao DMSO 1%.

**Figura 12- MTT 72 horas**

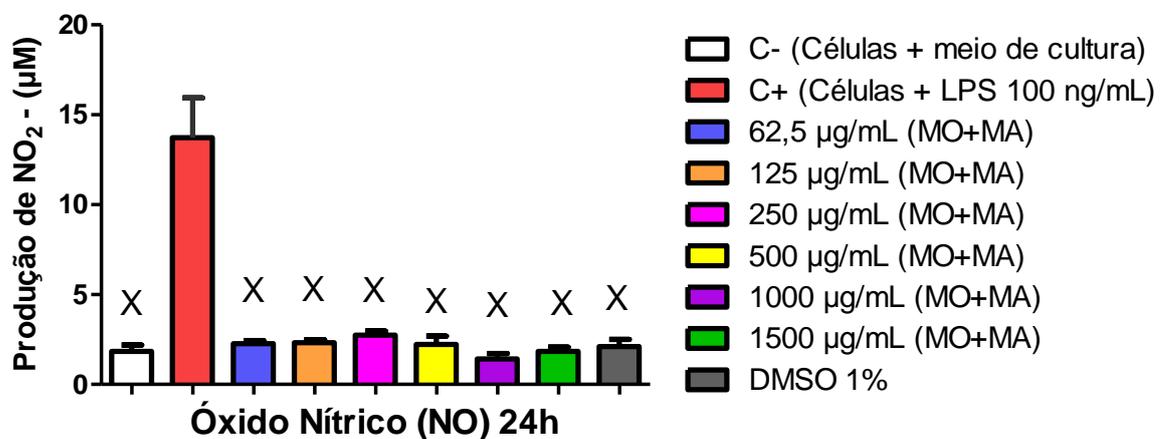


A percentagem da viabilidade dos macrófagos (RAW 264.7) no tempo de 72 horas foi calculada usando a média do C- (células + meio de cultura) como 100% de viabilidade. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, do controle negativo (células + meio de cultura) quando comparados com o grupo controle positivo (Células + SDS 10%). (y) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos das concentrações de mentol + mentona (125, 1000 e 1500  $\mu\text{g/mL}$ ) e controle negativo (Células + meio de cultura), quando comparados com o grupo DMSO 1%. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste pelo Método de Dunns. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 6.1.2 Análise da produção de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos (RAW 264.7) – determinação de Nitritos (NO<sub>2</sub>)

Nossos resultados demonstram, que no teste de 24 horas, nenhuma das concentrações de mentol+mentona testadas foi capaz de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Figura 13). Todas as concentrações foram significativamente diferentes do C+ (Células + LPS 100 ng/mL), que estimulou os macrófagos a produzirem óxido nítrico devido ao LPS.

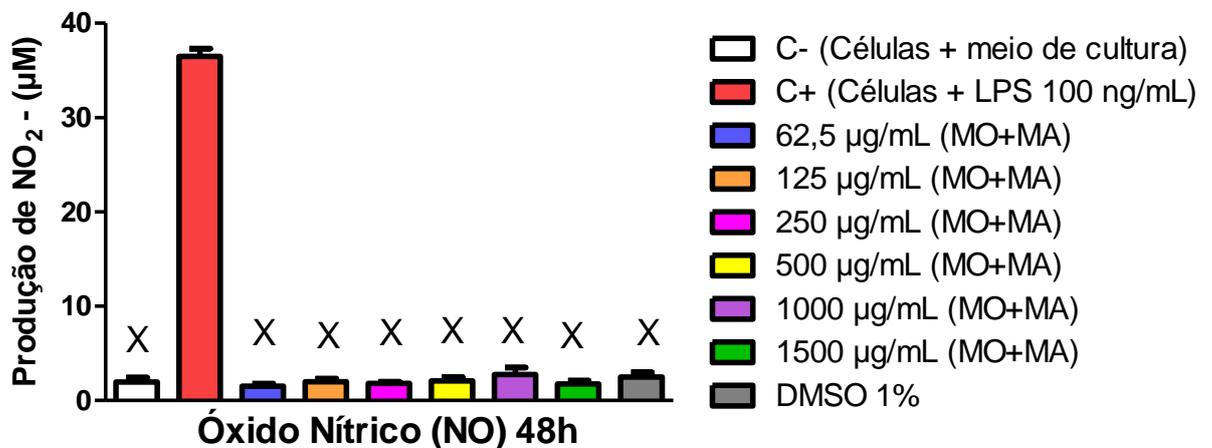
**Figura 13- Reação de Griess - 24 horas.**



O óxido nítrico (NO) foi medido indiretamente pela presença de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nos sobrenadantes de cultivo de macrófagos (RAW 264.7) previamente expostos por 24 horas a diferentes tratamentos. Os dados representam a média ± SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, C- (Células + meio de cultura) e do DMSO 1%, quando comparados com o grupo controle positivo (Células + LPS 100 ng/mL). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

O teste de Reação de Griess realizado no tempo de 48 horas, demonstra também que nenhuma das concentrações testadas estimulou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Todas as concentrações de mentol+mentona, DMSO 1% e controle negativo, são significativamente diferentes quando comparadas ao C+ (Células + LPS 100 ng/mL). Os resultados são mostrados na Figura 14.

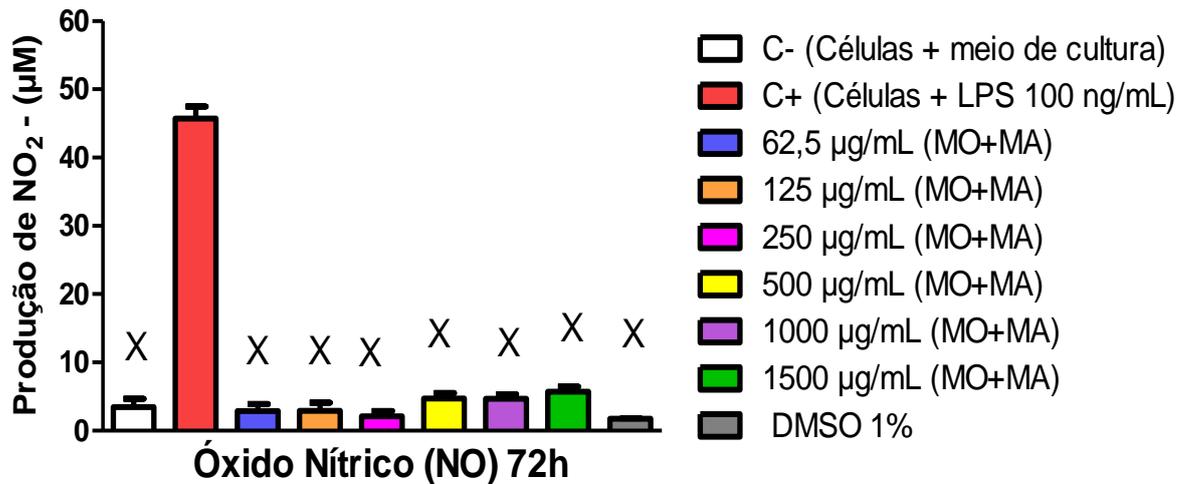
**Figura 14- Reação de Griess - 48 horas**



O óxido nítrico (NO) foi medido indiretamente pela presença de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nos sobrenadantes de cultivo de macrófagos (RAW 264.7) previamente expostos por 48 horas a diferentes tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, C- (Células + meio de cultura) e do DMSO 1%, quando comparados com o grupo controle positivo (Células + LPS 100 ng/mL). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

A Figura 15 mostra os resultados do teste de Reação de Griess realizado no tempo de 72 horas. Não houve produção de óxido nítrico em nenhuma das concentrações testadas, todas as concentrações de mentol+mentona, DMSO 1% e controle negativo, são significativamente diferentes quando comparadas ao C+ (Células + LPS 100 ng/mL).

**Figura 15- Reação de Griess - 72 horas.**



O óxido nítrico (NO) foi medido indiretamente pela presença de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nos sobrenadantes de cultivo de macrófagos (RAW 264.7) previamente expostos por 72 horas a diferentes tratamentos. Os dados representam a média ± SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos de todas as diferentes concentrações de mentol+mentona, C- (Células + meio de cultura) e do DMSO 1%, quando comparados com o grupo controle positivo (Células + LPS 100 ng/mL). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 6.2 Resultados *in vivo*- Experimento 1

### 6.2.1 Infecção dos camundongos com *S. mansoni*

Após o processo de imersão caudal por aproximadamente 2 horas, as cercárias que não penetraram na cauda dos animais foram contadas. Assim, na Tabela 3 podemos observar a percentagem de eficácia na infecção dos camundongos, que foi de 92,65%. Inicialmente, foram infectados 25 animais (25 amostras), porém no decorrer do experimento 1, três animais vieram a óbito decorrentes da infecção com cercárias de *S. mansoni*.

**Tabela 3- Percentagem da eficácia total na infecção dos camundongos- Experimento 1**

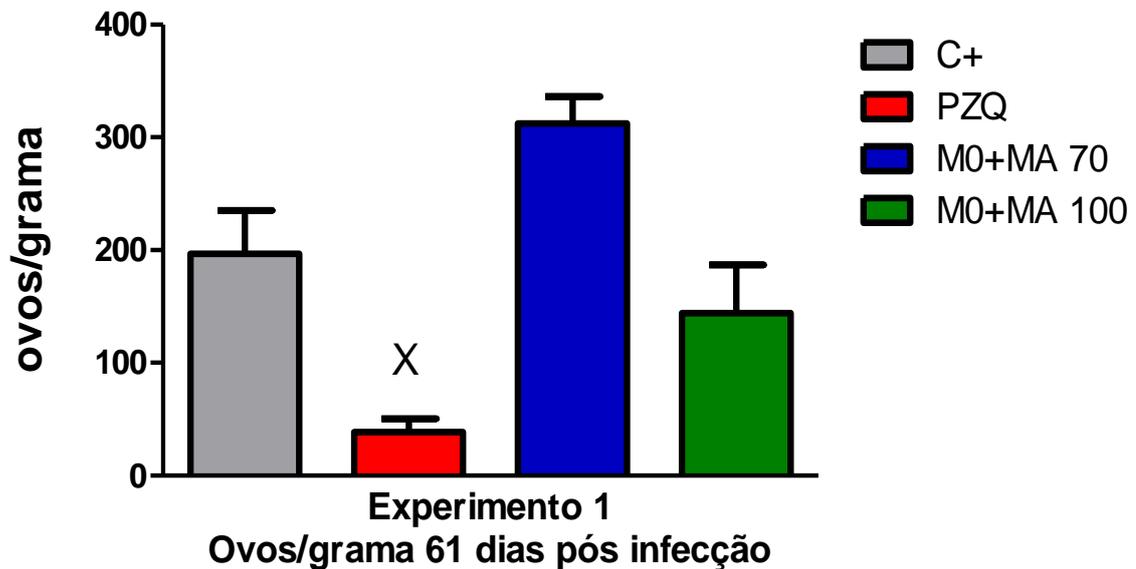
<b>Quantidade total de cercárias (80 cercárias por tubo*25 tubos)</b>	<b>Quantidade total de cercárias que não penetraram na cauda dos animais</b>	<b>% de eficácia total de infecção</b>
2000	147	92,65%

Eficácia da infecção dos camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni* (BH).

### 6.2.2 Quantificação de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos camundongos

A Figura 16 mostra a análise da quantificação de ovos/grama de fezes através do método de Kato-Katz. A técnica foi realizada no 61º dia após infecção dos animais com cercárias de *S. mansoni* e após término dos tratamentos propostos. Nossos resultados demonstram que o tratamento com praziquantel foi significativamente eficaz na redução de ovos de *S. mansoni* quando comparado ao controle positivo (grupo infectado e sem tratamento).

