

**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**

**EFEITO DA *Mentha piperita* L. DURANTE A INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni***

***MAURICIO GRECCO ZAIA***

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

**Co-Orientadora: Dra. Ana Afonso**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2015**

**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**

**EFEITO DA *Mentha piperita* L. DURANTE A INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni***

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.

**Aluno:** MAURICIO GRECCO ZAIA  
**Orientadora:** Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
**Co-Orientadora:** Dra. Ana Afonso

**SÃO CARLOS – SP  
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Z21em      Zaia, Mauricio Grecco.  
              Efeito da *Mentha piperita* L. durante a infecção  
              experimental por *Schistosoma mansoni* / Mauricio Grecco  
              Zaia. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
              73 f.

              Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
              Carlos, 2015.

              1. Imunologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. *Mentha*  
              *piperita*. 4. Doenças parasitárias - tratamento. I. Título.

CDD: 616.079 (20ª)



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 Mauricio Grecco Zaia, realizada em 27/02/2015:

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann  
USP

---

Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão  
USP

*À minha família e amigos, pelo  
amor, incentivo e apoio durante a  
realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Prof. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, por ter me aceitado como aluno e sempre me incentivado e encorajado aos diversos desafios que passei. Muito obrigado pela dedicação, responsabilidade, amor e respeito ao trabalho, sempre me ajudando a superar todas as dificuldades que passamos. Obrigado por mais esse crescimento profissional e pessoal que tem me proporcionado. Por ser mais que uma Professora, uma amiga.

A Prof. Dra. Ana Afonso, por sempre estar disposta a me ajudar em todas as ocasiões, me ensinando, me aconselhando e por todo o suporte que me deu durante o trabalho. Pela grande pessoa e profissional que é.

Ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares que gentilmente disponibilizou seu laboratório para a realização e leitura das lâminas histológicas.

A Prof. Dra. Lúcia Helena Faccioli por ter cedido espaço e material para a realização dos ensaios imunológicos do trabalho em seu laboratório.

A Prof. Dra Silmara Marques Alegretti por ter colaborado com o nosso trabalho durante a infecção dos animais.

A Prof. Dra Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo pela gentileza de deixar utilizar o *Freezer* - 80°C e pela utilização do microscópio para realização das fotomicrografias das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi pelo sua total disponibilidade e por estar disposto a ajudar sempre que foi preciso e por ter cedido o microscópio de fluorescência para a realização do Ensaio Cometa.

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley O. de Souza por ceder espaço e equipamentos para a realização do trabalho.

A técnica Alyne Fávero Galvão pela ajuda com os ensaios imunológicos.

A Rosimeire Nunes de Oliveira por ajudar com a infecção dos camundongos e por estar sempre presente para aconselhar.

A técnica Ana Rocha por ter realizado todas as lâminas histológicas do nosso trabalho.

Ao Tiago Mendes por ter me apresentando e ensinado a técnica do Ensaio Cometa.

Aos Funcionários e Professores da UFSCar e DMP que sempre estavam dispostos a me ajudar no dia-a-dia do laboratório, tirando dúvidas e por fazerem um ambiente de convívio sempre agradável e prazeroso.

Aos meus colegas de trabalho e amigos de laboratório, por estarem sempre presentes em todos os momentos, bons e ruins, por terem colaborado com a pesquisa, aconselhando, tirando dúvidas e, além de tudo, por terem se tornando grandes amigos que levarei para a vida toda.

As instituições CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, em especial a CAPES pelo auxílio como bolsista.

Aos meus queridos e amados familiares, meus pais Paulo e Elisabete, pela educação que me deram, pelo amor e por sempre me incentivar e encorajar a alcançar todos os meus sonhos. Ao meu irmão Alisson, que sempre estava disposto a me ajudar com grandes ideias. Aos meus avós, tios e primos e a Talita, pelo amor, paciência e carinho. Amo todos vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pelo apoio na participação de Congressos.

Aos colegas da pós-graduação pelo convívio durante as disciplinas.

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por várias espécies de vermes trematódeos e acredita-se que mais de 249 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo, sendo 700 milhões de pessoas em área de risco. No Brasil, apenas o *Schistosoma mansoni* é encontrado como agente etiológico da esquistossomose, responsável por mais óbitos que a dengue, leishmaniose visceral e a malária no país. Atualmente, existe apenas um medicamento indicado para o tratamento da esquistossomose mansônica (Praziquantel) e o desenvolvimento de novos fármacos se tornou imprescindível devido ao risco de resistência do parasito frente a este fármaco. Sendo assim, este estudo teve como proposta avaliar o perfil parasitológico, imunológico e histológico em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* após o tratamento com o fitoterápico comercial, composto por mentol (30-55%) e mentona (14-32%), preparado a partir das folhas de *Mentha piperita* L., e avaliar o possível efeito genotóxico do fitoterápico frente a células de vermes adultos recuperados desses animais tratados utilizando a técnica de Ensaio Cometa. Camundongos fêmeas, Balb/c foram divididos em 6 grupos: Controle Negativo, Controle Positivo, Mentha 15, Mentha 60, PZQ e Cremophor. Os animais foram infectados com 80 cercarias de *Schistosoma mansoni* e submetidos a 60 ou 15 dias de tratamento com o fitoterápico teste. Foi administrada única dose de 400 mg/kg de Praziquantel ao grupo PZQ. Os animais foram eutanasiados 61 dias após a infecção, na qual foi avaliado o perfil celular (contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos e do lavado da cavidade peritoneal (LCP), perfil imunológico (dosagem de IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) por ELISA e o perfil histológico de fígado e intestino dos camundongos submetidos ao tratamento. Foi realizada a técnica de Kato-Katz para quantificação de ovos/grama no 45° e 60° dia após a infecção e realizada a contagem de vermes adultos recuperados do sistema porta-hepático por perfusão. A análise estatística foi feita pelo programa *GraphPad Prism 5* (2005), usando o teste não paramétrico (*One-way ANOVA*) por meio da análise da variância (*Tukey*), considerando-se  $p < 0,05$ . Os resultados demonstraram que ambos os grupos tratados com o fitoterápico alteraram o comportamento da infecção. O tratamento mais prolongado com o fitoterápico (Mentha 60) apresentou redução no número de ovos de *S. mansoni* nas fezes, fígado e intestino dos camundongos, além de reduzir o número de granulomas hepáticos, quando comparado ao Controle Positivo. Neste mesmo grupo, a redução de eosinófilos sanguíneos chegou a 84%, além de diminuir os níveis de IL-4 e IL-10 significativamente quando comparado ao Controle Positivo, indicando uma provável imunomodulação neste modelo de infecção experimental. O tratamento com o fitoterápico não possui efeito genotóxico sobre vermes adultos de *S. mansoni* neste modelo. Portanto, sugere-se que o tratamento com o fitoterápico por tempo prolongado, composto por mentol e mentona, preparado a partir de folhas da *Mentha piperita* L., possui uma ação imunomoduladora e antiinflamatória neste modelo experimental de esquistossomose mansônica murina, podendo contribuir para a diminuição dos efeitos patológicos ocasionados pela infecção por *S. mansoni*.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*, *Mentha piperita* L., imunomodulação, genotóxico, tratamento.



## ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by several species of trematode worms and it is believed that more than 249 million people are affected worldwide, with 700 million people living in risk areas. In Brazil, only the *Schistosoma mansoni* is found as the etiologic agent of schistosomiasis, responsible for more deaths than dengue, visceral leishmaniasis and malaria in the country. Currently, there is only one drug indicated for the treatment of schistosomiasis (Praziquantel) and the development of new drugs has become essential due to parasite resistance risk against this drug. Thus, this study aimed to evaluate the parasitological, immunological and histological profile in infected mice with *Schistosoma mansoni*, after treatment with an herbal business, consisting of menthol (30-55%) and menthone (14-32%), prepared from the leaves of *Mentha piperita* L. In addition, we evaluated the possible genotoxic effect of the herbal in cells of adult worms recovered from these treated animals using the comet assay technique. Female BALB/c mice were divided into 6 groups: Negative Control, Positive Control, Mentha 15, Mentha 60, PZQ and Cremophor. Each animal was infected with 80 cercariae of *Schistosoma mansoni* and treated 60 or 15 days with the herbal test. Single dose of 400 mg/kg of Praziquantel to PZQ group was administered. The animals were killed 61 days after the infection, in which were evaluated the cellular profile (total and differential counts of blood leukocytes and peritoneal cavity lavage), immune profile (IL-10, IL-4 and IFN - $\gamma$  measurement by ELISA) and histological profile of liver and intestine of treated mice. Kato-Katz's technique was performed for quantifying eggs/gram at 45 and 60 days after infection and carried out adult worms recovered by perfusion of the hepatic portal system. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (2005), using the non-parametric test (One-way ANOVA) through the analysis of variance (Tukey), considering  $p < 0.05$ . The results showed that both groups treated with the herbal alter the behavior of the infection. The longer treatment with herbal (Mentha 60) decreased the number of *S. mansoni* eggs in the feces, liver and intestine of mice and reduced the number of hepatic granulomas, when compared to the Positive Control. In the same group was observed a reduction of blood eosinophils (84%) and a decrease the IL-4 and IL-10 levels when compared to the Positive Control, indicating a probable immunomodulation in this experimental infection model. Treatment with herbal medicine has no genotoxic effect on adult worms of *S. mansoni* in this model. Therefore, it is suggested that treatment with the herbal medicine for a long time, consisting of menthol and menthone, prepared from leaves of *Mentha piperita* L., has an immunomodulatory and anti-inflammatory action in this experimental model of murine schistosomiasis mansoni, contributing to the decrease in pathological effects caused by infection with *S. mansoni*.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*, *Mentha piperita* L., immunomodulation, genotoxic, treatment.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Classificação e Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Esquistossomose - Aspectos imunopatológicos .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Controle da Esquistossomose .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. <i>Mentha piperita</i> L. ....</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Ensaio Cometa .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Infecção dos camundongos com cercárias do <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Tratamento com o Fitoterápico .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Quantificação de ovos nas fezes.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Obtenção e contagem de células do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue. ....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Contagem de vermes localizados no sistema porta-hepático.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Quantificação de Citocinas .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7. Avaliação histológica do fígado e intestino dos camundongos .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8. Ensaio cometa .....</b>	<b>27</b>
<b>3.9. Análise estatística.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10. Desenho Experimental .....</b>	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Confirmação da infecção dos camundongos com <i>Schistosoma mansoni</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Análise parasitológica.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Quantificação de ovos nas fezes de camundongos.....	32
4.2.2. Quantificação de vermes adultos recuperados por perfusão do sistema porta-hepático.....	33
<b>4.3. Avaliação do perfil leucocitário durante a Esquistossomose mansônica experimental após diferentes terapias .....</b>	<b>35</b>

4.3.1. Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> e submetidos ou não as diferentes terapias .....	35
4.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos do líquido da cavidade peritoneal (LCP) de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> e submetidos ou não a diferentes terapias .....	37
<b>4.4. Avaliação de citocinas do plasma .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. Avaliação histológica do fígado e intestino .....</b>	<b>41</b>
4.5.1. Avaliação da histologia do fígado após 61 dias de infecção .....	41
4.5.2. Avaliação da histologia do intestino após 61 dias de infecção.....	48
<b>4.6. Análise de dano de DNA (Ensaio Cometa).....</b>	<b>54</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição da Esquistossomose Mundial.....	<b>01</b>
<b>Figura 2.</b> Distribuição da Esquistossomose no Brasil em 2012.....	<b>03</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>06</b>
<b>Figura 4.</b> Resposta imunológica durante a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> O granuloma na Esquistossomose mansônica.....	<b>12</b>
<b>Figura 6.</b> Folha de <i>Mentha piperita</i> L.....	<b>17</b>
<b>Figura 7.</b> Etapas do Teste Ensaio Cometa.....	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Infecção dos camundongos com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> pela técnica de imersão caudal.....	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Criação e manutenção da linhagem de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 10.</b> Análise quantitativa de ovos de <i>S. mansoni</i> utilizando a técnica de Kato-Katz.....	<b>25</b>
<b>Figura 11.</b> Delineamento Experimental do Trabalho.....	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Número de cercárias penetradas em camundongos Balb/C.....	<b>31</b>
<b>Figura 13.</b> Quantificação do número de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> (ovos/grama) 45 dias pós-infecção.....	<b>32</b>
<b>Figura 14.</b> Quantificação do número de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> (ovos/grama) 60 dias pós-infecção.....	<b>33</b>
<b>Figura 15.</b> Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> (400x).....	<b>34</b>
<b>Figura 16.</b> Número Total de Vermes Adultos de <i>S. mansoni</i> recuperados 61 dias após a infecção.....	<b>35</b>
<b>Figura 17.</b> Número Total de Casais de <i>S. mansoni</i> recuperados 61 dias após a infecção.....	<b>35</b>
<b>Figura 18.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos após 61 dias de infecção com <i>S. mansoni</i> e submetidos ou não a diferentes tratamentos.....	<b>37</b>

<b>Figura 19.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos do Líquido da Cavidade Peritoneal (LCP) após 61 dias de infecção com <i>S. mansoni</i> e submetidos ou não a diferentes tratamentos.....	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Concentração de IL-4 e IL-10 após 61 dias de infecção com <i>Schistosoma mansoni</i> submetidos ou não a diferentes tratamentos.....	<b>41</b>
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com HE (50x).....	<b>45</b>
<b>Figura 22.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com HE (200x).....	<b>46</b>
<b>Figura 23.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com Tricrômico de Gomori(50x).....	<b>47</b>
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com Tricrômico de Gomori (200x).....	<b>48</b>
<b>Figura 25.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com HE (50x).....	<b>51</b>
<b>Figura 26.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com HE (200x).....	<b>52</b>
<b>Figura 27.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com Tricrômico de Gomori (50x).....	<b>53</b>
<b>Figura 28.</b> Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com <i>S. mansoni</i> corados com Tricrômico de Gomori (200x).....	<b>54</b>
<b>Figura 29.</b> Análise do dano de DNA de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> pela técnica de Ensaio Cometa.....	<b>56</b>
<b>Figura 30.</b> DNA nuclear de células de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Ensaio Cometa).....	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Camundongos Balb/c utilizados para a realização de 2 experimentos independentes .....	<b>23</b>
<b>TABELA 2.</b> Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre ovos de <i>S. mansoni</i> em tecido hepático de camundongos Balb/c.....	<b>42</b>
<b>TABELA 3.</b> Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre granulomas em tecido hepático de camundongos Balb/c infectados com <i>S. mansoni</i> .....	<b>43</b>
<b>TABELA 4.</b> Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre ovos de <i>S. mansoni</i> em tecido mesentérico de camundongos Balb/c.....	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

**CEMIB** - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

**DNA** – Desoxirribonucleico

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético

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

**EO** – Óleo essencial

**GM-CSF** – Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos

**IFN** – *Interferon*

**IL** – Interleucina

**Ig** - Imunoglobulina

**LCP** – Lavado da cavidade peritoneal

**Mentha 15** – grupo de camundongos submetidos a 15 dias de tratamento com 50 mg/kg do fitoterápico testado após 45 dias de infecção com *Schistosoma mansoni*

**Mentha 60** – grupo de camundongos submetidos a 60 dias de tratamento com 50 mg/kg do fitoterápico testado logo após a infecção com *Schistosoma mansoni*

**mRNA** – ribonucleico mensageiro

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

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

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PZQ** – Praziquantel

**SCGE** - single cell gel electrophoresis (eletroforese em gel de célula única)

**SEA** – Antígenos solúveis dos ovos

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

**SSB** - *single strand break* ( quebra de cadeia simples)

**TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>** - Linfócitos T auxiliares

**Th** – Linfócito T *helper* ou auxiliar

**TMB** – Tetrametilbenzidina





## 1. INTRODUÇÃO

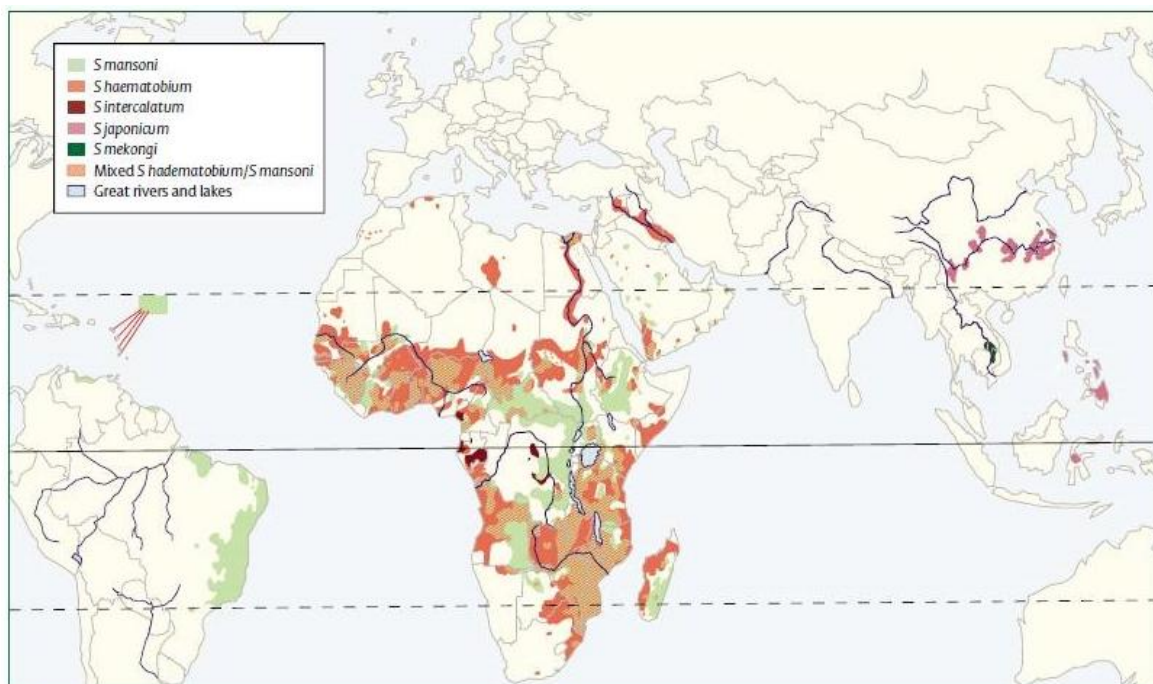
A esquistossomose é uma doença parasitária causada por várias espécies de vermes trematódeos e acredita-se que, mais de 249 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo, das quais 90% vivem no continente africano (WHO, 2014). Setenta e oito países são áreas endêmicas para a doença (WHO, 2013) e 700 milhões de pessoas vivem em área de risco (ESPÍRITO-SANTO, 2012). A esquistossomose é causada por várias espécies de *Schistosoma*, sendo prevalente em comunidades pobres que não possuem saneamento adequado e nem água potável. A forma urogenital é causada pelo *Schistosoma haematobium* e a esquistossomose intestinal pode ter como agente etiológico diversas espécies como: *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi* (WHO, 2013).

Além do continente africano, a região mediterrânea detêm 16 países endêmicos para a infecção, seguido de 10 países nas regiões das Américas, 6 no oeste do Pacífico, 3 no sudeste Asiático e a Turquia, único país Europeu endêmico para a esquistossomose (INOBAYA *et al*, 2014).

Na figura 1 temos o mapa (Gryseels *et al*, 2006) mostrando as localidades geográficas que cada espécie de *Schistosoma* pode ser encontrada. No Brasil, apenas o *Schistosoma mansoni* pode ser encontrado.

No Brasil, apenas o *Schistosoma mansoni* é encontrado como agente etiológico da esquistossomose e é causa de mais óbitos que a dengue, leishmaniose visceral e a malária (SESSP, 2009). Após a Malária, a esquistossomose é a principal doença parasitária quando comparado extensão de áreas endêmicas e quantidade de pessoas infectadas no mundo (LESCANO *et al*, 2004).

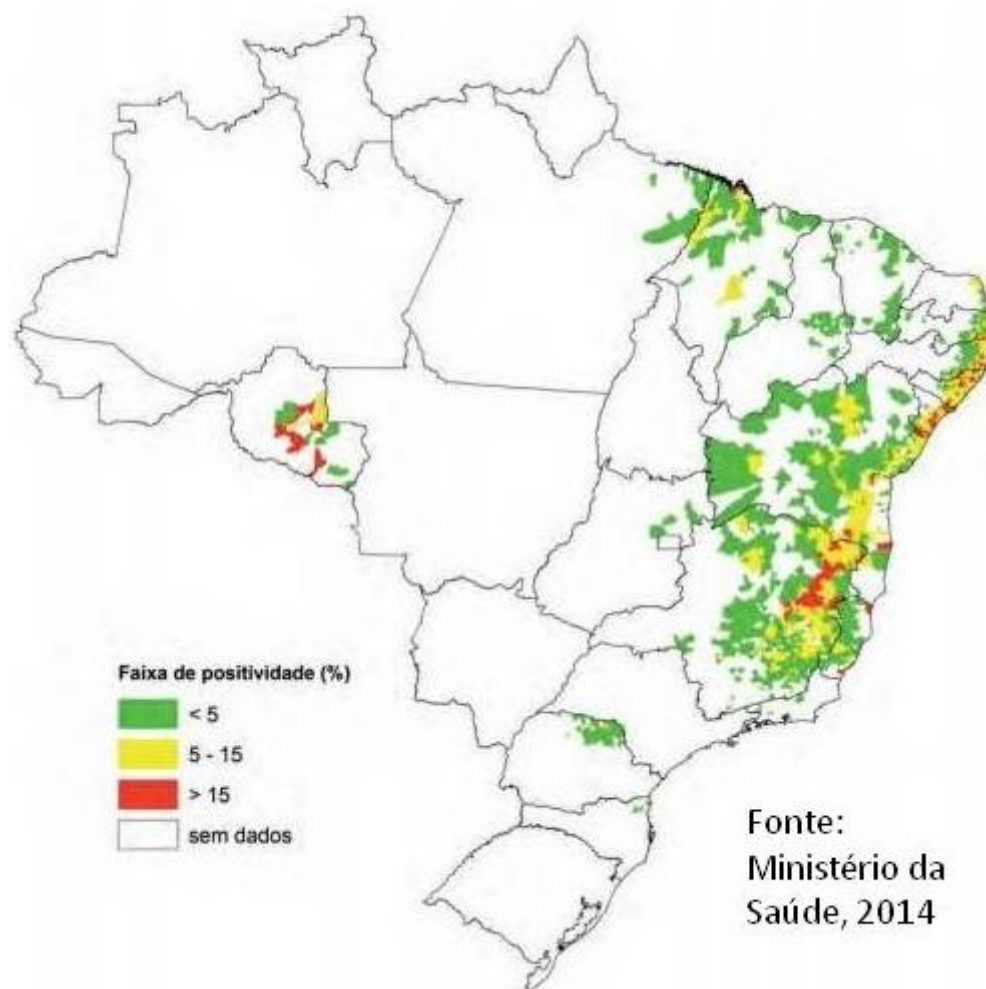
Crianças em idade escolar constituem o grupo com maior vulnerabilidade e exposição às parasitoses. Elas também estão mais expostas à esquistossomose pelo maior contato com a água em atividades recreativas em rios e lagos. No Brasil, a faixa etária de maior prevalência da esquistossomose abrange dos seis aos vinte anos. Uma vez que se associa à pobreza e aos hábitos culturais de uma determinada população, representa um importante indicativo do nível socioeconômico (PALMEIRA *et al*, 2010).



**Figura 1. Distribuição da Esquistossomose Mundial.** (Gryseels *et al*, 2006)

Acredita-se que no Brasil existam 6,79 milhões de portadores de esquistossomose mansônica (WHO, 2013) sendo a região Nordeste a mais prejudicada (Ministério da Saúde, 2013), como mostrado na figura 2. A evolução da doença e suas manifestações clínicas são influenciadas por fatores tais como a carga parasitária e a condição nutricional do indivíduo. A esquistossomose está quase sempre associada também à desnutrição, porque incide com frequência na parcela populacional menos favorecida economicamente (COUTO *et al*, 2008).

Ovos depositados por vermes adultos podem ficar retidos no fígado e induzir o desenvolvimento de lesões granulomatosas que por fim conduzem a fibrose hepática e hipertensão portal. A resposta imune contra ovos de *S. mansoni* é caracterizada por interleucinas Th2 na fase crônica (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (LA FLAMME, PATTON, PEARCE, 2001; WYNN *et al*, 1994).