**Figura 16- Kato-Katz Experimento 1.**

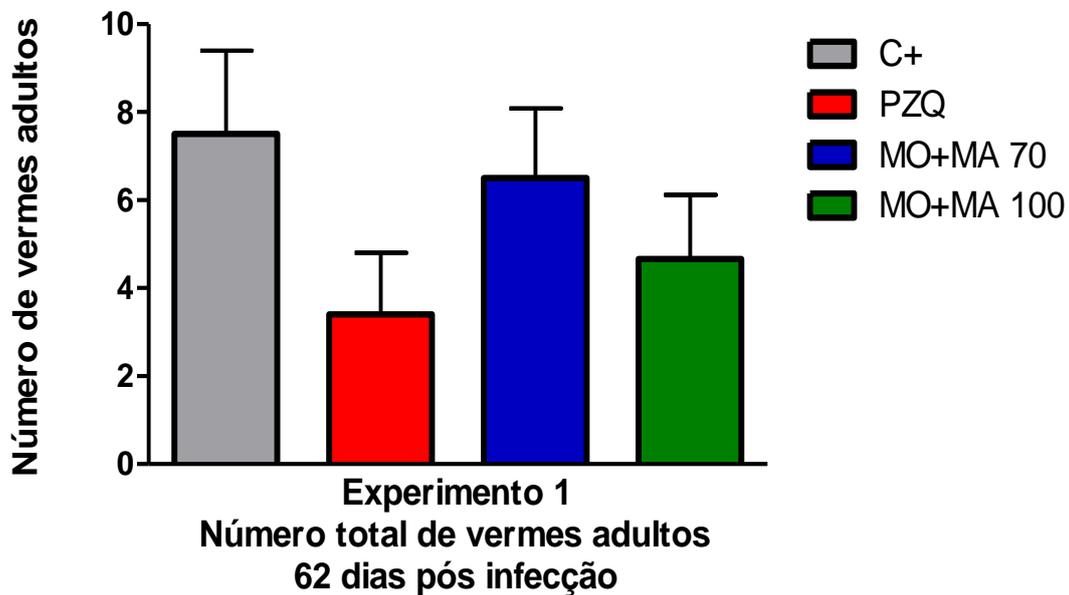


Quantificação do número de ovos de *S. mansoni* (ovos/grama) 61 dias pós-infecção. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ; MO+MA 70 e MO+MA 100), quando comparados com o grupo controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 6.2.3 Quantificação de vermes adultos de *S. mansoni*

Os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperados e contados mediante processo de perfusão do sistema porta-hepático e mesentérico. A perfusão foi realizada 62 dias após infecção dos camundongos com cercárias do parasita. Em relação ao número de vermes adultos recuperados (Figura 17), nenhum grupo infectado e tratado obteve redução significativa quando comparado ao controle positivo.

**Figura 17- Perfusão Experimento 1.**



Número total de vermes adultos de *S. mansoni* recuperados 62 dias após a infecção. Os dados representam a média do número de vermes adultos  $\pm$  SEM, utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

### 6.2.4 Grau de redução da carga parasitária: Ovos e vermes adultos

A redução da carga parasitária foi calculada conforme Fonseca et al (2004) e pode ser observada nas Tabela 4 e 5. Para ovos, o tratamento de 100 mg/kg de mentol + mentona, obteve uma redução de 14,3% no número de ovos eliminados pelos animais desse grupo, enquanto PZQ obteve redução de 82,8%. Para vermes, o grau de redução (GR) do grupo experimental tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona foi de 13,33%, no grupo tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona a redução foi de 37,8% e no grupo tratado com praziquantel, de 54,7%.

**Tabela 4- Percentagem de Redução da carga parasitária (Ovos) – Experimento 1**

Grupos Experimentais	Média do número de ovos	% Redução (GR)
<b>Controle Positivo</b>	224	--
<b>PZQ</b>	38,4	82,8
<b>MO + MA 70</b>	388	Não houve redução
<b>MO + MA 100</b>	192	14,3

Redução da média de ovos contados através do método Kato-Katz após 61 dias de infecção. Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento); PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg de praziquantel); MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona) e MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona)

**Tabela 5- Percentagem de Redução da carga parasitária (Vermes adultos) – Experimento 1**

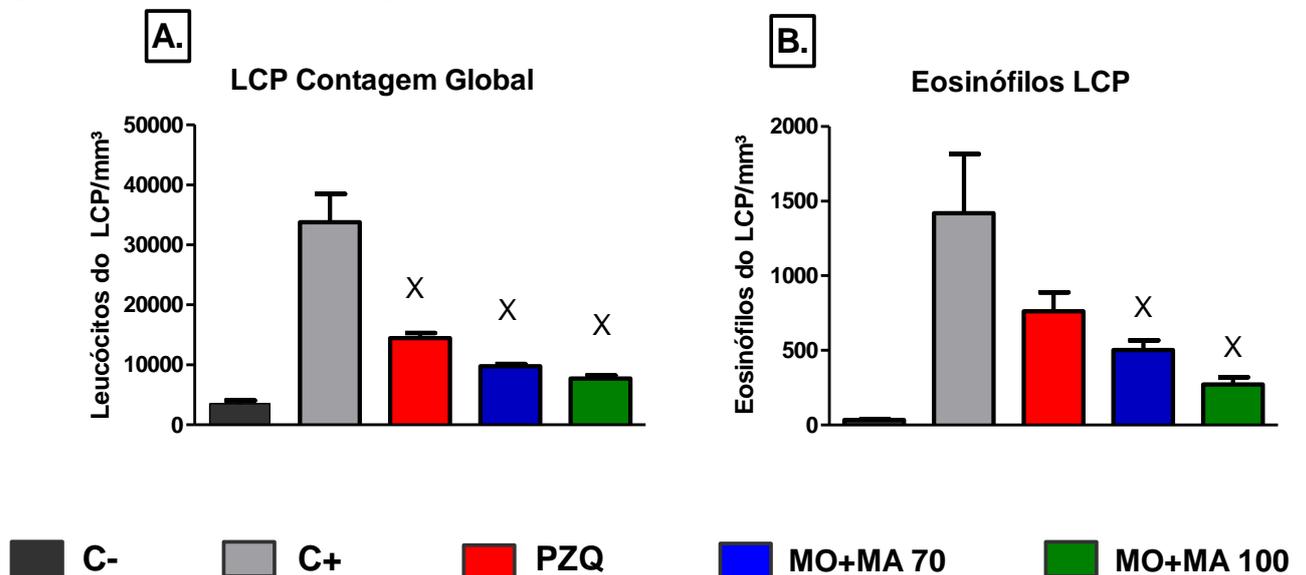
Grupos Experimentais	Média do número de vermes	% Redução (GR)
<b>Controle Positivo</b>	7,5	--
<b>PZQ</b>	3,4	54,7
<b>MO+MA 70</b>	6,5	13,3
<b>MO+MA 100</b>	4,66	37,8

Redução da média de vermes adultos recuperados por perfusão do sistema porta hepático e mesentérico dos camundongos após 62 dias de infecção. Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento); PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg de praziquantel); MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona) e MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona)

### 6.2.5 Contagem global e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não tratados

A análise de leucócitos totais do LCP (Figura 18-A) mostrou que todos os tratamentos foram significativamente eficazes na redução do número dessas células, quando comparado ao grupo controle positivo. Quanto aos eosinófilos apenas os grupos tratados com mentol + mentona foram significativos quando comparados ao controle infectado e sem tratamento (Figura 18- B).

**Figura 18- Contagem global e diferencial de leucócitos do lavado da cavidade peritoneal após 62 dias de infecção/ Experimento 1**

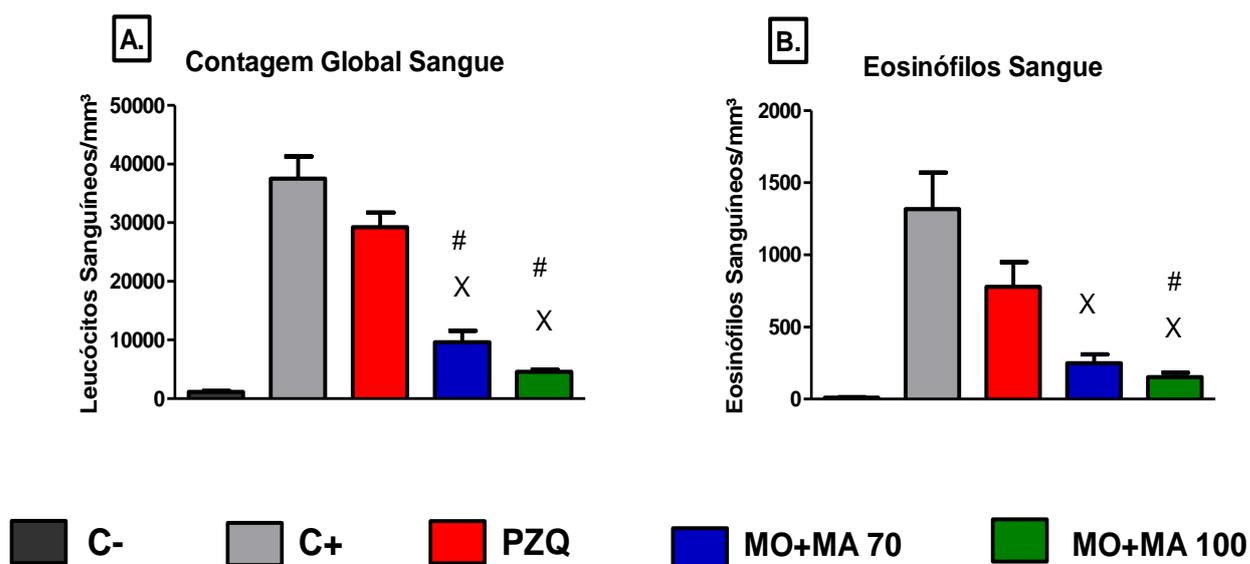


**A:** Contagem global de leucócitos LCP/mm<sup>3</sup>; **B:** Contagem diferencial de eosinófilos LCP /mm<sup>3</sup>. Os dados representam a média ±EPM. (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ, MO+MA 70 mg/kg e MO+MA 100 mg/kg) quando comparados com o grupo controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). O controle negativo (C-) refere-se ao grupo sem infecção e sem tratamento. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ , utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

### 6.2.6 Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos dos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não tratados

A análise da contagem global de leucócitos sanguíneos (Figura 19-A), mostrou que ambos os grupos tratados com mentol + mentona (70 mg/kg e 100 mg/kg) foram significativos em suas reduções, quando comparados ao grupo controle positivo e ao grupo tratado com praziquantel. Quanto a contagem diferencial de eosinófilos sanguíneos (Figura 19-B), todos os grupos infectados e tratados com mentol e mentona mostraram-se significativos menores quando comparados ao grupo controle positivo. O grupo tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona, reduziu significativamente o número de eosinófilos quando comparado ao grupo tratado com praziquantel.

**Figura 19- Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos após 62 dias de infecção/ Experimento 1.**

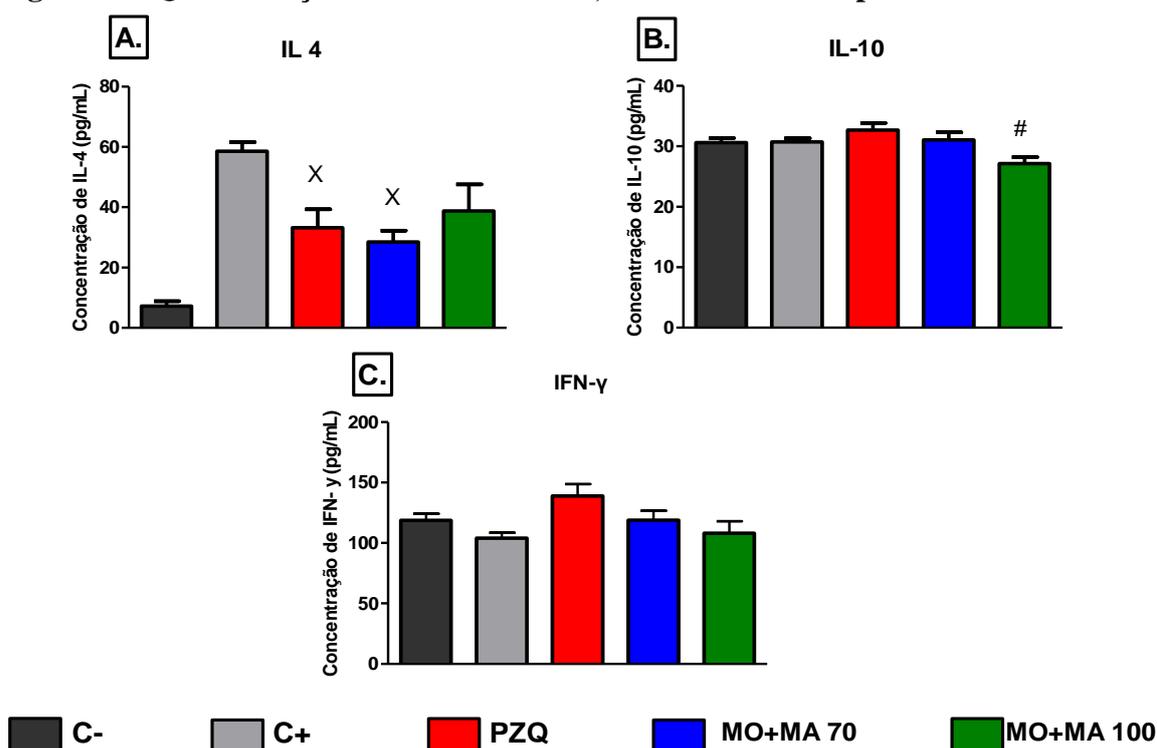


**A:** Contagem global de leucócitos sanguíneos/mm<sup>3</sup>; **B:** Contagem diferencial de eosinófilos do sangue /mm<sup>3</sup>. Os dados representam a média  $\pm$ EPM. (#) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (MO+MA 70 mg/kg e MO+MA 100 mg/kg) quando comparados com o grupo PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg de PZQ). (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (MO+MA 70 mg/kg e MO+MA 100 mg/kg) quando comparados com o grupo controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). O controle negativo (C-) refere-se ao grupo sem infecção e sem tratamento. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ , utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey

### 6.2.7 Quantificação de citocinas do plasma

Foram analisadas a produção de três citocinas: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , através do ensaio imunoenzimático ELISA. O grupo tratado com 70mg/kg de mentol+mentona e grupo tratado com Praziquantel tiveram redução significativa de IL-4 quando comparadas ao controle positivo (Figura 20-A), porém, o grupo MO+MA 100, reduziu em 33,7% os níveis de IL-4, quando comparado ao grupo controle positivo, embora de forma não significativa. Para a citocina IL-10 (Figura 20-B), apenas o grupo MO+MA 100 mostrou-se significativa diminuição em relação ao grupo tratado com PZQ. A citocina IFN- $\gamma$  não obteve resultado significativo (Figura 20-C). Entretanto, é possível observar uma discreta redução na concentração dessas citocina em todos os grupos tratados em relação ao controle positivo.

**Figura 20- Quantificação das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ / Experimento 1**



Análise das citocinas: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  através do ensaio imunoenzimático ELISA. **A:** IL-4 (pg/mL); **B:** IL-10 (pg/mL); **C:** IFN- $\gamma$  (pg/mL). Os dados representam a média  $\pm$  SEM. Foi usado o pool de plasma de cada grupo e analisado em triplicata. (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados tratados (PZQ, MO+MA 70), quando comparados com o grupo controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). (#) representa a diferença significativa entre o resultado obtido do grupo infectado e tratado (MO+MA 100 mg/kg), quando comparado com o grupo PZQ (400 mg/kg). O controle negativo (C-) refere-se ao grupo sem infecção e sem tratamento. A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 6.2.8 Análise histológica do fígado após 62 dias após infecção

No dia 62 após a infecção, os fígados dos animais pertencentes aos diferentes grupos, infectados ou não, tratados ou não, foram extraídos para análise histológica. As Figuras 21 e 22 mostram a coloração H.E em aumento de 50x e 200x, respectivamente. E a figura 23 e 24, a coloração T.G nos aumentos de 50x e 200x respectivamente.

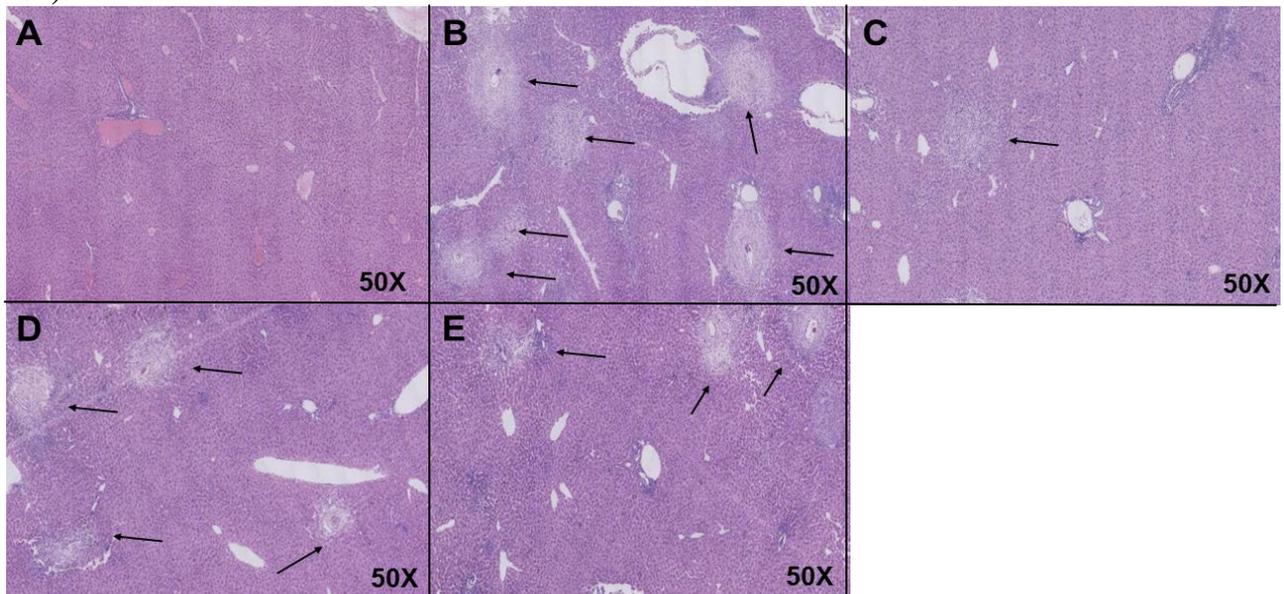
O fígado do grupo controle negativo, apresenta-se com o parênquima preservado, sem a presença de granulomas ou ovos, com hepatócitos dispostos de maneira organizada (Figuras 21-A e 22-A). A deposição de colágeno apresenta-se de forma normal, somente ao redor dos vasos (Figura 23-A e 24-A).

No fígado do grupo infectado e sem tratamento (Controle positivo), observa-se a presença de inúmeros granulomas periovulares bem caracterizados, granulomas pericanulares e perivasculares, com formação de infiltrado linfocitário misto (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos). Os granulomas apresentam-se em sua maioria, com a presença de ovos íntegros em sua região central (Figura 21-B e 22-B). A deposição de colágeno apresenta-se predominante ao redor dos ovos, concomitante aos granulomas, caracterizando os processos fibróticos (Figura 23-B e 24-B).

O fígado dos animais tratados com praziquantel apresenta-se com o parênquima preservado, com a presença de granulomas periovulares e pericanulares, e infiltrado linfocitário. Os ovos apresentam-se, em sua maioria, desintegrados (Figura 21-C; 22-C). A deposição de colágeno está presente ao redor dos vasos, canalículos e dos ovos juntamente aos granulomas (Figura 23-C e 24-C).

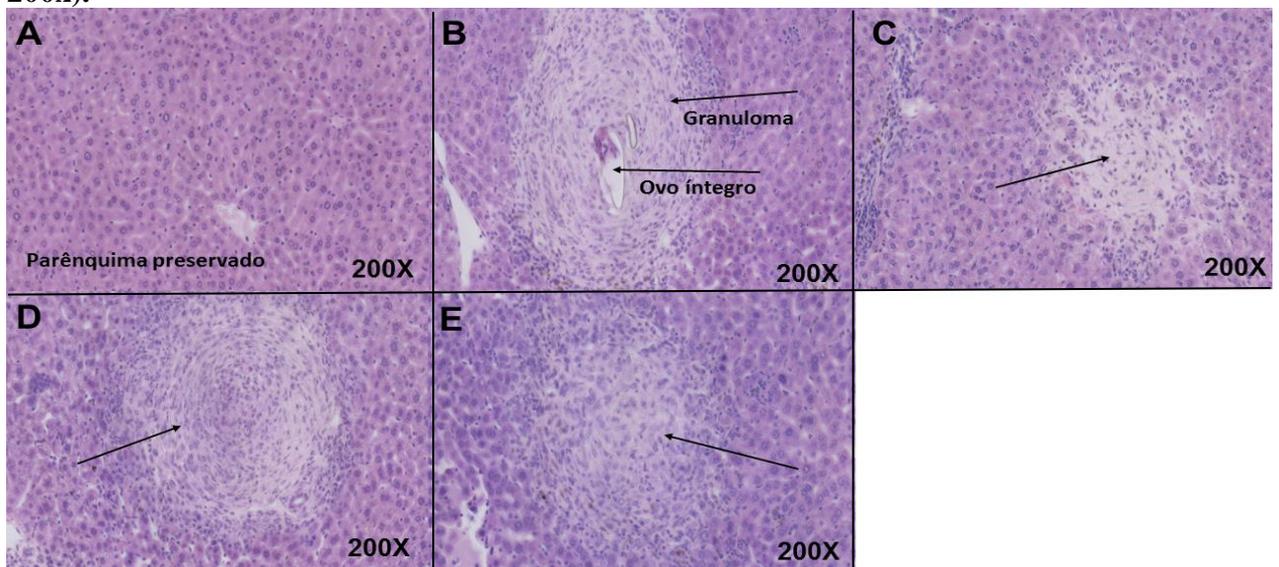
Nos grupos tratados com mentol+mentona (MO+MA 70 e MO+MA 100), observam-se a presença de granulomas periovulares menores quando comparados aos do grupo infectado e sem tratamento e presença de infiltrado celular (Figura 21-D, 21-E, 22-D e 22-E). O material colagenoso se apresenta ao redor dos vasos, canalículos e dos ovos juntamente aos granulomas. É possível observar o parênquima hepático mais preservado quando comparado ao grupo controle positivo (Figura 23-D, 23-E, 24-D e 24-E).

**Figura 21- Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1. (H.E 50x).**



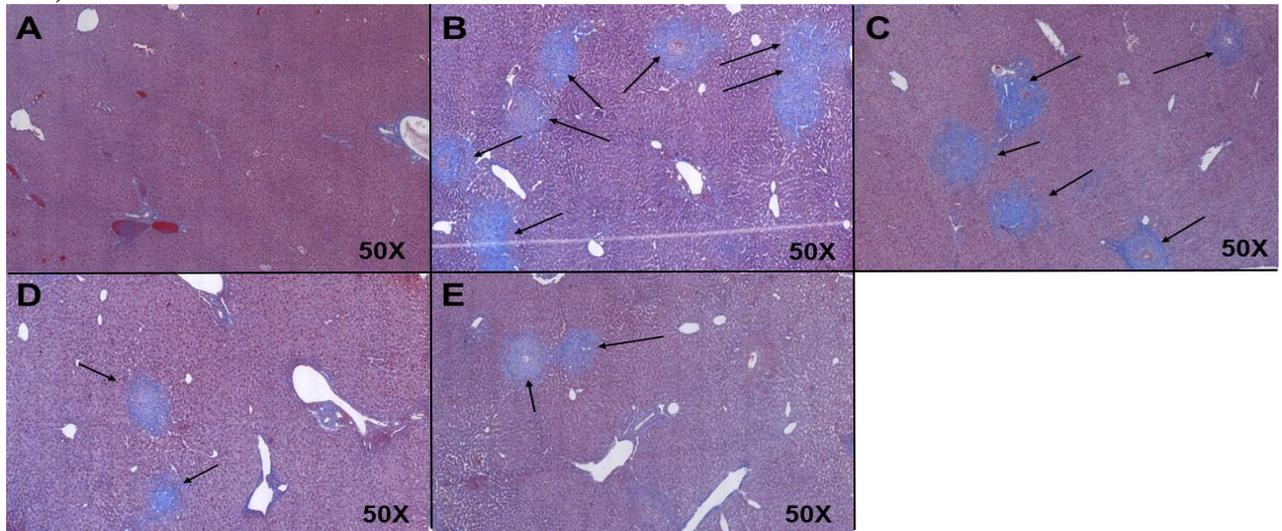
Foram analisados três cortes de fígado por grupo, sendo estes de grupos infectados ou não/tratados ou não. **A:** Controle Negativo (grupo sem infecção e sem tratamento); **B:** Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento); **C:** PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg); **D:** MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona); **E:** MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona). As setas indicam granulomas. Coloração H.E. Aumento: 50x (500  $\mu$ m).

**Figura 22- Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (H.E 200x).**



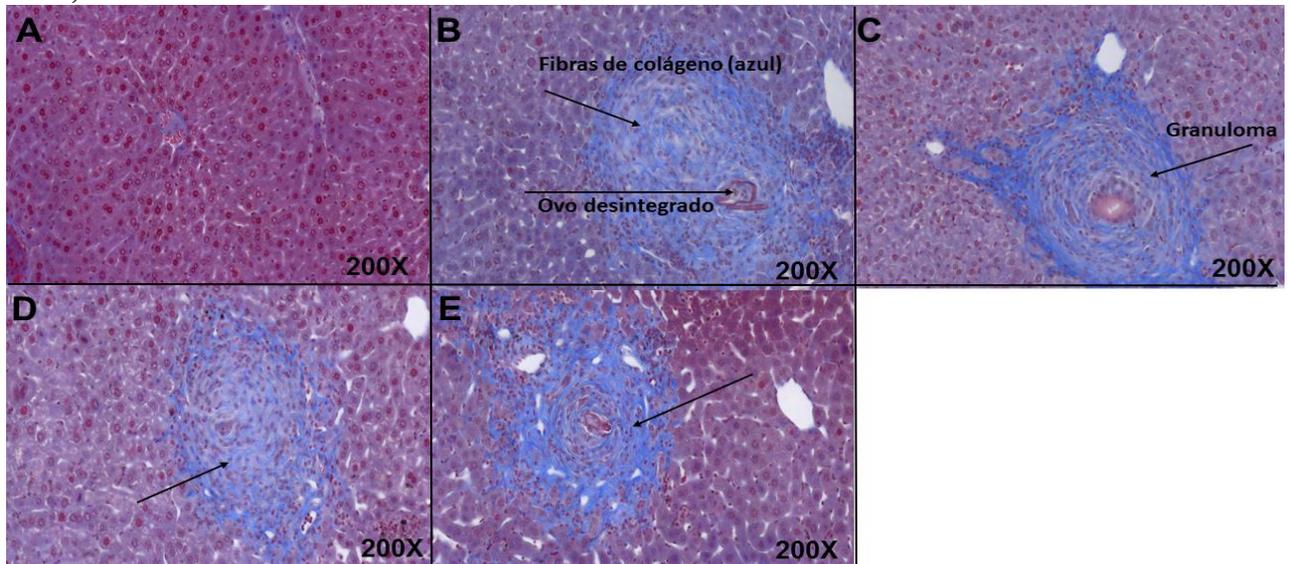
Foram analisados três cortes de fígado por grupo, sendo estes de grupos infectados ou não/tratados ou não. **A:** Controle Negativo (grupo sem infecção e sem tratamento); **B:** Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento); **C:** PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg); **D:** MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona); **E:** MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona). As setas indicam granulomas e na imagem 22-B, ovo íntegro no centro do granuloma. Coloração H.E. Aumento: 200x (100  $\mu$ m).

**Figura 23- Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (T.G 50x).**



Foram analisados três cortes de fígado por grupo, sendo estes de grupos infectados ou não/tratados ou não. **A:** Controle Negativo (grupo sem infecção e sem tratamento); **B:** Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento); **C:** PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg); **D:** MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona); **E:** MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona). As setas indicam granulomas. Coloração T.G. Aumento: 50x (500 µm).

**Figura 24- Análise histológica de fígado após 62 dias de infecção/ Experimento 1- (T.G 200x).**



Foram analisados três cortes de fígado por grupo, sendo estes de grupos infectados ou não/tratados ou não. **A:** Controle Negativo (grupo sem infecção e sem tratamento); **B:** Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento); **C:** PZQ (grupo infectado e tratado com 400 mg/kg); **D:** MO+MA 70 (grupo infectado e tratado com 70 mg/kg de mentol+mentona); **E:** MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona). As setas indicam granulomas e na imagem 24-B, ovo desintegrado no centro do granuloma. Coloração T.G. Aumento: 200x (100 µm).

Foi observada uma diminuição da quantidade de ovos (Tabela 6) e quantidade de granulomas (Tabela 7), nos grupos tratados com mentol e mentona, quando comparados ao grupo controle positivo. Não houve resultados significativos entre os grupos.

**Tabela 6- Quantidade ovos no tecido hepático/ Experimento 1.**

<b>Grupos</b>	<b>Ovo/lâmina (Média ± SEM)</b>	<b>Redução (%)</b>
<b>Controle Positivo</b>	3,6 ± 0,8	—
<b>PZQ</b>	1 ± 0,5 (ns)	72,2
<b>MO+MA 70</b>	1,6 ± 1,2 (ns)	55,5
<b>MO+MA 100</b>	2,3 ± 0,8 (ns)	36,1

Os dados representam a média ± SEM. A leitura foi realizada em cortes histológicos corados com HE. Foi realizado 3 cortes por grupo (n=3). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . (ns) = não significativo em relação ao controle positivo.

**Tabela 7- Quantidade de granulomas no tecido hepático/ Experimento 1.**

<b>Grupos</b>	<b>Granuloma/lâmina (Média ± SEM)</b>	<b>Redução (%)</b>
<b>Controle Positivo</b>	23 ± 2,0	—
<b>PZQ</b>	15 ± 4,0 (ns)	34,8
<b>MO+MA 70</b>	19,6 ± 2,3 (ns)	14,8
<b>MO+MA 100</b>	18 ± 5,5 (ns)	21,7

Os dados representam a média ± SEM. A leitura foi realizada em cortes histológicos corados com HE. Foi realizado 3 cortes por grupo (n=3). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . (ns) = não significativo em relação ao controle positivo.

## 6.3 Resultados *in vivo*- Experimento 2

### 6.3.1 Infecção dos camundongos com *S. mansoni*

A infecção dos camundongos foi realizada pelo processo de imersão caudal por aproximadamente 2 horas, as cercárias que não penetraram na cauda dos animais foram contadas. Na Tabela 8 podemos observar a % de eficácia na infecção dos camundongos do experimento 2, que foi de 98%.

**Tabela 8- Percentagem da eficácia total na infecção dos camundongos – Experimento 2**

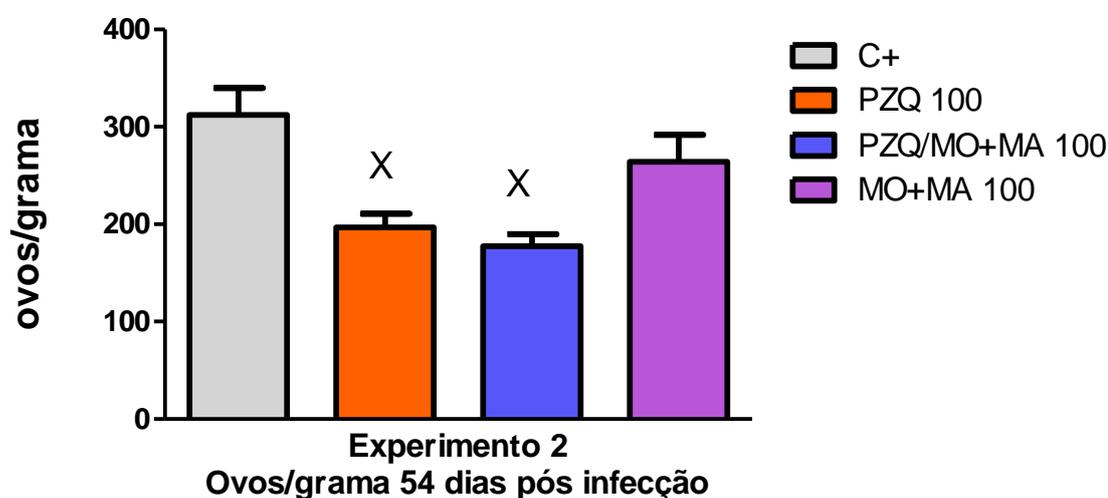
<b>Quantidade total de cercárias (80 cercárias por tubo*25 tubos)</b>	<b>Quantidade total de cercárias que não penetraram na cauda dos animais</b>	<b>% de eficácia total de infecção</b>
2000	40	98%

Eficácia da infecção dos camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni* (BH).

### 6.3.2 Quantificação de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos camundongos

O teste de Kato-Katz foi realizado 54 dias após infecção com cercárias de *S. mansoni*. Os grupos tratados PZQ 100 e PZQ/MO+MA 100 obtiveram redução significativa do número de ovos, quando comparados ao grupo controle positivo. O resultado pode ser observado na Figura 25.

Figura 25- Kato-Katz Experimento 2.

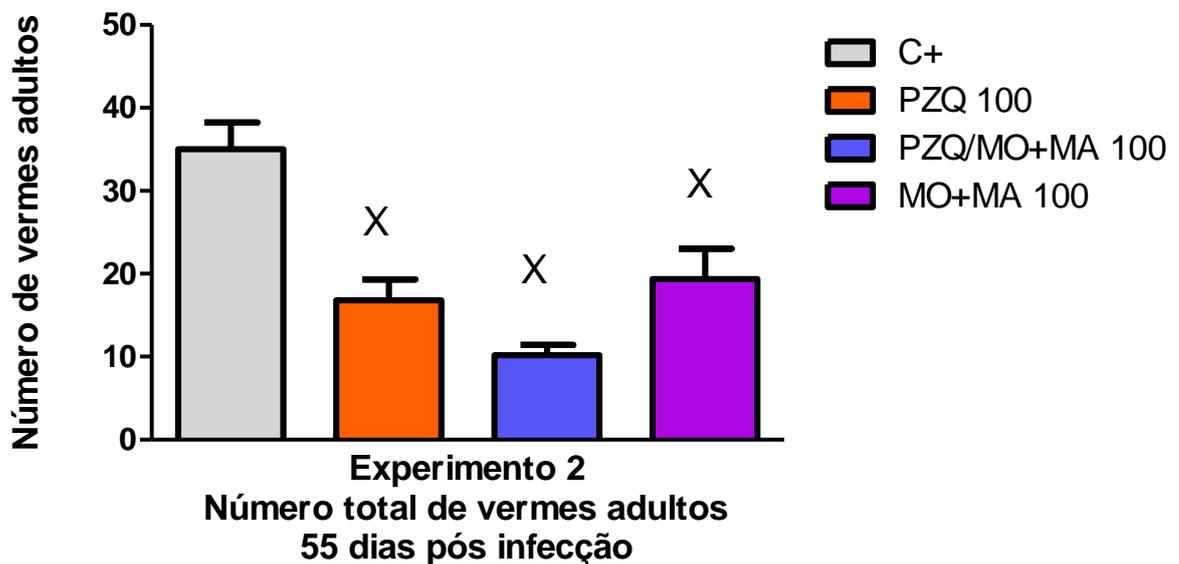


**Quantificação do número de ovos de *Schistosoma mansoni* (ovos/grama) 54 dias pós-infecção.** Os dados representam a média ± SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ; MO+MA 70 e MO+MA 100), quando comparados com o grupo controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 6.3.3 Quantificação de vermes adultos de *S. mansoni*

A perfusão do sistema porta-hepático e mesentérico, foi realizado 55 dias após infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni*. Na Figura 26, observa-se que todos os grupos tratados reduziram significativamente o número de vermes adultos, quando comparado ao grupo sem tratamento (C+).

**Figura 26- Perfusão Experimento 2.**



**Número total de vermes adultos de *S. mansoni* recuperados 55 dias após a infecção.** Os dados representam a média  $\pm$  SEM. (X) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ; MO+MA 70 e MO+MA 100), quando comparados com o grupo Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### 6.3.4 Grau de redução da carga parasitária: Ovos e vermes adultos

Através da fórmula proposta por Fonseca et al (2004), foi possível analisar o grau de redução da carga parasitária (Tabela 9 e 10). Para os ovos, o tratamento de 100 mg/kg de mentol + mentona, obteve uma redução de 15,4% no número de ovos eliminados pelos animais desse grupo, enquanto PZQ obteve redução de 37%. E o grupo tratado com 100 mg/kg de PZQ complementado ao mentol+mentona 100mg/kg, obteve redução de 43%. Para vermes, o grau de redução do grupo experimental tratado com 100 mg/kg de praziquantel foi de 52%, no grupo tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona a redução foi de 34,3% e a maior redução foi do grupo tratado com 100 mg/kg de PZQ complementado com 100 mg/kg de mentol+mentona, com 70,8%.