**Figura 2. Distribuição da Esquistossomose no Brasil em 2012.**

### 1.1. Classificação e Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é causada por vermes sanguíneos do gênero *Schistosoma* (Filo *Platyhelminthes*). São dióicos e possuem um complexo ciclo de vida compreendendo vários fenótipos distintos morfológicamente entre hospedeiros intermediário e definitivo (BERRIMAN *et al*, 2009). Diferentes antígenos específicos de cada estágio de vida podem ser encontrados entre esquistossômulo, cercária, ovos e vermes adultos (JACOBS *et al*, 1997).

Os vermes adultos são brancos ou acinzentados com 7-20 mm de comprimento com o corpo cilíndrico apresentando-se com duas ventosas terminais, um tegumento complexo, um tubo digestivo cego e órgãos reprodutores. O corpo do macho forma um sulco ou canal

ginecóforo, onde se estabelece a fêmea, mais longa e fina. Após a formação do casal, eles passam a viver dentro do plexo venoso perivesical ou mesentérico. Eles se alimentam de sangue e globulinas através da glicólise anaeróbia. Os detritos são regurgitados no sangue do hospedeiro (GRYSEELS *et al*, 2006), podendo sobreviver de 5-10 anos dentro do hospedeiro (HAMS, AVIELLO, FALLON, 2013).

Existem três principais espécies que afetam o homem em todo o mundo: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. No Brasil, apenas o *Schistosoma mansoni* é causador da doença (ABATH *et al*, 2006; WHO, 2013).

O *S. mansoni* apresenta um ciclo biológico heteroxênico, tendo como hospedeiro intermediário um molusco. Três espécies de caramujos de água doce são conhecidas: *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (ABATH *et al*, 2006).

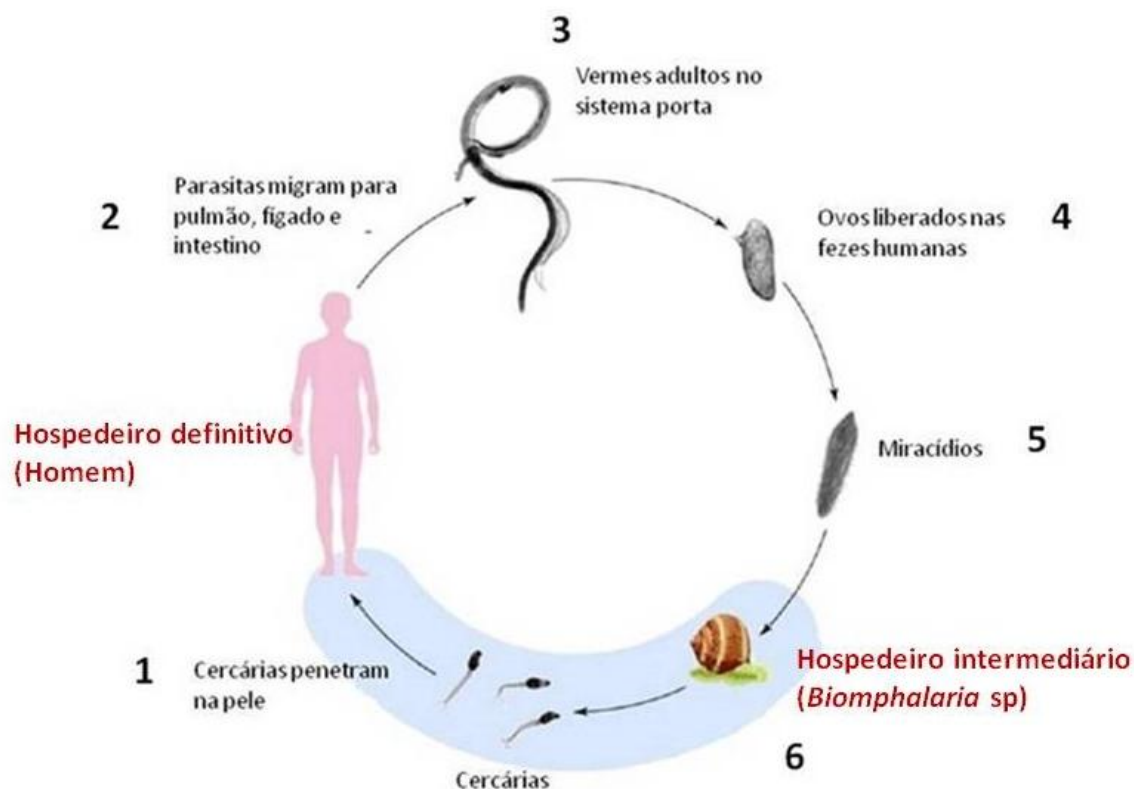
Apesar dos humanos serem os principais hospedeiros, roedores e primatas também podem se infectar (GRYSEELS *et al*, 2006). O homem ou outros animais se infectam durante o contato com a água doce contaminada com cercarias, que são liberadas pelas várias espécies de caramujos e penetram ativamente através da pele intacta. Após a penetração, as cercarias se transformam em esquistossômulos. Após alguns dias no tecido subcutâneo, os esquistossômulos migram primeiramente ao pulmão e, em seguida para todos os tecidos através da migração intravascular. Aqueles que conseguem chegar ao fígado atingem a maturidade sexual e se fixam nas veias do sistema porta-hepático, onde se acasalam em torno do 25º dia e a fêmea realiza a postura dos ovos no interior das veias mesentéricas. Os ovos atravessam a parede dos vasos e chegam ao lúmen intestinal, sendo liberados juntamente com as fezes a partir do 35º dia após a infecção (STAVITSKY, 2004). Em média, cada casal de *Schistosoma mansoni* podem eliminar 300 ovos por dia durante toda a sua vida (INOBAYA *et al*, 2014).

Os ovos eliminados ganham o ambiente aquático e liberam os miracídios que infectam os moluscos do gênero *Biomphalaria*, desenvolvendo-se em esporocistos e em seguida à cercarias infectantes. Alguns dos ovos liberados pela fêmea ficam retidos nos tecidos ou no sistema porta alojando-se nos sinusóides e induzindo o granuloma hepático (STAVITSKY, 2004), como esquematizado na figura 3.

A infecção é normalmente adquirida através de atividades como lavar roupas, natação, banho, pesca e agricultura. Os moluscos habitam lugares com um fluxo moderado de água e a infecção aumenta exponencialmente com o maior tempo de contato com a água, atingindo o pico em 30 minutos (GRAY *et al*, 2011).

Atualmente, a técnica parasitológica Kato-Katz é o método recomendado para o diagnóstico de esquistossomose por *S. mansoni*, porque ele é um método quantitativo, relativamente barato e simples. Entretanto, a sensibilidade desta técnica diminui ao passo que a prevalência e a intensidade da infecção são baixas. Nestes casos, a utilidade do PCR para detecção de DNA de *S. mansoni*, apesar de ser mais cara e mais complexa, apresenta uma sensibilidade maior que a técnica anterior. A especificidade deste teste é de 100%, demonstrada pela ausência da amplificação de DNA de outros helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Taenia solium*, and *Trichiuris trichiuria*), que co-infectam pessoas nas áreas endêmicas para esquistossomose (ABATH *et al*, 2006; GRAY *et al*, 2011).

Todos os estágios evolutivos do *Schistosoma mansoni* são capazes de expressar centenas de antígenos, podendo estimular fortemente e ser facilmente detectado pelas respostas imunes celular e humoral. Além disso, os produtos regurgitados pelos vermes adultos e liberados na corrente sanguínea são antigênicos e são a base de ensaios diagnósticos (COLLEY, SECOR, 2014).



**Figura 3. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.** (1) Cercárias de *S. mansoni* penetram ativamente no hospedeiro definitivo (homem) através da pele intacta. As cercárias perdem a cauda bifurcada e passam a serem chamadas de esquistossômulos. (2) Os esquistossômulos ganham a circulação e migram para diversos órgãos, como pulmão, fígado e intestino. (3) Após 5 semanas, os esquistossômulos evoluem para vermes adultos nas veias do sistema porta-hepático, acasalam-se e iniciam a oviposição. (4) Os ovos eliminados através das fezes do hospedeiro definitivo ganham o meio externo aquático e liberam uma nova forma evolutiva, o miracídio. (5) O miracídio é capaz de nadar livremente até encontrar e penetrar no tecido mole do hospedeiro intermediário, o caramujo *Biomphalaria* sp. (6) No hospedeiro intermediário, há formação de novas cercárias que são eliminadas no ambiente aquático, sendo a forma infectante para outros hospedeiros definitivos (Adaptado de: Castro *et al*, 2013).

## 1.2. Esquistossomose - Aspectos imunopatológicos

Após a penetração das cercarias na pele intacta, urticária e lesões papulosas podem aparecer e permanecer por dias no local. Essas lesões podem se desenvolver em poucas horas e geralmente são mais graves em infecções primárias, como ocorre com turistas e imigrantes (ROSS *et al*, 2002; GRYSEELS *et al*, 2006).

A Esquistossomose aguda é uma reação de hipersensibilidade sistêmica contra esquistossômulos migratórios, ocorrendo entre poucas semanas e meses após a primo infecção. Ela é comum em áreas com altas taxas de transmissão. Sugere-se que os sintomas são mediados por complexos imunes, e a maioria dos casos inicia com deposição de ovos no interior dos tecidos. Os sintomas comuns incluem febre, fadiga, dor de cabeça, mialgias, tosse não produtiva, dor no hipocôndrio direito e diarreia sanguinolenta. Nem todos os pacientes eliminam ovos nas fezes, mas todos apresentam eosinofilia e testes sorológicos positivos (ROSS *et al*, 2002; GRYSEELS *et al*, 2006).

A esquistossomose resulta de uma resposta imunológica do hospedeiro contra ovos de *Schistosoma* e reação granulomatosa provocada por antígenos secretados por eles (SEA-Soluble Egg Antigen). Os granulomas destroem o ovo, mas resultam em uma deposição fibrótica no tecido. A maioria desses granulomas desenvolvem-se nos locais de máxima acumulação de ovos. Os granulomas periovulares têm sido encontrados em muitos tipos de tecidos, incluindo pele, pulmões, cérebro, glândulas adrenais e músculo esquelético, entretanto os focos principais são intestinos e fígado (ROSS *et al*, 2002)

Ovos de *Schistosoma mansoni* migram através da parede intestinal e induzem uma inflamação necessária para a translocação para dentro do lúmen intestinal e excreção pelas fezes. Os sintomas resultantes incluem hiperplasia, ulceração, formação de microabscessos e pólipos. Muitas das lesões estão situadas no intestino grosso e no reto. Os sinais e sintomas mais comuns são dores abdominais crônicas ou intermitentes, perda de apetite e diarreia com ou sem sangue. Essas características dificilmente não são diagnosticadas como esquistossomose em áreas endêmicas. Diarreia é mais comum em crianças e apresenta forte correlação com a esquistossomose (GRYSEELS *et al*, 2006; ROSS *et al*, 2002).

Esquistossomose hepática inflamatória é uma reação inicial contra ovos presos nos espaços presinusoidal e periportal hepático. Esta é a principal causa de hepatomegalia por *Schistosoma* em crianças e adolescentes. Esse tipo de hepatomegalia é encontrado em 80% das crianças infectadas e é menos comum e intensa em adultos (GRYSEELS *et al*, 2006).

A deposição de colágeno periportal leva a uma progressiva obstrução do fluxo sanguíneo, hipertensão portal e varizes, sangramento por varizes e esplenomegalia. A fibrose periportal pode ser detectada por ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética e é característica de esquistossomose. A função hepatocelular é preservada até estágios tardios da doença. A arquitetura lobular é mantida e hiperplasia regenerativa nodular não ocorre (ROSS *et al* , 2002; GRAY *et al*, 2011).

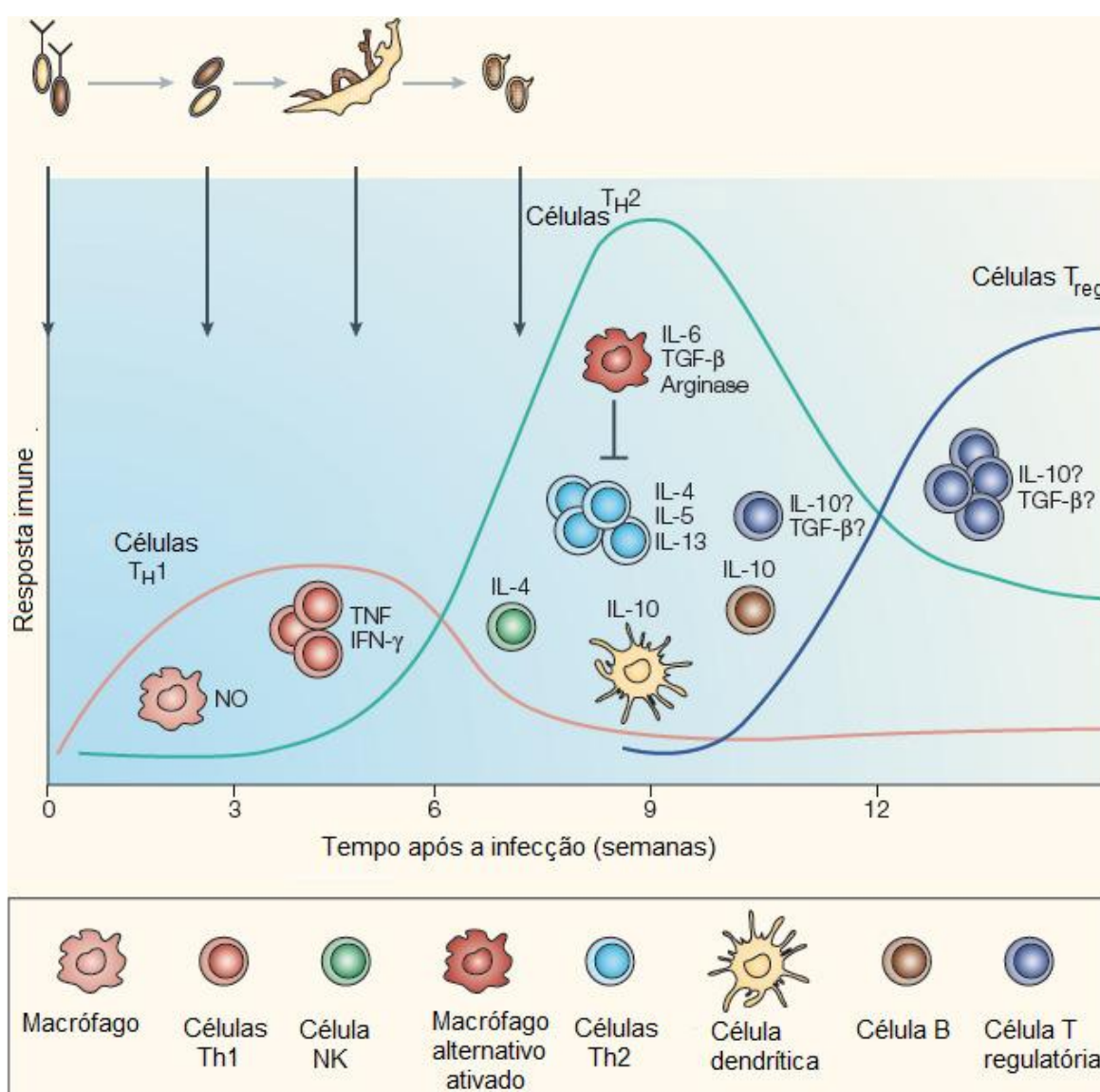
As principais lesões na infecção crônica não são devidas aos vermes adultos, mas sim pela deposição de ovos nos tecidos durante ou após a migração dos vermes, no fígado, baço, pulmão ou sistema cerebrospinal. Os ovos secretam enzimas que provocam reações granulomatosas e inflamações eosinofílicas típicas, que são progressivamente substituídas por depósitos fibróticos. A severidade dos sintomas está relacionada tanto com a intensidade da infecção quanto pela resposta imunológica do hospedeiro. Ao contrário de outras doenças hepatocelulares, como a cirrose, a função hepática parece não ser afetada. Esse processo pode levar de 5 a 15 anos, momento em que a infecção pode não estar mais presente ou detectável (GRYSEELS *et al*, 2006).

No hospedeiro infectado, a doença é caracterizada pela presença de granulomas, imunopatologia resultante da infiltração celular e fibrose residual ao redor dos ovos. O modelo de esquistossomose em murinos apresenta muitas das características da doença humana, incluindo a patologia do fígado e hipertensão portal (LANGLEY, BOROS, 1995; CHIARAMONTE *et al*, 1999), sendo assim um ótimo modelo para estudo da doença e possíveis tratamentos. O processo granulomatoso na esquistossomose é dependente de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e macrófagos (PARRA *et al*, 1992) e requer o recrutamento e a migração de células inflamatórias circulantes para o local da deposição dos ovos. Mastócitos e macrófagos são conhecidos por participar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e das reações à infecção parasitária, incluindo a esquistossomose (KHALIL, 1996). A inflamação granulomatosa que ocorre ao redor dos ovos do parasita é considerada a lesão básica na patologia da esquistossomose e é mediada pela resposta imune contra antígenos solúveis dos ovos (SEA) (PARRA *et al*, 1992).

A resposta imunológica inicial da infecção por *S. mansoni* é fortemente Th1, e inicialmente contra antígenos do verme. Deve ser notado também que uma resposta Th2 é iniciada. Com o acasalamento dos vermes adultos e o início da produção de ovos após 5-6 semanas de infecção, a resposta imune altera marcadamente, levando a uma diminuição dos componentes Th1 e aumento de uma potente resposta Th2. A mudança para o tipo Th2 é



uma consequência da produção de ovos pelos vermes fêmeas maduros. Os ovos de *S. mansoni* são potentes indutores de resposta Th2 quando injetados em camundongos virgens (HAMS, AVIELLO, FALLON, 2013). Camundongos infectados exibem duas fases imunológicas distintas. A fase aguda é vista oito semanas após a infecção e é caracterizada pela vigorosa formação granulomatosa e respostas de hipersensibilidade tardia, com grande quantidade de IL-2 e IL-4 sendo produzida (DUNNE, COOKE, 2005). Na fase crônica, 16 a 20 semanas após a infecção, há uma marcada diminuição da inflamação granulomatosa, com diminuição da resposta linfoproliferativa e diminuição da produção de citocinas (CHEEVER *et al*, 2002). Os granulomas são compostos por diversas células, principalmente por macrófagos, linfócitos e eosinófilos (PEARCE, MACDONALD, 2002).



**Figura 4. Resposta imunológica durante a infecção por *Schistosoma mansoni*.** Adaptado de DUNNE & COOKE, 2005.

O Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) foi demonstrado durante as fases iniciais da formação de granulomas hepáticos em ratos infectados e a interleucina-12 (IL-12) é vista como estimuladora da fibrogênese, pois possui atividades estimulantes sobre as células NK na produção de IFN- $\gamma$ , bem como os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (WYNN *et al*, 1994). O desenvolvimento de tecido fibroso faz parte naturalmente do processo de cura após um dano. Além disso, existe ainda uma deposição excessiva de colágeno que interfere com o funcionamento normal do tecido afetado. De fato, a síntese de colágeno e o tecido cicatricial são as principais manifestações de uma grande variedade de doenças crônicas e debilitantes, incluindo doenças autoimunes, alérgicas e infecciosas (CHIARAMONTE *et al*, 1999).

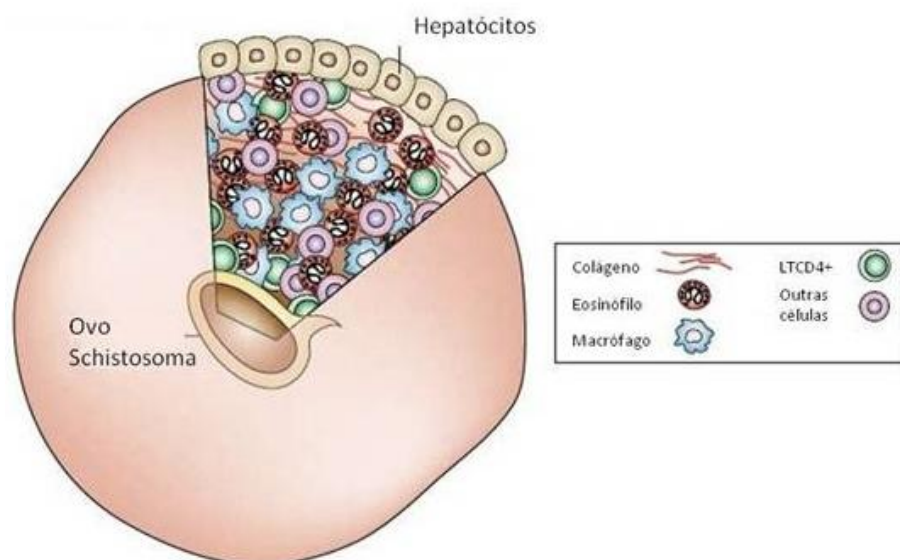
A fibrose tem seu início em granulomas durante a fase crônica da inflamação granulomatosa (Figura 5). Uma variedade de moléculas estimula a diferenciação de células estreladas hepáticas em miofibroblastos que secretam proteínas de matriz extracelular, incluindo o colágeno (STAVITSKY, 2004). As células estreladas hepáticas (CEH) são células perisinusoidais que armazenam vitamina A e produzem fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e outras substâncias bioativas (BRANDÃO *et al*, 2006).

Em modelo murino de esquistossomose, diversas citocinas associadas ao padrão Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13, são induzidas após a infecção com *S. mansoni* e contribuem para muitos aspectos da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (CHIARAMONTE *et al*, 1999). A IL-13 tem um papel muito importante na patogênese da esquistossomose, podendo ser considerada uma citocina dominante responsável pelo desenvolvimento da fibrose hepática (HAMS *et al*, 2013). Em experimento com animais deficientes de IL-4 foi possível verificar que IL-13 é a principal citocina do tipo Th2 que conduz a formação de mRNA para a produção de colágenos tipo I e tipo III e fibrose hepática em camundongos infectados com *S. mansoni* (CHIARAMONTE *et al*, 1999). Sugere-se que a IL-10 seja uma potente citocina inibitória, contribuindo com a supressão da resposta granulomatosa (WYNN *et al*, 1994). Segundo Falcão *et al* (1998), IL-10 possui um importante papel na regulação da formação do granuloma *in vitro* e do tamanho do granuloma *in vivo*, sugerindo, portanto, que esta citocina desempenha um importante papel no controle da patologia da doença causada por *S. mansoni*. A polarização das respostas Th2 induzidas pelos ovos é muito influenciada pela IL-10, sugerindo, portanto, que o hospedeiro é de fato protegido dos

danos teciduais e dos efeitos letais da polarização das respostas imunes (HOFFMANN, CHEEVER, WYNN, 2000).

Três citocinas: fator estimulante de crescimento monocítico/granulocítico (GM-CSF), IL-3 e IL-5 são reconhecidas atualmente por promover eosinopoiese (KROEGEL *et al*, 1994). A IL-5 também melhora a adesão de eosinófilos às células endoteliais e induz quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* e *in vivo* (KROEGEL *et al*, 1994). Sendo importantes por manter o numero de eosinófilos circulantes mais elevados.

Mesmo com todas as defesas imunológicas do hospedeiro contra este trematódeo, estes parasitas conseguem sobreviver no interior do hospedeiro por muitos anos. Isso se deve, em parte, à mecanismos do parasita em regenerar continuamente seu tegumento e também a uma habilidade de mimetizar ou adquirir antígenos do hospedeiro (COLLEY, SECOR, 2014), permitindo sua evasão das respostas imunes contra o parasita.



**Figura 5. O granuloma na Esquistossomose mansônica.** A principal patologia da esquistossomose mansônica é deposição de ovos no tecido hepático, levando a formação de uma resposta imune granulomatosa. Adaptado de PEARCE, MACDONALD, 2002.

### 1.3. Controle da Esquistossomose

A atividade anti-helmintica dos derivados de pirazinoisoquinolona foi primeiramente descrita por E. Merck e Bayer A.G em 1972 na Alemanha. Posteriormente, em 1975, entre

um grande número de compostos relacionados, o Praziquantel (PZQ) foi desenvolvido como um novo anti-helmíntico de largo espectro contra trematódeos e cestódeos (CHAI, 2013).