**Tabela 9- Percentagem de Redução da carga parasitária (Ovos) – Experimento 2**

Grupos Experimentais	Média do número de ovos	% Redução (GR)
Controle Positivo	312	--
PZQ 100	196,8	37
PZQ/MO+MA 100	177,6	43
MO + MA 100	264	15,4

Redução da média de ovos contados através do método Kato-Katz após 54 dias de infecção. Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento); PZQ (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de praziquantel); PZQ/MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com dose única de 100 mg/kg de PZQ e mais 13 dias com 100 mg/kg de mentol+mentona) e MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona).

**Tabela 10- Percentagem de Redução da carga parasitária (Vermes adultos) – Experimento 2**

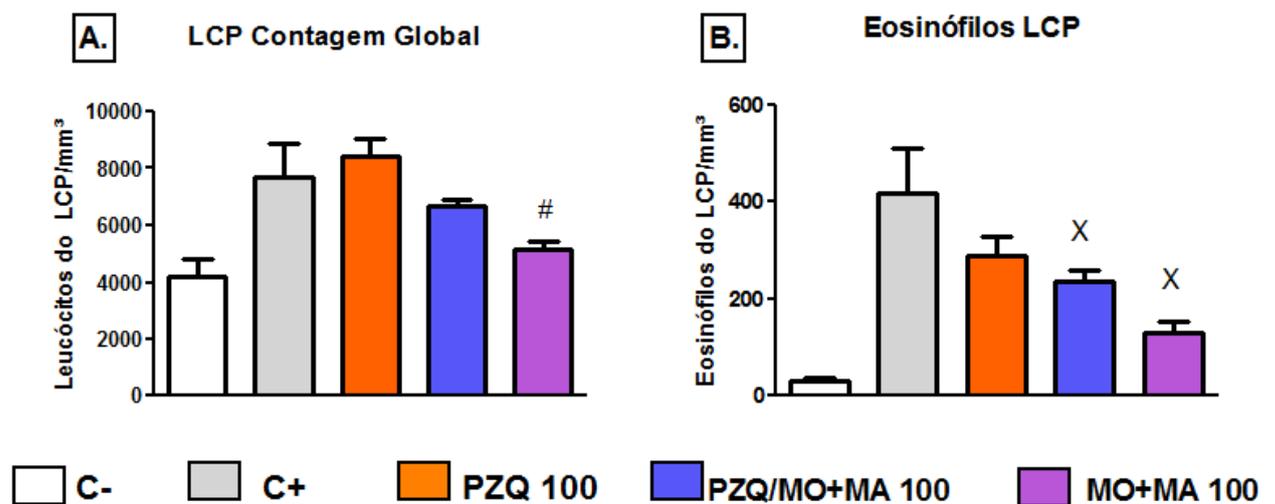
Grupos Experimentais	Média do número de vermes	% Redução (GR)
Controle Positivo	35	--
PZQ 100	16,8	52
PZQ/MO + MA 100	10,2	70,8
MO + MA 100	23	34,3

Redução da média de vermes contados através da perfusão do sistema porta hepático e mesentéricos dos camundongos após 55 dias de infecção. Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento); PZQ (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de praziquantel); PZQ/MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com dose única de 100 mg/kg de PZQ e mais 13 dias com 100 mg/kg de mentol+mentona) e MO+MA 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de mentol+mentona).

### 6.3.5 Contagem global e diferencial de leucócitos do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não tratados

A análise global de leucócitos do LCP (Figura 27-A) mostrou que o tratamento de 100 mg/kg de mentol e mentona foi significativo em sua redução quando, comparado ao grupo tratado com 100 mg/kg de PZQ. Apesar de não significativo, o grupo PZQ/ MO+MA 100 reduziu em 13,15% e MO+MA 100 reduziu em 33,11%, quando comparados ao número de leucócitos do grupo controle positivo. Quanto aos eosinófilos (Figura 27-B), os grupos PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100, obtiveram redução significativa, quando comparados ao controle positivo.

**Figura 27- Contagem global e diferencial de leucócitos do lavado da cavidade peritoneal após 55 dias de infecção/ Experimento 2.**

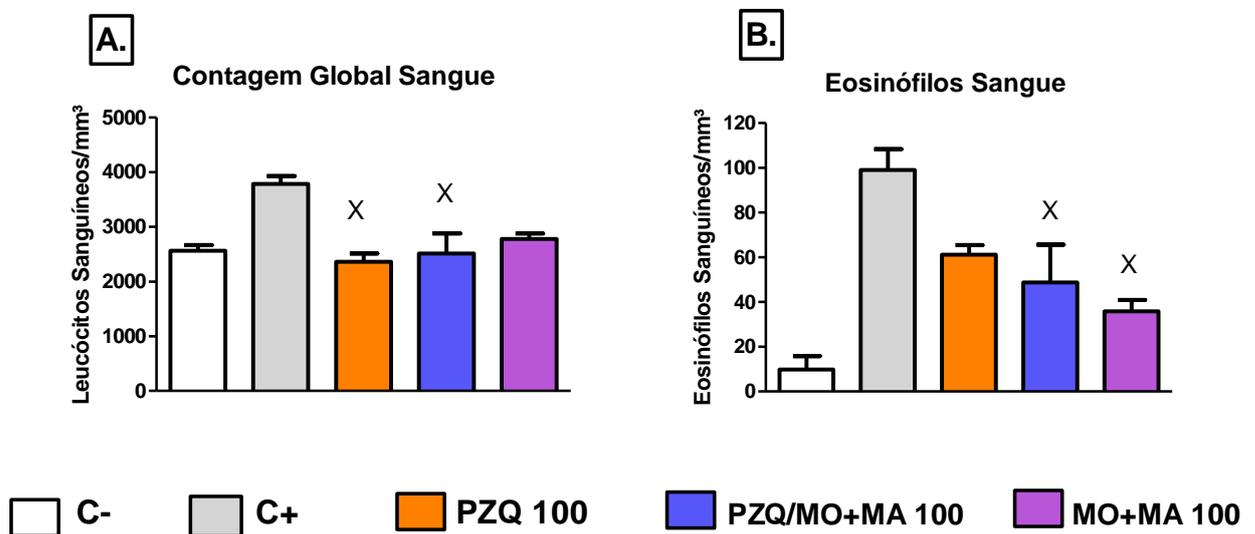


**A:** Contagem global de leucócitos LCP/mm<sup>3</sup>; **B:** Contagem diferencial de eosinófilos LCP/mm<sup>3</sup>. Os dados representam a média ±EPM. (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ 100, PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100 mg/kg) quando comparados com o grupo Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). (#) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100) quando comparados com o grupo PZQ 100 (grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de praziquantel). O controle negativo (C-) refere-se ao grupo sem infecção e sem tratamento. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ , utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

### 6.3.6 Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos dos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não tratados

Na contagem global de leucócitos sanguíneos (Figura 28-A), os grupos PZQ 100 e PZQ/MO+MA 100 mostraram-se significativos menores em relação ao controle positivo. O grupo MO+MA 100, obteve redução de 26,7%. Para os eosinófilos sanguíneos (Figura 28-B), os grupos PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100 obtiveram redução significativa quando comparados ao controle positivo.

**Figura 28-** Contagem global e diferencial de leucócitos sanguíneos após 55 dias de infecção/ Experimento 2.

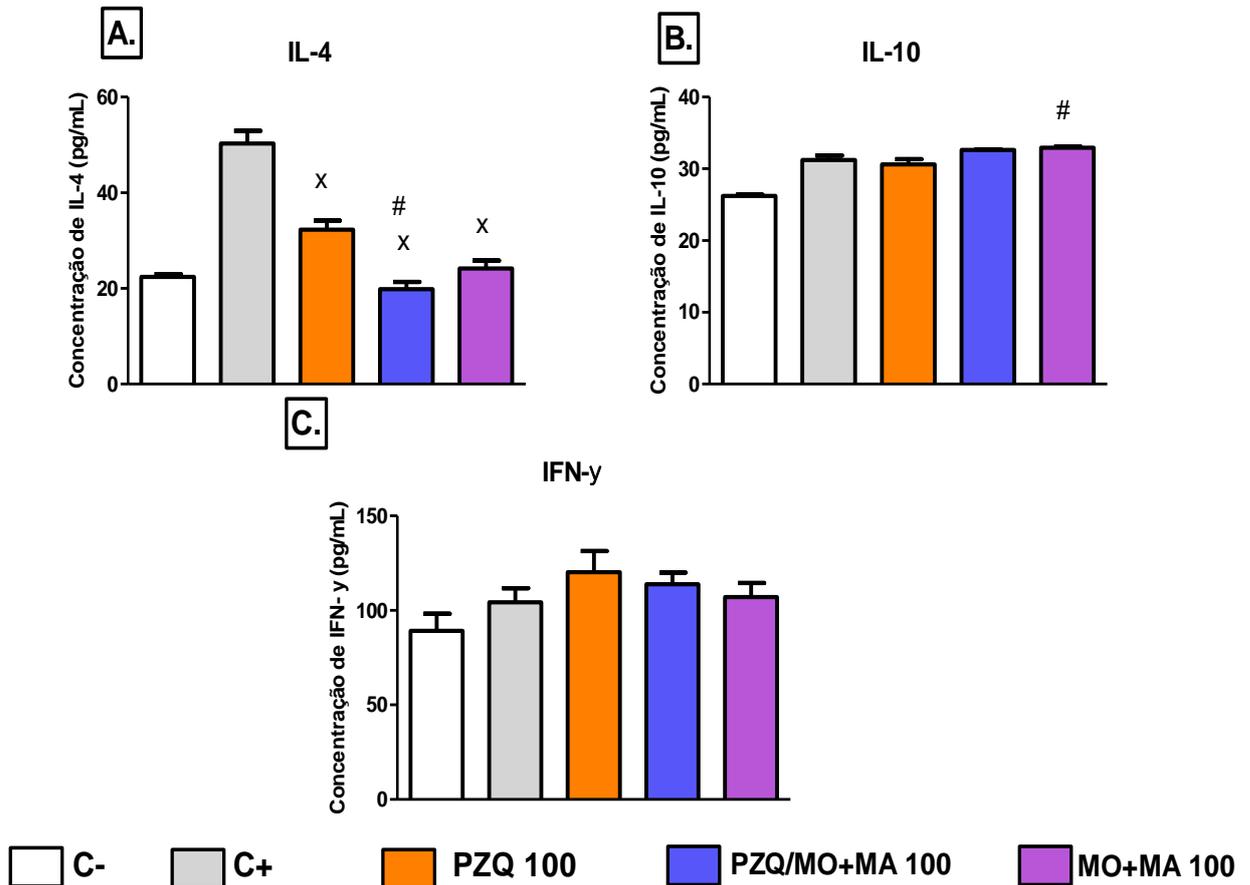


**A:** Contagem global de leucócitos Sangue/mm<sup>3</sup>; **B:** Contagem diferencial de eosinófilos Sangue/mm<sup>3</sup>. Os dados representam a média  $\pm$ EPM. (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados e tratados (PZQ 100, PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100 mg/kg) quando comparados com o grupo Controle positivo (grupo infectado e sem tratamento). O controle negativo (C-) refere-se ao grupo sem infecção e sem tratamento. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ , utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

### 6.3.7 Quantificação de citocinas do plasma

A partir do plasma, três citocinas foram quantificadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Para a citocina IL-4 (Figura 29-A), todos os grupos tratados obtiveram redução significativa quando comparados ao grupo infectado e sem tratamento. O grupo PZQ/MO+MA 100 também mostrou redução significativa, em relação ao grupo tratado somente com PZQ na concentração de 100 mg/kg. Para a citocina IL-10 (Figura 29-B), apenas o grupo MO+MA 100 mostrou significativo quando comparado ao grupo PZQ 100. Enquanto que, para a citocina IFN- $\gamma$  (Figura 29-C), não houve significância, entretanto todos os grupos tratados aumentaram discretamente os níveis de IFN- $\gamma$ .

Figura 29- Quantificação das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ / Experimento 2.



**A: Análise das citocinas: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  através do ensaio imunoenzimático ELISA** IL-4 (pg/mL); **B:** IL-10 (pg/mL); **C:** IFN- $\gamma$  (pg/mL). Os dados representam a média  $\pm$  SEM. Foi usado o pool de plasma de cada grupo e analisado em triplicata. (X) representa diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados tratados (PZQ 100, PZQ/MO+MA 100 e MO+MA 100), quando comparados com o grupo Controle Positivo (grupo infectado e sem tratamento). A análise foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 7. DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença helmíntica de grande relevância, sendo responsável por cerca de 200 mil mortes por ano e aproximadamente 206 milhões de pessoas necessitam de tratamento. No Brasil, encontramos somente a espécie *S. mansoni*, causadora da esquistossomose mansônica que afeta cerca de 6 milhões de pessoas no país (WHO, 2017; ABATH et al, 2006). O maior problema enfrentado pela doença é o seu tratamento limitado, que culmina em casos de vermes resistentes, devido ao intenso uso, principalmente em áreas endêmicas, do medicamento praziquantel (PZQ), usado como único tratamento por mais de 40 anos. Além disso, o medicamento é pouco eficaz contra as formas mais jovens do verme e já tem relatos de vermes com perda de sensibilidade.

O uso de plantas medicinais e suas diferentes aplicações para prevenção, cura ou tratamento de doenças é considerada uma das práticas mais antigas da humanidade. Essas, sem dúvida, são uma importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007). Dessa forma, o uso de plantas na busca de tratamentos alternativos ou que auxiliam no tratamento com o fármaco de escolha contra a esquistossomose mansônica torna-se valioso.

Nosso estudo propôs avaliar os efeitos citotóxicos, anti-inflamatórios, imunomodulador e parasitário, da associação de mentol e mentona, com composições definidas (sendo 70% mentol e 30% mentona), durante a esquistossomose murina, complementando ou não o tratamento convencional com PZQ. Esses compostos são extraídos de plantas do gênero *Mentha*, sobretudo de *Mentha x piperita* L., a maior produtora de mentol e mentona. Além disso, buscou-se complementar o efeito de PZQ numa concentração menor que a recomendada pela OMS, com tratamento diário de mentol+ mentona.

Apesar da utilização medicinal de plantas ser uma prática milenar, é imprescindível que sejam realizados estudos que comprovem a eficácia e segurança no uso dessas plantas, pois muitas são utilizadas de forma incorreta, podendo causar intoxicações variadas desde uma simples dermatite ou até a morte (CARNEIRO et al, 2014). Dessa forma, o presente estudo buscou inicialmente avaliar a citotoxicidade da associação dos compostos mentol e mentona, em diferentes concentrações frente aos macrófagos (RAW 264.7).

O estudo de Silva et al (2017), demonstrou a não citotoxicidade do composto mentol nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, testada por 24 horas sobre a linhagem L929 de fibroblastos. Cabe ressaltar que 70% do nosso tratamento *in vitro* é composto de apenas mentol. Enquanto que, Sun et al (2014) testa a citotoxicidade do óleo essencial de *M. x*

*piperita* oriunda da China, sobre macrófagos (RAW 264.7), nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 µg/mL por exposição de 24 horas e nenhuma das concentrações foi citotóxica, permitindo viabilidade celular acima de 80%. As concentrações mais baixas do nosso estudo de 62,5 e 125 µg/mL da associação de mentol e mentona, também demonstraram não citotoxicidade frente à linhagem de macrófagos (RAW 264.7). Esses dados demonstram que os compostos mentol e mentona permitem viabilidade de células diferentes, no caso fibroblastos e macrófagos (nas concentrações citadas). Nenhuma das concentrações testadas em nosso estudo, inclusive as concentrações maiores de 250, 500, 1000 e 1500 µg/mL foram citotóxicas para macrófagos (RAW 264.7). Além do mais, nosso trabalho avaliou três tempos de exposição diferentes: 24, 48 e 72h (Figuras 10, 11 e 12).

Uma outra propriedade de *Mentha x piperita* L., particularmente importante para nosso estudo, foi demonstrada pelo nosso grupo, onde Correia et al (2010), avaliou o extrato de *Mentha x piperita* L. em concentrações acima de 1000 µg/mL que mostrou atividade contra vermes adultos de *S. mansoni in vitro*, causando separação dos casais e diminuindo a atividade motora do tegumento. Não sabemos se de fato os efeitos causados derivam do extrato bruto como um todo ou se somente alguns princípios ativos de *Mentha x piperita* L., *in vitro*, seriam capazes de agir contra os vermes de *S. mansoni*, porém esse fato abre portas para novos estudos, onde mentol e mentona poderiam ser testados *in vitro*.

Um outro parâmetro analisado *in vitro* foi a produção ou não de óxido nítrico (NO) por macrófagos, expostos a diferentes concentrações da associação de mentol e mentona. O NO está envolvido em processos que favorecem o aumento de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, produção de prostaglandinas, e ainda, pode ser considerado como um mediador inflamatório. NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que está presente sob três tipos de isoformas (nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (induzível), e essa última (iNOS), está presente nos processos inflamatórios. Em repouso, macrófagos não produzem iNOS (PACHER; BECKMAN; LIAUDET 2007; COLEMAN, 2002). Assim, quando macrófagos estão ativos, durante uma inflamação, passam a produzir óxido nítrico.

Karimian et al (2013) demonstram em seu trabalho que macrófagos (J774A-1), expostos a fração hexano do extrato de *M. longifolia* (0,05, 0,10 e 0,10 mg/mL) e estimulados com LPS, tiveram reduções significativas de NO. Enquanto que, Sun et al (2014) utilizando macrófagos (RAW 264.7) estimulados com LPS e tratados com 100 µg/mL do OE de *M. x piperita* L., obteve inibição de 34,3% na produção de NO. Esses trabalhos diferem dos nossos pois, os autores realizaram a estimulação de macrófagos com LPS e após, realizaram

tratamento com plantas do gênero *Mentha* e assim, obtiveram reduções nos níveis de produção de NO. Enquanto que no nosso estudo não houve a estimulação com LPS, apenas exposição com diferentes concentrações de MO+MA e comparação com o grupo estimulado com LPS, mas sem tratamento com mentol e mentona (Figuras 13, 14 e 15). Entretanto, esses dados podem sugerir que de fato, o gênero *Mentha* possui propriedades anti-inflamatórias visto que, não induz macrófagos a produzirem NO e além do mais, podem auxiliar modulando macrófagos a reduzirem a produção de NO em situações de inflamação.

Dentro da fisiopatologia da esquistossomose mansônica, o NO possui funções que devem ser mantidos em homeostase. A produção de NO aumenta no fígado do hospedeiro quando se inicia a oviposição pelas fêmeas de *S. mansoni*. Em contrapartida, com o aumento de resposta do tipo Th2, a resposta Th1 diminui e ocorre a regulação de produção excessiva de NO (BRUNET et al, 1999). Entretanto, Patton (2002), observaram em seu estudo que camundongos deficientes em IL-4 (citocina de perfil Th2), tinham níveis em excesso de NO e de IFN- $\gamma$ , e desenvolveram granulomas bem estruturados e uma síndrome aguda, levando os a morte. Isso decorreu da falta de resposta Th2 que não regulou NO. Quando NO é produzido de maneira controlada durante a esquistossomose mansônica, danos hepatocelulares e fibróticos podem ser limitados (HESSE et al., 2001). Ainda, um estudo de Shen et al (2017), sugere que são os altos níveis de expressão de iNOS que explicam a não susceptibilidade de algumas espécies de ratos a infecção com *S. japonicum*.

PZQ é recomendado pela OMS para tratamento em humanos na dose única de 40 mg/kg para *S. mansoni* (WHO, 2008b). Nos experimentos utilizando camundongos, a dose é ajustada devido ao intenso metabolismo dos roedores, assim usualmente utiliza-se uma dose única de 400 mg/kg (10x mais que a recomendada). A dose única de 400 mg/kg foi utilizada no experimento 1, para comparação com os diferentes tratamentos utilizando mentol e mentona. Para o experimento 2, buscando avaliar de fato, a contribuição da complementação da associação de mentol e mentona ao tratamento com PZQ, baixamos a dose para 100 mg/kg de acordo com o estudo de Keiser et al (2011), que associaram o PZQ a mefloquina (medicamento para tratamento de malária). Nesse estudo foi demonstrado que a dose única de 100 mg/kg de PZQ em camundongos (NMRI) infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (LS), reduziu o número de vermes em 15%, enquanto que o melhor tratamento combinado (100mg/kg de PZQ + 100 mg/kg de mefloquina) reduziu em 86% o número de vermes. Em nosso estudo o grupo tratado com apenas a dose única de 100 mg/kg de PZQ, obteve redução de 52% no número de vermes (Tabela 9), porém utilizamos linhagens de camundongos (Balb/c) e de cercárias de *S. mansoni* (B.H) diferentes. No estudo de Clercq (2000), foi

realizado a associação de PZQ e artesunato (derivado da artemisina- extraído de *Artemisia annua*) para o tratamento de pacientes humanos diagnosticados com esquistossomose mansoni no Senegal. A taxa de redução de ovos após 5 semanas do tratamento, foi maior para o tratamento associado (89%) do que os tratamentos que receberam só artesunato (59%) ou só praziquantel (84%). Embora nosso estudo, não seja de uma associação, tivemos bons resultados com o grupo PZQ complementado ao mentol e a mentona (Figuras 25 e 26).

Em nosso estudo, a análise de ovos nas fezes dos animais do primeiro experimento, ocorreu no dia 61º após infecção com cercárias de *S. mansoni* (B.H) e nenhum dos tratamentos com mentol e mentona no tempo de 15 dias, obtiveram redução significativa, porém o grupo MO+MA 100 reduziu em 14,3% o número de ovos e em 37,8% o número de vermes (Figuras 16 e 17; Tabelas 4 e 5). Para o segundo experimento, a análise de ovos nas fezes dos animais, ocorreu no 55º dia após a infecção e os tratamentos com mentol e mentona foram por 13 dias. O grupo tratado com 100 mg/kg de mentol e mentona, obteve uma redução no número de ovos de 15,4%, número semelhante ao do tratamento por 15 dias do experimento 1, e redução de 34,3% de redução dos vermes adultos (Figuras 25 e 26; Tabelas 9 e 10). Já o grupo PZQ/MO+MA 100, obteve redução de ovos de 43% e de 70,8% de redução de vermes, números superiores à redução encontrada no grupo tratado apenas com PZQ (100 mg/kg), que foi de 37% para ovos e de 52% para vermes (Figuras 25 e 26; Tabelas 9 e 10). Em nosso grupo Zaia et al (2016), realizou o tratamento de camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* (linhagem B.H), com 50 mg/kg de uma cápsula contendo apenas mentol e mentona (30-55% de MO e de 14-32% de mentona), e observou a redução de 8,4% no número de ovos no grupo tratado por 60 dias e redução de 28,4% no grupo tratado por 15 dias. Enquanto que, outro estudo do nosso grupo realizado por Dejadi (2014), demonstrou que a administração por 49 dias de 100 mg/kg do extrato bruto de *Mentha x piperita* L., em camundongos Balb/c infectados com cercárias de *S. mansoni* (linhagem L.E), leva a redução de 35,2% no número de vermes e de 51,7% de redução no número de ovos encontrados nas fezes. E nosso estudo, realizado por Feitosa et al (2018), mostrou que camundongos tratados por somente 14 dias com os compostos mentol e mentona em cápsula, na concentração de 30 mg/kg, reduz os ovos de *S. mansoni* em 62,80%. Esse trabalho utilizou camundongos Swiss e linhagem diferente de cercárias (L.E). Dessa forma, sugerimos que não é necessário um tratamento prolongado para que ocorra a ação parasitária do tratamento com mentol e mentona, quando as composições estão definidas (70% MO e 30% MA), na concentração de 100 mg/kg. Porém outros componentes presentes no extrato bruto da planta e diferentes

linhagens de cercarias de *S. mansoni* utilizadas na infecção dos camundongos, podem influir sobre os resultados, sobretudo na redução de ovos eliminados nas fezes dos animais.