Desde o seu desenvolvimento, ele tem sido utilizado e logo se tornou a única droga de escolha para o tratamento da esquistossomose humana. Seu grande uso foi devido à alta eficácia, excelente tolerabilidade, poucos e transientes efeitos colaterais, fácil administração e custo competitivo (WANG, WANG, LIANG, 2012). Os seus efeitos colaterais já registrados incluem náusea, vômitos e dores abdominais. Em infecções pesadas, cólicas agudas com diarreia sanguinolenta podem ocorrer logo após o tratamento. Apesar disso, o PZQ apresenta toxicidade muito baixa em animais e é considerado seguro para o tratamento de crianças e mulheres grávidas (GRYSEELS *et al*, 2006).

O PZQ é produzido atualmente por vários fabricantes ao redor do mundo e é utilizado em larga escala para o tratamento de infecções por helmintos em animais e humanos (CHAI, 2013). A quimioterapia baseado no PZQ tem sido aplicada na estratégia de controle mundial da doença, reduzindo muito a prevalência e intensidade das infecções (WANG, WANG, LIANG, 2012).

Ainda não se conhece completamente o mecanismo de ação do PZQ, porém um rápido influxo de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) acompanhado por mudanças morfológicas no verme, que incluem rápidas contrações musculares e formação de bolhas e vacúolos no tegumento estão entre os mecanismos de ação sugeridos para o PZQ. Células imunes do hospedeiro como os granulócitos, macrófagos e os anticorpos foram reportados por contribuir muito para os efeitos do PZQ *in vivo* (ROSS *et al*, 2002). Em modelos animais, a presença de anticorpos tem sido considerada essencial para esta eficácia. O PZQ aumenta a susceptibilidade de o parasita ser facilmente atacado por anticorpos do hospedeiro pela exposição de dois antígenos de superfícies do verme (CHAI, 2013).

O PZQ é rapidamente absorvido através do intestino, em uma taxa de 80% após uma administração de forma oral em humanos. A maioria do fármaco absorvido é metabolizada no fígado pelo sistema Citocromo p450 e excretado principalmente pela urina, além de bile e fezes, em um tempo de 24 horas. O tempo de meia vida do PZQ em humanos é de 1 a 2 horas (CHAI, 2013) e a droga não é capaz de eliminar a fase larvária (esquistossômulos) que estão presentes de 3 a 21 dias após a infecção, não sendo, portanto, aconselhável o seu uso para profilaxia (ROSS *et al* 2002).

Algumas terapias requerem de 2 a 3 doses de 20 mg/kg dado entre 6 e 8 horas. Programas de controle comunitários tratam seus pacientes usualmente com uma dose única de 40

mg/kg, no qual apresenta cura com segurança de 60-90% dos pacientes e redução de 80-95% no número de ovos excretados (CIOLI *et al*, 2014). Pacientes que continuam liberando ovos viáveis devem ser retratados com a mesma dose, sendo aconselhável, principalmente, se a eosinofilia e altos títulos de anticorpos persistirem (GRAY *et al*, 2011).

O Praziquantel tem sido utilizado há mais de 40 anos para o tratamento de helmintoses, principalmente contra espécies de *Schistosoma*, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para esse tipo de doença. Uma grande preocupação foi gerada no campo científico depois de registros mostrando a habilidade de selecionar resistência ao PZQ *in vitro* (CHAI, 2013) e relatos de possível perda de sensibilidade ao PZQ em povoados do Senegal (GRYSEELS *et al*, 2011) e Egito (ISMAIL *et al*, 1999). A atual disponibilidade de apenas uma droga confiável para o tratamento da esquistossomose sugere prioridade no desenvolvimento de novas drogas (WEBSTER *et al*, 2010).

Após a introdução do PZQ no mercado, foram sintetizados e testados diversos derivados do PZQ, porém nenhuma delas foi tão eficaz quanto a droga recomendada (CIOLI *et al*, 2014).

O Oxamniquine foi descrita em 1960 (INABAYA *et al*, 2014) e é a única droga alternativa à infecção por *S. mansoni*, porém possui limitada disponibilidade devido sua eficácia apenas a espécie mansônica. Além dele não atuar contra outras espécies de *Schistosoma*, ele pode provocar efeitos colaterais mais acentuados, induzir ao sono e causar epilepsias. Seu alto custo levou à substituição pelo PZQ em países como o Brasil (CILI *et al*, 2014) e desde 2010 esse fármaco não tem sido recomendado como opção para tratar a esquistossomose mansônica.

Um grupo alternativo de drogas compreende alguns derivados da artemisinina, composto isolado da *Artemisia annua* L., como o artesunato e o artemether (INOBYA *et al*, 2014). O Artemether, bem conhecido por possuir atividade anti-malarial, também tem sido estudado para o tratamento de infecções humanas por espécies de *Schistosoma*. Ele é capaz de matar esquistossômulos de *S. mansoni* durante os primeiros 21 dias de infecção, porém o uso de Artemether em áreas onde a malária é endêmica seria desaconselhável devido ao potencial em selecionar cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* (ROSS *et al*, 2002; GRYSEELS *et al*, 2006).

O Furoxan, um antioxidante encontrado em vertebrados, se mostrou ativo contra formas adultas e juvenis *in vitro* e foi altamente efetivo *in vivo* quando administrado por 5 dias intraperitonealmente em camundongos (CIOLI *et al*, 2014).

O contato com a água infectada não pode ser sempre evitada, especialmente por trabalhadores como pescadores, fazendeiros e produtores de arroz que vivem em áreas endêmicas (INOBAYA *et al*, 2014). A administração de droga em massa tem sido implementada em vários países no Programa Nacional de Controle à Esquistossomose, em Uganda, Serra Leoa, Nigéria, Brasil, entre outros. Esse programa é frequentemente complementado com outras estratégias, como o controle de caramujos (INOBAYA *et al*, 2014).

Mais de 42 milhões de pessoas foram tratadas com PZQ em 2012, porém esse número representa apenas 14,4% da população estimada que necessita de tratamento. O medicamento é amplamente distribuído através do sistema escolar e facilmente administrado, sem necessidade de supervisão médica, não produzindo sérios efeitos colaterais e pode ser dosado através do peso das crianças (CIOLI *et al*, 2014). Entretanto, no Brasil apenas as Secretarias de Saúde fazem a distribuição do PZQ com solicitação e pedido médico, não sendo encontrado esse fármaco para compra nas farmácias.

O controle da doença através da eliminação completa dos caramujos é uma tarefa muito complexa. Isso iria requerer recursos humanos e materiais para uma aplicação eficiente, assim como dados epidemiológicos e malacológicos. Além disso, a toxicidade dos moluscidas para outros organismos aquáticos, incluindo os peixes, originaria problemas ecológicos e econômicos (GRYSEELS *et al*, 2006). A niclosamida é o único moluscida recomendado pela OMS. Para este tipo de controle ser eficaz deve ser realizado 2 vezes ao ano e em grandes áreas torna uma ferramenta muito cara e pouco efetiva (INOBAYA *et al*, 2014). Geralmente, os moluscidas utilizados apresentam um tempo de vida curto e poucos caramujos sobreviventes são suficientes para repovoar os locais tratados. Os caramujos também podem ser combatidos utilizando predadores ou organismos competidores como peixes ou diferentes espécies de caramujos, porém essas abordagens permanecem indisponíveis (CIOLI *et al*, 2014).

No Egito, a combinação da quimioterapia, controle do caramujo e melhoria nas condições da água e saneamento resulta em uma menor morbidade, prevalência e severidade da infecção. Na China, o Programa Nacional de Controle da Esquistossomose foi primordial para a redução da taxa de infecção para menos de 1% para 2015, incluindo tratamento em massa com PZQ e uma intensa educação sanitária (INOBAYA *et al*, 2014).

O principal problema da quimioterapia é que ela não previne a re-infecção, tendo a necessidade de repetidos tratamentos, principalmente em áreas endêmicas para a doença. No

final do século de 1970, o estudo de vacinas para a esquistossomose foi encorajada por resultados interessantes utilizando cercarias irradiadas mostrando mais de 80% de resistência utilizando o modelo murino, porém não atingiram os resultados esperados utilizando os imunógenos isolados (CIOLI *et al*, 2014). Numerosos candidatos a vacinas tem sido explorados, estando alguns já em fases avançadas de desenvolvimento, como a Sm14kDa, uma proteína ligante de ácido graxo, Smp80 calpaina, proteína de tegumento de *Schistosoma mansoni* e a Sm-TSP-2, proteína da família da tetraspanina (INOBYA *et al*, 2014; COLLEY, SECOR, 2014). Assim, não temos vacinas disponíveis que possam contribuir para o controle da esquistossomose.

#### **1.4. *Mentha piperita* L.**

Plantas medicinais são utilizadas há séculos na medicina tradicional devido aos seus valores terapêuticos. Muitas espécies de hortelã têm sido exploradas pelo homem a mais de dois mil anos (SAHARKHIZ *et al*, 2012). No Brasil, pesquisas demonstram que 82% da população brasileira utilizam produtos à base de espécies vegetais (FÉLIX-SILVA *et al*, 2012).

Diversos extratos de plantas medicinais têm sido testados nas mais variáveis formas de vida do *Schistosoma mansoni*, bem como nas outras espécies causadores da esquistossomose. Algumas plantas como a *Eremanthus goyazensis*, *Millettia thonningii* e a *Berheya speciosa*, tem mostrado resultados promissores (CASTRO *et al*, 2013). A atuação dos principais componentes da *Mentha piperita* L. durante a esquistossomose experimental ainda não está muito clara.

O gênero *Mentha* L. compreende mais de 20 espécies de ervas (TAHER, 2012). *Mentha piperita* L., é uma importante erva medicinal utilizada há mais de 250 anos (SAHARKHIZ *et al*, 2012). Pertencente à Família *Lamiaceae*, é uma planta híbrida entre *M. spicata* L. e *Mentha aquati*, popularmente conhecida como hortelã-pimenta. Ela foi cultivada por antigos egípcios e documentada na farmacopeia islandesa no século XIII. Ela é altamente cultivada em áreas temperadas do globo, particularmente na Eurásia, Austrália, América do Norte e Norte da África, porém atualmente ela passou a ser cultivada em todas as regiões do mundo (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011; TAHER, 2012).

*M. piperita* L. possui de 50 a 90 cm de altura, é normalmente quadrangular e seu caule é quase sempre ramificado e arroxeadado. As folhas verdes escuras ou claras de 1,1 a 5,1 cm de largura possuem o pecíolo curto, são ovaladas e serrilhadas, com suas margens finamente

dentadas e superfícies rugadas (Figura 6). As flores possuem espinhos falsos de coloração rosa ou roxa e raramente se apresentam com sementes (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011; FÉLIZ-SILVA *et al*, 2012).



**Figura 6. Folha de *Mentha piperita* L.**

Adaptado de:

[http://article.wn.com/view/2014/12/12/Mentha\\_oil\\_futures\\_decline\\_022\\_pc\\_on\\_profitbook](http://article.wn.com/view/2014/12/12/Mentha_oil_futures_decline_022_pc_on_profitbook) ing/). Acesso em: 27 de janeiro de 2015.

Suas folhas e flores possuem propriedades medicinais. Os óleos essenciais (EO) são produtos naturais valiosos usados como matéria-prima para perfumes, cosméticos, aromaterapia, fototerapia, especiarias e nutrição (SAHARKHIZ *et al*, 2012). A parte medicinal são os óleos essenciais (EO) extraídos de toda a planta, principalmente das partes aéreas das plantas floridas, das folhas secas e flores frescas (SINGH *et al*, 2011). O óleo da hortelã-pimenta é um dos mais populares e amplamente utilizados, principalmente por causa de seus componentes, mentol e mentona (SAHARKHIZ *et al*, 2012).

Estudos anteriores mostraram que o EO e extratos metanólicos (EM) da erva possuem atividades antivirais, antibacteriano, antifúngico, analgésico, antioxidante e confere radioproteção. Além disso, bactérias e fungos, como espécies de *Candida*, que são capazes de produzir biofilme, muitas vezes são resistentes aos medicamentos atuais e os produtos naturais podem contribuir na inibição da formação do biofilme (SAHARKHIZ *et al*, 2012).



Outras utilidades como anti-espasmódico, anti-séptico, tratamento de cânceres, resfriados, cólicas, indigestão, náuseas, dor de garganta, dor de dente e desordens inflamatórias em geral também foram atribuídos ao EO da *Mentha piperita L.* (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011; TAHER, 2012).

A hortelã-pimenta rende 0,1-1% de óleo volátil composta principalmente de mentol (29-48%), mentona (20-31%), mentofurano (6,8%) e acetato de mentilo (3-10%). Outros ingredientes farmacologicamente ativos incluem substâncias amargas, ácido caféico, flavonóides (12%), polifenóis polimerizados (19%), carotenos, tocoferóis, betaína, colina e taninos (SINGH *et al*, 2011). Através de triagem fitoquímica dos extratos das folhas de *M. piperita L.*, foram detectados taninos, gomas, heterosídeos senevólicos, cumarinas, fenóis, esteróides, triterpenóides, carotenóides, resinas e alcalóides (FÉLIX-SILVA *et al*, 2012).

A composição química das plantas aromáticas depende muito da variabilidade genética individual e as concentrações relativas variam de acordo com o cultivo, clima e localização geográfica. A composição química do óleo da hortelã-pimenta é muito complexa e altamente variável (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011; SAHARKHIZ *et al*, 2012).

As atividades farmacológicas de *M. piperita L.* e outras da mesma família foram sujeitos de muitos estudos (TAHER, 2012) inclusive comprovando efeitos antiparasitários (NARANJO *et al*, 2006). Dejeni e colaboradores (2014) demonstrou que o extrato etanólico de *Mentha piperita L.* possui propriedades antiparasitárias e imunomodulatórias durante a infecção experimental por *S. mansoni*,

## 1.5. Ensaio Cometa

Os estudos de genotoxicidade em roedores com exposições definidas são modelos de teste biológicos úteis para a toxicologia e estudos sobre os mecanismos de investigação, e que servem como uma importante avaliação de segurança pré-clínica e avaliação de agentes ambientais para o risco genotóxico para os seres humanos. Em comparação com testes *in vitro*, testes *in vivo* pode fornecer dados mais relevantes para a avaliação do potencial de danos ao DNA em humanos, uma vez que leva em conta a dinâmica dos processos fisiológicos de todo o animal, como a captação e distribuição sistêmica do sistema

circulatório, Fase I e Fase II do metabolismo e sistemas de eliminação/excreção que não pode ser inteiramente recriado *in vitro* (RECIO *et al*, 2010).

Muitos métodos têm sido utilizados para identificar substâncias genotóxicas, incluindo a detecção de danos no DNA, aberrações cromossômicas e as mutações do gene, tanto *in vitro* como *in vivo* (RECIO *et al*, 2010).

Um método popular para medir o dano ao DNA, mesmo nos estágio iniciais da exposição, é eletroforese em gel de célula única (SCGE-single cell gel electrophoresis), conhecido como ensaio cometa. Esta técnica demonstrada pela primeira vez em 1988 por Singh *et al*. utilizou linfócitos humanos e revolucionou a área de pesquisa de danos em baixos níveis em DNA. Esta técnica é amplamente difundida como uma ferramenta simples, sensível e rápida para a avaliação de danos de DNA e seu reparo em células individuais (WIDZIEWICZ *et al*, 2011).

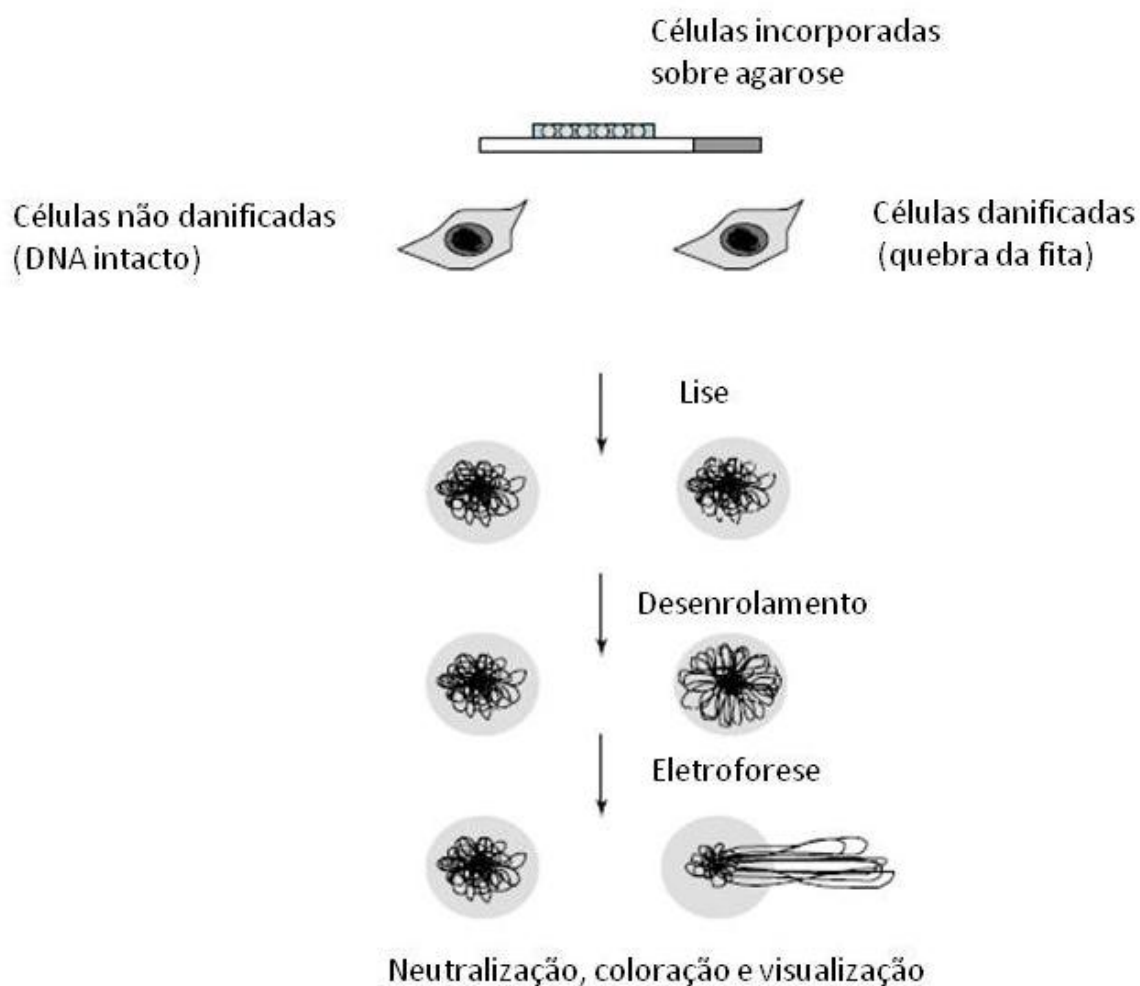
O ensaio cometa é uma técnica padrão para testar a genotoxicidade de químicos e tem sido amplamente utilizada na biomonitoração na população humana, epidemiologia molecular e na avaliação de dano/reparo do DNA e estresse oxidativo (LIU *et al*, 2013).

Este método pode detectar quebras de cadeia simples (SSB) como dano inicial e aqueles desenvolvidos a partir de sítios álcali-lábeis sob condições alcalinas (pH > 12,6) e é requerido um pequeno número de células (RECIO *et al*, 2010).

O ensaio depende do relaxamento do DNA, permitindo que o DNA seja arrastado em direção ao Ânodo sob corrente elétrica (eletroforese), formando imagens parecidas com cometas e analisados em microscópio de fluorescência (AZQUETA, COLLINS, 2013).

Diversos parâmetros são analisados, incluindo formação de cauda, comprimento da cauda, porcentagem de DNA na cauda e momento na cauda, quando utilizado o Ensaio Cometa ( EL-SAYED, ALY, 2014).

Diferente de outros trabalhos que estudaram os efeitos de diferentes extratos de *Mentha piperita* L., este estudo procurou avaliar os efeitos antiparasitários e imunomodulatórios do mentol e da mentona, extraídos das folhas da *Mentha piperita* L., durante a infecção experimental por *S. mansoni*, além de analisar um possível efeito genotóxico do composto frente ao *Schistosoma mansoni in vivo*, a fim de contribuir para o entendimento da ação da erva durante a esquistossomose mansônica.



**Figura 7. Etapas do Teste Ensaio Cometa.** Células de vermes adultos de *S. mansoni* misturadas em agarose *low melting* foram colocadas sobre lâminas pré-revestidas de agarose 1%. As células foram submetidas a etapas de lise, desenrolamento do DNA, eletroforese, neutralização, coloração e visualização. Adaptado de Azqueta & Collins, 2006.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Atualmente, existe apenas um medicamento indicado para o tratamento da esquistossomose mansônica, o Praziquantel, e o desenvolvimento de novos fármacos se tornou imprescindível devido ao risco de resistência do parasito frente a este fármaco. Sendo assim, o estudo teve como proposta estudar o efeito anti-*Schistosomal* do fitoterápico comercial, composto por Mentol e Mentona preparado a partir das folhas de *Mentha piperita L.*, em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e avaliar o efeito genotóxico do fitoterápico em células de vermes adultos recuperados de camundongos tratados.

### 2.2. Objetivos específicos

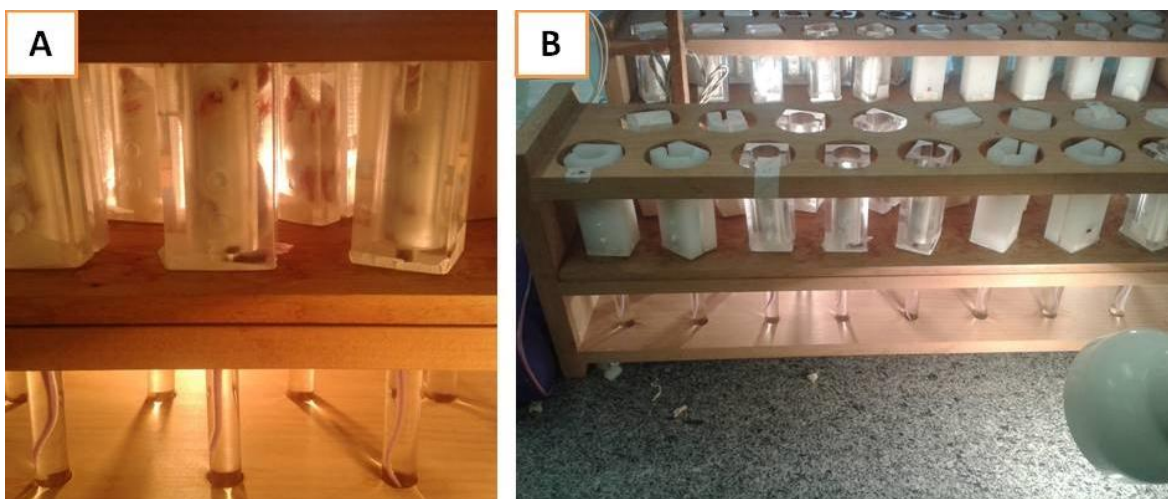
- Avaliação da carga parasitária em camundongos submetidos ou não ao tratamento (contagem de ovos nas fezes e contagem de vermes adultos no sistema porta-hepático).
- Contagem celular total e diferencial do sangue e do lavado da cavidade peritoneal (LCP).
- Avaliação do infiltrado celular e da deposição de colágeno nos tecidos acometidos (fígado e intestino) através de análise histológica com corantes específicos.
- Dosagem de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no plasma de camundongos.
- Avaliação do efeito genotóxico do fitoterápico frente a células de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos tratados utilizando a técnica de Ensaio Cometa.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

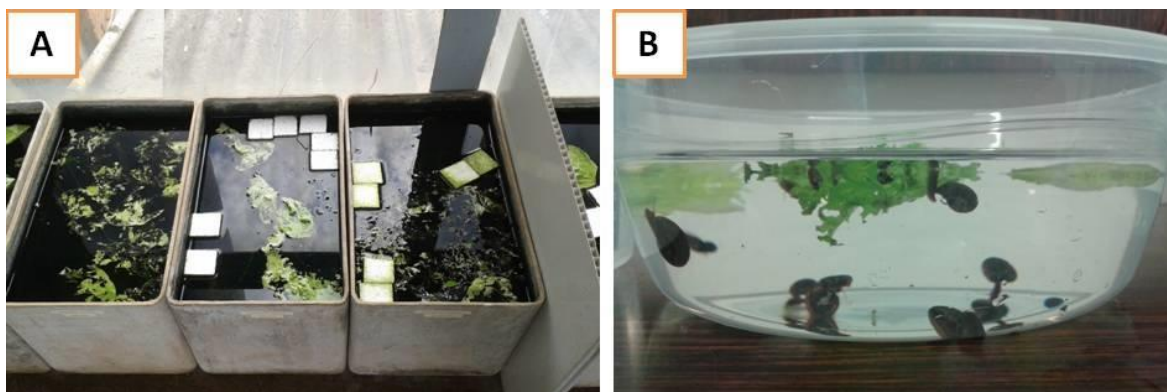
#### 3.1. Infecção dos camundongos com cercárias do *Schistosoma mansoni*

Camundongos de linhagem Balb/C fêmeas com 5 semanas de vida, pesando entre 18 e 20 gramas, foram infectados com  $\pm 80$  cercárias da linhagem *Schistosoma mansoni* BH (oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil) utilizando a técnica de imersão caudal durante duas horas com exposição à luz e temperatura de aproximadamente 28°C (n=40), de acordo com o protocolo descrito por Oliver & Stirewalt, (1952), como demonstrado na figura 8. Depois de transcorrida duas horas, na qual a cauda de cada animal ficou exposta a 80 cercarias, foram realizadas novas contagens para verificação da quantidade de cercarias que não conseguiram penetrar ativamente nos camundongos e, assim, saber quantas cercarias, de fato, foram capazes de infectar o hospedeiro definitivo (camundongo). A infecção foi realizada com a supervisão da Doutoranda Rosimeire Nunes de Oliveira. Esta linhagem é mantida em moluscos, planorbídeos *Biomphalaria glabrata* no Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp, sob responsabilidade da Professora Doutora Silmara Marques Alegretti, mostrado na figura 9.

Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Os ensaios biológicos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar sob nº 034/2013.



**Figura 8. Infecção dos camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni* pela técnica de imersão caudal.** (A) Camundongos imobilizados em caçapas individuais e com a cauda imersas em água contendo cercarias ativas de *S. mansoni*. (B) Detalhe da estimulação das cercarias pela luz e pelo calor para aumento de sua atividade motora.



**Figura 9. Criação e manutenção da linhagem de *Biomphalaria glabrata*.** Esta linhagem é utilizada para manutenção do ciclo biológico do *S. mansoni* no Departamento de Biologia Animal, IB, Unicamp. (A) Aquários contendo *Biomphalaria glabrata* em ambiente favorável à sua reprodução. (B) Aquário contendo *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* para liberação de cercarias.

### 3.2. Tratamento com o Fitoterápico

Os animais foram divididos em diferentes grupos (representado na tabela abaixo).

**TABELA 1.**  
**Camundongos Balb/c utilizados para a realização de 2 experimentos independentes**

Subgrupo	Nº camundongos	Dose	Tratamento
1- Controle negativo	06	-	-
2- * Controle positivo	08	-	-
3- * Mentha 15	08	50 mg/kg/0,2ml	15 dias
4- * Mentha 60	08	50 mg/kg/0,2ml	60 dias
5- * Praziquantel	08	400mg/kg/0,2ml	Dose única
6- * Cremophor	08	0,2 ml	Dose única

\*Infectado com larvas infectantes de *Schistosoma mansoni*.

Neste trabalho foi utilizado um fitoterápico de uso humano comercial, composto por mentol (30-55%) e mentona (14-32%), preparado a partir de folhas de *Mentha piperita* L. O fitoterápico comercial, apresentado sob a forma de cápsula gastroresistente, foi solubilizada em 10 ml de água filtrada com no mínimo 24 horas antes do uso. A partir desta solução, foram realizadas as diluições para administração de 50 mg/kg do fitoterápico para cada

camundongo, de acordo com o peso corporal médio do grupo. O tratamento foi realizado através de via oral (gavagem) utilizando cânula metálica inoxidável apropriada. A dose do fitoterápico foi administrada em 0,2 mL diariamente no mesmo horário durante 14 ou 60 dias, uma vez ao dia.

A droga recomendada pela Organização Mundial da Saúde para tratamento da esquistossomose, o Praziquantel (Tenil®Vet - Atral Cipan ) foi solubilizada em Cremophor 2% e administrada por gavagem, na concentração de 400 mg/kg, de acordo com o peso corporal médio do grupo.

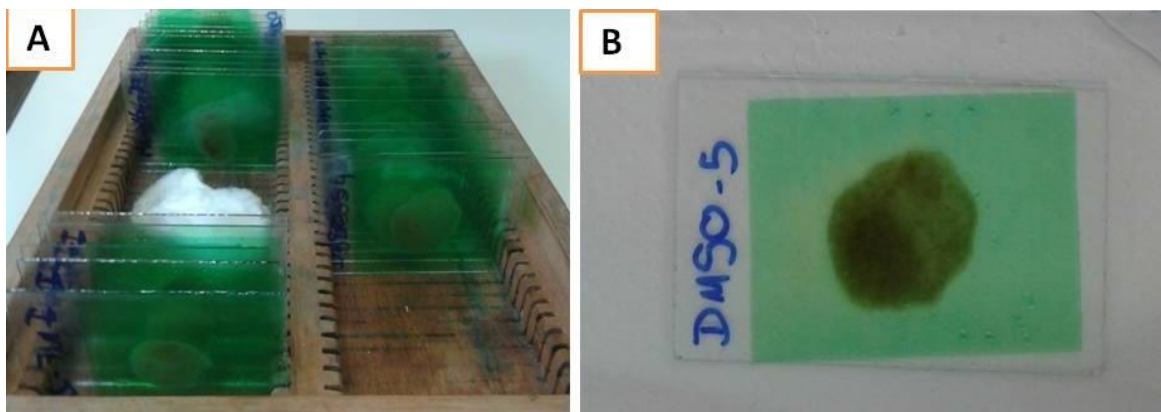
Os tratamentos foram iniciados no 45<sup>a</sup> após a infecção, com exceção do grupo Mentha 60 que teve seu tratamento iniciado no mesmo dia da infecção. Foram realizados três grupos controle: Controle negativo (camundongos sem infecção e sem tratamento), Controle positivo (camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* sem tratamento) e Cremophor 2% (camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e com administração da solução solubilizadora do Praziquantel, Cremophor 2%).

Antes de cada administração, a alimentação (ração e água) foi suspensa por 1 hora a fim de diminuir a chance de regurgitação do fitoterápico após sua administração.

### 3.3. Quantificação de ovos nas fezes

A técnica utilizada para análise quantitativa de ovos/grama de fezes dos animais infectados antes e depois dos tratamentos é uma adaptação da técnica clássica Kato-Katz (KATZ; PEIXOTO, 2000), comercializado pelo Laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como Kit Helm Teste. Brevemente, os animais foram separados em caixas individuais e as fezes frescas foram utilizadas para a realização da técnica. As fezes foram submetidas ao peneiramento em tela de nylon e a quantidade exata de fezes foi determinada através do preenchimento de um orifício com diâmetro conhecido (fornecido pelo Kit), e em seguida colocada sobre uma lâmina de vidro. As fezes, já dispostas sobre a lâmina, foram recobertas com lamínula de papel celofane verde impregnada com uma solução diafanizadora de verde malaquita, a fim de preservação e clareamento do material (Figura 10). Em cada experimento foi realizada uma lâmina por animal e efetuada a leitura de toda a lâmina em microscópio óptico. A quantidade de ovos foi determinada através da

fórmula padronizada pelo Kit Helm Teste, Bio-Manguinhos: número de ovos contados x 24 = ovos/grama de fezes. No 45º dia após a infecção, foi determinado número de ovos por grama das fezes dos animais infectados, a fim de confirmação da infecção. No 60º dia, após 14 dias de tratamento, a técnica foi repetida para avaliação do efeito dos tratamentos.



**Figura 10. Análise quantitativa de ovos de *S. mansoni* utilizando a técnica de Kato-Katz.** (A) Laminário contendo várias lâminas prontas para leitura em microscópio óptico. (B) Lâmina preparada pela técnica de Kato-Katz em destaque.

### 3.4. Obtenção e contagem de células do lavado da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue.

No 61º dia após a infecção dos animais, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. O sangue foi obtido através da veia braquial esquerda empregando o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante.

A técnica de lavagem peritoneal foi aplicada posteriormente a coleta sanguínea para recuperação de células da cavidade peritoneal. Para obtenção dessas células, foi injetado 3 mL de salina-citratada (0,5% de citrato de sódio) na cavidade peritoneal. A solução foi injetada, homogeneizada e uma amostra de aproximadamente 3 ml foi coletada.

O número total de células/mm<sup>3</sup> em ambos os compartimentos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer com a utilização de uma solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) na diluição de 1:20 (STIBBE; WEISE; SEIDEL, 1985).



A contagem diferencial foi realizada em lâminas de esfregaços sanguíneos e naquelas preparadas em citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem). Ambas as lâminas foram coradas utilizando o corante Panótico (Laborclin). Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000x.

### **3.5. Contagem de vermes localizados no sistema porta-hepático**

Após a eutanásia, os vermes adultos foram recuperados dos camundongos através de perfusão do sistema porta-hepático e mesentéricos (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956; DUVALL; DEWITT, 1967).

Após a contagem dos vermes recuperados, eles foram armazenados em salina (NaCl 0,9%) e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Foram mantidos -80°C até a realização do Ensaio Cometa.

### **3.6. Quantificação de Citocinas**

Foi realizada a dosagem das Citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  através do ensaio imunoenzimático ELISA. Para isso foi utilizado os Kits de detecção da R&D Systems® (mouse IL-4, mouse IL-10 e mouse IFN- $\gamma$ ) seguindo os procedimentos de acordo com o fabricante. Para a dosagem, foi realizado um *pool* de amostras e testado em triplicata.

Para a realização do ELISA, utilizaram-se placas de microtitulação com 96 poços. Primeiramente, as placas foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L/poço de solução contendo o anticorpo de captura em uma concentração de 4  $\mu$ g/mL diluído em PBS (anti-IL4, anti-IL-10 e anti-IFN- $\gamma$ ). As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. Após este período as placas foram lavadas duas vezes com solução 0,05% Tween 20 em PBS e uma vez em PBS e adicionado 300  $\mu$ L de 1% Soro Bovino Fetal em PBS para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas. A seguir foi adicionado o padrão com as respectivas diluições das citocinas recombinantes e as amostras (100 $\mu$ L/poço). A primeira concentração da citocina recombinante foi de 2000 pg/mL para IL-10 e IFN- $\gamma$  e 1000 pg/mL para IL-4, sucessivamente diluídas na base de 2 por 12 vezes em 1% Soro Bovino Fetal em PBS. Após

incubação em temperatura ambiente por 2 horas, foi realizada a lavagem das placas e adicionado 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 600 ng/mL para IL-4 e IFN- $\gamma$  e 600 ng/mL para IL-10), ficando incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas por 20 minutos contendo 100  $\mu$ L/poço da enzima Estreptoavidina-HRP diluída em 1% Soro Bovino Fetal em PBS (1:1000). Após lavagem das placas, foram adicionados 100 $\mu$ L de Substrato 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Tetrametilbenzidina (TMB), que ficaram incubadas por mais 20 minutos. Para finalizar, a reação foi bloqueada adicionando 50 $\mu$ L/poço de Solução Stop (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 450nm em leitor de placas  $\mu$ Quant.

As análises foram realizadas no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) gerenciado pela Professora Doutora Lúcia Helena Faccioli. Os ensaios foram realizados com a supervisão da técnica responsável Alyne Favero Galvão.

### **3.7. Avaliação histológica do fígado e intestino dos camundongos**

O fígado e o intestino de 5 camundongos por grupo foram removidos no tempo de 61 dias após a infecção para avaliação da inflamação e deposição de colágeno no fígado e intestino. Fragmentos de cada órgão foram fixados em formol tamponado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.5 g para 1 L de formol 10%). Em seguida, esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 4  $\mu$ m, e, posteriormente, corados com Hematoxilina/Eosina (H.E.) (Hematoxilina 5 g, Álcool Absoluto 5%, Alúmen de Potássio e Amônio 100 g, Óxido Vermelho Mercúrio 2.5 g/ Eosina 1%, Floxina 1%, Álcool Absoluto 95%, Ác. Acético Glacial 0.5%) para a avaliação celular. A outra coloração utilizada foi a de Gomori (Cromotrope 0.6 g, Azul de Anilina 0.3 g, Ác. Fosfotúngstico 0.8 g, Água destilada 100 mL, Ác. Acético Glacial 1 mL), para avaliação do depósito de colágeno no granuloma hepático e mesentérico, por microscopia óptica. Foi realizada a contagem de ovos e granulomas no fígado e contagem de ovos no intestino. Foram realizadas dois cortes por fígado e três cortes para intestino para cada coloração, sendo analisados 5 animais por grupo.

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela técnica Ana Maria da Rocha. A leitura das lâminas foi realizada no mesmo laboratório pelo Professor Responsável Doutor Edson Garcia Soares. As

fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, mantido sob responsabilidade da Professora Doutora Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

### 3.8. Ensaio cometa

Os vermes recuperados através da perfusão foram separados de acordo com o grupo e submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido. Foram mantidos em *freezer* a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do Ensaio Cometa. Foi utilizado um *freezer* localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, sob responsabilidade da Professora Dr<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo.

Os vermes foram descongelados e utilizados para a preparação das lâminas do Ensaio Cometa. Para cada lâmina foram utilizados de 6-10 vermes adultos contendo vermes de ambos os sexos. Foi realizada a montagem de 5 lâminas por grupo.

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com Singh *et al*, 1988, com algumas modificações. Sobre lâminas de vidro limpas e com a extremidade fosca voltada para cima, foi adicionada 1 ml de agarose 1% derretida em água destilada. As lâminas foram secas em temperatura ambiente *overnight* e marcadas. Uma quantidade de 6 -10 vermes adultos de ambos os sexos foram macerados com auxílio de uma agulha e ressuspensos em 30 $\mu\text{l}$  de PBS pH=7,4. A esta suspensão foi adicionada 140  $\mu\text{l}$  de solução de agarose *low melting point* 1%, homogeneizada e colocada sobre as lâminas pré-revestidas. Sobre a lâmina foi adicionada uma lamínula 18 x 18 mm e armazenada por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para o endurecimento da agarose. Após esta etapa, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (NaCl 2,5M; Na<sub>2</sub> EDTA 0,1M; Tris 10 mM, pH=10), adicionado de Triton X-100 e 10 mL de DMSO para cada 100 mL de solução de lise, durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . As lâminas foram colocadas em um tanque de eletroforese por 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA e submetidas a eletroforese utilizando uma solução alcalina (NaOH 0,3M; Na<sub>2</sub> EDTA 1mM; pH<13) por 60 minutos a 25V. As lâminas foram neutralizadas em PBS pH=7,4 por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e 10 minutos em água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ . Durante todos os passos anteriores, as lâminas foram mantidas em gelo. Após secas (*overnight*), as lâminas foram coradas com 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de Brometo de Etídio 20  $\mu\text{g/ml}$  em água destilada e coberta por uma

lamínula. Após 10 minutos foram observadas e fotografadas em microscópio Olympus Bx50, utilizando câmera fotográfica acoplada Olympus DP72, utilizando filtro verde de 570nm. No total, foram analisadas 100 núcleos por grupo de forma aleatória. Para a realização do Controle Positivo, vermes adultos foram submetidos a luz UV durante 24 horas em HCl 1M.

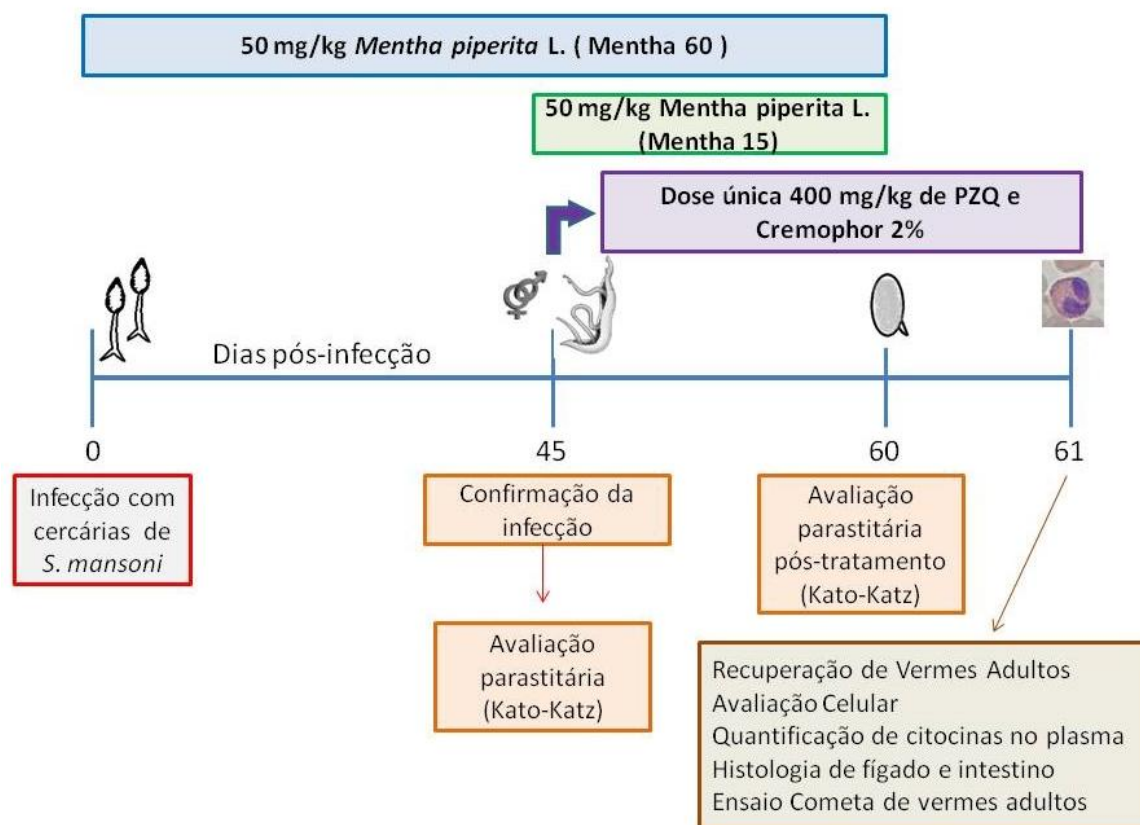
As lâminas foram fotografadas utilizando o software DP2-BSw versão 2006-2008 no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, sob responsabilidade do Professor Marcelo de Bello Cioffi. Posteriormente, as fotos foram analisadas utilizando o *software* gratuito CaspLab versão 1.2.3beta2. O software diferencia automaticamente a cabeça e a cauda do cometa e consegue medir uma variedade de parâmetros, incluindo % comprimento da cauda, % de fluorescência total da cabeça e na cauda e “momento da cauda”, utilizando diferença entre coloração dos cometas corados (DNA) e ausência de cor do fundo da lâmina (sem DNA). O “momento da cauda” é definido como tamanho da cauda/ % DNA na cauda (El-Sayed, Aly, 2014).

Em nosso trabalho, não foi realizado teste em células de camundongos submetidos ao tratamento com o fitoterápico, pois o medicamento testado já é autorizado pela ANVISA.

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados obtidos entre os diferentes grupos foram analisados utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA (*One-Way analysis of variance*), pós-teste pelo Método de Tukey (*Compare all pairs of columns*), utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0, 2005 (San Diego, California). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3.10. Desenho Experimental



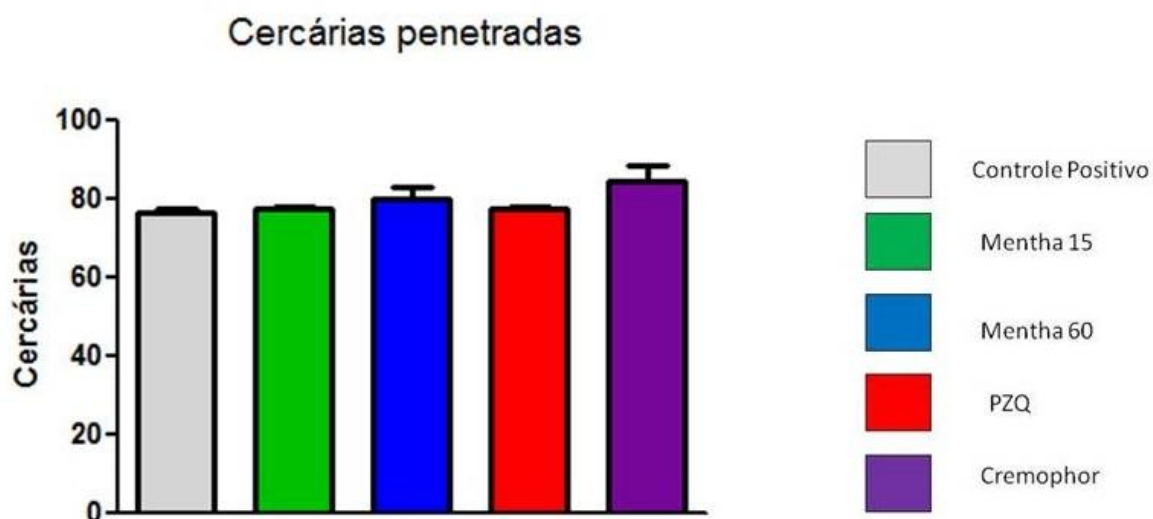
**Figura 11. Delineamento Experimental do Trabalho.** Após 45 dias de infecção dos camundongos Balb/c com cercárias de *S. mansoni*, vermes adultos já atingiram a maturidade sexual e começam a eliminar ovos, estes que podem ser encontrados nas fezes e fígado do hospedeiro definitivo. O experimento *in vivo*, tem como objetivo avaliar os parâmetros celulares, imunológicos e parasitários após o tratamento com o fitoterápico preparado a partir da *Mentha piperita* L, além de avaliar um potencial efeito genotóxico sobre células de vermes adultos de *S. mansoni*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Confirmação da infecção dos camundongos com *Schistosoma mansoni*

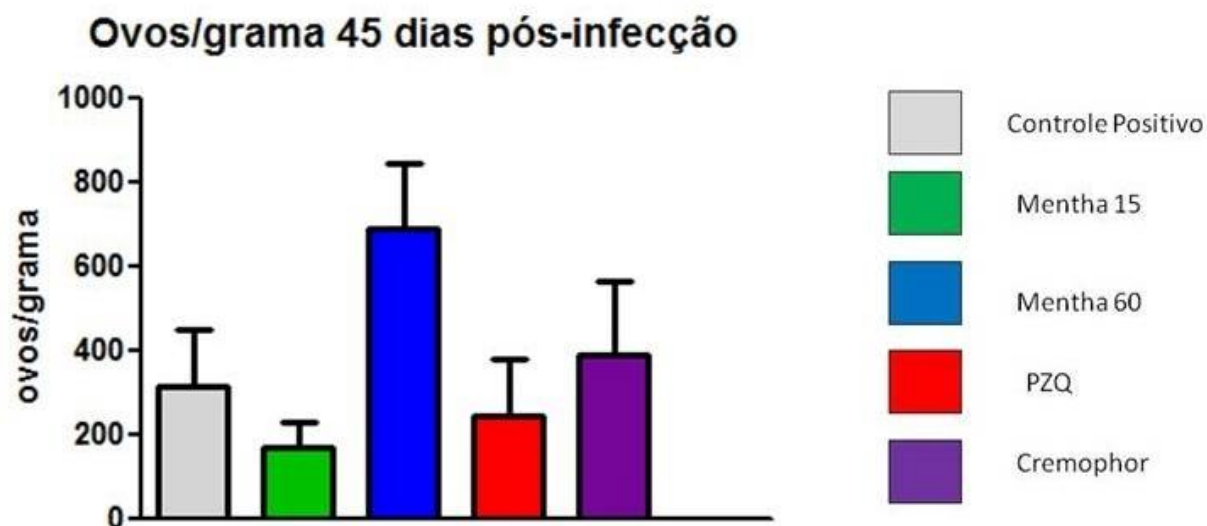
Todos os camundongos, com exceção aos do grupo Controle Negativo, foram expostos a 80 cercárias de *Schistosoma mansoni* utilizando a técnica de imersão caudal.

Em todos os animais expostos, 75 (setenta e cinco) ou mais cercárias conseguiram penetrar ativamente através da cauda de cada camundongo, demonstrando que a técnica de imersão caudal foi bem sucedida e é um método eficaz para o estudo com o modelo experimental da esquistossomose mansônica murina (Figura 12).