O granuloma pode ser definido como um conjunto organizado de células, que formam uma estrutura esférica, circundando o ovo. Sua formação é induzida pelos antígenos liberados pelos ovos (SEA) e mediada por linfócitos T CD4+, TNF, Th1 e Th2 e linfócitos T CD8. Seus principais constituintes são eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos que induzem resposta inflamatória e fibrótica (LENZI et al., 1991; SWARTZ et al., 2006; CHEEVER et al., 2002). Em nosso estudo foi realizado a contagem global do número de leucócitos sanguíneos e do LCP nos animais. Em ambos experimentos encontramos reduções de leucócitos nos grupos tratados com a associação de mentol e mentona (Figuras 18-A, 19-A, 27-A e 28-A). No trabalho de Sharafi et al (2010), houve diminuição de 38,3% nas contagens de leucócitos sanguíneos, de animais tratados por 30 dias com óleos fitoquímicos bioativos de *Mentha x piperita* L., nas concentrações de 100 a 200 mg/kg. Sugere-se que essas reduções ocorreram, devido ao potencial anti-inflamatório que *Mentha x piperita* L. possui.

Os eosinófilos constituem cerca de 50% dos granulomas esquistossomóticos. Quando ativados, os eosinófilos induzem inflamação e liberam grânulos eosinofílicos. Esses grânulos são constituídos de proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada de eosinófilos e peroxidase eosinofílica. Esses componentes são tóxicos sobre os parasitas. Entretanto, a proteína básica principal, também é tóxica para o hospedeiro, causando lesões teciduais (HOGAN et al., 2008; SWARTZ et al., 2006). Essas divergências causam questionamentos sobre o papel dos eosinófilos perante a defesa do hospedeiro, o mais provável é que durante uma infecção não ocorra exacerbada eosinofilia ou eosinopenia. Em nosso trabalho analisamos os eosinófilos pela contagem diferencial do LCP e do sangue dos animais. No primeiro experimento todos os grupos que receberam tratamentos com mentol+mentona reduziram significativamente o número de eosinófilos do LCP e do sangue (Figura 18-B e 19-B). No segundo experimento, houve reduções significativas no número de eosinófilos do LCP, nos grupos PZQ/MO+MA e MO+MA 100 quando comparados ao grupo controle positivo. No sangue, o mesmo perfil repete-se, apenas o grupo PZQ/MO+MA e o grupo MO+MA 100, reduziram significativamente os eosinófilos sanguíneos (Figura 27-B e 28-B). Esses dados sugerem que mentol e mentona podem modular o recrutamento dos eosinófilos, pois os grupos tratados somente com PZQ (400 ou 100 mg/kg) não foram eficazes na redução dos eosinófilos no sangue e nem no LCP. Nossos dados corroboram com o de Zaia et al (2016), que demonstraram redução no número de eosinófilos sanguíneos, no grupo tratado por 60 dias com 50 mg/kg de mentol e mentona em cápsula. O grupo tratado

com dose única de 400 mg/kg não obteve reduções de eosinófilos no sangue e nem LCP. E Feitosa et al (2018), também demonstraram que grupos tratados com mentol e mentona em cápsula, por 14 dias, nas doses de 30 e 50 mg/kg foram significativos em suas reduções quando comparados ao controle positivo, infectado e sem tratamento. Esses dados demonstram o potencial de regulação inflamatório de mentol e mentona.

A fase aguda da esquistossomose tem perfil de citocinas do tipo Th1, que são citocinas pró inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. Durante fase crônica a resposta do tipo Th1 sofre redução, e prevalece resposta do tipo Th2, que tem seu pico de produção aproximadamente 7 a 8 semanas após a infecção (PEARCE; MACDONALD, 2002; BURKE et al., 2009; STAVITSKY, 2004). Nossos experimentos analisaram a produção de citocinas oito semanas após infecção para o experimento 1 e sete semanas após infecção para o experimento 2. Apesar disso, observa-se que para ambos experimentos, ocorreu discreto aumento da citocina IFN- $\gamma$ , nos grupos tratados (Figuras 20-C e 29-C). O estudo de Fallon (2000) em modelo murino, demonstrou uma atividade de redução da deposição de colágeno, mediado por citocinas tipo Th1, principalmente a IFN- $\gamma$ . Trabalhos *in vitro* também tem demonstrado que a IFN- $\gamma$  é uma citocina antifibrótica, inibindo a produção de proteínas de matriz extracelular (ROCKEY; CHUNG, 1994). Esses dados sugerem que os animais tratados com mentol e mentona, possam apresentar um processo fibrótico reduzido.

A imunomodulação durante resposta Th2 na esquistossomose é de extrema importância, pois garante que não ocorra exacerbação dos processos granulomatosos e fibróticos da fase crônica (FALLON et al., 2000). A citocina IL-10, sendo considerada uma citocina regulatória possui papel importante para sobrevivência do hospedeiro, pois controla a morbidade da esquistossomose. Dessa forma, IL-10 é dita como uma citocina protetora (SOUZA et al., 2011). A transição da fase aguda para a crônica é marcada por níveis maiores de IL-10 (PEARCE; MACDONALD, 2002). Nossos resultados em ambos experimentos demonstraram aumento da citocina IL-10 em todos os grupos infectados e tratados, porém sem significância quando comparados ao controle positivo (Figuras 20-B e 29-B). Porém, os níveis aumentados de IL-10, podem sugerir que houve diminuição da resposta inflamatória nesse modelo experimental.

Nossos resultados para a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, vão de encontro aos resultados encontrados por outro estudo de nosso grupo, realizado por DeJani (2014). As citocinas foram analisadas sete semanas após infecção por *S. mansoni* e o grupo tratado por 49 dias com 100 mg/kg de extrato bruto de *Mentha x piperita* L. apresentaram aumento nos níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 assim como no presente trabalho. Demonstrando que não

há necessidade de tratamentos prolongados com mentol e mentona, quando se apresentam em composições definidas (70% de mentol e 30% de mentona).

A IL-4 está relacionada com a reação granulomatosa e é uma importante citocina na iniciação da resposta inflamatória, principalmente no perfil Th2 (FALLON, 2000; SILVEIRA-LEMOS, 2008). Estudos feitos com camundongos demonstraram que durante a fase crônica da esquistossomose, houve expressão de níveis maiores de IL-4, e esta é descrita como uma citocina indutora do colágeno (FERTIN et al., 1991; SEMPOWSKI; DERDAK; PHIPPS, 1996). Nossos resultados demonstraram redução da produção dessa citocina em todos os grupos tratados, tanto no experimento 1, quanto no experimento 2 (Figura 20-A e 29-A). A baixa expressão de IL-4 diminui a resposta inflamatória do tipo Th2, o que não favorece a proliferação e atividade dos eosinófilos (SWARTZ et al., 2006). Dessa forma, os níveis reduzidos de IL-4 corroboram com a redução dos eosinófilos encontrados nos grupos tratados com a solução de mentol e mentona e sugere-se que houve menor número de ovos e conseqüentemente, menor número de granulomas nesses grupos comparado ao controle positivo (Figuras 18-B; 19-B; 27-B; 28-B e Tabelas 6 e 7).

As principais complicações da esquistossomose mansônica, decorrem principalmente da localização dos vermes e do acúmulo de ovos presos aos tecidos, durante fase crônica da doença. Esses ovos ao liberar seus antígenos, principalmente os solúveis (SEA), recrutam células que ao tentar destruí-los formam os granulomas. Com a desintegração dos ovos, o granuloma diminui, mas as fibras colágenas formadas durante a fibrose levam a aumento da pressão sanguínea e aumento do diâmetro da veia porta. Essas alterações podem levar ao quadro de bloqueio da circulação pré-sinusoidal no fígado que acarreta na hipertensão portal, varizes gastrointestinais, ascite e hepatoesplenomegalia, e em casos mais graves a morte do indivíduo infectado. Portanto, o fígado pode ser considerado como o órgão com maior comprometimento durante a esquistossomose mansônica (GRYSEELS et al., 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Estudos histológicos foram realizados somente para o experimento 1. Os fígados foram analisados 62 dias após a infecção com *S. mansoni*. Ao observar as fibras de colágeno nos grupos tratados com a associação de mentol e mentona, observa-se maior deposição no grupo tratado com 70 mg/kg, pois esse apresenta maior número de granulomas hepáticos. Porém ambos grupos tratados com solução mentol e mentona apresentaram um parênquima hepático mais preservado quando comparado ao fígado dos animais infectados e sem nenhum tratamento (Figuras 23-A, 23-D e 23-E e Figuras 24-A, 24-D e 24-E). A contagem de ovos, somente leva em consideração ovos íntegros. Ao realizarmos a contagem de ovos no fígado

dos animais do grupo MO+MA 70, percebemos que ao mesmo tempo que há menor número de ovos íntegros (55,2%), também há muitos ovos que já foram desintegrados e ao seu redor os granulomas, dessa forma há mais granulomas nesse grupo do que no grupo MO+MA 100. Já o grupo MO+MA 100, apresenta maior número de ovos íntegros, e por isso menor percentual de redução (36,1%), porém, possui menor número de granulomas. Esses dados podem ser observados nas tabelas 6 e 7. Zaia et al (2016) demonstram que camundongos tratados com cápsula de mentol e mentona por 15 dias na concentração de 50 mg/kg obtiveram 7% de redução nos granulomas, redução abaixo do que observamos em nosso estudo utilizando uma concentração maior e com composições definidas de mentol+mentona. Enquanto que no mesmo trabalho, o grupo tratado com 400 mg/kg de PZQ reduziu granulomas em 36,1%, redução semelhante ao que encontramos em nosso estudo no grupo tratado com PZQ, que foi de 34,8%. Outro trabalho do nosso grupo, Feitosa et al (2018), demonstraram que grupos tratados com mentol e mentona em cápsula associado ao ácido acetilsalicílico (AAS), foram capazes de produzir mais colágeno tipo III em seu tecido hepático, caracterizando melhor cicatrização nos processos fibróticos. Entretanto, esse trabalho utilizou-se de método de coloração Picro-Sírius que identifica os tipos de colágenos, através da cor observada por microscopia com lente polarizada.

Ao realizarmos a complementação do PZQ (100 mg/kg) com a associação de mentol e mentona (100 mg/kg) obtivemos melhores resultados, do que quando realizamos o tratamento utilizando somente os compostos ou somente PZQ. Dessa forma podemos sugerir que o uso desses compostos podem ser uma forma eficaz de auxiliar o tratamento tradicional. O fato de realizarmos o tratamento utilizando composições definidas de mentol e mentona, 70% e 30% respectivamente, podem facilitar a construção de um medicamento, pois estes compostos podem ser sintetizados. Porém, visto que nossos resultados derivam de experimentos amostrais é de fundamental importância que mais estudos sejam realizados, buscando a melhor compreensão dos dados já obtidos.

Por fim, nossos resultados sugerem que a associação de mentol e mentona, além de sua complementação ao tratamento com PZQ, podem contribuir para a modulação do processo inflamatório durante a esquistossomose murina, e isso contribui para um potencial efeito antiparasitário e anti-inflamatório nos diferentes tratamentos utilizando os compostos mentol+mentona.

## 8. CONCLUSÕES

- I. O tratamento composto por 70% de mentol associado a 30% de mentona, apresentam efeitos antiparasitários e anti-inflamatórios durante infecção experimental com *S. mansoni* em modelo murino;
- II. Apesar de mentol e mentona serem os principais constituintes de *Mentha x piperita* L., outros componentes de seu óleo essencial podem auxiliar na redução da carga parasitária de camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni*;
- III. Os efeitos antiparasitários foram melhores demonstrados no tratamento utilizando 100 mg/kg da associação de mentol e mentona, que promoveu redução no número de ovos eliminados nas fezes, redução de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e redução de granulomas no tecido hepático;
- IV. O efeito anti-inflamatório foi demonstrado perante redução de leucócitos totais e número de eosinófilos do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal, além da redução significativa observada nos níveis de IL-4 em grupos tratados com os compostos, promovendo redução de granulomas;
- V. A complementação de uma dose menor de praziquantel (100 mg/kg) com a associação de mentol e mentona (100 mg/kg), apresentam melhores resultados do que os tratamentos realizados de forma isolada (somente 100 mg/kg de mentol e mentona ou somente 100 mg/kg de PZQ) para o controle da esquistossomose murina, sobretudo na redução da carga parasitária;
- VI. Nossos resultados sugerem que a associação de mentol e mentona, na composição apresentada, 70% mentol e 30% mentona, não necessita de tratamentos prolongados para que seus efeitos sejam observados;
- VII. A associação de mentol e mentona não são citotóxicos e sugerem maior segurança na elaboração de um medicamento que utilize esses compostos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.C.F. et al. Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, p.145-148, 2006.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology E-Book. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

ALANKAR, S. A review on peppermint oil. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 2, p. 27-33, 2009.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

BARBOSA, C. S. et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v.17, n.3, p. 725- 728, 2001.

BEHN, H. et al. Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7361-7367, 2010.

BEZERRA, F. S. M. Moluscos transmissores da esquistossomose mansoni. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana, v.10, **Atheneu**, 2000.

BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, p. 1471– 1482, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). 2014. **Situação epidemiológica**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>>. Acesso em 19 jan. 2018.

BROOKER, S. et al. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. **Geospatial health**, v. 1, n. 2, p. 141-146, 2007.

BRUNET, L. R. et al. Nitric oxide and the th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology, Baltimore**, n. 163, p. 4976-4977, 1999.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v.31, n.4, Apr, p.163-76. 2009

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARVALHO, E. M. F. et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, n.4, p. 787-795, 2005.

CARVALHO, O. S. et al. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. *Schistosoma mansoni*: **Esquistossomose uma Visão Multidisciplinar**, p. 149-160, 2008.

CHAI, J. Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. **Infection & chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 32-43, 2013.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917-940, 2002.

CASTRO, A.P. et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: a review of bioactivity against *Schistosoma mansoni*. **Journal. Medicinal. Plants Research**, v.7, n.21, p.1515-1522, 2013.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141-150, 2014.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Cimerman: parasitologia humana e seus fundamentos gerais. **Atheneu**, 2010.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.195, p.23-29, 2014.

CLERCQ, D. de et al. What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, n. 10, p. 744-746, 2000.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide: A regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 129, n. 1, p. 4-10, 2002.

CORREIA, R. O. et al. Atividade esquistomissida da *Mentha piperita* L. contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, *in vitro*. **Revista Saúde**, v. 4, 2010.

CORTELLINI, A. et al. Topical menthol for treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Indian journal of palliative care**, v. 23, n. 3, p. 350, 2017.

COURA, JR.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p.13-19, 2004.

COUTINHO, A. D.; DOMINGUES, A. L. C. Esquistossomose mansoni, In: **Gastroenterologia Clínica**. 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, Cap. 108. p. 1697-1728, 1993.

CROTEAU, R. et al. Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562-577, 2005.

- DAVIS, E. M. et al. Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. **Plant physiology**, v. 137, n. 3, p. 873-881, 2005.
- DE ALMEIDA, L. M. S. et al. Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- DEJANI, N. N. et al. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x piperita* L. **Immunobiology**, v. 219, n. 8, p. 627-632, 2014.
- DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.
- DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.
- DUVALL, R.H.; DEWITT, W.B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, n. 4, p. 483-6, 1967.
- EL-DEEN, S. A. S.; BRAKAT, R. M.; MOHAMED, A. S. El D. Artichoke leaf extract protects liver of *Schistosoma mansoni* infected mice through modulation of hepatic stellate cells recruitment. **Experimental Parasitology**, v.178, p. 51-59, 2017.
- FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83-88, 1994.
- FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology today**, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000.
- FALLON, P.G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol.**, v.164, n. 5, p. 2585-91, 2000.
- FEITOSA, K. A. et al. Menthol and menthone associated with acetylsalicylic acid and their relation to the hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1000, 2018.
- FERTIN, C. et al. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. **Cell Mol Biol.**, v. 37, n. 8, p. 823-9, 1991.
- FONSECA C.T. et al. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 63-6, 2004.
- FREZZA, T. F. et al. Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. **Acta Tropica**, v. 128, p. 70-75, 2013.

GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 103-118, 2003.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem**, v.126, n.1, p. 131-38, 1982.

GREENBERG, R. M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? **International journal for parasitology**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2005.

GRYSEELS, B. et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Tropical medicine & international health**, v. 6, n. 11, p. 864-873, 2001.

GRYSEELS, B. K. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, n. 9541, p.1106-18. 2006.

HAMS, E; AVIELLO, G; FALLON, P.G. The *Schistosoma granuloma*: friend or foe? **Front. Immunol.** v.4, n.89, p. 1-4, 2013.

HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1 / type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by pattern of l-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-750, 2008.

KAMATOU, G. P. P. et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. **Phytochemistry**, v. 96, p. 15-25, 2013.

KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G.; AMIRGHOFRAN, Z. Anti-inflammatory effect of *Mentha longifolia* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: reduction of nitric oxide production through inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Journal of immunotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 393-400, 2013.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, Barriga d'água. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p.303-308, 2000.

KEISER, J.; MANNECK, T.; VARGAS, M. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1791-1797, 2011.

KUMAR, P. et al. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 802-817, 2011.

LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 77-90, 1991.

LORENZI, H.; MATOS, J. F. A. Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**. p.51, 2002.

MACKEY, T. K. et al. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 949–79, 2014.

McKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytoter Res**, v.20, n.8, p.33, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, J. F. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica nos bairros Novo Horizonte e Campo Limpo, Feira de Santana, Bahia. **Sittentibus Ciências Biológicas**, v. 2, n. 1, p. 69-72, 2002.

OLIVEIRA, L. F. A. et al. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infection and immunity**, v. 74, n. 2, p. 1215-1221, 2006.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PARISE-FILHO, R.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 123-135, 2001.

PATEL, T.; ISHIUJI, Y.; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 873-878, 2007.

PATTON, E. A. et al. Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 177-184, 2002.

PAULUS, D. et al. Teor e qualidade do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) produzida sob cultivo hidropônico e em solo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 9, n. 2, p. 80-87, 2007.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PEGORARO, R. L. et al. Produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* var. piperita (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, p. 631-637, 2010.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev. Bras. Malariol.** v. 8, p. 589-97, 1956.

RASO, G. et al. Efficacy and side effects of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in a community of western Côte d'Ivoire. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 18-27, 2004.

REY, L. Parasitologia. 4. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008

ROCKEY, D.C, CHUNG, J.J. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. **J. Investig Med.**, v. 42, n. 4, p. 660-70, 1994.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D'Oeste-SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

ROSS, A.G.P. et al. *Schistosomiasis*. **N. Engl J Med.** v.346, n.16, p.1212-1220, 2002.

RUFFER, M.A. 1910. Note on the presence of Bilharzia haematobia in Egyptian mummies of the twentieth dynasty. **Br Med**, v.1, p. 16, 1910.

SARVEL, A.K. et al. Evaluation of a 25-Year-Program for the Control of *Schistosomiasis mansoni* in an Endemic Area in Brazil. **PLoS Negl Trop**, v.5, p.3, 2011.

SÃO PAULO (Estado) Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo- SESSP. **Novas estratégias para a vigilância epidemiológica da esquistossomose no estado de São Paulo**. Revista de Saúde Pública, v.43, n.4, p.728-730, 2009.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Trop.**, v. 132, p. 57-63, 2014.

SCRAVONI, J. et al. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Rev Bras Pl Med**, v. 8, n. 4, p. 40-43, 2006.

SEMPOWSKI, G.D.; DERDAK, S.; PHIPPS, R.P. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. **J Cell Physiol.** v. 167, n. 2, p. 290-6, 1996.

SHARAFI, S. M. et al. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 147, 2010.

SHAKER, Y.; SAMY, N.; ASHOUR, E. Hepatobiliary schistosomiasis. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 212, 2014.

SILVA, A. et al. Leishmanicidal Activity and StructureActivity Relationships of Essential Oil Constituents. **Molecules.** v.22; 2017.

SILVA, D. B. et al. Mint (*Mentha* spp) germplasm conservation in Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 27-31, 2006.

SILVEIRA-LEMONS, D. et al. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta tropica**, v. 108, n. 2, p. 150-159, 2008.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines, and pain. **Beaulieu P, Lussier**, 2010.

STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2004.

SUN, Z. et al. Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114767, 2014.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2420-2427, 2006.

THOMAS, H.; GONNERT, R. The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. **Parasitology Research**, v. 52, n. 2, p. 117-127, 1977.

TREVISAN, S. C. C. et al. Properties of *Mentha piperita*: a brief review. **World Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, p. 309-313, 2017.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema. **Biota Netrop**, v. 9, n. 1, p. 279-276, 2009.

TURNER, P. V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011.

VAN DER WERF, M. J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection sub-Saharan Africa. **Acta Trop**. 86, 125-139, 2003.

VAN HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 6, p. 691-699, 2006.

WRIGHT, L. et al. Menthol reduces phototoxicity pain in a mouse model of photodynamic therapy. **Pain**, 2017.

XIAO, S.; CATTO, B. A.; WEBSTER JR., L. T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 6, p. 1130-1137, 1985.

XUE, J. et al. L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 42-48, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 2017. **Fact sheet schistosomiasis**. Atualizado em out. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em 19 jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 2008a. **The facets of TDR research from drug discovery to implementation**. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/news/2008/facets/en/index6.html> >. Acesso em 19 jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 2008b. Praziquantel: Getting the dosage right. Disponível em: < <http://www.who.int/tdr/news/2008/praziquantel-dosing/en/>>. Acesso em 19 jan. 2018.

YOUNG, L.; CHAMBERS, T. A mouse bleeding technique yielding consistent volume with minimal haemolysis. **Laboratory Animal Science**, v.23, p.428-430, 1973.

ZAIA, M. G. et al. Anti-Inflammatory Properties of Menthol and Menthone in *Schistosoma mansoni* Infection. **Frontiers in pharmacology**, v.7, 2016.

## ANEXO

Pró Reitoria  
 Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de São Carlos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da complementação terapêutica do praziquantel ao mentol e mentona durante esquistossomose mansônica experimental", protocolada sob o CEUA nº 5576230616, sob a responsabilidade de **Karina Alves Feitosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/08/2016.

We certify that the proposal "Effect of complementary therapeutic of praziquantel to menthol and mentona during experimental schistosomiasis mansoni", utilizing 50 Isogenics mice (50 females), protocol number CEUA 5576230616, under the responsibility of **Karina Alves Feitosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/18/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2016](#) a [02/2018](#) Área: [Genética E Evolução](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [50](#)

Linhagem: [Balb-C](#)

Peso: [18 a 20 g](#)

Resumo: A esquistossomose mansônica causada pelo trematódeo intravascular *Shistosoma mansoni* é atualmente considerada como uma parasitose de grande relevância mundial e de saúde pública. Estima-se que 249 milhões de pessoas estão infectadas pela doença em aproximadamente 78 países. Para seu tratamento, apenas um fármaco é recomendado pela Organização Mundial da Saúde, o Praziquantel. Além disso, estudos mostram a perda de sensibilidade dos parasitas a este medicamento, e este atua principalmente nas formas adultas do *S. mansoni*. Dessa forma, novos métodos de tratamento para o controle da esquistossomose faz-se necessário. A fitoterapia é uma alternativa valiosa, e há alguns anos nosso grupo vem demonstrando o efeito da planta *Mentha piperita* L. (hortelã pimenta), como potencial fitofármaco para o controle da esquistossomose. Em estudos iniciais avaliamos o efeito do extrato bruto dessa planta no modelo murino da esquistossomose e resultados promissores mostraram alterações na infecção contribuindo para o controle da infecção pelo *S. mansoni*. Mas, sabe que formular um fármaco usando um extrato bruto traz sérias dificuldades. Assim, iremos avaliar por meio da mentona e mentol (substâncias puras) em diferentes formulações o potencial dessa planta como fitofármaco e anti-inflamatório no controle da esquistossomose mansônica utilizando o modelo murino, e ainda testar a associação dessa melhor dose ao fármaco de escolha, o Praziquantel. Buscamos assim, uma potencialização na resposta do hospedeiro em relação à esquistossomose mansônica e também propiciar um uso seguro e adequado das plantas medicinais que já são amplamente utilizadas na cultura popular.

Local do experimento: Laboratório de Parasitologia - LAP UFSCar

São Carlos, 31 de agosto de 2016

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase  
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Federal de São Carlos