**Figura 12.** Número de cercárias penetradas em camundongos Balb/C. Os dados representam a média de cercarias penetrada por grupo  $\pm$  SEM. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

Antes de iniciar os tratamentos em estudo, com exceção ao grupo Mentha 60 que teve o tratamento iniciado 1 dia após a infecção, foi realizada a técnica coproparasitológica Kato-Katz para confirmação da infecção por *Schistosoma mansoni* através da quantificação de ovos/grama eliminados nas fezes dos camundongos. A técnica foi realizada após 45 dias de infecção, demonstrando que todos os animais foram realmente infectados e que as cercárias penetradas através da técnica de imersão caudal conseguiram se desenvolver até a fase de vermes adultos, possibilitando o acasalamento e a eliminação de ovos pela fêmea (Figura 13).

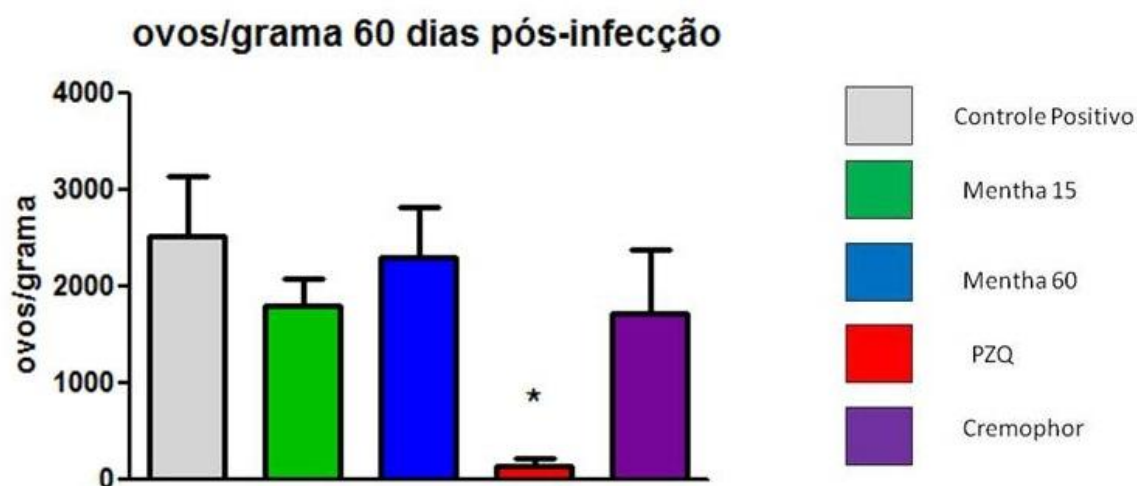


**Figura 13. Quantificação do número de ovos de *Schistosoma mansoni* (ovos/grama) 45 dias pós-infecção.** Os dados representam a média do número de ovos/grama de fezes  $\pm$  SEM. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

## 4.2. Análise parasitológica

### 4.2.1. Quantificação de ovos nas fezes de camundongos

A figura 14 apresenta a análise coproparasitológica através da técnica Kato-Katz para quantificação de ovos/grama de *S. mansoni* eliminados pelas fezes dos camundongos infectados e submetidos ou não aos tratamentos propostos. O exame foi realizado 60 dias após a infecção com cercarias de *S. mansoni* e após os tratamentos propostos.



**Figura 14. Quantificação do número de ovos de *Schistosoma mansoni* (ovos/grama) 60 dias pós-infecção.** Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , representa diferença significativa entre os grupos Mentha 15, Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

Nossos resultados mostram que ambas as formas de tratamento com 50 mg/kg do fitoterápico composto por mentol e mentona tiveram uma queda da média no número de ovos/grama eliminados (Figura 15). O grupo Mentha 15 obteve uma diminuição de 28,4% de ovos/grama e o grupo Mentha 60 reduziu 8,4% ovos/grama, quando comparado ao Controle Positivo. O grupo tratado com PZQ diminuiu de forma significativa o número de ovos eliminados pelos camundongos, 94,5% de ovos/grama, efeito esperado após a administração de 400 mg/kg de PZQ.





**Figura 15. Ovo de *Schistosoma mansoni* (400x).** (FONTE: Arquivo pessoal)

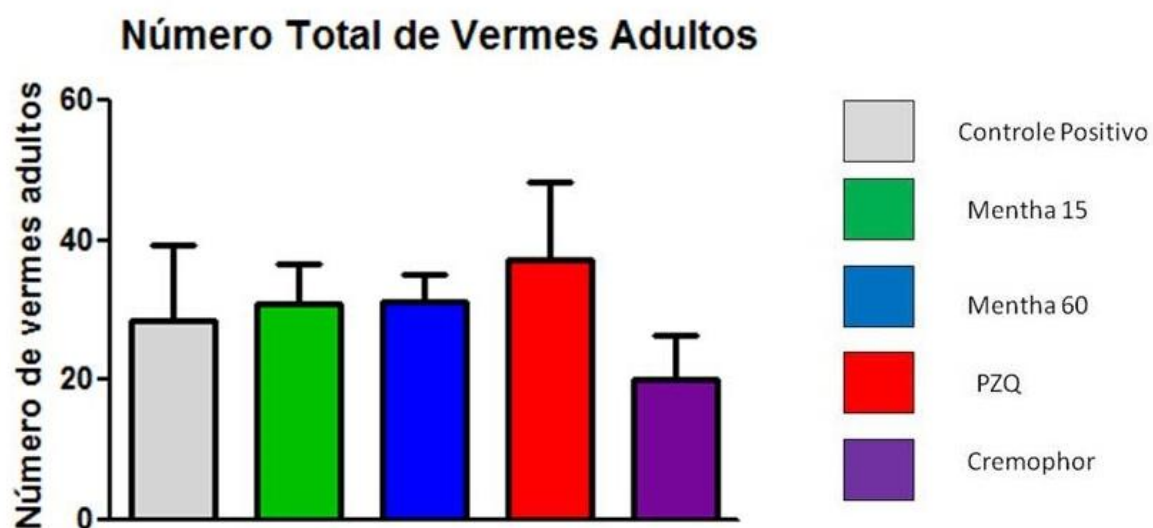
#### **4.2.2. Quantificação de vermes adultos recuperados por perfusão do sistema porta-hepático**

No 61º dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e submetidos ao processo de perfusão do sistema porta-hepático para recuperação e contagem de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

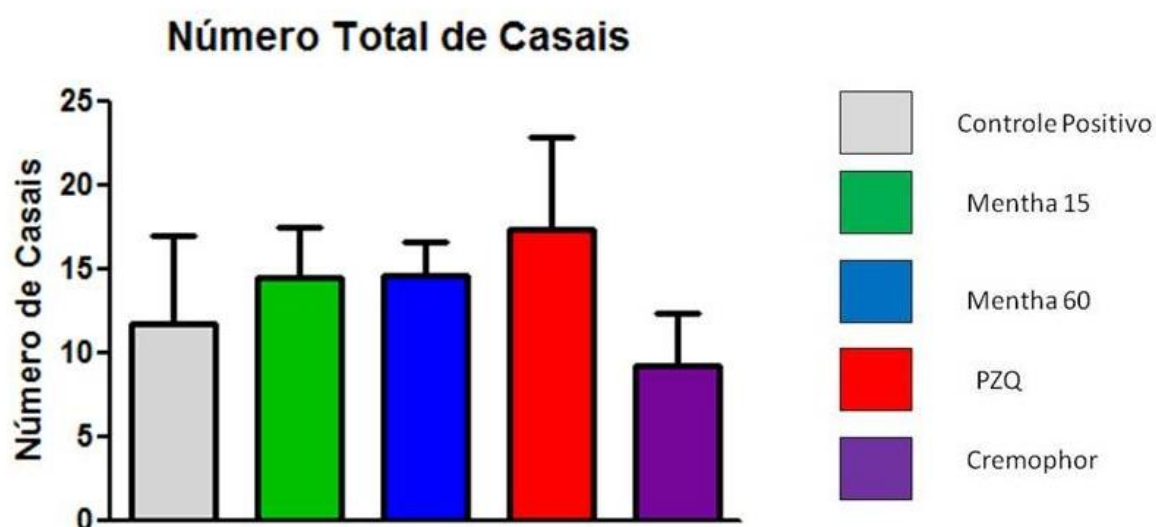
Em relação ao número de vermes adultos recuperados (Figura 16) foi possível analisar que nenhuma forma de tratamento conseguiu diminuir o número de vermes adultos do sistema porta-hepático dos camundongos quando comparado ao Controle Positivo.

O número total de casais recuperados (Figura 17) seguiu o mesmo padrão, não mostrando nenhuma diminuição significativa dos grupos tratados quando comparado ao Controle Positivo.

O tratamento com PZQ também não mostrou diminuição no número total de vermes adultos e no número total de casais, quando comparado ao grupo Controle Positivo.



**Figura 16. Número Total de Vermes Adultos de *S. mansoni* recuperados 61 dias após a infecção.** Os dados representam a média do número de vermes adultos  $\pm$  SEM, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.



**Figura 17. Número Total de Casais de *S. mansoni* recuperados 61 dias após a infecção.** Os dados representam a média do número de vermes adultos  $\pm$  SEM, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

De acordo com os resultados encontrados, nenhum tratamento foi eficaz na diminuição de vermes adultos do sistema porta-hepático. O número de vermes contabilizados foram aqueles encontrados na veia porta-hepática e veias mesentéricas dos camundongos.

### **4.3. Avaliação do perfil leucocitário durante a Esquistossomose mansônica experimental após diferentes terapias**

#### **4.3.1. Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* e submetidos ou não as diferentes terapias**

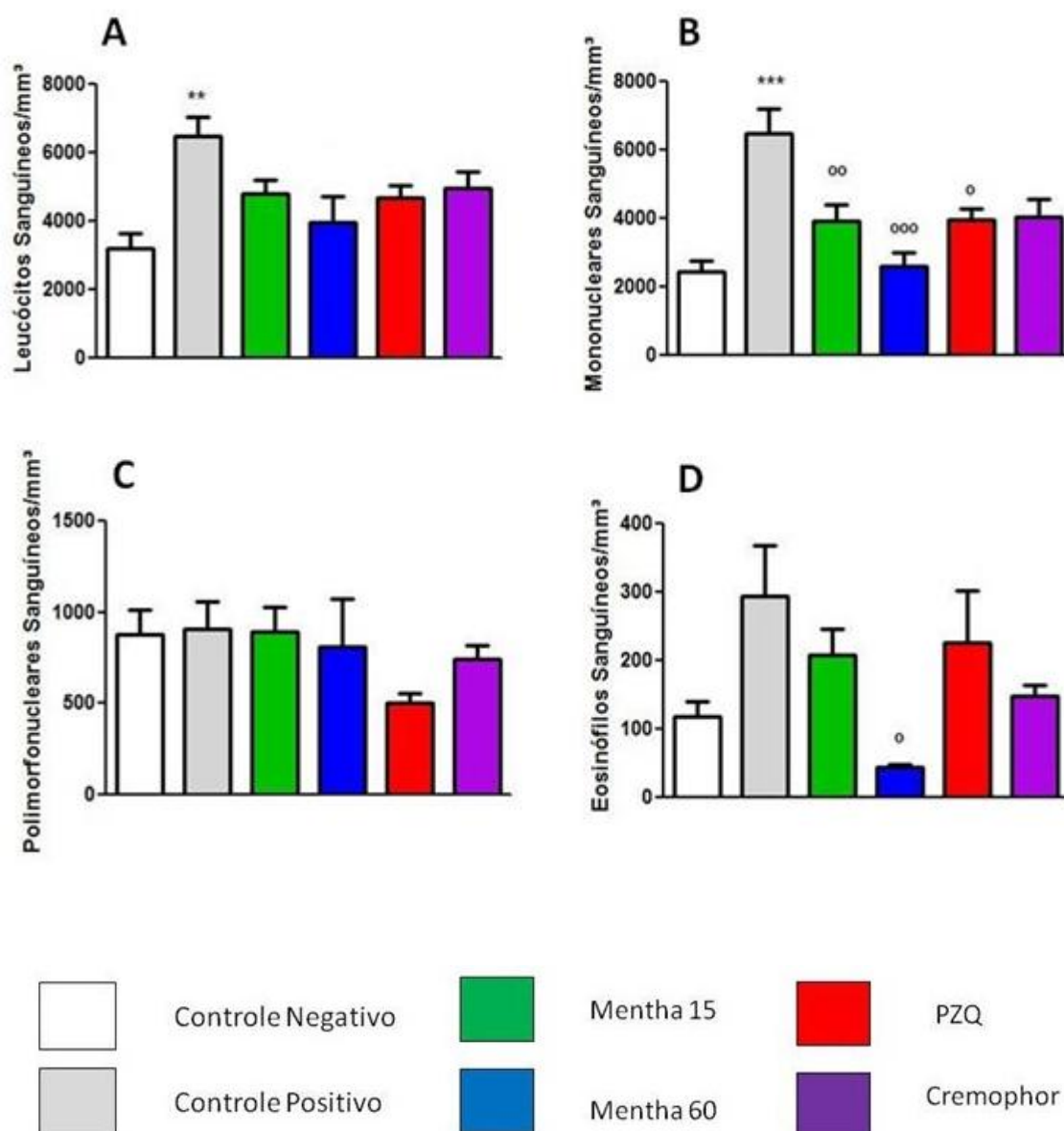
Após a eutanásia dos animais, foi realizada a coleta de sangue dos camundongos e realizada a contagem de leucócitos totais e contagem diferencial dos leucócitos, no qual foram diferenciados em (1) células mononucleares, correspondendo aos monócitos e linfócitos, (2) células polimorfonucleares, correspondendo aos neutrófilos e (3) eosinófilos.

De acordo com os resultados observados, o grupo Mentha 15 obteve uma redução de 26,3% de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> no sangue quando comparado ao grupo Controle Positivo. Já o grupo tratado diariamente, Mentha 60, obteve uma queda ainda maior, 38,68% (Figura 18A).

Em relação às células mononucleares sanguíneas, os grupos Mentha 15, Mentha 60 e PZQ demonstraram diminuição significativa em relação ao Controle Positivo. O grupo Mentha 15 obteve uma diminuição de 39,22% e contra 59,61% do grupo Mentha 60, ambos comparados ao Controle Positivo (Figura 18B).

De acordo com este modelo de estudo, a quantidade das células polimorfonucleares não se apresentou alterada de forma significativa entre os grupos estudados (Figura 18C).

A análise dos eosinófilos mostrou diminuição significativa no grupo Mentha 60 em relação ao Controle Positivo, com 84,91% de queda no nível dessas células. Os animais do grupo Mentha 15 também demonstraram diminuição com uma queda de 29,4% no número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comprado aos animais infectados e não tratados, embora não significativa. (Figura 18D).



**Figura 18. Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos após 61 dias de infecção com *S. mansoni* e submetidos ou não a diferentes tratamentos. Leucócitos Sanguíneos/mm<sup>3</sup> (17A); Mononucleares Sanguíneos/mm<sup>3</sup> (17B); Polimorfonucleares Sanguíneos/mm<sup>3</sup> (17C); Eosinófilos Sanguíneos/mm<sup>3</sup> (17D). Os dados representam a média  $\pm$  SEM (n= 12-16 animais) de 2 experimentos independentes. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, representa diferença significativa entre o Controle Positivo quando comparado ao Controle Negativo. <sup>o</sup> p<0,05, <sup>oo</sup> p<0,01, <sup>ooo</sup> p<0,001, representa diferença significativa dos grupos Mentha 15, Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.**

#### **4.3.2. Contagem total e diferencial de leucócitos do líquido da cavidade peritoneal (LCP) de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* e submetidos ou não a diferentes terapias**

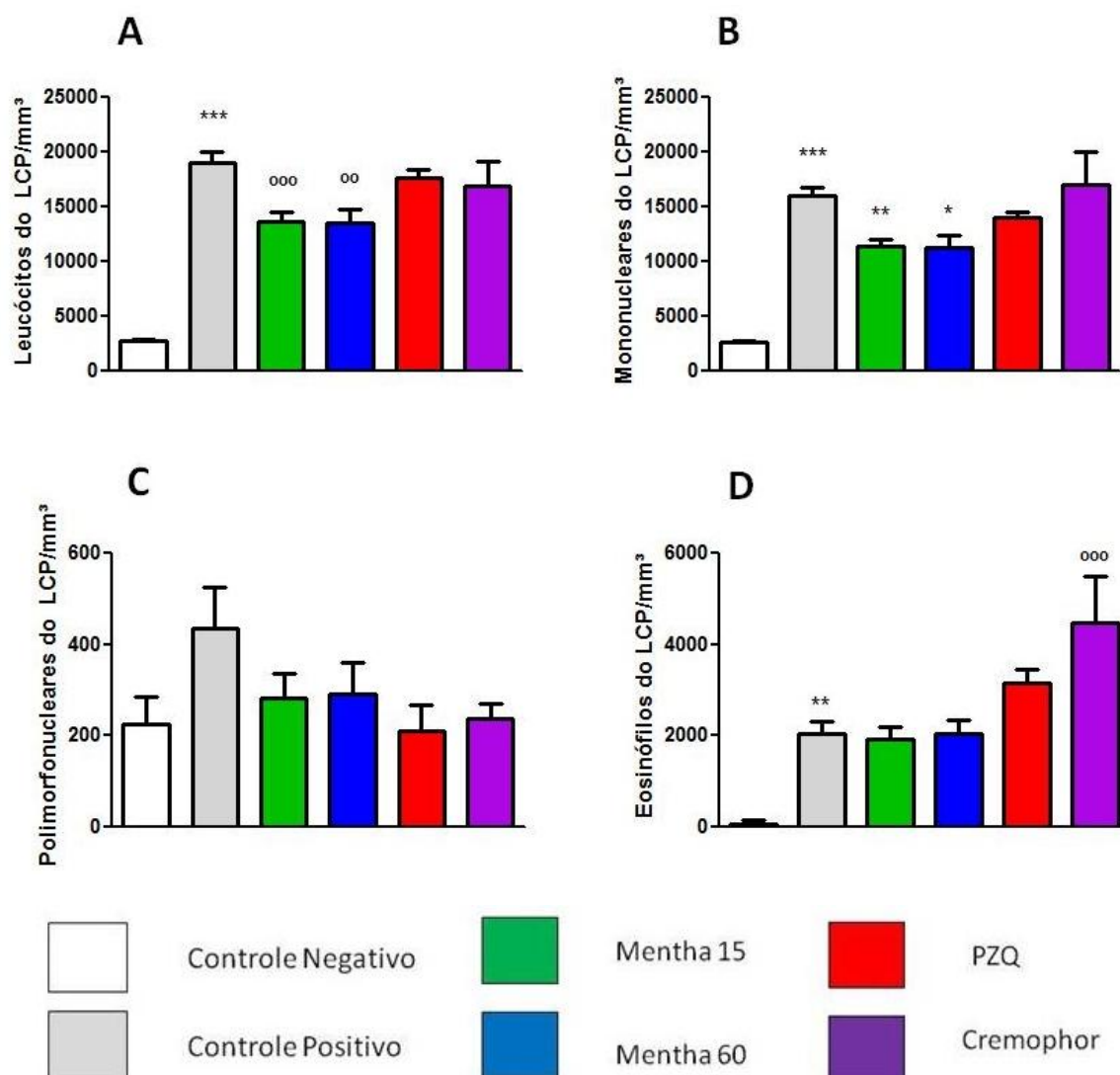
Após a coleta do sangue dos animais, foi realizada a coleta do lavado da cavidade peritoneal dos camundongos (LCP) e realizada a contagem de leucócitos totais e contagem diferencial dos leucócitos, no qual foram diferenciados em (1) células mononucleares, correspondendo aos linfócitos, (2) células polimorfonucleares, correspondendo aos neutrófilos e (3) eosinófilos.

A análise dos leucócitos totais do LCP/mm<sup>3</sup> demonstrou que ambos os grupos tratados com o fitoterápico estudado, Mentha 15 e Mentha 60, apresentaram diminuição significativa quando comparados ao Controle Positivo, 28,2% e 28,78%, respectivamente (Figura 19A).

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar diminuição significativa nos níveis de células mononucleares do LCP em ambos os grupos tratados com 50 mg/kg do fitoterápico, Mentha 15 e Mentha 60, comparado ao Controle Positivo (Figura 19B). Os animais do grupo Mentha 15 mostraram uma diminuição de 29,1% contra 29,7% do Mentha 60.

Os resultados demonstrados pela análise das células polimorfonucleares não demonstraram nenhuma alteração significativa entre os grupos estudados, embora todos os grupos tenham apresentado médias inferiores ao Controle Positivo (Figura 19C).

Não houve alteração significativa em relação aos níveis de eosinófilos do LCP dos animais dos grupos tratados quando comparado ao Controle Positivo (Figura 19D).



**Figura 19.** Contagem total e diferencial de leucócitos do Líquido da Cavidade Peritoneal (LCP) após 61 dias de infecção com *S. mansoni* e submetidos ou não a diferentes tratamentos. Leucócitos do LCP/mm<sup>3</sup> (18A); Mononucleares do LCP/mm<sup>3</sup> (18B); Polimorfonucleares do LCP/mm<sup>3</sup> (18C); Eosinófilos do LCP/mm<sup>3</sup> (18D). Os dados representam a média  $\pm$  SEM (n= 12-16 animais) de 2 experimentos independentes. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, representa diferença significativa entre o Controle Positivo quando comparado ao Controle Negativo. ° p<0,05, °° p<0,01, °°° p<0,001, representa diferença significativa dos grupos Mentha 15, Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo, utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

#### 4.4. Avaliação de citocinas do plasma

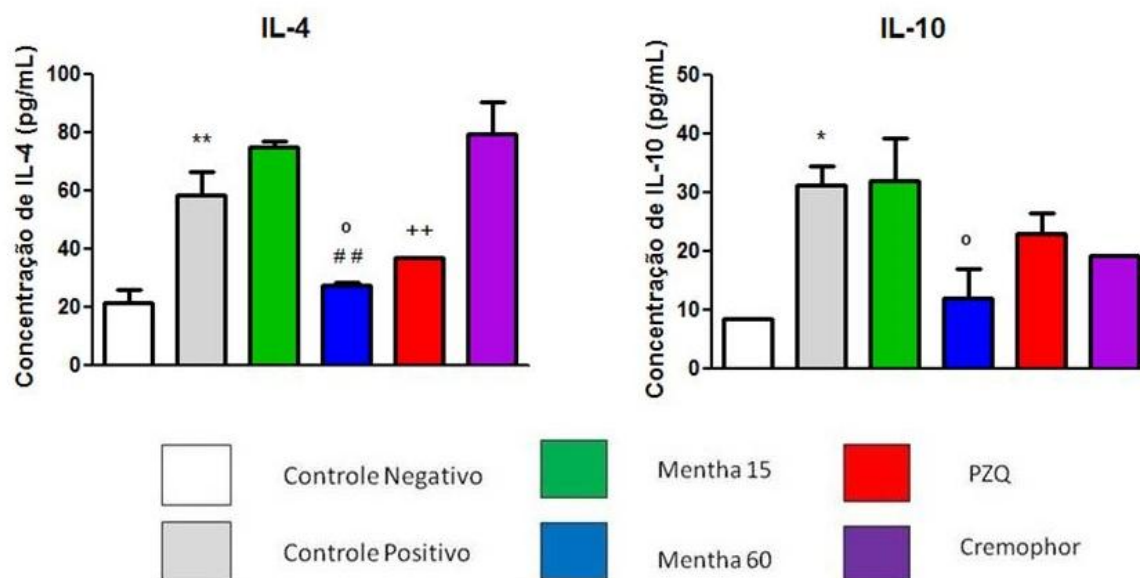
Neste trabalho foram avaliados três citocinas: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , utilizando a técnica imunoenzimática ELISA.

No período de 61 dias após a infecção, o grupo tratado durante 60 dias com 50mg/kg do fitoterápico, composto de mentol e mentona, reduziu 53,5% os níveis de IL-4, quando comparado ao Controle Positivo. Além disso, mostrou-se significativamente em menores concentrações quando comparado aos animais do grupo Mentha 15, na qual foram tratados apenas durante os últimos 15 dias (Figura 20).

A Interleucina-10 também foi avaliada no mesmo período, 61 dias após a infecção. Os resultados mostram que o grupo Mentha 60 apresentou os menores níveis de IL-10 quando comparado ao grupo Controle Positivo, uma queda de 62% (Figura 20).

O grupo tratado apenas 15 dias com 50 mg/kg do fitoterápico testado, Mentha 15, demonstrou um aumento, embora pequeno e não significativo, da concentração de ambas as Interleucinas analisadas.

A análise de IFN- $\gamma$ , não demonstrou produção desta citocina em nenhum dos grupos analisados utilizando a técnica imunoenzimática ELISA.



**Figura 20. Concentração de IL-4 e IL-10 após 61 dias de infecção com *Schistosoma mansoni* submetidos ou não a diferentes tratamentos.** Os dados representam a média  $\pm$  SEM. Foi utilizado o *pool* de plasma de cada grupo e analisado em triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , representa diferença significativa entre o Controle Positivo quando comparado ao Controle Negativo. °  $p < 0,05$ , °°  $p < 0,01$ , °°°  $p < 0,001$ , representa diferença significativa dos grupos Mentha 15, Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ , representa diferença significativa dos grupos Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao grupo Mentha 15. +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ , representa diferença significativa do grupo PZQ quando comparado ao grupo Cremophor. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.



#### **4.5. Avaliação histológica do fígado e intestino**

Neste trabalho foi realizada análise histológica do fígado e intestino dos animais infectados com *S. mansoni* e submetidos ou não aos tratamentos propostos. Foram utilizadas duas colorações, HE e coloração de Gomori. Essas colorações permitem a observação das estruturas e integridade do órgão, bem como a presença de células e colágeno, respectivamente.

##### **4.5.1. Avaliação da histologia do fígado após 61 dias de infecção**

Camundongos pertencentes ao grupo Controle Negativo apresentaram estruturas hepáticas bem estruturadas e preservadas, podendo ser observado apenas a presença de colágeno pericanicular e perivascular de forma delgada (Figuras 23A e 24A).

A análise histológica hepática dos animais infectados com *S. mansoni* (tratados ou não) mostrou a presença de granulomas periovulares formados por linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e células epitelióides (gigantócitos). Os órgãos apresentaram-se com estruturas preservadas em locais onde não havia a deposição de ovos (Figuras 21 e 22).

Foi possível observar a formação de material colagenoso nos órgãos dos animais de todos os grupos infectados (Figuras 23 e 24). Além da deposição de colágeno pericanicular e perivascular, foi possível observar a deposição de colágeno ao redor dos ovos, juntamente com os granulomas. Todos os grupos apresentaram deposição de colágeno periovular, indicando a ocorrência de um processo cicatricial fibrótico no tecido hepático.

Nossos resultados revelaram uma diminuição da quantidade de ovos (Tabela 2) e conseqüentemente uma queda no número de granulomas hepáticos dos animais infectados e submetidos ao tratamento diário com 50mg/kg do fitoterápico (Mentha 60) quando comparado ao grupo Controle Positivo. Os animais do grupo Mentha 15 apresentaram-se com pequena redução no número de granulomas hepáticos (Tabela 3).

TABELA 2

**Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre ovos de *S. mansoni* em tecido hepático de camundongos Balb/c**

Média ± SEM		
Grupos	Ovo/lâmina	Redução (%)
Controle Positivo	35.2 ± 3.7	-
Mentha 15	35.6 ± 4.3	não houve
Mentha 60	25.8 ± 2.3	26.7
PZQ	15.2 ± 1.7 <sup>oo</sup>	56.8
Cremophor	21.2 ± 3.7	40

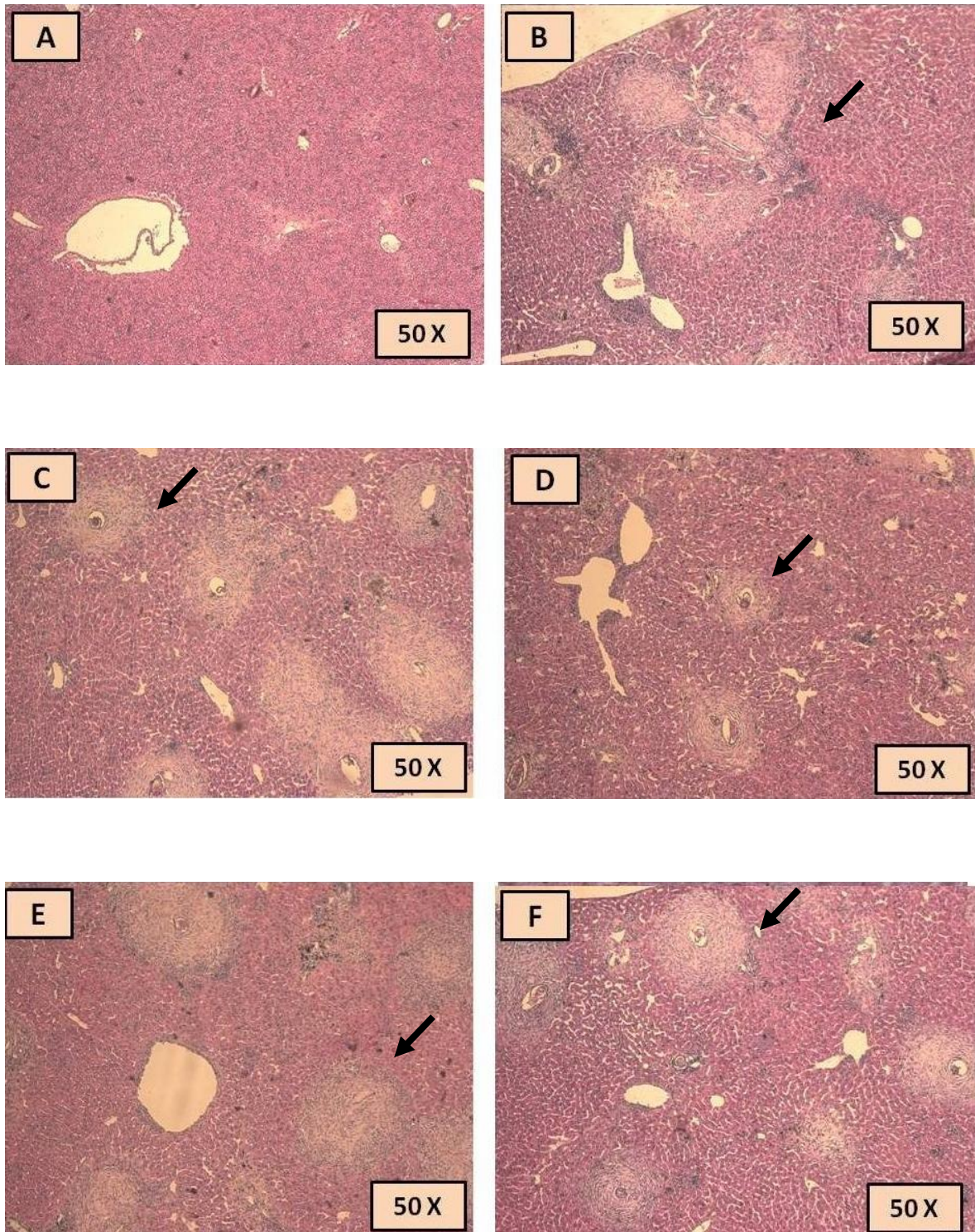
Os dados representam a média ± SEM. A leitura foi realizada em cortes histológicos corados com HE. Foi realizada uma lâmina por animal (n=5). Os órgãos foram removidos 61 dias após a infecção. ° p<0,05, °° p<0,01, °°° p<0,001, representa diferença significativa do grupo PZQ quando comparado ao Controle Positivo. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.

TABELA 3

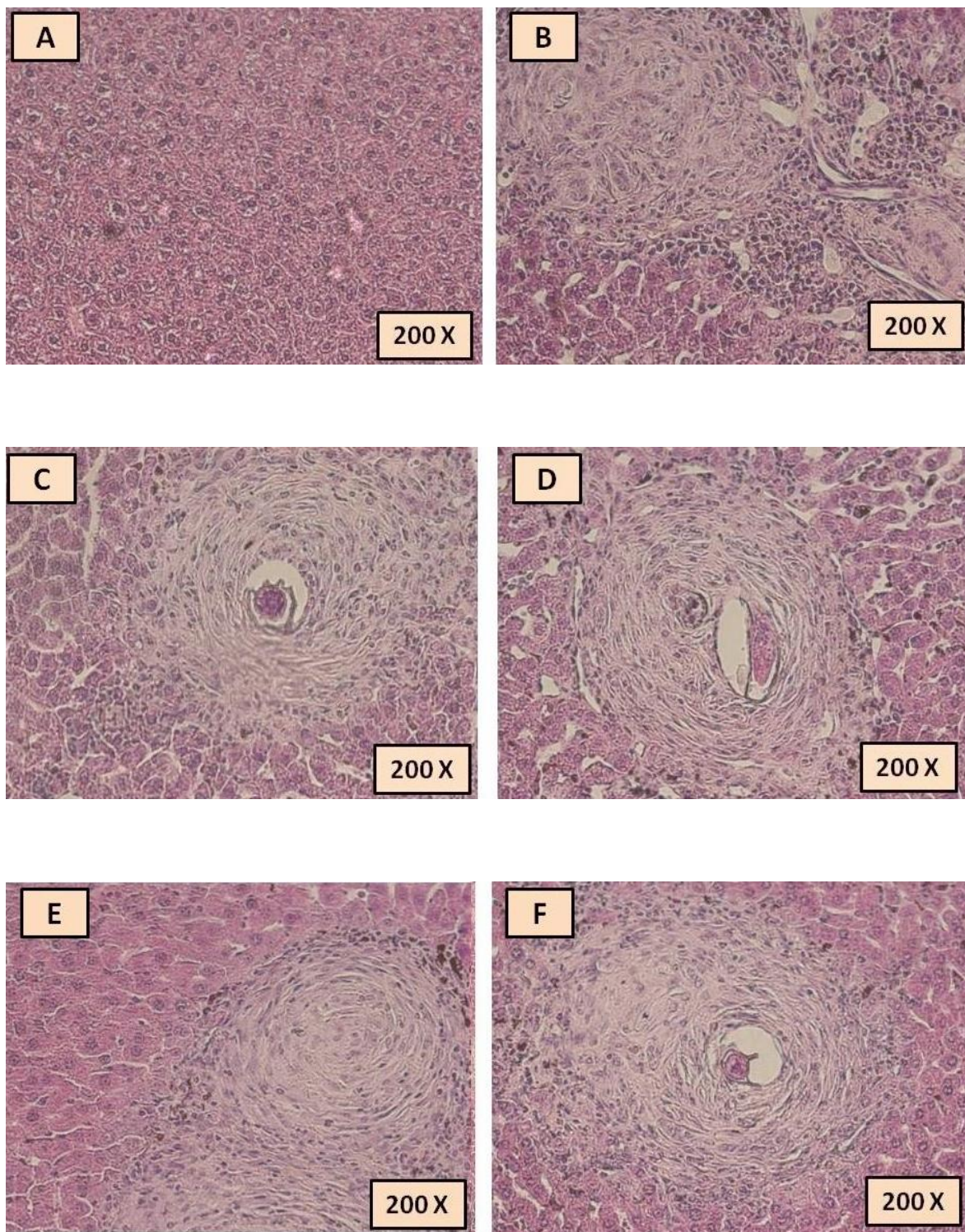
**Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre granulomas em tecido hepático de camundongos Balb/c infectados com *S. mansoni***

Média ± SEM		
Grupos	Granuloma/lâmina	Redução (%)
Controle Positivo	51 ± 3.8	-
Mentha 15	47.4 ± 3.2	7
Mentha 60	33.8 ± 3.9 <sup>o</sup>	33.7
PZQ	32.6 ± 3 <sup>o</sup>	36.1
Cremophor	35 ± 2.7 <sup>o</sup>	31.4

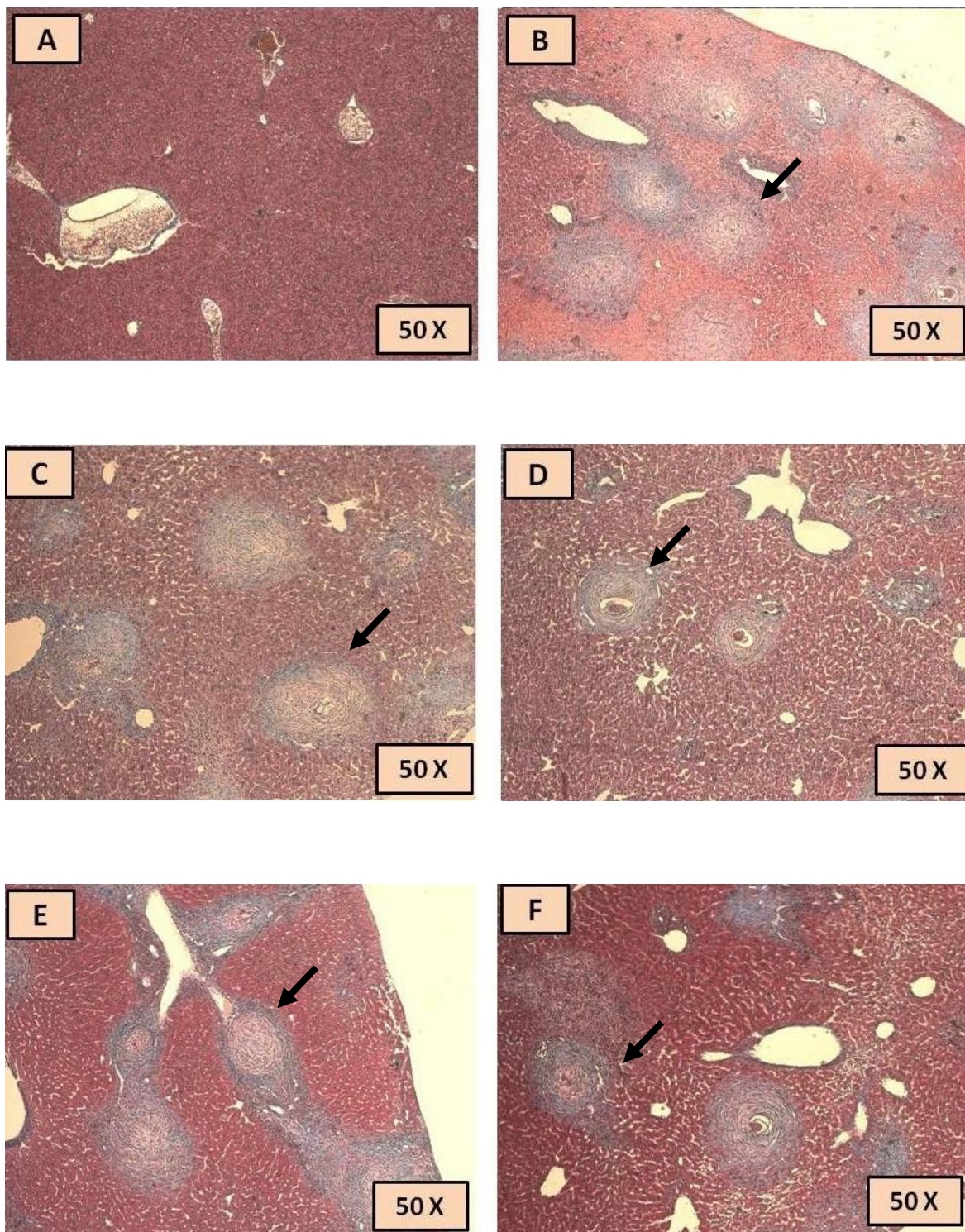
Os dados representam a média ± SEM. A leitura foi realizada em cortes histológicos corados com HE. Foi realizada uma lâmina por animal (n=5). Os órgãos foram removidos 61 dias após a infecção. <sup>o</sup> p<0,05, <sup>oo</sup> p<0,01, <sup>ooo</sup> p<0,001, representa diferença significativa dos grupos Mentha 60, PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.



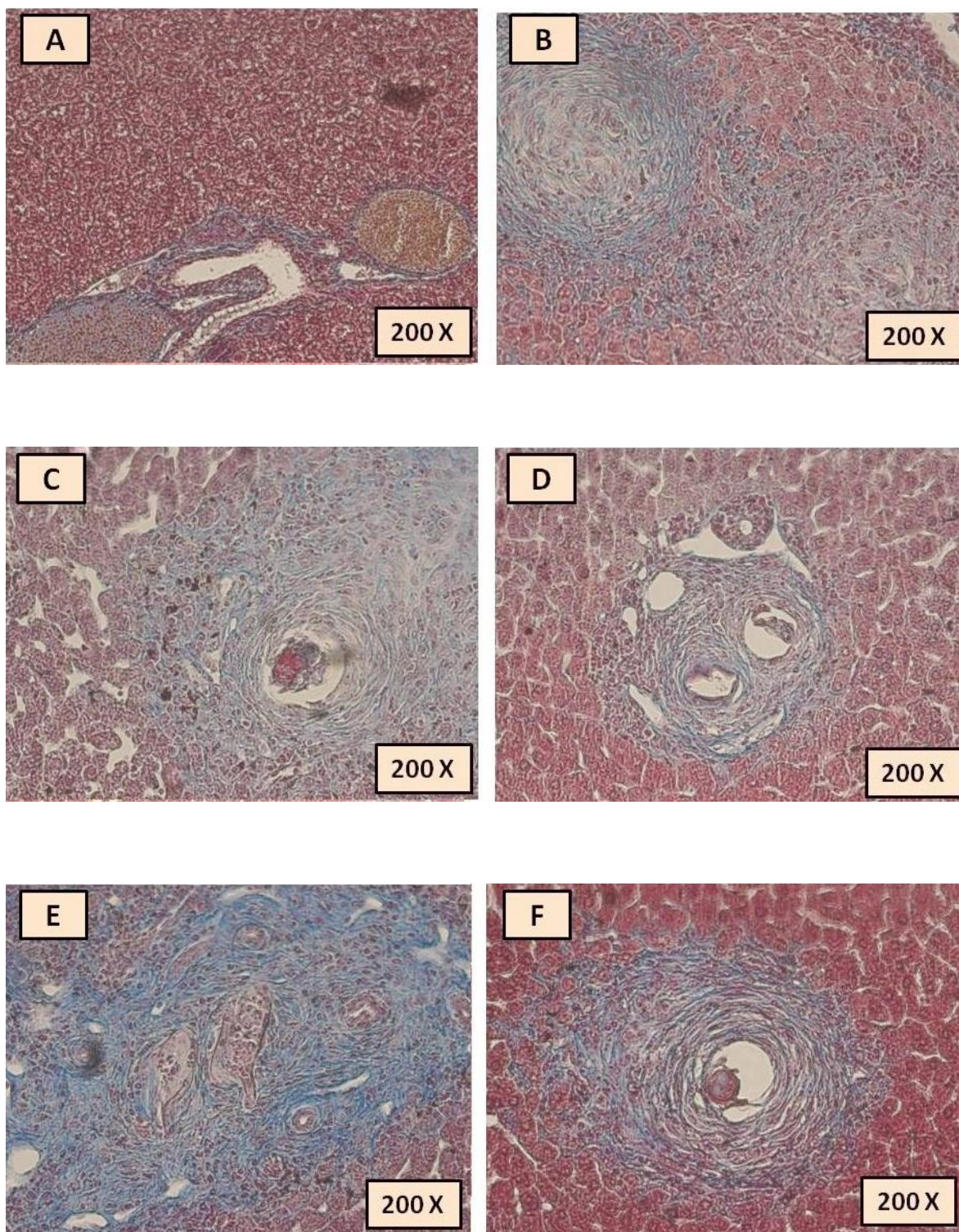
**Figura 21. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com HE (50x).** Análise morfológica de cortes histológicos de fígado 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração HE. Aumento de 50x. O granuloma é indicado pela seta.



**Figura 22. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com HE (200x).** Análise morfológica de cortes histológicos de fígado 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração HE. Aumento de 200x.



**Figura 23. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com Tricrômico de Gomori (50x).** Análise morfológica de cortes histológicos de fígado 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração de Gomori. Aumento de 50x. O granuloma é indicado pela seta.



**Figura 24. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com Tricrômico de Gomori (200x). Análise morfológica de cortes histológicos de fígado 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração de Gomori. Aumento de 200x.**

#### **4.5.2. Avaliação da histologia do intestino após 61 dias de infecção**

Camundongos pertencentes ao grupo Controle Negativo apresentaram estruturas intestinais bem estruturadas e preservadas (Figuras 25A e 26A). Nos animais submetidos à infecção, foi possível observar a presença de ovos na submucosa e musculatura do órgão, com ou sem a presença de granulomas (Figuras 25 e 26).

Foi possível observar a formação de material colagenoso nos órgãos dos animais de todos os grupos infectados. O processo fibrótico ocorreu principalmente ao redor dos ovos, juntamente com a formação dos granulomas (Figuras 27 e 28).

No intestino, ambos os grupos tratados com o fitoterápico foram capazes de reduzir o número de ovos no órgão, com maior atenção ao grupo Mentha 60, que apresentou redução de 41,4% (Tabela 4).

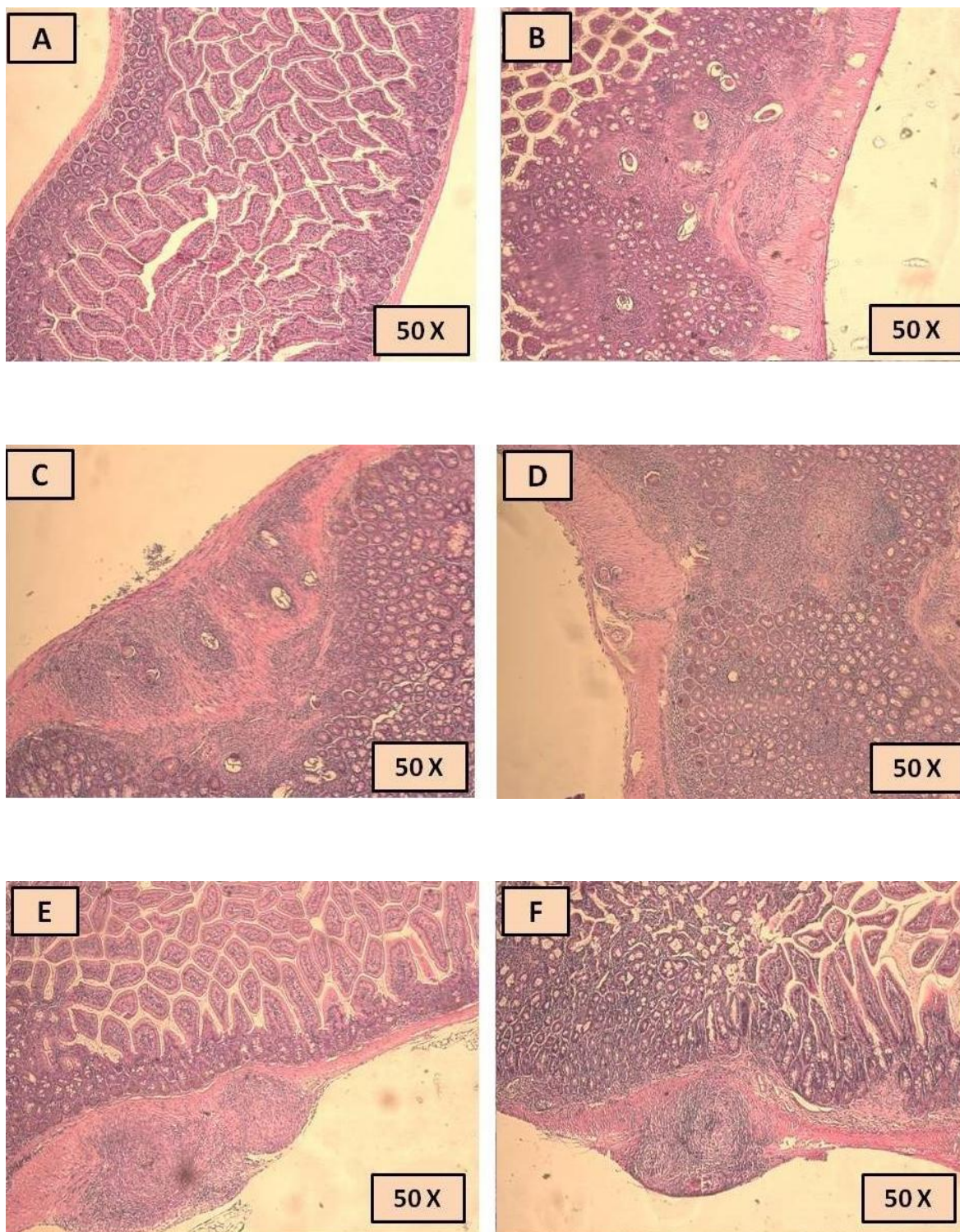


**TABELA 4**

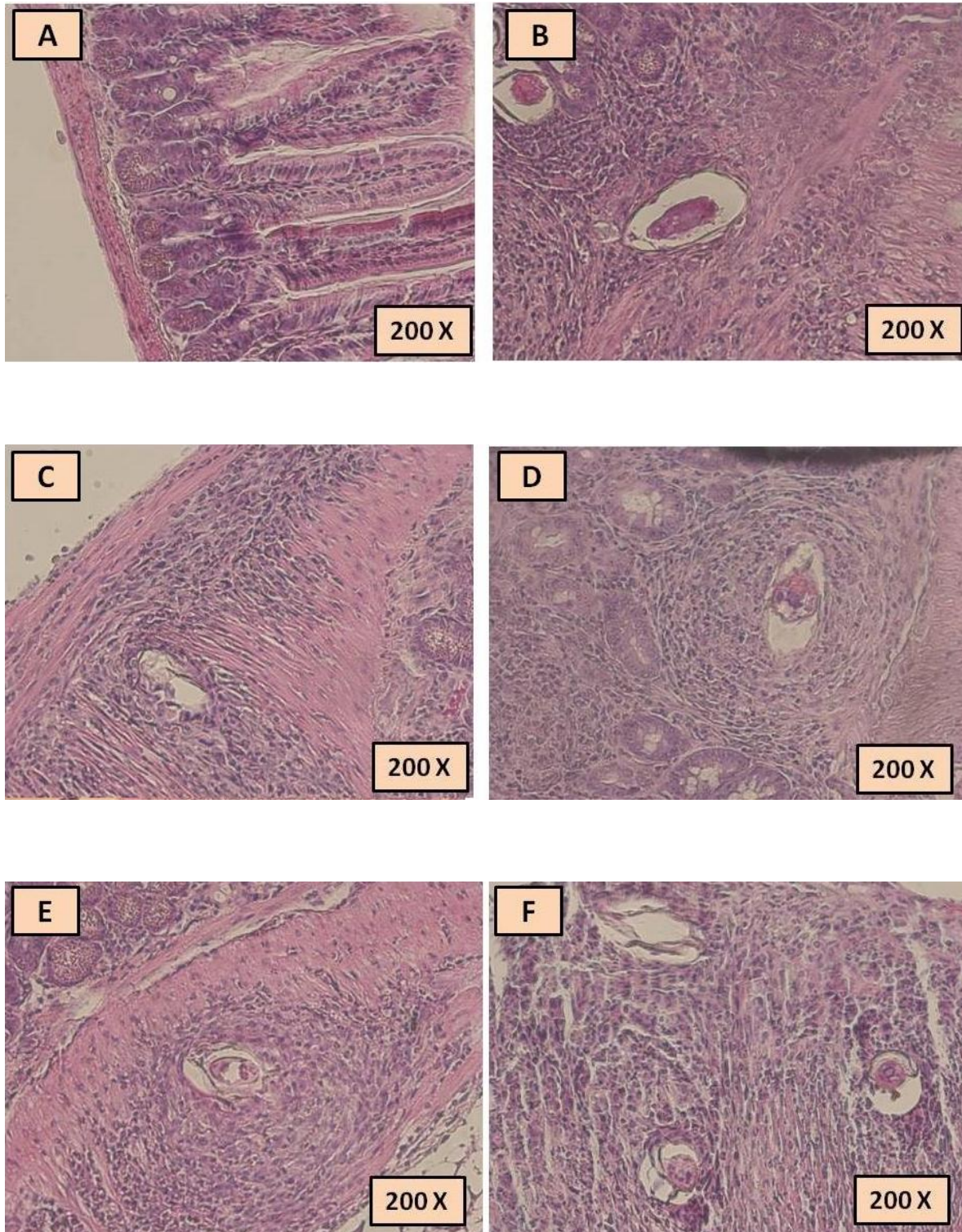
**Efeito da administração do Fitoterápico e Praziquantel sobre ovos de *S. mansoni* em tecido mesentérico de camundongos Balb/c**

Média ± SEM		
<b>Grupos</b>	<b>Ovo/lâmina</b>	<b>Redução (%)</b>
<b>Controle Positivo</b>	123.8 ± 31.2	-
<b>Mentha 15</b>	95.2 ± 13.8	23.1
<b>Mentha 60</b>	72.6 ± 16.9	41.4
<b>PZQ</b>	26.4 ± 5.1 <sup>°</sup>	78.7
<b>Cremophor</b>	28.4 ± 7.1 <sup>°</sup>	77.1

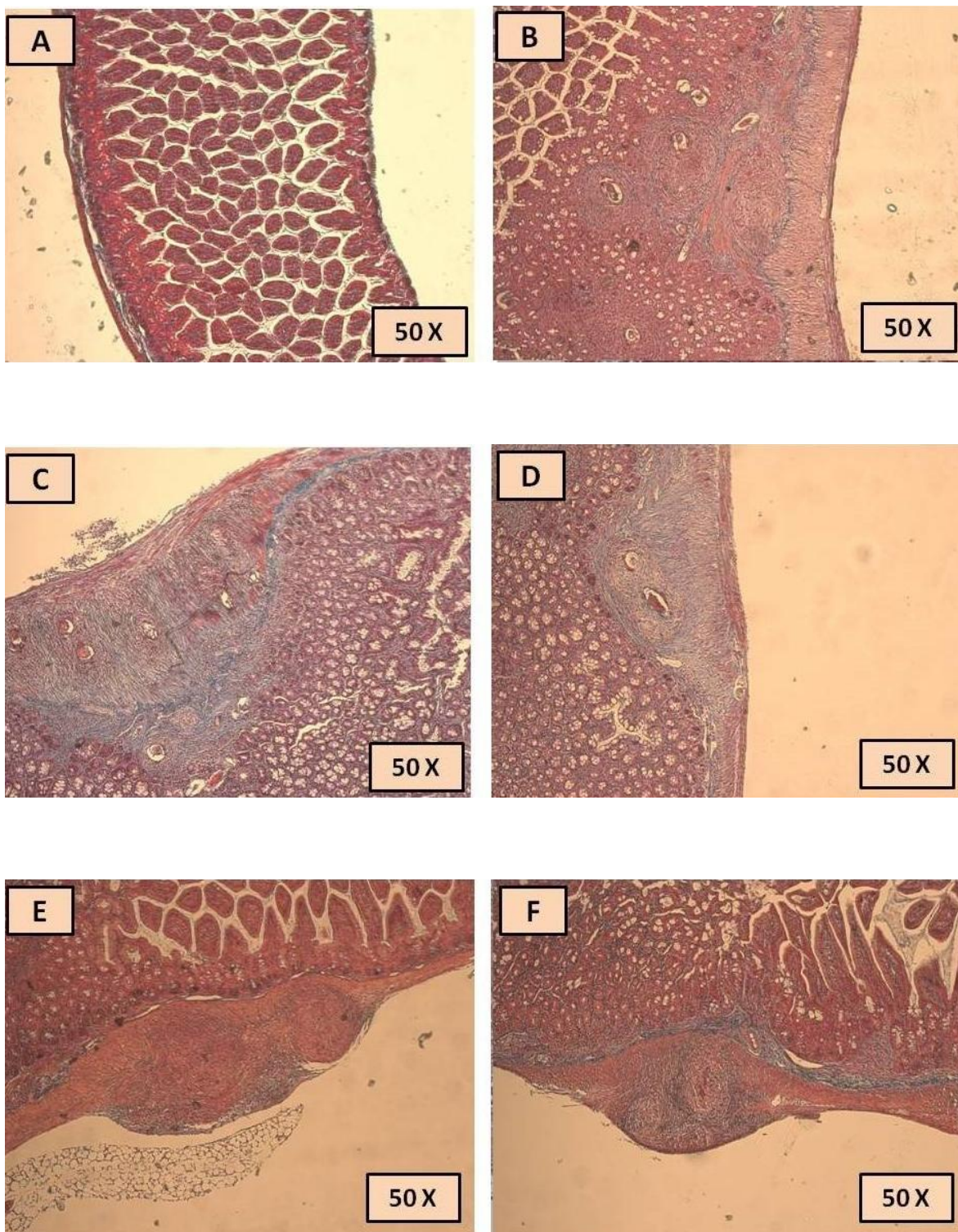
Os dados representam a média ± SEM. A leitura foi realizada em cortes histológicos corados com HE. Foi realizada uma lâmina por animal (n=5). Os órgãos foram removidos 61 dias após a infecção. <sup>°</sup> p<0,05, <sup>°°</sup> p<0,01, <sup>°°°</sup> p<0,001, representa diferença significativa dos grupos PZQ e Cremophor quando comparado ao Controle Positivo. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey.



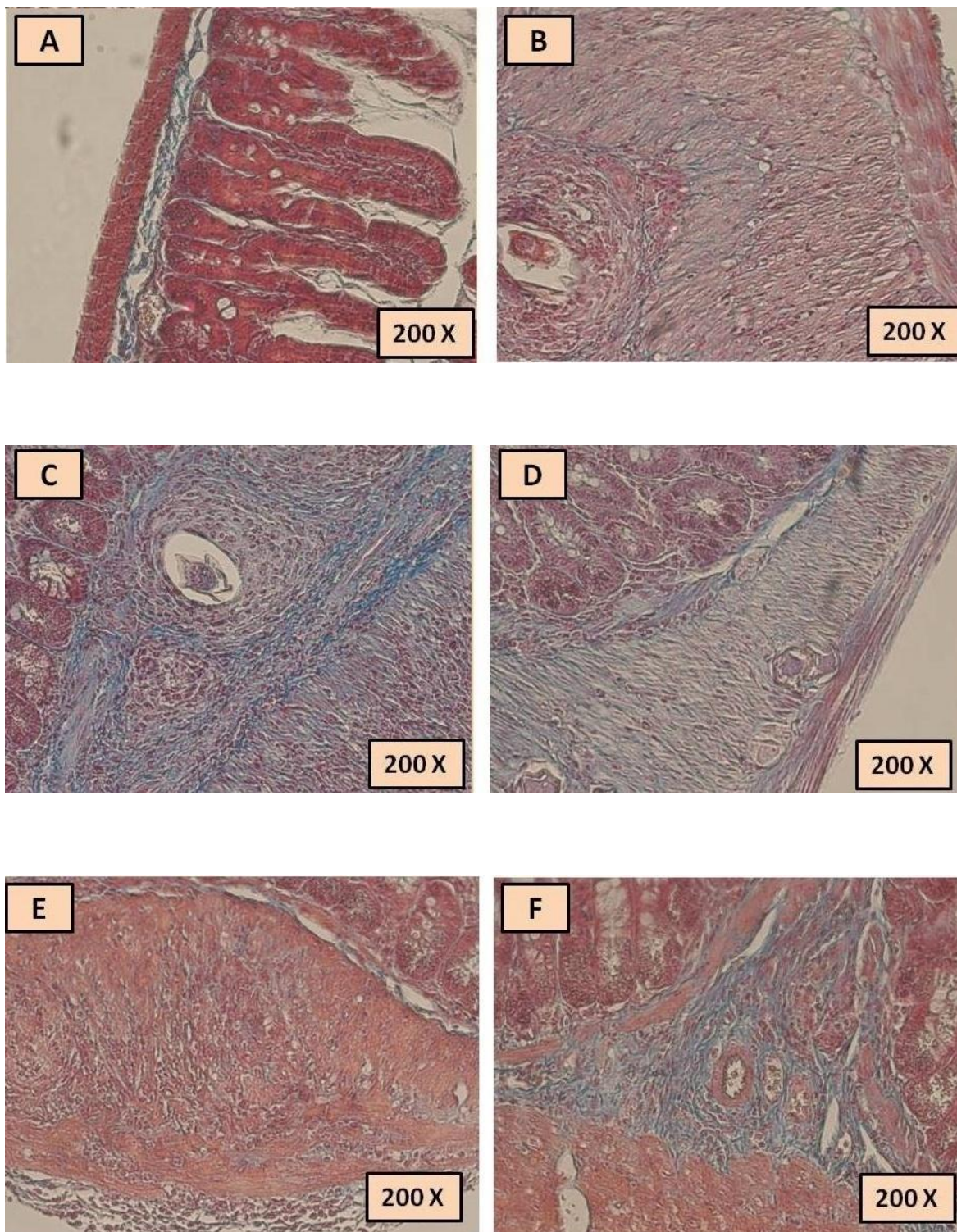
**Figura 25. Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com HE (50x). Análise morfológica de cortes histológicos de intestino 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração HE. Aumento de 50x.**



**Figura 26. Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com HE (200x).** Análise morfológica de cortes histológicos de intestino 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração HE. Aumento de 200X.



**Figura 27. Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com Tricrômico de Gomori (50x). Análise morfológica de cortes histológicos de intestino 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração de Gomori. Aumento de 50x.**



**Figura 28.** Fotomicrografia de cortes histológicos mesentéricos de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* corados com Tricrômico de Gomori (200x). Análise morfológica de cortes histológicos de intestino 61 dias após a infecção com *S. mansoni* nos animais dos grupos Controle Negativo (A), Controle Positivo (B), Mentha 15 (C), Mentha 60 (D), PZQ (E) e Cremophor (F). Coloração de Gomori. Aumento de 200x.

#### 4.6. Análise de dano de DNA (Ensaio Cometa)

Após a recuperação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, pela técnica de perfusão do sistema porta-hepático, os vermes foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e conservados a -80°C. Parte dos vermes recuperados dos animais não submetidos a nenhum tratamento (animais do grupo Controle Positivo), foi deixada 24 horas sob iluminação UV em HCl 1 M para realização do Controle Positivo de Dano. A utilização do HCl 1M foi necessária para danificar o tegumento espesso dos vermes e favorecer a ação da luz UV sobre as células.

Os Cometas foram analisados através do *software CaspLab 1.2.3b.2*, na qual foram verificadas diversas características desses cometas: Comprimento da Cauda (µm), Porcentagem do DNA da cauda e o Momento de cauda (Unid) ou “*Tail Moment*”. Os resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  (Figura 29).

Os resultados mostraram que a maneira de indução de dano ao DNA utilizado foi adequada ao modelo experimental, mostrando significativamente dano no DNA do grupo Controle Positivo quando comparado ao grupo Controle Negativo em todas as análises (comprimento da cauda, DNA da Cauda e Momento da Cauda).

Os grupos Controle Negativo, Mentha 15 e Mentha 60 não apresentaram alteração significativa entre eles, deixando clara a ausência de danos provocada por ambos os tratamentos testados (Mentha 15 e Mentha 60). Os cometas desses grupos apresentaram mínima porcentagem de DNA de cauda, mostrando ausência de danos no DNA (Figura 30).

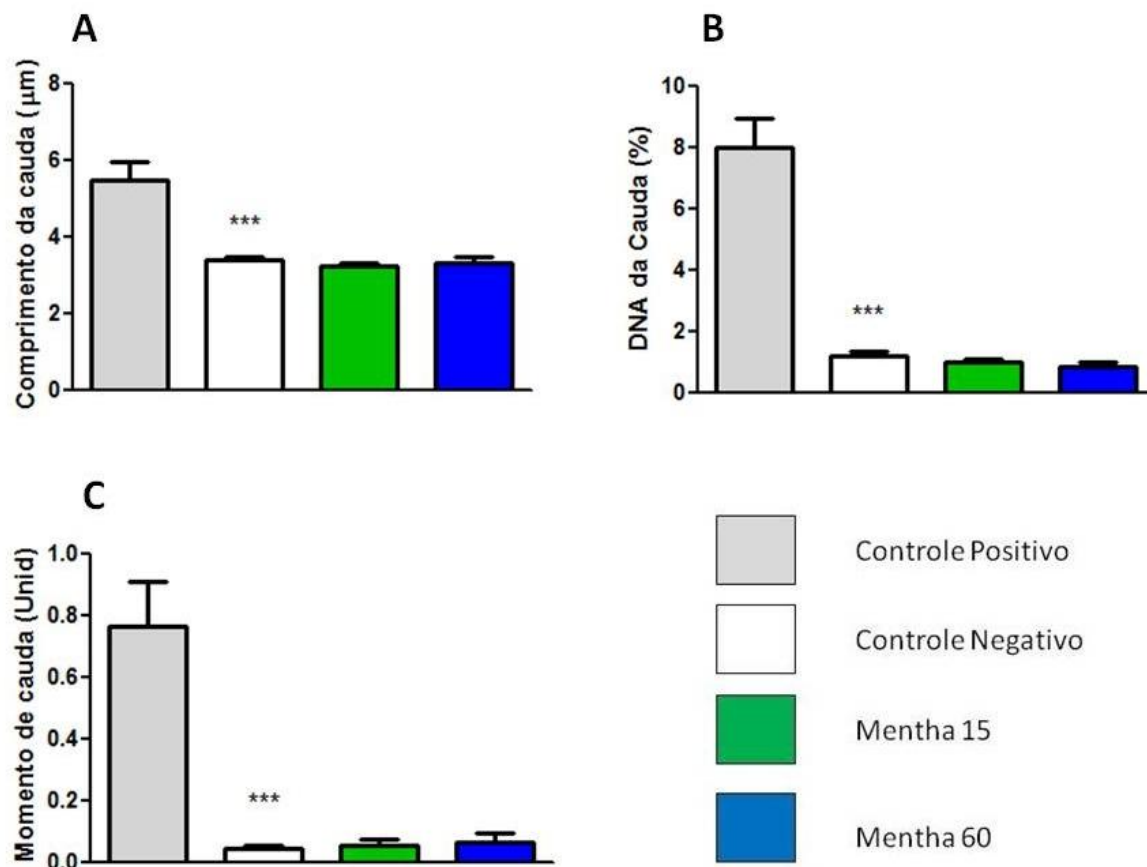
O Momento da cauda ou “*Tail Moment*” é definido como o produto do comprimento da cauda e a fração do DNA total da cauda expressas em Unidades, como segue:

$$\text{Momento da cauda} = \text{Comprimento da cauda} \times \% \text{ DNA da cauda}$$

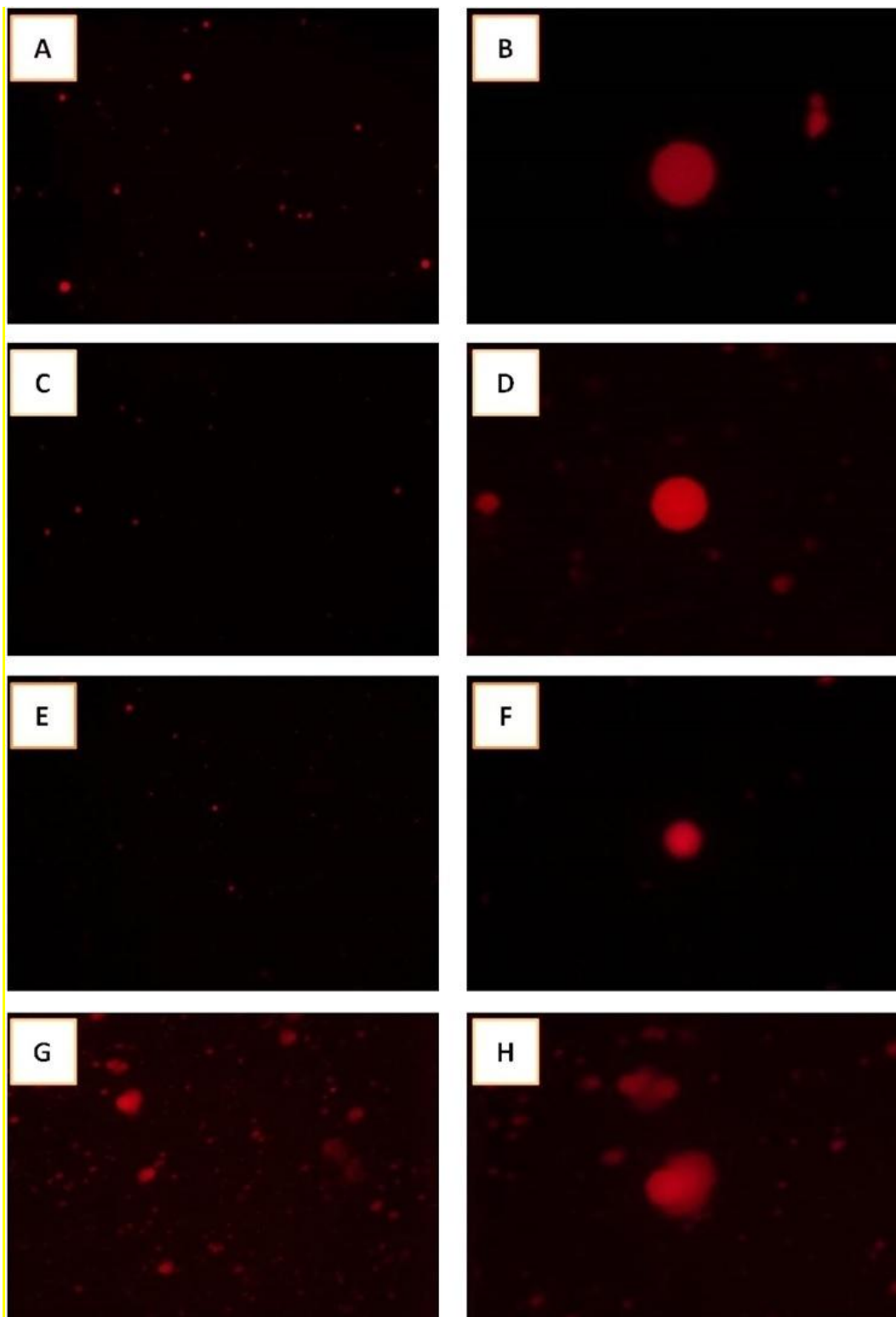
(El-Sayed, Aly, 2014).

O tratamento com 50 mg/kg do fitoterápico durante 15 ou 60 dias não causou nenhum dano ao DNA de acordo com as nossas análises, sugerindo que este fitoterápico não possui

efeito genotóxico para células de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* neste modelo experimental.



**Figura 29. Análise do dano de DNA de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* pela técnica de Ensaio Cometa.** (A) Comprimento da cauda em µm, (B) Porcentagem de DNA da cauda e (C) Momento da cauda ou “tail moment” em Unidades. Os resultados são expressos como a média ± SEM. A análise foi realizada utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA e pós-teste pelo Método de Tukey e considerada significativa quando  $p < 0,05$ . \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , representa diferença significativa entre o grupo Controle Negativo quando comparado ao grupo Controle Positivo. Os grupos Mentha 15 e Mentha 60 não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo Controle Negativo.



**Figura 30. DNA nuclear de células de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Ensaio Cometa).** (A e B) Controle Negativo (ausência de danos); (C e D) Mentha 15, grupo tratado durante 15 dias com 50 mg/kg do fitoterápico; (E e F) Mentha 60, grupo tratado durante 60 dias com 50 mg/kg do fitoterápico; (G e H) Controle Positivo, 24 horas no UV + HCl 1M.



## 5. DISCUSSÃO

Relatos de possíveis linhagens de *Schistosoma mansoni* com perda de sensibilidade vinda de países africanos, Senegal (GRYSEELS *et al*, 2011) e Egito (ISMAIL *et al*, 1999), geraram preocupação no campo científico, já que o Praziquantel é o único medicamento recomendando pela OMS para o tratamento de infecções causadas por espécies de *Schistosoma*.

Plantas naturais têm sido utilizadas pelos seres humanos há muitos anos para tratamento de doenças, sendo a medicina tradicional chinesa um dos mais importantes exemplos de eficiência desses produtos. A complexidade, diversidade química e propriedades biológicas de produtos naturais levaram a pesquisas e descobertas de novas drogas. No Brasil, de 100.000 espécies de plantas catalogadas, apenas 8% possui seus componentes químicos conhecidos e somente 1.100 espécies tem sido estudada para uso terapêutico (CASTRO *et al*, 2013). Dessa forma essa área de estudo se tornou uma área muito atrativa e com um grande potencial na busca por novos compostos que contribua com a terapêutica de doenças infecciosas. Na África do Sul, país que possui uma elevada taxa de infecção por helmintos, devido principalmente por deficiência sanitária e má-nutrição, já identificou mais de 115 espécies de plantas com potencial anti-helmíntico (AREMU, FINNIE, STADEN, 2012).

Uma diversidade enorme de plantas tem sido testada contra espécies patogênicas de *Schistosoma* ao redor do mundo. A artemisinina, produto extraído das folhas da *Artemisia annua*, utilizado atualmente para controle da malária no mundo, conseguiu reduzir o número de vermes fêmeas e negatar a liberação de ovos (LESCANO *et al*, 2004). Outro exemplo é a curcumina, composto fenólico isolado de rizomas da *Curcumin longa*, muito utilizado como tempero e corante alimentar. Sugere-se que este composto possui um potencial terapêutico no tratamento ou prevenção dos problemas causados pela infecção com *Schistosoma mansoni* (ALLAM, 2009). Estudo realizado com alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*) demonstrou que ambos foram eficazes na diminuição da carga parasitária de *S. mansoni* em modelo murino em 73% e 66%, respectivamente (MANTAWY, ALI, RIZK, 2011). Recentemente, nosso grupo demonstrou através do trabalho de Dejeni e colaboradores (2014) que, o extrato etanólico de *Mentha piperita* L. possui propriedades antiparasitárias e imunomodulatórias durante a infecção experimental por *S. mansoni*, e que foi capaz de modular significativamente o recrutamento celular, além de outras moléculas imunológicas envolvidas nesse processo, sugerindo um forte efeito anti-inflamatório no

modelo da esquistossomose murina. Perante isso, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o potencial anti-schistosomal de dois componentes importantes extraídos das folhas da *Mentha piperita* L. no modelo da esquistossomose mansônica experimental.

A *Mentha piperita* L., popularmente conhecida como hortelã-pimenta, é uma das plantas mais utilizadas pelo homem por possuir diversas propriedades: antiséptico, estimulante, espasmódico, antifúngico, antibacteriano, antiinflamatório e vermífugo (NARANJO *et al*, 2006). Os componentes medicinais da *M. piperita* L. podem ser encontrados em todas as partes da planta, incluindo folhas e flores. Possui uma ampla variedade de componentes, na qual se destacam o mentol (29-48%), a mentona (20-31%), mentofurano (6,8%) e acetato de metila (3-10%), que representam aproximadamente 90% de todo o EO, além de outros componentes farmacologicamente ativos como ácido caféico, flavonoides e taninos (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011). Sendo assim, nosso trabalho propôs analisar os efeitos antiparasitário e imunológico de um fitoterápico comercial de uso humano, composto de mentol e mentona extraído de folhas de *Mentha piperita* L., em um modelo experimental de esquistossomose mansônica murina. O fitoterápico testado possui concentrações de mentol e mentona conhecidas, importante para uma melhor avaliação da atividade destes compostos na infecção por *S. mansoni*, já que esses componentes podem ser variáveis na erva dependendo do clima, tipo de solo e formas de plantio e colheita (SAHARKHIZ *et al*, 2012).

*Mentha piperita* L. já teve seus efeitos anti-parasitários demonstrados. Vidal *et al*, 2007, mostrou efeitos tóxicos sobre trofozoítos de *Giardia lamblia*, indicando uma potencial terapia no tratamento da giardíase. O extrato de *Mentha piperita* L., em concentrações maiores de 1000 µg/mL, foi capaz de promover a separação de casais e diminuir a atividade motora do tegumento de *S. mansoni in vitro*, como já foi demonstrado por nosso grupo (CORREIA *et al*, 2010). Em nosso laboratório, camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* linhagem LE e tratados durante 49 dias com extrato bruto de *Mentha piperita* L. mostraram redução de ovos eliminados em mais de 50%, além de reduzir 35,2% o número de vermes adultos recuperados por perfusão (DEJANI *et al*, 2014). Em nosso experimento, os animais dos grupos tratados com 50 mg/kg do fitoterápico composto por mentol e mentona, Mentha 15 e Mentha 60, apresentaram uma pequena redução do número de ovos eliminados, 28,4% e 8,4% respectivamente, quando comparado ao Controle Positivo. O número de vermes adultos recuperados não mostrou diferença significativa entre os grupos tratados e o Controle Positivo. Esses resultados ficaram abaixo daqueles apresentados por

Dejani *et al*, 2014, sugerindo que outros componentes ativos presentes nos extratos e EO da *Mentha piperita* L. podem estar atuando como coadjuvantes ou como principal componente ativo contra *S. mansoni*. Alta concentração de mentol associado com fenóis ou flavonoides é dita possuir atividade antibacteriana (SINGH, SHUSHNI, BELKHEIR, 2011). Porém, foi demonstrado que o EO contendo apenas 3,6% de mentol da *Mentha piperita* L. apresenta efeito antimicrobiano, deixando claro que outros componentes presentes no óleo também contribuem para esta atividade (YADEGARINIA *et al*, 2006). Outra diferença é que a linhagem de *Schistosoma mansoni* utilizada em nosso estudo (BH) difere daquela utilizada por Dejani e colaboradores (2014) (LE), mais um motivo talvez que tenha favorecido a divergência desses resultados.

A formação do granuloma é mediado por linfócitos ThCD4<sup>+</sup> anti-antígeno de ovo. As células ThCD4<sup>+</sup> expressam dois subgrupos separados por meio de secreção de citocinas e propriedades funcionais: células Th1, que produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral e estão associados com resposta mediada por célula e as células Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e estão associadas com a produção de anticorpos por linfócitos B (STADECKER, HERNANDEZ, 1998). Camundongos deficientes em células ThCD4<sup>+</sup> falham na montagem de uma resposta granulomatosa efetiva (WILSON *et al*, 2007). Em uma infecção natural, a resposta ocorre sequencialmente, tal que a resposta Th1 é diminuída (*down-regulation*) e a resposta Th2 é elevada em aproximadamente 8 semanas após a infecção (STAVITSKY, 2004). Citocinas específicas, em particular IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ , tem sido implicadas na regulação da resposta granulomatosa da esquistossomose (KING, XIANLI, STAVITSKY, 2001). Formas severas da doença estão associadas com o perfil de citocinas do tipo Th1, enquanto o perfil Th2 está correlacionado com a redução da patologia e um curso mais benigno da doença (STADECKER, HERNANDEZ, 1998). Em nosso estudo, os camundongos foram eutanasiados oito semanas após a infecção (61 dias), ou seja, no pico da liberação de citocinas de padrão Th2, como IL-4 e IL-10, quantificadas neste trabalho. Além dessas, foi realizada a quantificação de IFN- $\gamma$ , citocina com padrão de resposta Th1 (dados não mostrados).

A IL-4 é uma importante citocina para a iniciação da resposta inflamatória de padrão Th2 na esquistossomose (SILVEIRA-LEMOS, 2008). A depleção de resposta Th2, particularmente IL-4, resulta em dano tecidual e mortalidade do hospedeiro devido a resposta Th1 pró-inflamatória. Portanto, resposta Th2 também exibe uma função protetora ao hospedeiro e minimiza o dano global da patologia do hospedeiro (COLLEY, SECOR, 2014).

Nosso trabalho mostrou que o grupo tratado durante 15 dias com o fitoterápico (Mentha 15) não exibiu mudança significativa quando comparado ao nosso Controle Positivo (Figura 20). Isso corrobora com os resultados demonstrados pela análise histológica, na qual o tratamento com 50mg/kg do fitoterápico não diminuiu o número de ovos presentes no tecido hepático (Tabela 2), sugerindo que este tratamento não impediu a deposição de ovos no tecido hepático e não alterou o perfil de resposta inflamatória neste modelo. Uma situação diferente foi vista no grupo tratado durante 60 dias com o fitoterápico (Mentha 60), na qual apresentou concentrações bem diminuídas de IL-4 (Figura 20). Esse resultado corrobora com os achados histopatológicos, já que foi observada diminuição de ovos nos tecidos hepáticos e mesentéricos, além de diminuição da formação de granuloma hepático (Tabela 3), fato último induzido por resposta de padrão Th2. Esse resultado sugere que a diminuição da deposição dos ovos em ambos os tecidos tenham contribuído para a diminuição da secreção de IL-4 no plasma. Entretanto, os animais tratados com PZQ tiveram reduções ainda menores no quesito deposição de ovos e formação de granulomas nos tecidos, porém não apresentou uma queda tão acentuada como o grupo Mentha 60. Isso sugere que o fitoterápico possui uma ação imunomoduladora que reduz o padrão de resposta Th2, quando administrada por longo período de tempo neste modelo experimental.

A IL-10 pode ter uma função anti-inflamatória por inibir a função de células acessórias, resultando em diminuição de citocinas inflamatórias, expressão de moléculas coestimulatórias e estimulação de linfócitos T (STADECKER, HERNANDEZ, 1998). A baixa produção de IL-10 está associada com o alto risco de fibrose derivado de infecção por *S. mansoni*. Sendo assim, a IL-10 pode reduzir a patologia aguda da esquistossomose, regulando a resposta imunológica e controlando a morbidade em pacientes crônicos (SILVEIRA-LEMONS, 2008). Macrófagos ativados alternativamente e IL-10 são parte de um *feedback* regulatório da resposta Th2 que limita a inflamação granulomatosa inicial (COLLEY, SECOR, 2014). A análise de IL-10, citocina anti-inflamatória no modelo de esquistossomose, mostrou que o grupo Mentha 15 não alterou a concentração em comparação ao nosso Controle Positivo (Figura 20). Já o grupo Mentha 60, apresentou uma diminuição significativa quando comparado ao Controle Positivo (62%) (Figura 20), corroborando com os resultados observados com IL-4, sugerindo que o tratamento prolongado com o fitoterápico composto por mentol e mentona pode possuir uma atividade imunomoduladora na esquistossomose mansônica murina experimental.

Dejani e colaboradores (2014) mostraram efeito inverso após tratamento durante 49 dias com extrato etanólico de *Mentha piperita* L. com aumento significativo nos níveis de IL-10 quando comparado aos níveis daqueles infectados e não tratados. Com isso, confirma ainda mais a existência de possíveis componentes, presentes no extrato etanólico e ausentes no fitoterápico, que influenciam na resposta imunológica neste modelo experimental murino de esquistossomose mansônica.

Camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  também exibem uma redução no tamanho do granuloma e parece favorecer a transição para uma fase crônica mais rapidamente, sugerindo que o IFN- $\gamma$  também contribui para a formação do granuloma. Ao passo que o IFN- $\gamma$  tem mostrado efeito antifibrótico em outros modelos experimentais, o excesso dele também pode causar uma severa patologia hepática na esquistossomose (WILSON *et al*, 2007). A análise de IFN- $\gamma$  pela técnica de ELISA não mostrou detecção desta citocina em nenhum grupo analisado (dados não mostrados).

A análise de células mononucleares sanguíneas revelou que os animais tratados durante 60 dias apresentaram o menor nível dessas células quando comparado ao Controle positivo. Com isso podemos sugerir que o tratamento promoveu uma diminuição da ativação de linfócitos, ocasionando baixos níveis dessas células em circulação e baixa produção de citocinas. Os linfócitos ThCD4<sup>+</sup> correspondem a 50% das células secretoras de antígenos em uma reação granulomatosa (KING, XIANLI, STAVITSKY, 2001). Os animais tratados apenas 15 dias, mostraram uma diminuição significativa nas células mononucleares sanguíneas em relação ao Controle Positivo, da mesma forma que os animais tratados com PZQ, porém essa diminuição não alterou o padrão de resposta inflamatória.

A fase crônica da esquistossomose está fortemente relacionada com a localização de vermes adultos e ovos que ficam retidos nos tecidos. Os ovos aprisionados nos tecidos secretam enzimas proteolíticas induzindo a mobilização de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, dado o nome de reação granulomatosa. (GRYSEELS *et al.*, 2006). O fígado é o principal órgão afetado pelo acúmulo de ovos, pois após a liberação pelas fêmeas adultas, esses ovos são carregados pelo fluxo sanguíneo e acabam retidos nos sinusóides hepáticos. Os ovos presos provocam as reações granulomatosas que se acumulam levando a uma progressiva fibrose nos espaços periportais, bloqueando a circulação pre-sinusoidal e conduzindo a hipertensão portal, a circulação colateral, ascite, hepatomegalia e varizes gastrointestinais. A fibrose hepática, portanto, é causada pelo intenso acúmulo de

fibras de colágeno no fígado, devido à resposta cicatricial aos danos causados (GRYSEELS *et al.*, 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Tem sido postulado que os eosinófilos exibem um importante papel protetor na resposta imune na infecção por *S. mansoni*, com aumento do número e da atividade dessas células, que pode contribuir para o papel dos eosinófilos durante a infecção. Além disso, os eosinófilos são também uma grande fonte de produção de citocinas, fatores de crescimento e capazes de estimular a proliferação de fibroblastos e favorecendo a síntese de colágeno. (SILVEIRA-LEMOS, 2008). Em nosso estudo, foi possível observar uma diminuição de 29,4% no número de eosinófilos sanguíneos/mm<sup>3</sup> do grupo Mentha 15 em relação ao Controle Positivo (Figura 18D). Além disso, o grupo tratado por 60 dias (Mentha 60) reduziu 84,91%, o nível dessas células (Figura 18D). Esses dados estão corroborando com os resultados apresentados pelas citocinas e análise histológica, reforçando ainda mais uma ação imunomoduladora do mentol e da mentona quando utilizado por tempo prolongado. Uma baixa produção de IL-4 diminui a resposta inflamatória de padrão Th2, desfavorecendo a multiplicação e atividade dos eosinófilos, estimulado principalmente pela IL-5 (SWARTZ *et al.*, 2006).

Não há na literatura trabalhos que já tenham avaliado o potencial genotóxico da *Mentha piperita* L. sobre células de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Galloway (2000) sugere que óleos essenciais da *Mentha* não possuem efeito genotóxico e nem carcinogênico *in vivo* para células de mamíferos, no entanto não foram encontrados trabalhos que discutissem esses resultados em parasitas. Em nosso trabalho, analisamos o efeito genotóxico do fitoterápico, testado através do Ensaio Cometa, em células de vermes adultos de *S. mansoni* recuperados por perfusão após os diferentes tratamentos *in vivo*. A técnica de Ensaio Cometa consegue avaliar danos em todos os tipos celulares com alta sensibilidade, requerendo uma pequena quantidade de células, em pouco tempo e baixo custo (WIDZIEWCZ, 2012). Esta técnica é capaz de detectar quebras de fita simples ou dupla e sítios de reparo incompleto em células de organismos eucariotos (EL-SAYED, ALY, 2014). Nosso trabalho demonstrou que os vermes recuperados de ambos os grupos tratados com 50mg/kg do fitoterápico composto por mentol e mentona, Mentha 15 e Mentha 60, não apresentaram danos no DNA (Figuras 29 e 30), sugerindo que o mentol e a mentona não possuem a capacidade de ocasionar quebras de fita simples ou duplas ou impedir a reparação do DNA do *S. mansoni*, podendo ser considerado não genotóxico o *Schistosoma mansoni*

neste modelo experimental. No entanto, outros componentes do parasita podem estar sendo modulados, que não foram detectados pela técnica utilizada.

Assim, todos os resultados apresentados sugerem que, o tratamento com o fitoterápico (composto por mentol e mentona) por tempo prolongado, preparado a partir de folhas da *Mentha piperita* L., possui uma ação imunomoduladora e anti-inflamatória no modelo da esquistossomose mansônica murina, podendo contribuir para a diminuição dos efeitos patológicos ocasionados pela infecção por *S. mansoni* e controlar a fisiopatogênese da infecção nesse modelo.

## 5. CONCLUSÕES

- O fitoterápico composto por mentol (30-55%) e mentona (14-32%), extraídos das folhas de *Mentha piperita* L. apresentam efeitos imunomoduladores e antiparasitários em modelo de esquistossomose murina experimental.
- O efeito imunomodulador do fitoterápico composto por mentol e mentona diminui os níveis plasmáticos de IL-4 e IL-10, de forma indireta, modulando negativamente os eosinófilos no sangue de camundongos quando utilizado por tempo prolongado.
- O efeito antiparasitário do tratamento com mentol e mentona é sugerido devido ao tratamento prolongado com o fitoterápico reduzir o número de ovos eliminados nas fezes, fígado e intestino de camundongos, além de reduzir o número de granulomas hepático.
- Sugere-se que o mentol e a mentona são os principais componentes da *Mentha piperita* L. atuantes como antiparasitário, porém outras substâncias presentes no extrato bruto desta planta podem apresentar funções ainda desconhecidas para o controle da esquistossomose murina experimental.
- O fitoterápico, composto por mentol e mentona, não possui efeito genotóxico sobre células de *Schistosoma mansoni* avaliado pelo Ensaio Cometa, neste modelo de esquistossomose murina experimental.



## 6. REFERÊNCIAS

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, supl.I, p.145-148, 2006.

ALLAM, G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. **Immunobiology**, v. 214, p.712-727, 2009.

AREMU, A.O.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Potential of South African medicinal plants used as anthelmintics: their efficacy, safety concerns and reappraisal of current screening methods. **South African Journal of Botany**, v.82, p.134-150, 2012.

AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. The Comet Assay: A Sensitive and Qualitative Method for Analysis of DNA Damage. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2011. Disponível em: <<http://DOI: 10.1002/9780470027318.a9192>>. Acesso em mar.2014.

BERRIMAN M. *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v.460, p.352-358, 2009.

BRANDÃO, D.F. *et al.* Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.1, p.54-57, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases**. Brasília/DF, 2013.

BRASIL: Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes Técnicas**. 4ª Edição, Brasília/DF, 2014.

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.

CHAI, J. Y. PRAZIQUANTEL TREATMENT IN TREMATODE AND CESTODE INFECTIONS: An Update. **Infect Chemotherapy**, v.45, n.1, p.32-43, 2013.

CHEEVER, A.W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bulletin of World Health Organization**, v.39 p.328-331, 1968.

CHEEVER, A.W. *et al.* The role of cytokines in the pathogenesis of hepatic granulomatous disease in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, Suppl. IV, p. 81–85, 1992.

CHIARAMONTE, M. G. *et al.* An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**. v.104, p.777-785, 1999.

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

COLLEY, D.G.; SECOR, W.E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 347-357, 2014.

CORREIA, R. O. *et al.* Atividade esquistomissida da *Mentha piperita* L. contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, *in vitro*. **Revista Saúde**, v. 4 (Esp1), 2010.

COUTO, J.L.A. *et al.* Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v.41, n.4, p.390-393, 2008.

CUSHLEY W.; KUSEL J.R. Interaction of the plant toxin ricin with different life cycle stages of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 24, p. 67-71, 1987.

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** (2014).Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio>.> Acesso em: mar. 2014.

DUNNE, D.W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 5, p. 420-426, 2005.

DUVALL, R.H.; DEWITT, W.B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. 4, p. 483-6, 1967.

EI-SAYED, N.M.; ALY, E.M. Toxoplasma gondii infection can induce retinal DNA damage: an experimental study. **International Journal of Ophthalmology**. v.7, n. 3, p. 431-436, 2014.

ESPÍRITO-SANTO, M.C.C *et al.* Two sequential PCR amplification for detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples with low parasite load. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.54, n 5, p.245-248, 2012.

FALCÃO, P.L. *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 447-454, 1998.

FÉLIX-SILVA, J *et al.* Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinas**, v.14, n.3, p.548-555, 2012.

FONSECA C.T. *et al.* Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 63-6, 2004.

GALLOWAY, S.M. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 191–201, 2000.

GRAY, D.J. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, v. 342, p. 1-11, 2011.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, p.1106-1118, 2006.

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.864–73, 2001.

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

HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal

immunopathology in murine schistosomiasis. **The Journal of Immunology.**, v. 15, n. 164, v.12, p. 6406-16, 2000.

INOBAYA, M.T, *et al.* Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Journal of Research and Reports in Tropical Medicine**, v.5 p.65-75, 2014.

ISMAIL, M, *et al.* Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicina and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932–935, 1999.

JACOBS, W. *et al.* Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation in vivo. Stereological analysis and immuno-phenotyping of extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and chemokines. **The American Journal of Pathology**, v.150, p. 2033-2045, 1997.

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.

KHALIL, R.M.A. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in mice augments the capacity for interleukin 3 (IL-3) and IL-9 production and concurrently enlarges progenitor pools for mast cells and granulocytes-macrophages. **Infection and Immunity**. v.64, n.12, p.4960-4966, 1996.

KING, C.L.; XIANLI, J.; STAVITSKY, A.B. Murine schistosomiasis mansoni: coordinate cytokine regulation and differences in cellular immune responses of granuloma cells and splenocytes to endogenous and exogenous schistosome egg antigens. **Parasite Immunology**, v. 23, p.607-615, 2001.

KROEGEL C. *et al.* Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leukocyte. **Eur. Respir. J**, v.7. p. 743-760, 1994.

LA FLAMME, A.C.; PATTON, E.A.; PEARCE, E.J. Role of gamma interferon in the pathogenesis of severe schistosomiasis in interleukin-4-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7445-7452, 2001.

LANGLEY, J.G.; BOROS, D.L. T-Lymphocyte responsiveness in murine schistosomiasis mansoni is dependent upon the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1,

lymphocyte function-associated antigen-1, and very late antigen-4. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3980-3986, 1995.

LESCANO, S.Z. *et al.* Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.1, p.71-75, 2004.

LIU, J *et al.* The effects of combined menthol and borneol on fluconazole permeation through the cornea ex vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 688, p. 1-5, 2012.

LIU, XJ *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity of 1-chloro-2-hydroxy-3-butene and 2 1-chloro-3-buten-2-one, two alternative metabolites of 1,3-butadiene. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 271, n.1, p.13-19, 2013.

MANTAWY, M.M.; ALI, H.F.; RIZK, M.Z. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.53, n.3, p.155.163, 2011.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n.2, p. 307-310, 1981.

NARANJO J. P, *et al.* Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v. 35, n.3, p. 1-4, 2006.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 19-23, 1952.

PALMEIRA, D.D.D. *et al.* Prevalência de infecção por *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43.n.3, p.313-317, 2010.

PARRA, J.C. *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: studies on *in vitro* granuloma modulation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, supl.V, p.79-81, 1992.

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

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 589-97, 1956.

RECIO, L. *et al.* Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus and comet assay protocol. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.35, n.2, p.149-162, 2010.

RIAD, N.H.A.; TAHA, H.A.; MAHMOUD Y.I. Effects of garlic on *Schistosoma mansoni* harbored in albino mice: Molecular characterization of the host and parasite. **Gene**, v.518, p.287-291, 2013.

ROSS, A.G.P. *et al.* Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, v.346, n.16, p.1212-1220, 2002.

SAHARKHIZ, M.J. *et al.* Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. **ISRN Pharmaceutics**, 2012.

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.

SHALABY, I.; GHERBAWY, Y.; BANAJA, A. Genetic diversity among *Schistosoma mansoni* population in the western region of Saudi Arabia. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n.1, p.90-101, 2011.

SILVEIRA-LEMOS. D. *et al.* Eosinophils activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta Tropica**, v.108, p.150-159, 2008.

SINGH, N.P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**. 2011. Disponível em:<<http://doi:10.1016/j.arabjc.2011.01.019>>, acesso em mar 2015.

STADECKER, M.J.; HERNANDEZ, H.J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, v.20, p.217-221, 1998.

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

STIBBE, W.; WEISE, M.; SEIDEL, D. Automated platelet count in thrombocytopenic patients: a comparison of methods. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 399-404, 1985.

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

TAHER, Y.A. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. **Libyan Journal Medicine**, 2012. Disponível em: < DOI: 10.3402/ljm.v7i0.16205 >, acesso em mar 2015.

VIDAL, F. *et al.* *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v.115, p.25-31, 2007.

WANG, W; WANG Li; LIANG, YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v.111, p.1871-1877, 2012.

WEBSTER, J.P. *et al.* Schistosome genomes: a wealth of information. **Trends in Parasitology**, 2010. Disponível em: < doi: 10.1016/j.pt.2009.12.006 >, acesso em: mar 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/info/en/>>. Acesso em: 25 fev. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Schistosomiasis. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/info/en/>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Schistosomiasis: new genetic blue print revealed 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/info/en/>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. 10 facts about schistosomiasis. Disponível em: < <http://www.who.int/features/factfiles/schistosomiasis/en/>>. Acesso em 27 jan. 2015

WIDZIEWICZ, K. *et al.* The comet assay for the evaluation of genotoxic potential of landfill leachate. **The Scientific World Journal**, 2012. Disponível em: < doi: 10.1100/2012/435239 >, acesso em 27 mar. 2015

WILSON M.S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.148-154, 2007.

WYNN, T.A. *et al.* Endogenous interleukin 12 (ID12) Regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically pmmunizes against egg pathology. **The Journal Experimental Medicine**, v.179, p.1551-1561, 1994.

YADEGARINIA, D. *et al.* Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v.67, p.1249-1255, 2006.

## ANEXO I





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**nº 034/2013**

Protocolo nº. 034/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Participação da Mentha piperita L. na expressão de genes no Schistosoma mansoni*", submetido pelo pesquisador *Mauricio Grecco Zaia*.

São Carlos, 11 de setembro de 2013.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais