



Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Escola de Farmácia - EFAR

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CiPharma

Laboratório de Doença de Chagas – LADOC



**“Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol”**

Mestranda: Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana

Co-Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Glenda Nicioli Silva

Fevereiro/2019

Ouro Preto – MG

**“Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol”**

**Aluno: Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen**

**Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana**

**Co-orientadora: Glenda Nicioli Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Diagnóstico, Vacinas e Terapêutica.

Fevereiro/2019

Ouro Preto – MG

T676a Torchelsen, Fernanda Karoline Vieira da Silva.  
Avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol [manuscrito] / Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen. - 2019.  
85f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Quimioterapia. 3. Medicamentos- Utilização. I. de Lana, Marta. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
ESCOLA DE FARMÁCIA



**LISTA DE PRESENÇA**

Sessão de defesa da 151ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 22 de fevereiro de 2019.

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta  
FIOCRUZ

  
Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão  
UFOP

Profa. Dra. Marta de Lana  
UFOP

## Agradecimentos

O mestrado foi uma experiência de tomar um projeto de pesquisa “nas mãos”, planejar, organizar, executar, analisar, ter muitas dúvidas, fazer muito *brainstorming*, e concluir que mais pesquisa é necessária! Aprendi muito e aprendi que ainda tenho muito mais a aprender!

Agradeço a todos que acompanharam e ajudaram de perto ou de longe, em especial aos meus pais pelo suporte e preocupação! Ao Marcos, que ouviu detalhes de experimentos, leu resumos, viu muitas fotos de lâminas e nem é da área rs! Obrigada pelo companheirismo e todo carinho!

Agradeço a minha orientadora, a Marta, pelo apoio e ensinamentos, pelas inúmeras correções e pela dedicação, mesmo aos fins de semana e feriados.

Meu muito obrigada aos meus colegas de laboratório, que me ouvem reclamar e comemorar e estão sempre prontos para ajudar! E aos meus alunos de iniciação científica Arthur e Thaila por todo auxílio e comprometimento!

Obrigada também a todos do CiPharma e NUPEB, que disponibilizam suas ideias, opiniões e equipamentos rs!

E a Deus, que esteve presente em tudo e todos do percurso, e que faz parte desse agradecimento antes mesmo de eu tê-lo escrito.

Obrigada!

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária endêmica na América Latina e encontrada em diversos países no mundo. Seu tratamento é feito com o benznidazol (BZ) e o nifurtimox (NF), ambos fármacos com baixa eficácia terapêutica na maioria dos pacientes em fase crônica tardia da DC, e que causam vários efeitos colaterais. A busca por novos fármacos para a DC é estimulada entre produtos naturais e em estratégias como associação de fármacos. A silibinina (SLB) é um composto natural capaz de inibir a proteína de efluxo (Pgp) nas membranas celulares, induzir a morte de microrganismos, além de possuir atividade anti-inflamatória. Ainda não há na literatura relato de sua atividade em *T. cruzi*. Neste trabalho foi avaliada a atividade *in vitro* e *in vivo* de SLB e de SLB associada a BZ (SLB+BZ) frente a cepa Y de *T. cruzi*. Foi realizado ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT em células VERO (24h), que revelou IC<sub>50</sub> de 250,22 µM para a SLB. A atividade tripanocida avaliada por método com resazurina em epimastigotas (24h) mostrou que a SLB 25 µM inibiu o crescimento dos parasitos. O ensaio em amastigotas revelou índice de seletividade de 3,13, além de mostrar a maior porcentagem de inibição (> 90%) quando a SLB foi usada na associação de SLB100+BZ10µM, em comparação com SLB (100; 25; 6,25 µM) ou BZ (10; 5; 2,5 µM) isolados. No ensaio *in vivo*, camundongos *Swiss* comprovadamente infectados IP com 10.000 tripomastigotas sanguíneos foram tratados por via oral por 20 dias consecutivos com SLB50, SLB150, SLB50+BZ25, SLB50+BZ50, SLB50+BZ100, SLB150+BZ25, SLB150+BZ50, SLB150+BZ100, BZ25, BZ50 e BZ100 mg/kg/dia. Os animais foram avaliados diariamente na fase aguda (parasitemia) e aos 90, 180 e 240 dias após tratamento por hemocultura, qPCR de eluato sanguíneo e sorologia (ELISA). Após a eutanásia, foram feitas, além das avaliações anteriores, a qPCR do tecido cardíaco. Os resultados *in vivo* demonstraram que a SLB em monoterapia não foi capaz de controlar a parasitemia e a mortalidade dos animais. As avaliações parasitológicas mostraram 100% de negatividade na maioria dos grupos de animais tratados com combinação de drogas ou doses menores de BZ, enquanto a sorologia foi positiva em todos os animais não sendo constatada cura pelo critério clássico. Entretanto verificamos que os grupos experimentais tratados com BZ em menores doses e que os tratados com BZ em menores doses quando associado a SLB apresentaram maior negatividade nos exames parasitológicos, porém sem diferenças significativas entre os demais grupos. Análise histopatológica cardíaca será feita para avaliar se houve redução da inflamação/fibrose entre os grupos tratados com a associação SLB+BZ *versus* BZ.

### Palavras chave:

doença de Chagas experimental, silibinina, benznidazol, associação de fármacos tratamento, *in vitro*, *in vivo*.

## ABSTRACT

Chagas' disease (CD) is an endemic parasitic disease in Latin America and found in many countries worldwide. Its usual treatment is with benznidazole (BZ) and nifurtimox (NF), both with low efficacy in most patients in the late chronic phase of infection and cause several side effects. The search for new drugs for CD is stimulated between natural products and strategies such as drug association are stimulated. Silibinin (SLB) is a natural compound able to inhibit the efflux of protein (Pgp) in cell membranes, induce death of microorganism's specie, and presents anti-inflammatory activity. There is no report of SLB activity in *T. cruzi* in the literature. In this work the *in vitro* and *in vivo* activity of SLB and SLB associated with BZ (SLB + BZ) were evaluated against an isolate of the *T. cruzi* strain Y. Cytotoxicity assay was performed by the MTT method in VERO cells (24h), which revealed an IC<sub>50</sub> of 250.22  $\mu$ M for SLB. The trypanocidal activity evaluated by resazurin method in epimastigotes (24h) showed that SLB 25  $\mu$ M significantly inhibited the parasites growth. The amastigote assay revealed a selectivity index of 3.13, in addition showed the higher percentage of inhibition (> 90%) when SLB was used in the association of SLB100 + BZ10  $\mu$ M, compared with SLB (100; 25; 6.25  $\mu$ M) or BZ (10; 5; 2.5  $\mu$ M) isolated. In the *in vivo* assay, *Swiss* mice intraperitoneally infected with 10,000 trypomastigotes were orally treated for 20 consecutive days with SLB50, SLB50 + BZ25, SLB50 + BZ50, SLB50 + BZ100, SLB150 + BZ25, SLB150 + BZ50, SLB150 + BZ100, BZ25, BZ50 and BZ100 mg/kg/day. During the acute phase the animals were evaluated daily (parasitemia) and at 90, 180 and 240 days after treatment by blood culture, blood eluate qPCR and serology (ELISA). After euthanasia, qPCR of cardiac tissue was performed in addition to previous evaluations. *In vivo* results demonstrated that SLB monotherapy was not able to control the parasitemia and mortality of the animals. The parasitological evaluations showed 100% of negativation in the majority of the groups of animals treated with association of drugs or with smaller doses of BZ, whereas the serology was positive in all animals and no cure was observed by the classic criterion. However, we verified that the experimental groups treated with BZ in lower doses and those treated with BZ in lower doses when associated with SLB presented higher negativation in the parasitological exams, but without significant differences between the other groups. Cardiac histopathological analysis will be performed to evaluate if there was reduction of inflammation/fibrosis between the groups treated with the SLB + BZ association *versus* BZ.

**Key words:** Experimental Chagas disease, silibinin, benznidazole, drug association, *in vitro*, *in vivo*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de uma lignana .....	27
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular de flavonóide.....	27
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular de silibinina .....	27
<b>Figura 4:</b> Estrutura química de silibinina .....	32
<b>Figura 5 :</b> Estrutura química do benznidazol.....	32
<b>Figura 6:</b> Delineamento experimental da avaliação da atividade citotóxica e anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> de silibinina, benznidazol e associação silibilina+benznidazol em diferentes concentrações <i>in vitro</i> utilizando células VERO e a cepa Y .....	34
<b>Figura 7:</b> Delineamento experimental da avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> de silibinina, benznidazol e associação silibilina+benznidazol em diferentes doses por via oral em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas, inoculados com a cepa Y .....	39
<b>Figura 8:</b> Porcentagens de viabilidade celular de células VERO após tratamento com Silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) no ensaio de MTT .....	45
<b>Figura 9:</b> Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) por ensaio com resarzurina.....	45
<b>Figura 11:</b> Curva de parasitemia média de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral durante 20 dias consecutivos na fase aguda da infecção.....	48
<b>Figura 12:</b> Gráficos de dispersão de absorbância relativos à sorologia convencional (ELISA) em amostras de soro de camundongos infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Índice de seletividade de silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) oriundos da relação da citotoxicidade (IC50%) e índice de inibição (IE50% da infecção de células VERO com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros derivados da curva de parasitemia de camundongos <i>Swiss</i> experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações, via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção .....	49
<b>Tabela 3:</b> Avaliação da hemocultura de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.....	51
<b>Tabela 4:</b> Avaliação de qPCR em sangue de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção .....	52
<b>Tabela 5:</b> Avaliação de qPCR em sangue de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção .....	54
<b>Tabela 6:</b> Sobrevida pós infecção de camundongos <i>Swiss</i> infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral durante 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção avaliados por 260 d.p.i.	55
<b>Tabela 7:</b> Resultado global da avaliação aos 240 dias pós-tratamento de camundongos infectados com cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral, 20 dias consecutivos, durante a fase aguda da infecção .	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sobre a curva
BENEFIT	"Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy"
BZ	Benznidazol
CCA-UFOP	Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CINT	Controle infectado e não tratado
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DC	Doença de Chagas
d.p.t.	Dias pós tratamento
DMSO	Dimetilsilfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPI	Dia pós infecção
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
DTU	"Discrept typing unit"
EDTA	Ácido etilenodietilnitritotetracético
ELISA	" <i>Enzime-linked immunosorbent assay</i> "
ESF	Exame de sangue a fresco
FDA	U.S. Food and Drug Administration
G	Gramma
HC	Hemocultura

IC <sub>50</sub>	concentração da substância ativa que reduz o número de células ou amastigotas em 50%
IE	Índice endocítico
IgG	Imunoglobulina da classe G
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de Seletividade
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LAFEPE	Laboratorio Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIT	"Liver infusion tryptose"
MTT	Solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
MS	Ministerio da Saúde
NF	Nifurtimox
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	Orto-fenileno-diamino
PAR	Parasitemia
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Período patente
PPP	Período pré-patente
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico

ROs	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SLB	Silibinina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TS	Tripomastigotas sanguíneos
TTM	Tratamento
V.O.	Via oral
WHO	"World Health Organization"

## SUMÁRIO

<b>1.0. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1. A DOENÇA DE CHAGAS .....	16
2.2 O PARASITO .....	18
2.2.1 <i>Ciclo de vida</i> .....	18
<b>2.3 QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS</b> .....	19
2.3.1. <i>Metabolismo do benznidazol</i> .....	22
2.3.2 <i>Resistência a fármacos: Importância das proteínas de efluxo</i> .....	23
<b>2.4 NOVAS ABORDAGENS NA QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS</b> .....	25
2.4.1. <i>Associação de Fármacos</i> .....	25
2.4.2. <i>Produtos naturais e o tratamento da doença de Chagas</i> .....	26
<b>3.0. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.0. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. OBJETIVO GERAL .....	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>5.0. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1. FÁRMACOS ESTUDADOS</b> .....	32
5.1.1. <i>Silibinina</i> .....	32
5.2 <i>Cepa de T.cruzi</i> .....	33
5.3. ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....	33
5.3.1. <i>Estudo da atividade citotóxica de silibinina e benznidazol por MTT (Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazol)</i> .....	33
5.3.2 <i>Estudo de atividade anti-Trypanosoma cruzi sobre formas epimastigotas</i> .	35
5.3.3 <i>Estudo da atividade anti-Trypanosoma cruzi sobre formas amastigotas</i> ....	36
5.4. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI- <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM MODELO MURINO .....	37
5.4.1. <i>Princípios éticos</i> .....	37
5.4.2 <i>Infecção e Tratamento dos animais</i> .....	38
5.5. AVALIAÇÕES PÓS-TRATAMENTO .....	40
5.5.1 <i>Avaliação Parasitológica</i> .....	40
5.5.1.3. <i>Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)</i> .....	40
5.5.2. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PELA ELISA .....	43
5.5.3. CRITÉRIO DE CURA .....	43
5.5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>6.0. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
6.1. RESULTADOS <i>IN VITRO</i> .....	45
6.1.1. ....	45
6.1.3. <i>Avaliação anti T-cruzi em formas amastigotas em células VERO</i> .....	46
6.2. TESTES <i>IN VIVO</i> .....	47
6.2.1. <i>Parasitemia e parâmetros derivados da curva de parasitemia</i> .....	48
6.2.3. <i>Avaliação molecular por qPCR em eluato de sangue</i> .....	51
6.2.4. <i>Sorologia</i> .....	52

6.2.5. Avaliação molecular por qPCR em tecido cardíaco.....	54
<b>7.0. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8.0. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>9.0. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>70</b>
<b>10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

## 1.0. INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas, como a doença de Chagas (DC), são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade nas regiões tropicais (RICHARD; WERBOVETZ, 2010; WHO, 2017). Atualmente, a DC é um desafio mundial devido à sua expansão para países não-endêmicos da América do Norte, Europa, Oceania e Ásia, uma consequência da migração de indivíduos infectados para esses países (SCHMUNIS e YADON, 2010). A DC é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, epidemiologicamente relevante e impactante em saúde pública em 21 países da América Latina. Existem apenas duas opções terapêuticas, Benznidazol (BZ) e Nifurtimox (NF), empregadas em seu tratamento e que lamentavelmente apresentam resultados insatisfatórios.

Dentre os muitos desafios a serem enfrentados em relação a DC estão a falta de terapias profiláticas e quimioterapia efetivas para pacientes crônicos tardios (COURA; DE CASTRO, 2002). A existência de populações do *T. cruzi* naturalmente resistentes aos fármacos atuais, associada aos baixos índices de cura observados na fase crônica, e considerando que ainda não há um fármaco ideal para o tratamento da DC mais de cem anos após sua descoberta, torna a busca de terapias para esta enfermidade contínua e necessária (COURA; DE CASTRO, 2002; GUEDES et al., 2006). Dentre as propostas de novas terapias há o redirecionamento de fármacos (BELLERA et al., 2015), a busca por novos fármacos entre os produtos naturais (APT, 2010) ou terapia combinada, em que se faz a associação de fármacos em estudo ao BZ e NF (COURA, 2009).

Dentre os produtos naturais, esse trabalho explorou a associação de BZ e silibinina (SLB). A SLB é um produto natural extraído das sementes da *Silybum marianum* da família Asteraceae, originária da Europa e Ásia, encontrada em todo o mundo. A SLB apresenta propriedades antifúngicas (SALEHI et al., 2011; YUN; LEE, 2017), anti-inflamatórias, anticancerígenas (GREENLEE et al., 2007), e antimicrobiana (DE OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, é atribuída à SLB a atividade inibidora da Glicoproteína P (ZHANG; MORRIS, 2003; LEE; CHOI, 2010), uma proteína transportadora de efluxo pertencente à grande família ABC, presente nas membranas celulares e responsável pelo efluxo de nutrientes, toxinas e também de fármacos, dentre eles o BZ. A propriedade de inibir a proteína de efluxo do principal fármaco existente para o tratamento da DC traz o potencial para uma redução na dose do BZ, pois esse seria menos eliminado e permaneceria por mais tempo na circulação sanguínea, possibilitando assim a redução de dose no tratamento da doença.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana foi descoberta em 1909 pelo médico e pesquisador Carlos Chagas. Trata-se de uma doença parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, cuja epidemiologia é afetada por fatores como a variedade de triatomíneos vetores e reservatórios (o que dificulta a completa erradicação do parasito circulante), má qualidade de habitação nas áreas endêmicas (frequentemente rurais), fase aguda comumente despercebida e subdiagnosticada (CANÇADO, 2002) com posterior instalação da fase crônica assintomática nos primeiros anos ou décadas, ou até mesmo por toda a vida do paciente (forma clínica indeterminada), além da falta de medidas profiláticas e quimioterapias mais efetivas (DURAN-REHBEIN et al., 2014) e existência de diversos outros mecanismos de infecção independentes dos triatomíneos vetores. Mesmo após 109 anos de sua descoberta, a DC é um dos principais problemas de saúde pública com mais de 8 milhões de pessoas afetadas pela doença, endêmica em 21 países da América Latina (WHO, 2017), e presente em diversos países de outros continentes além das Américas, tais como Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS; YADON, 2010; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014) nos quais a transmissão se dá por mecanismos independentes de vetor (SCHMUNIS, 2007). A DC configura-se como uma das 18 doenças tropicais negligenciadas e atualmente na América Latina os países Argentina, Brasil e México são os três com maior número de pessoas infectadas (WHO, 2010).

A transmissão natural da DC a humanos e animais se dá por insetos hematófagos da subfamília Triatominae, que após se alimentarem defecam próximo ao local da picada. Ao coçar a região, o indivíduo possibilita a entrada do protozoário *T. cruzi* pelo local da picada ou o leva passivamente aos olhos ou a mucosas dando início a infecção. A transmissão da DC também pode se dar por mecanismos não vetoriais como via oral, transfusão sanguínea e transmissão congênita, além de outros tais como transplantes e acidentes laboratoriais (DIAS, 2015).

A DC apresenta-se dividida em duas fases: aguda e a crônica. A **fase aguda** corresponde ao período logo após a infecção pelo *T. cruzi* com duração de cerca de 2-4 meses. Alguns sinais específicos denominados de "porta de entrada" podem ser

observados nesta fase da doença, que se inicia no local da picada do inseto cuja lesão recebe o nome chagoma de inoculação (MAZZA; FREIRE, 1940). Quando ocorre contaminação do olho por fezes com a forma infectante do parasito, ocorre edema e inflamação, fenômeno conhecido como sinal de Romana (ROMAÑA, 1935). Além dos sinais de "porta de entrada" da DC, manifestações típicas de infecção aguda generalizada observadas em qualquer processo infeccioso agudo também podem estar presentes, como febre, linfadenopatia, edema, hepatoesplenomegalia, linfocitose e outros. O mais comum é que a fase aguda seja oligosintomática ou assintomática (95%), passando despercebida ou não sendo diagnosticada, uma vez que a sintomatologia em geral dura poucos dias e desaparece espontaneamente (PRATA, 2001; RASSI, 2010) resultando em subnotificação das pessoas infectadas ou doentes. Uma importante característica da fase aguda é a ocorrência de parasitemia patente, ou seja, parasitos presentes na corrente sanguínea do indivíduo doente e encontrados com facilidade no exame de sangue a fresco (ESF). Além disso, há no soro do paciente a presença de anticorpos da classe IgM, além da classe IgG que pode ser detectada por toda a vida do paciente.

**A fase crônica** é o período que segue a fase aguda, passando por um período de transição (fase subaguda) no qual as manifestações clínicas da fase aguda vão desaparecendo gradualmente. Os casos que permanecem com algum sintoma após esta fase são raros e associados a fase aguda maligna e de mau prognóstico (PRATA, 2001 RASSI, 2010). A maioria dos pacientes (50 a 70%) passam por um longo período assintomático, que pode durar décadas ou até mesmo toda a vida do paciente, denominada **forma clínica indeterminada**.

A fase crônica é caracterizada por parasitemia subpatente, ou seja, negativa ao ESF, e presença de IgG, alvo do diagnóstico sorológico da infecção pelos métodos da sorologia convencional (ELISA, IFI e HAI). Com a evolução da doença de Chagas instalam-se quadros característicos da mesma, e a forma indeterminada pode evoluir para as formas clínicas cardíaca, digestiva (principalmente megaesôfago e/ou megacólon), ou mista (associação de manifestações cardíacas e gastrointestinais).

**A forma cardíaca** da DC é de destaque, pois no desenvolvimento da patologia o acometimento do coração traz complicações graves como congestão, arritmias, e o desenvolvimento de um quadro progressivo de insuficiência cardíaca. Na forma cardíaca, podem ser observadas desde leves alterações no eletrocardiograma (ECG), alta frequência

de arritmias, bradicardia, edema e até morte súbita (PRATA, 2001), um dos maiores traumas para a família dos pacientes.

A **forma intestinal** é caracterizada pela alteração de motilidade, secreção e absorção do trato gastrointestinal. São acometidos principalmente o esôfago e o cólon, caracterizando o megaesôfago e megacólon. Estes compartimentos do trato gastrointestinal aumentam o seu diâmetro, e as vezes seu comprimento (dolico cólon), o que torna suas paredes mais delgadas e distendidas (PRATA, 2001). A **forma mista** envolve a associação de manifestações cardíacas e gastrointestinais.

No Brasil predominam atualmente os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial, uma vez que o maior cuidado com os bancos de sangue extinguiu a contaminação por via transfusional (SILVEIRA; SILVA; PRATA, 2011).

## **2.2 O Parasito**

### **2.2.1 Ciclo de vida**

O agente etiológico da DC, o *T. cruzi*, é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (HOARE; WALLACE, 1966), parasita celular obrigatório e de ciclo biológico heteroxênico, incluindo assim hospedeiros vertebrados e invertebrados. O *T. cruzi* possui como característica marcante o cinetoplasto proeminente, estrutura que corresponde a uma condensação de DNA mitocondrial, denominado nDNA, além de flagelo livre presente em duas de suas formas evolutivas, epimastigota e tripomastigota, que lhe favorecem movimentação intensa. Há também uma forma intermediária, com flagelo livre presente apenas no vetor, a esferomastigota. Além das formas flageladas há uma forma com flagelo não exposto, em formato oval, denominada amastigota (DE LANA; DE MENEZES MACHADO, 2017).

Após o repasto sanguíneo, no estômago do vetor, as formas tripomastigotas se transformam em esferomastigotas, que a seguir se transformam em epimastigotas no intestino médio do inseto onde se multiplicam intensamente por divisão binária simples. Na porção intestinal final, também conhecida como ampola retal, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado que são naturalmente eliminadas nas fezes ou urina (DIAS, 1934). O hospedeiro vertebrado é infectado quando, após a alimentação do triatomíneo, esse defeca e elimina junto com as fezes os tripomastigotas metacíclicos. Após invadirem inicialmente as células do sistema mononuclear fagocitário, os tripomastigotas se transformam em

amastigotas livres no citoplasma da célula hospedeira onde se multiplicam por divisão binária. Posteriormente as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, rompem a célula hospedeira, caem no interstício celular ou na corrente sanguínea, atingindo diferentes órgãos e tecidos, ou poderão ser ingeridos por um vetor por ocasião de um novo repasto sanguíneo, que poderá levar a infecção a novas pessoas ou animais (DE LANA; DE MENEZES MACHADO, 2017)

O *T. cruzi* atualmente é subdividido em 7 DTUs (*discrete typing units*) denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e mais recentemente foi descrita TcBat (associada a morcegos) (ZINGALES, 2017). Acredita-se que TcIII, TcIV são híbridos derivados de fenômenos de hibridação entre TcI x TcII; e TcV e TcVI híbridos derivados de TcII x TcIII (WESTENBERGER; STURM; CAMPBELL, 2006). Há também a possibilidade dos híbridos terem surgido a partir de um ancestral comum entre TcI x TcII ou TcII x TcIII (DE FREITAS et al., 2006). Associação entre a genética do parasito e aspectos diversos de sua biologia, incluindo resistência/susceptibilidade ao tratamento etiológico tem sido observada (FILARDI; BRENER, 1987; ANDRADE *et al*, 1992; TOLEDO *et al*, 2003)

### **2.3 Quimioterapia da Doença de Chagas**

Muitos esforços têm sido feitos em prol de controlar a DC na maioria dos países endêmicos, como o combate aos vetores (COURA, 2013) e outras medidas de controle, tal como da transfusão sanguínea. Porém, esses esforços sozinhos não parecem ser capazes de atingir a erradicação da doença, pois o parasito circula na natureza entre animais e triatomíneos silvestres. Nem mesmo o ciclo peridoméstico de circulação do parasito (entre animais e triatomíneos presentes no peridomicílio) foi eliminado, o que constitui uma ameaça permanente para o controle da transmissão. Infelizmente, há falta de interesse político pelas regiões endêmicas mais importantes da DC. Várias delas são isoladas como comunidades rurais ou então compostas por populações pobres, com infraestrutura domiciliar e atendimento médico precário. Além disso, a busca por novos fármacos é desinteressante para as empresas farmacêuticas, que não veem a DC como um mercado lucrativo (COURA; DE CASTRO, 2002). Enquanto isto, a busca e pesquisa de novos fármacos para a DC concentra-se em universidades e institutos de pesquisa.

Desde a descoberta da DC, a inexistência de uma cura efetiva para todos os casos da doença é uma questão aberta, em especial na fase crônica tardia. Agregada a isso há a resistência natural de cepas de *T. cruzi* aos fármacos existentes e em estudo (FILARDI;

BRENER, 1987) que contribuem para a dificuldade de eliminação do parasito no hospedeiro. Assim, apesar de diversas tentativas, os resultados obtidos continuam insatisfatórios em alcançar cura.

A história dos fármacos para doença de Chagas iniciou-se logo após a descoberta da doença em 1909 por Carlos Chagas. Foram testados atoxil (composto de arsênio), fucsina (rosanilina, um dos componentes da fucsina básica), tártato emético (antimonial pentavalente) e cloreto de mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer & Rocha Lima (1912), todos sem resultados satisfatórios. Até 1962 inúmeros compostos foram testados, como derivados quinolólicos, antimaláricos, sais de ouro, bismuto, cobre, violeta genciana, anti-histamínicos e mais de 30 antibióticos, todos inativos contra o parasito (COURA; DE CASTRO, 2002).

Somente entre as décadas de 60 e 70 do século passado surgiram os primeiros fármacos que trouxeram respostas satisfatórias frente à infecção pelo *T. cruzi*. Em 1967, foi introduzida na terapêutica a classe de fármacos dos nitrofuranos (BOCK *et al*, 1969), sendo entre estes o 5-nitrofurano (3-metil-4-5 (nitrofurfurilidenoamina) traidro-4H-1, tiazina 1-1 dióxido) (Bayer 2502), o nifurtimox (NF) ou Lampit, o mais efetivo. Em 1972, o derivado 2-nitroimidazólico (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida), o benznidazol (BZ) ou Rochagan, mostrou-se ainda mais eficaz no tratamento da doença de Chagas (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006). Benznidazol e Nifurtimox foram introduzidos na terapêutica de forma empírica, mas são utilizados até os dias atuais no tratamento humano (URBINA, 2002).

O mecanismo de ação de BZ não está totalmente elucidado. Atualmente alguns autores sugerem que há a redução do grupo nitro ligado ao anel do benznidazol, o que pode se dar pela ação de nitroreductases tipo I ou II. As nitroreductases quando ativadas medeiam a transferência de elétrons através de um grupo nitroso gerando hidroxilamina que por sua vez gera glioxal, que é um composto tóxico para *T. cruzi* (STREETER; KRUEGER; HOENER, 1988; MAYA *et al.*, 2007). Já o mecanismo de ação do NFX contra o *T. cruzi* está associado a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (DOCAMPO *et al.*, 1981).

O nifurtimox (Lampit, Bayer®) teve sua comercialização interrompida no Brasil na década de 80 (COURA; DE CASTRO, 2002), embora continue sendo produzido em

El Salvador, pela Bayer®, doado à OMS (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006) e usado em outros países endêmicos da América Latina.

No mercado nacional encontra-se apenas o benznidazol, cuja patente foi cedida pela Roche ao Brasil e o governo brasileiro concedeu direito de produção ao laboratório LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco).

Desde a introdução na clínica, ambos BZ e NF mostraram ser efetivos na fase aguda de infecções por *T.cruzi*, atingindo cura, e por mais de 20 anos têm sido indicados para o tratamento dessa fase da doença. Entretanto algumas questões com relação ao uso de NFX e BZ tornam-se empecilhos a terapêutica: seus esquema de tratamento prolongado e inúmeras e significativas reações adversas (URBINA, 2001; COURA; DE CASTRO, 2002).

O tratamento da DC no Brasil é atualmente feito com o BZ, sendo indicado para fase aguda da infecção. Quanto a fase crônica, BZ e NF são indicados no para tratamento da fase crônica recente, e passaram a ser indicados formalmente no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas (2018) devido a melhora que podem proporcionar no prognóstico da fase crônica tardia em fases iniciais da DC (Entretanto, devido aos inúmeros efeitos colaterais, combinados ao baixo índice de cura nessa fase, ainda é questionado o uso destes compostos da mesma forma que há na fase aguda).

Assim, para a fase crônica no Brasil é preconizado o uso de BZ apenas em crianças (com idade igual ou inferior a 12 anos) e adolescentes (com idade entre 13 e 18 anos), além dos adultos em fase crônica com forma indeterminada, nos quais benefícios do tratamento são descritos, como redução da progressão da doença, aumento na queda de títulos sorológicos, e de uma maneira geral menor deterioração da condição clínica do paciente (FABBRO et al., 2000; GALLERANO; SOSA, 2000; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2006; VIOTTI et al., 2006; DE LANA et al., 2009; MACHADO-DE-ASSIS et al., 2013). Os pacientes que apresentam a forma indeterminada tendem a permanecer sem sinais e sintomas clínicos da DC após o tratamento, mesmo sem necessariamente estarem curados conforme o critério de cura clássico descrito nos Consensos sobre Doença de Chagas de 2005 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; PINTO DIAS et al., 2016b).

Apesar de não ser preconizado, também não é contraindicado o tratamento antiparasitário nas demais formas crônicas da DC, baseado na potencial redução de risco

de desenvolvimento ou progressão da cardiopatia chagásica (CONITEC, COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2016; M.S, 2016). Cuidados especiais são necessários em pacientes com cardiomiopatia avançada e em casos de comprometimento de fígado ou rins, assim como em gestantes, onde o tratamento deve ser evitado (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

Ainda no contexto de tratamento de fase crônica de DC, o projeto BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) foi desenvolvido, tendo como objetivos avaliar se o tratamento específico com BZ é capaz de melhorar o prognóstico dos pacientes, com a redução da mortalidade e retardo das principais manifestações clínicas cardíacas, e também determinar a segurança e tolerância dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) a este fármaco (MARIN-NETO et al., 2008; ANTONIO MARIN-NETO et al., 2009). A hipótese estabelecida no projeto entretanto não pode ser confirmada com o *follow-up* de apenas 5 anos (RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Entretanto, futuras avaliações dos pacientes serão feitas para averiguar os possíveis benefícios do tratamento para estes pacientes.

### **2.3.1. Metabolismo do benznidazol**

Após a administração oral de BZ, há absorção rápida e quase total do fármaco, alcançando concentrações plasmáticas máximas entre 2–4 horas, com picos de concentração plasmática de 2,2–2,8 µg/mL entre 3–4 h após a administração oral em indivíduos saudáveis (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979; RAETHER; HÄNEL, 2003). Em modelo murino, as concentrações plasmáticas obtidas variam conforme a dose utilizada, sendo de 36 µg/mL no tratamento com 78 mg/kg/dia (LEE; WORKMAN, 1984), 41 µg/mL no tratamento com 100mg/kg/dia (PERIN et al., 2017), 151,3 µg/Kg após administração de 5mg/animal (DA SILVA et al., 2012). A meia-vida de eliminação de BZ em humanos é de aproximadamente 12 horas, sendo encontrado no organismo principalmente sem sofrer metabolismo, sob forma inalterada. Em modelo murino a meia vida de sua eliminação é de cerca de 2h (LEE; WORKMAN, 1984; DA SILVA et al., 2012; DAVANÇO; DE CAMPOS; PECCININI, 2015; PERIN et al., 2017).

A eliminação de BZ do organismo humano se dá por biotransformação no fígado, sendo que apenas 20% da dose é excretada na urina na forma inalterada. O restante apresenta-se como metabólitos (RAAFLAUB, 1980; RAETHER; HÄNEL, 2003) .

A biotransformação de BZ no fígado envolve reações de fase 1 e 2, ou seja, ações do citocromo P-450 e da glutathione transferase (UGT), seguida de excreção metabólica

por meio de proteínas de membrana pertencentes a grande família ABC (*ATP-binding cassette*), como a MDR1 (glicoproteína-P) e MRP2 (PERDOMO et al., 2013). Interferir nessas vias de biotransformação e eliminação são meios de aumentar a biodisponibilidade de BZ.

### **2.3.2 Resistência a fármacos: Importância das proteínas de efluxo**

No contexto susceptibilidade a fármacos, foi visto por Andrade, Magalhães e Pontes (1985) perfis diferentes de resposta frente ao tratamento com BZ e NFX, sendo considerado elevado o perfil de resistência do grupo TcI (*T. cruzi* I), e mais susceptíveis as cepas do grupo TcII (*T. cruzi* II), DTUs polares do ponto de vista filogenético. Os resultados obtidos por Andrade e seus colaboradores em 1985 foram de encontro com a teoria da evolução clonal postulada para *T. cruzi* (TIBAYRENC; AYALA, 1988) que predisse uma relação entre a diversidade genética, características biológicas (crescimento em meio de cultivo acelular, infectividade em hospedeiros vertebrados e invertebrados, etc) e sensibilidade a fármacos, que foi vista e reforçada em diversos trabalhos (BRENER; COSTA; CHIARI, 1976; FILARDI; BRENER, 1987; ANDRADE; MAGALHÃES, 1997; DE LANA et al., 1998; REVOLLO et al., 1998; TOLEDO et al., 2003).

A resistência a fármacos pode estar relacionada a diferentes processos, como a aumento da expressão da molécula alvo, diminuição da ativação do fármaco, e mecanismos de efluxo mediados por transportadores de membrana (bombas de efluxo) (YASINZAI et al., 2013). Uma das hipóteses sobre a resistência a fármacos apresentada pelo *T. cruzi* envolve uma proteína de efluxo transmembrana ATP-dependente, a glicoproteína-p (Pgp). (MURTA et al., 2001; CAMPOS et al., 2013)

Alguns autores acreditam que essas correlações relativas a resistência de diferentes cepas ao tratamento não existem, como no tocante a expressão de Pgp (MURTA et al., 2001; MORENO et al., 2010; MORAES et al., 2014).

A Pgp é uma glicoproteína transmembrana ativa que foi descoberta inicialmente em células cancerígenas; que a possuem em super expressão, o que lhes confere um fenótipo de multirresistência a fármacos, também associado ao desenvolvimento de resistência verificado em protozoários dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e

*Plasmodium* e aos antibióticos observada em diversos microorganismos patogênicos (HIGGINS, 1992; SAUVAGE et al., 2009).

Em *T.cruzi*, os primeiros genes relativos a superfamília ABC descritos foram tcPgp1 (gene codificante de glicoproteína P 1 de *T.cruzi*) e tcPgp2 (gene codificante de glicoproteína P 2 de *T.cruzi*) (DALLAGIOVANNA; CASTANYS; GAMARRO, 1994; DALLAGIOVANNA; GAMARRO; CASTANYS, 1996). Pouquíssimos genes da família ABC foram caracterizados em *T.cruzi*, e apenas cerca de 30 deles são conhecidos no genoma do parasito (SAUVAGE et al., 2009).

Em *T.cruzi* a PGP está localizada predominantemente na membrana plasmática, onde atua como bomba de efluxo, secretando xenobióticos e metabólitos celulares. Murta e colaboradores (2001) analisaram cepas de *T.cruzi* e clones considerados naturalmente susceptíveis ou naturalmente resistentes ao BZ e NFX e/ou que tiveram resistência induzida, e não detectaram correlação entre os níveis de Pgp expressos associados ao fenômeno de resistência.

Já em 2013, Campos e colaboradores trabalhando com grupos de cepas com resistência induzida e grupos parentais dessas mesmas cepas, avaliaram a relação da indução de resistência com o aumento da expressão de Pgp na membrana dos parasitos e de expressão de seus genes codificantes, sugerindo o envolvimento da Pgp na resistência ao BZ em *T.cruzi*. Em 2018, Costa e colaboradores reforçam ser plausível a proposição de Campos et al. (2013) sobre a relação de Pgp e a resistência de *T.cruzi* a fármacos.

### **2.3.2.1 Proteína de efluxo: a Pgp em humanos**

Em humanos a Pgp desempenha papel defensivo promovendo secreção de metabolitos tóxicos e xenobióticos para regiões de lúmen de órgãos ocos reduzindo a exposição sistêmica. Assim pode ser encontrada em especial em regiões de “barreira” e filtração, como fígado, rins, intestino delgado, barreira hematoencefálica. Dessa forma a Pgp reduz a disponibilidade de fármacos, pois limitam sua absorção oral e promovem excreção biliar, renal e intestinal (PANG; RODRIGUES; PETER, 2010).

A literatura mostra que células que expressam Pgp, quando tratadas com fármacos substrato para tal glicoproteína, tem a expressão desta glicoproteína aumentada (RAGHAVA; LAKSHMI, 2012), o que leva ao longo de um tratamento, a diminuição de fármaco presente nos tecidos, uma vez que o aumento da expressão da glicoproteína de

efluxo leva ao aumento do efluxo de fármacos (RAAFLAUB, 1980; PERDOMO et al., 2013). Além disso, muitos fármacos que são substratos da PGP também são substratos de enzimas metabolizadoras de fármacos, como o citocromo P450 - CYP3A4, a exemplo o benznidazol (MAYA et al., 2007; PERDOMO et al., 2013) .

Assim, além de envolvida na resistência a fármacos em *T.cruzi* (CAMPOS et al., 2013; DA COSTA et al., 2018), a Pgp também está associada ao aumento na eliminação de fármacos no organismo humano (RAAFLAUB J., 1980).

## **2.4 Novas Abordagens na Quimioterapia da doença de Chagas**

Considerando que em mais de cem anos de descoberta da DC ainda não há um fármaco ideal para seu tratamento, e que as melhores descobertas se deram nas décadas de 60 e 70, há uma necessidade de contínuos esforços em prol de novas terapias. Dentre as propostas de novas terapias há o redirecionamento de fármacos tal como o uso dos inibidores da biossíntese do ergosterol; a busca por novos fármacos entre os produtos naturais; ou terapia combinada, em que se faz a associação de fármacos já existentes ao BZ e NF.

### **2.4.1. Associação de Fármacos**

Outra proposta terapêutica para DC é o uso de terapias combinadas. Baseando-se em dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o controle de doenças como toxoplasmose, malária, tuberculose (WHO, 2001) após o uso da terapia medicamentosa combinada, somado a estudos promovidos frente à resistência de diferentes cepas do parasito em avaliações de monoterapia (ANDRADE; MAGALHAES; PONTES, 1985; FILARDI; BRENER, 1987; ANDRADE et al., 1992) a combinação de fármacos já existentes, em especial se associados ao BZ ou NF, torna-se uma opção pertinente.

A combinação de fármacos tem sido proposta, pois produz maiores índices de cura, menor tempo de tratamento e menos efeitos adversos (BARRETT; CROFT, 2012; MARTINS et al., 2015), revelando novos usos para fármacos já conhecidos. Vários trabalhos de associação para terapia da DC estão presentes na literatura, como cetoconazol e terbinafina (MALDONADO et al., 1993), BZ e cetoconazol (ARAÚJO et al., 2000), amiodoranoa e posaconazol (BENAIM et al., 2006), BZ e itraconazol (DA SILVA et al., 2012) que melhorou a farmacocinética do BZ, BZ e alopurinol (PEREZ-MAZLIAH et al., 2013) , BZ e posaconazol (DINIZ et al., 2013), BZ e pentoxifilina

(VILAR-PEREIRA et al., 2016), nos quais foi vista melhor eficácia com a associação de fármacos, passando o seu uso a ser estimulado.

Ainda que traga muitas vantagens, não se podem descartar os riscos. A administração de fármacos em associação é uma estratégia delicada, pois há a possibilidade da ocorrência de interações medicamentosas que gerem efeitos indesejados (FUHR, 2000; BRUNTON et al., 2010).

#### **2.4.2. Produtos naturais e o tratamento da doença de Chagas**

Outra vertente na busca por novos tratamentos da DC é a pesquisa de novas substâncias ativas em produtos naturais que possuam atividade anti-*T.cruzi*. Produtos naturais são uma rica fonte de compostos com potencial ativo, podendo ser de origem terrestre ou marítima.

Os produtos naturais marinhos tem sido amplamente isolados e estudados, e são fonte de compostos com potencial terapêutico (JONES et al., 2013). Dentre eles, vários dos ativos isolados demonstraram atividade *in vitro* anti- *T.cruzi*, tais como o elatol, obtido da alga vermelha brasileira (DOS SANTOS et al., 2010), os cembranoides diterpenos de *Lobophytum crassum* and *L. laevigatum*, e o 5 $\alpha$ -colest-8(14)-eno-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol de *Astropecten polyacanthus* (THAO et al., 2014).

Quanto aos produtos naturais de origem terrestre, é sabida a grande diversidade de espécies de plantas medicinais, especialmente no território brasileiro, e o potencial das substâncias naturais a serem pesquisadas e testadas como alternativas terapêuticas para várias enfermidades (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

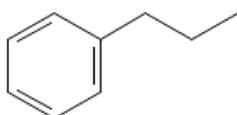
A classe dos alcaloides por exemplo apresenta muitos compostos ativos contra *T.cruzi*, como os alcaloides esteroidais e quinolínicos, os flavonoides e também dentre os sesquiterpenos, isolados de lactonas sesquiterpênicas (IZUMI et al., 2011). As lactonas sesquiterpênicas se destacam com a obtenção de cura na terapia em modelo murino contra *T.cruzi* (BRANQUINHO et al., 2014).

Outra classe de compostos que apresentam atividade contra todas as formas evolutivas de *T.cruzi* são as lignanas, isoladas das famílias Lauraceae e Piperaceae. As lignanas tetraidrofurânicas reduziram 50% de formas tripomastigotas em cultivo celular em avaliações de 24h nas concentrações de 2.2 e 4.4 mM (IZUMI et al,2011).

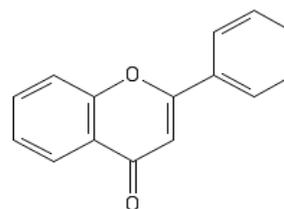
As lignanas (**Figura 1**) ao passarem por um processo biosintético de acoplamento oxidativo a flavonoides (**Figura 2**) dão origem aos flavonolignanos, que são compostos

com potencial atividade anti- *T.cruzi* (SHARMA, 2006). Dentre os flavonolignanos são conhecidos o *Hydnocarpin*, isolado de *Onopordon corymbosum* (CARDONA et al., 1990), *Scutellaprostin*, isolado de *Scutellaria prostrata* (KIKUCHI; MIYAICHI; TOMIMORI, 1991), *Palstatin*, isolado de *Hymeneae palustris* (PETTIT et al., 2003) e o complexo Silimarina extraído de *Silybum marianum* (Cardo de Leite)(BIJAK, 2017).

**Figura 2:** Estrutura molecular de uma lignana



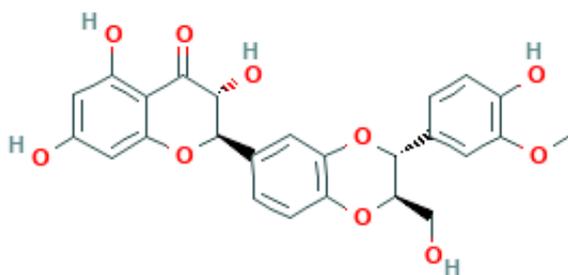
**Figura 1:** Estrutura molecular de flavonoide



#### 2.4.2.1. *Silybum marianum*: A silibinina

O *Silybum marianum* ou cardo de leite, é uma planta da família Asteraceae, originária do sul da Europa até a Ásia e encontrada em todo o mundo. Essa planta é conhecida ainda pelos nomes de cardo mariano, leite abençoado, cardo de santa Maria, dentre outros. O Cardo Mariano é historicamente utilizado em condições de distúrbios hepáticos, datando de 2000 anos atrás (CROCENZI; ROMA, 2006). Das sementes de *Silybum marianum* é extraído o complexo de isoflavolignanos silimarina, que é composto por silibinina (**Figura 3**) e esteroisômeros de silibinina como isosilibinina, silicristina, isosilicristina, silidianina e silimonina). (WAGNER; DIESEL; SEITZ, 1974; LUPER, 1998; BIJAK, 2017).

**Figura 3:** Estrutura molecular de silibinina



O flavonolignano silibinina compreende de 50-70% do extrato silimarina, sendo o componente isolado em maior quantidade e o mais bioativo. Diversas publicações relatam sobre as propriedades da silibinina como antioxidante, anticancerígena, quimiopreventiva (POLACHI et al., 2016), antifúngicas (SALEHI et al., 2011; YUN;

LEE, 2017), antiedema cerebral, antidepressivas, anti-inflamatórias, anti-fibrótica (ABASCAL; YARNELL, 2003b; KREN; WALTEROVÁ, 2005; AHMED AZIZ et al., 2014), antimicrobiana (DE OLIVEIRA et al., 2015) e de inibição de glicoproteínas de membrana que atuam como bomba de efluxo (ZHANG; MORRIS, 2003).

A atividade antifúngica demonstrada com SLB (SALEHI et al., 2011) pode vir a ser interessante para o tratamento doença de Chagas, partindo da premissa de que estudos com antifúngicos já são conduzidos a fim de eliminar o *T.cruzi* (URBINA, 2001; COURA et al., 2002; TOLEDO et al., 2003; DE SOUZA et al., 2010; CANÇADO et al., 2011; DINIZ, 2013; CALDAS et al., 2014; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Isto porque os antifúngicos agem por mecanismos que alteram a constituição membranar do parasito levando à sua morte. Da mesma forma, há possibilidade de que a SLB possa agir nessa linha; já que leva a morte de fungos por meio de perturbação na estrutura membranar, com formação de poros (YUN; LEE, 2017). Essa perturbação membranar leva a um desequilíbrio no potencial de membrana, com perda de íons intracelulares, o que por fim afeta a viabilidade celular dos fungos.

Associada à possível atividade anti-*T.cruzi*, a SLB possui também atividade anti-inflamatória. A literatura traz que a ação anti-inflamatória de SLB se dá por sua inibição do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) (GIORGI et al,2012; KIM et al, 2013)

O NF-kB é um fator de transcrição ativado em situações patológicas (ABRAHAM; SINGER, 2007). Ele está presente nas células do sistema imune e é responsável pela transcrição de genes relacionados com a inflamação e considerado como um dos principais reguladores das respostas imunes inata e adaptativa(BONIZZU; KARIN, 2004). A ativação do fator NF-kB leva a cascata de citocinas como TNF, IL-1beta, IL-2, IL6, IL-12, moléculas de adesão e por fim resposta tecidual de inflamação, uma tentativa do organismo em combater um agente patológico que resulta em resolução de um processo infeccioso ou patológico , gerando inflamação e/ou fibrose, que compromete a morfologia e por vezes a função do tecidual e fisiológica do órgão afetado.

A DC é uma doença em que a inflamação é um componente patológico fundamental. É sabido que na DC aguda há uma resposta inflamatória intensa, que pode levar a danos nos tecidos do hospedeiro, e que na fase crônica essa resposta inflamatória se mantém, podendo ser de forma intensa, moderada ou discreta. Essa intensidade varia, pois na fase crônica diversos mecanismos imunológicos de modulação mantêm a infecção

sobre controle (TALVANI; TEIXEIRA, 2011) ou causam fenômenos de autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2015). Essa resposta inflamatória e lesões teciduais são sucedidas por mecanismos de reparo tecidual, como a formação de fibrose, que muitas vezes danifica a função primordial do órgão, conforme é visto no coração (ANDRADE, 1999). Assim, o uso de um fármaco com potencial ação anti-inflamatória proporcionaria uma diminuição no mecanismo de lesão aos tecidos parasitados, com consequente melhoria do prognóstico da doença.

Além das citadas possibilidades advindas do uso de SLB, há ainda a propriedade dela ser um inibidor de bombas de efluxo da superfamília de transportadores ABC, com enfoque na glicoproteína P (Pgp). A capacidade de silibinina em inibir a bomba de efluxo foi elucidada ao se demonstrar o aumento na concentração doxorrubicina em linhagem celular resistente a doxorrubicina (SCAMBIA et al., 1996). Essa atividade foi reconfirmada quando se demonstrou que há inibição da Pgp ATPase frente ao tratamento com a silibinina (ZHANG; MORRIS, 2003)-

Em 2015 (JABINI et al., 2015) propôs com *Leishmania major* (parasito que expressa a Pgp e tem essa expressão como mecanismo de resistência) um estudo partindo da premissa sobre inibição de Pgp pela silibinina. Foi feita a avaliação de associação entre Silibinina e Glucantime em modelo BALB/c, obtendo resultados satisfatórios nas avaliações de tamanho de lesão e diminuição do parasitismo, corroborando a atividade já demonstrada por Scambia et al. (1996) e Zhang e Morris (2003).

Atualmente a silibinina é encontrada no mercado como princípio ativo puro na Sigma- Aldrich , Jinan Great Chemical, Shanghai Gen Yu Perfume, dentre outras empresas, na forma de comprimido do ingrediente ativo puro em farmácias de manipulação de todo mundo. Ela se apresenta como constituinte em cápsulas e comprimidos do extrato silimarina com nomes comerciais de Legalon (Rottapharm / Madaus - Takeda Pharmaceutical Company), Silimalon (Zydus Nikkho Farmacêutica), Silimarin-Loges (Dr.Loges & Co. GmbH), Silimarina Forte (Polipharma). Ela pode ser encontrada ainda na forma de silibinina 2',3-di(succinato de sódio), apresentação liofilizada para administração injetável com nome comercial Legalon Sil (Rottapharm / Madaus farmacêutica), dentre outras.

### **3.0. JUSTIFICATIVA**

Este trabalho se justifica por avaliar a ação de um produto natural, a silibinina, para uso isolado e em associação ao benznidazol, no tratamento da doença de Chagas. A silibinina já demonstrou atividade terapêutica para outros microrganismos patogênicos, além de ser capaz de inibir a Ppg (glicoproteína P) uma das principais proteínas de efluxo do BZ que está presente tanto na membrana do parasito quanto nas membranas de células presentes na luz de órgãos ocos, como intestino e outros (onde é capaz de diminuir a absorção do fármaco pelo organismo). Dessa forma, acreditamos que a associação silibinina+benznidazol propicie a diminuição da dose de benznidazol (um fármaco tóxico na dose usual em humanos) ao poder atuar na diminuição de seu efluxo, paralelamente a uma melhor atividade terapêutica, pois há relatos na literatura de que a silibinina promove ainda diminuição do perfil inflamatório em animais acometidos por doenças parasitárias, como é o caso da doença de Chagas, onde a inflamação é a primeira e constante lesão, com conseqüente melhoria do prognóstico desta infecção/doença.

## **4.0. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de silibinina e sua associação ao benznidazol *in vitro* e *in vivo* no tratamento da infecção murina na fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- (1) Realizar estudo de citotoxicidade da SLB e BZ *in vitro*;
- (2) Realizar estudo da atividade/eficácia de SLB, BZ e associações *in vitro* sobre formas epimastigotas do *T. cruzi*;
- (3) Realizar estudo da atividade/eficácia *in vitro* de SLB, BZ e associações sobre as formas amastigotas do *T. cruzi*;
- (4) Avaliar a eficácia *in vivo* da SLB, BZ e suas associações em modelo murino experimentalmente infectado com a cepa Y de *T. cruzi*.

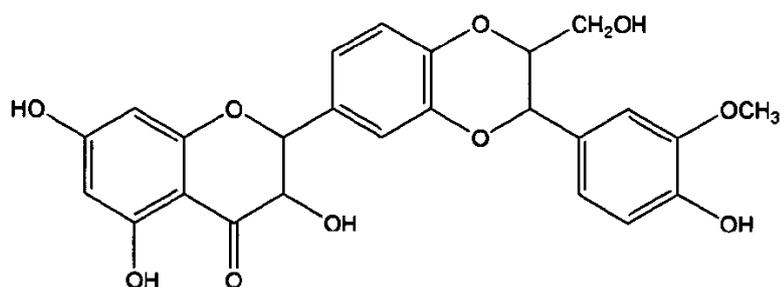
## 5.0. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Fármacos estudados

#### 5.1.1. Silibinina

A SLB (**Figura 4**) comercializada pela Sigma –Aldrich foi utilizada nos testes *in vitro* e *in vivo*. Para o teste *in vitro* foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL de SLB com 2% DMSO e a partir dela feitas as diluições desejadas para atingir as doses aqui testadas.

**Figura 4:** Estrutura química de silibinina

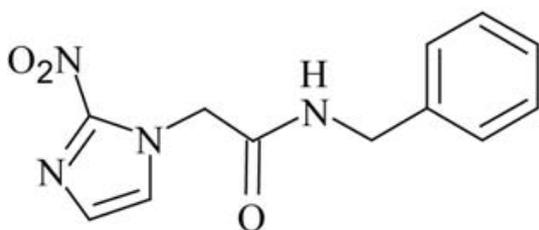


#### 5.1.2. Benznidazol

O BZ (2-nitroimidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) (**Figura 5**) comercializado pela LAFEPE/PE (laboratório responsável pela sua produção no Brasil) foi utilizado como fármaco de referência na determinação da eficácia dos tratamentos empregados neste trabalho. O BZ puro foi obtido do isolamento e purificação a partir de comprimidos segundo Branquinho *et al.* (2014) para permitir a condução dos testes *in vitro*.

Para os procedimentos *in vivo* foi utilizada uma suspensão de comprimidos de BZ em água destilada após trituração em goma arábica.

**Figura 5 :** Estrutura química do benznidazol



## **5.2 Cepa de *T.cruzi***

Neste trabalho foi utilizada nos testes *in vitro* (células VERO) e *in vivo* (modelo murino) a cepa Y, classificada como TcII (ZINGALES et al., 2009), confirmada como tal com as metodologias usuais na classificação de molecular *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2015) antes de ser usada neste estudo. A cepa Y (FILARDI e BRENER, 1987) provenientes de camundongos na fase aguda (7º dia de infecção), utilizados para manutenção de cepa em passagens sucessivas (CEUA 2015/50).

## **5.3. Estudos *in vitro***

Todos os estudos *in vitro* foram realizados conforme o Delineamento Experimental (**Figura 6**).

Para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas células VERO mantidas em meio DMEM F12 com 1% de soro fetal bovino e 1% estreptomicina. Garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo as células foram mantidas em estufas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura foi tripsinizada semanalmente e repicada até as células atingirem confluência ideal para realização dos experimentos.

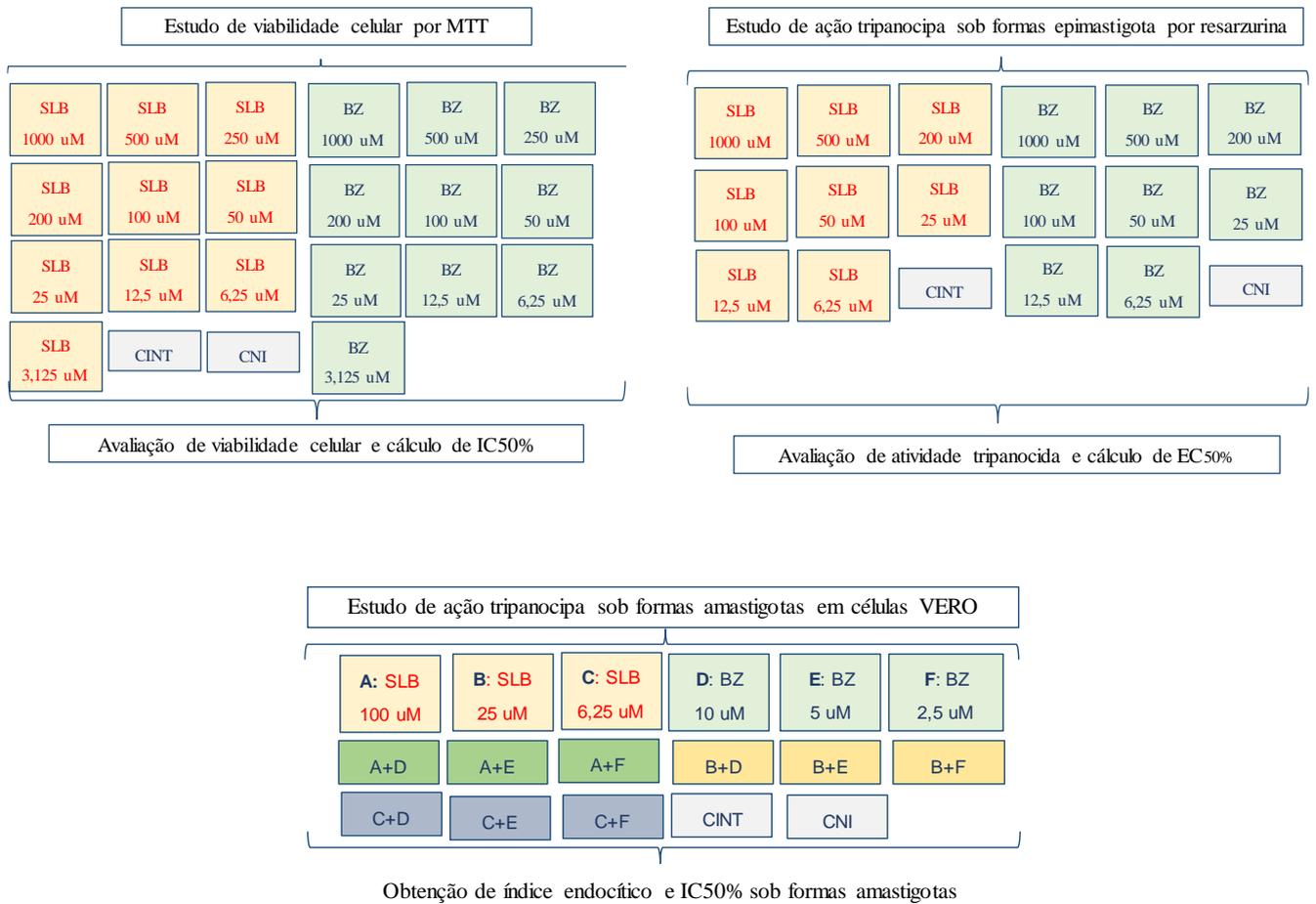
### **5.3.1. Estudo da atividade citotóxica de silibinina e benznidazol por MTT (Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazol)**

#### **5.3.1.1 Preparo das placas com as células VERO**

Para o preparo das placas testes, as células contidas nas garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 10 min em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em meio DMEM F12 1% SBF. Após a contagem em câmara de Neubauer utilizando o Azul de Trypan®, o número de células VERO plaqueadas (10.000 células por poço) foi determinado de acordo com metodologia padronizada no Laboratório de Doença de Chagas (LADOC) baseada em Mosmann (1983). As células foram incubadas por 24h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para aderirem à microplaca. Após 24h de incubação o meio de cultura foi retirado das células e nelas foram adicionados diferentes concentrações do composto ativo diluído SLB em DMEM F12 1% SFB em cada poço (1000 uM, 500 uM, 250 uM, 200 uM, 100 uM, 50uM, 25 uM, 12,5 uM, 6,25 uM; 3,125 uM). Como controles foram utilizados o fármaco de referência (BZ) nas mesmas concentrações já descritas para a SLB, meio de cultura (controle não tratado - CNT) e solução de KCl 3M como controle de morte celular

(Delineamento Experimental 1, **Figura 6**). As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade.

**Figura 6:** Delineamento experimental da avaliação da atividade citotóxica e anti-*Trypanosoma cruzi* de silibinina, benznidazol e associação silibilina+benznidazol em diferentes concentrações *in vitro* utilizando células VERO e a cepa Y



SLB: Silibinina, BZ: Benznidazol, A+D: SLB 100+BZ10 uM, A+E: SLB 100+BZ5 uM, , A+F: SLB 100+BZ2,5 uM ; B+D: SLB 25+BZ10 uM, B+E: SLB 25+BZ5 uM, , B+F: SLB 25+BZ2,5 uM ; C+D: SLB 6,25+BZ10 uM, C+E: SLB 6,25+BZ5 uM, , C+F: SLB 6,25+BZ2,5 uM ; CINT: controle infectado não tratado; CNI: controle não infectado

### 5.3.1.2. Teste viabilidade celular por Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazol (MTT)

O teste *in vitro* de MTT é considerado padrão-ouro utilizado pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) baseado em normas sugeridas pela *International Organization for Standardization*, ISSO 10993-5: 2009, para avaliação biológica de dispositivos médicos (FDA 2012).

Este ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas converterem o substrato MTT num sal formazan formado por cristais de coloração azul-escuro/roxo e insolúveis em água. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983). Este teste foi feito segundo o Delineamento Experimental 1 (**Figura 6**).

Após o preparo das placas como descrito anteriormente, 150 µL de uma solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich) na concentração de 5,0mg/mL foi adicionada aos poços da placa (DENIZOT e LANG, 1986). Após 4h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante presente no fundo dos poços da placa foi diluído em um volume de 100µL/poço de uma solução de DMSO. As microplacas foram então lidas em um espectrofotômetro (Bio-Rad modelo 680) utilizando um filtro de 570nm. Este teste foi realizado em triplicata.

A partir do percentual de inibição de cada concentração dos fármacos, foi calculado o IC-50 (concentração do fármaco que reduz a viabilidade das células em 50%), utilizando o programa *CalcuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 2 repetições.

### 5.3.2 Estudo de atividade anti-*Trypanosoma cruzi* sobre formas epimastigotas

Para avaliação inicial de efeito de SLB em *T. cruzi* foi avaliado o efeito dos fármacos sob culturas de epimastigotas deste parasito em meio LIT segundo o Delineamento Experimental 1 (**Figura 6**).

Inicialmente foi ajustado o número de parasitos para a concentração de  $1,0 \times 10^6$ /mL. Cem microlitros dessa suspensão foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços. A seguir, concentrações crescentes das drogas, isoladamente, foram adicionadas aos poços contendo os parasitos num volume de 100 µL.

As concentrações de SLB e BZ testadas foram: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM e 3,125 µM. Foram testados em paralelo, Controles Negativos: (Meio LIT), controles de redução da droga (LIT + droga) e Controles Positivos (LIT + parasitos). As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C por 24 horas. Após esse período foram adicionados 20 µL de resazurina/poço. Após 3 horas as placas foram lidas em leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 680) utilizando filtros de 570nm e 600nm.

Os cálculos dos percentuais de redução do corante e de inibição da proliferação do parasito foram realizados segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100.$$

sendo: A570 = absorvância a 570nm, A600 = absorvância a 600nm e R0 = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de parasitos [R0 = (A570 / A600)].

A partir do percentual de inibição de cada concentração dos fármacos, foi calculada a IC50% (concentração inibitória do fármaco, que induz 50% do efeito analisado, inibição da prolifereação celular), utilizando o programa *CalcuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 2 repetições.

### 5.3.3 Estudo da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* sobre formas amastigotas

Este estudo foi seguido o Delineamento Experimental 1 (**Figura 6**). Um total de  $1,0 \times 10^4$  células VERO foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro, dispostas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e posteriormente infectadas com formas tripomastigotas, originadas de cultura da cepa Y em células VERO, na razão de 20:1 parasitos/células. Após 24 horas de interação o sobrenadante foi removido e cada poço lavado com PBS 1x estéril para remoção dos parasitos não internalizados. Foram adicionados a cada poço meio de cultura fresco, contendo ou não as substâncias SLB e BZ em diferentes concentrações (conforme descrito e apontado no delineamento experimental 1, Figura 6), ajustando-se para um volume final de 1mL/poço. As células foram novamente incubadas por 24h, a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. As lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS 1x estéril, fixadas com metanol e em seguida coradas com solução de *Giemsa* (10% em água destilada). Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck) foi determinada a porcentagem de células infectadas em uma contagem aleatória ao microscópio

óptico (aumento de 100x) de 100 células. Apenas as formas íntegras do parasito com morfologia característica das formas amastigotas foram consideradas na avaliação da infecção.

#### **5.3.3.1 Índice Endocítico (IE) e IC<sub>50</sub>**

Para se determinar o efeito do tratamento das células infectadas e tratadas com as diferentes concentrações dos compostos SLB e BZ, foi calculado o índice endocítico (IE). O IE corresponde à média da porcentagem de células infectadas com as formas amastigotas multiplicada pelo número médio de amastigotas por célula. Utilizando este dado, foi calculado o percentual de inibição da infecção das células tratadas em relação às células infectadas e não tratadas.

Esse percentual de inibição foi então utilizado para a construção de curvas de dose-efeito e cálculo da IC<sub>50</sub> com auxílio dos softwares *Graph Pad Prism 6* e *CompuSyn*. Todos os experimentos com amastigotas foram realizados em triplicata com no mínimo 2 repetições.

#### **5.3.3.1 Índice de Seletividade**

O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando a razão entre o valor de IC<sub>50</sub> do ensaio de MTT (concentração do fármaco ou substância ativa que reduz a viabilidade celular em 50%) e o valor de IC<sub>50</sub> do teste de atividade anti-*T. cruzi* em amastigotas (concentração da substância ativa que reduz o número de parasitas em 50%). Esse índice avalia o quão seletivo é um fármaco para o seu alvo sem causar toxicidade às células do hospedeiro.

### **5.4. Estudo da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* em modelo murino**

#### **5.4.1. Princípios éticos**

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CBIO-UFMG), MG, Brasil. Esses animais foram recebidos, mantidos e quarentena, avaliados pelos veterinários responsáveis pelo setor do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP e após liberados, mantidos no CCA-UFOP segundo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), recebendo água filtrada e alimentados com ração comercial balanceada “ad libitum”. Todas as atividades realizadas em modelo animal foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), MG, Brasil, protocolo nº 2018/16.

#### 5.4.2 Infecção e Tratamento dos animais

Esta etapa do estudo seguiu o Delineamento Experimental 2 (**Figura 7**).

Os animais foram infectados por via IP com  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas provenientes de animais mantidos para manutenção de cepa (CEUA 2015/50). Antes de iniciar o tratamento dos animais a confirmação da infecção foi realizada pelo ESF (BRENER, 1962) realizado entre o 4º e 10º dia após a inoculação. Para este exame, amostras de sangue foram coletadas diariamente da veia caudal do animal e examinadas ao microscópio óptico para pesquisa exaustiva de formas tripomastigotas sanguíneas.

Para administração oral da SLB foram utilizadas as concentrações de 50mg/kg e 150mg/kg. A SLB foi dissolvida em óleo de algodão puro (ZHAO; AGARWAL, 1999), e administrada aos camundongos por via oral (gavagem) uma vez ao dia.

O BZ foi também preparado em diferentes concentrações (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) na forma de suspensão (BRANQUINHO et al., 2014) a partir do macerado de comprimido de BZ proveniente do laboratório LAFEPE (Lote: 16070001) com goma arábica 0,5% e água.

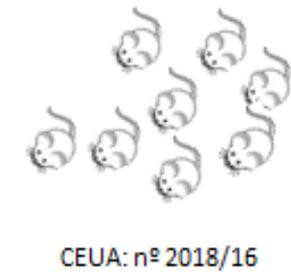
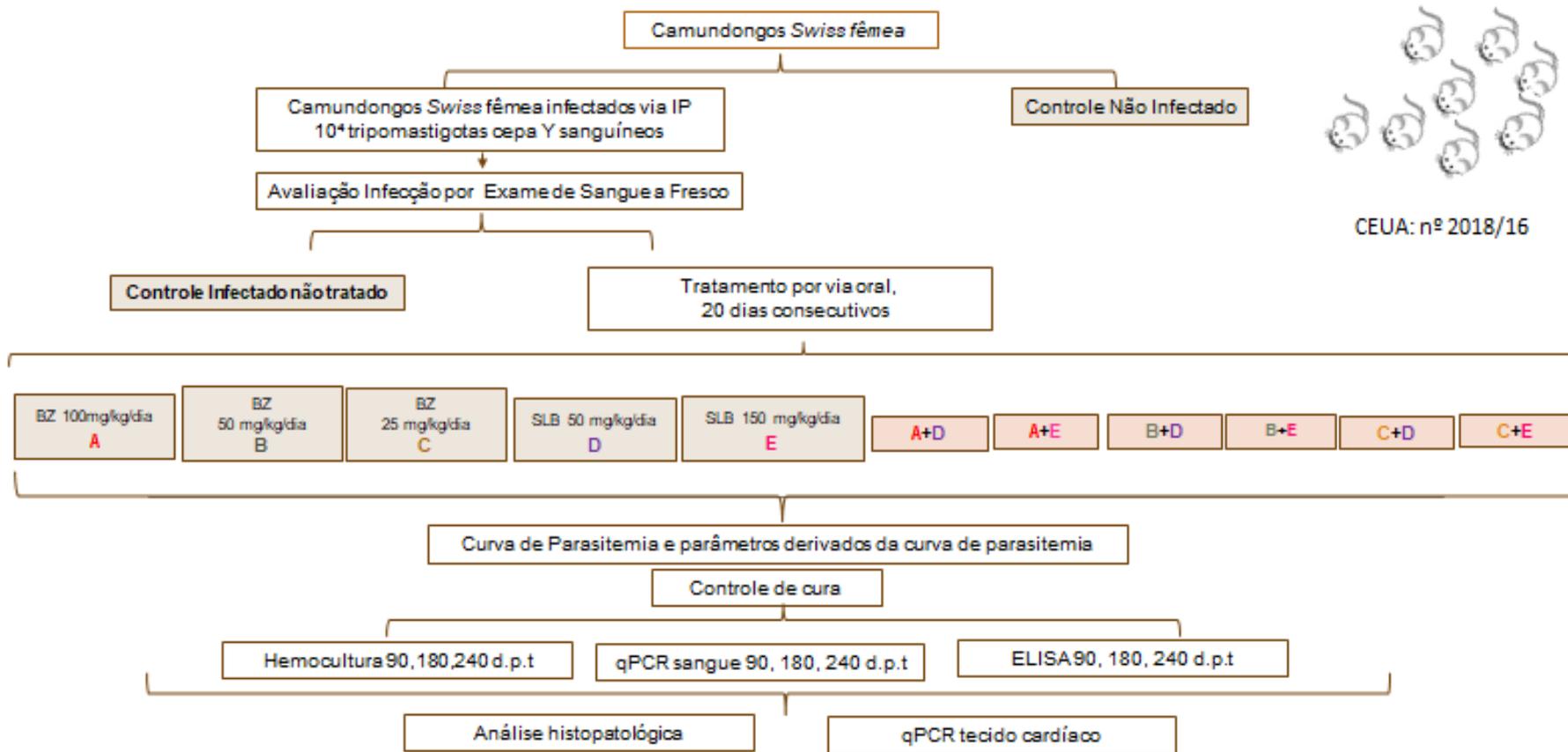
Os tratamentos da fase aguda com SLB, BZ e suas associações foram feitos segundo o Delineamento Experimental 2 (**Figura 7**) e realizados utilizando 11 grupos de camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade média de 28 dias, pesando de 25-30g e contendo oito animais por grupo. Os animais foram inoculados com a cepa Y de *T.cruzi* pela via intraperitoneal (IP) com inóculo de 10.000 tripomastigotas sanguíneas calculado segundo Brener (1962). Em paralelo foram avaliados um grupo controle infectado não tratado (INT) e um grupo controle de animais não infectados (CNI).

Os tratamentos dos camundongos foram feitos por via oral com as soluções de SLB nas doses de 50 mg/kg/dia; 150 mg/kg/dia; BZ nas doses de 25 mg/kg/dia, 50 mg/kg/dia; 100 mg/kg/dia. Nas associações foram utilizadas as mesmas doses de SLB e de BZ já citadas.

Os tratamentos foram iniciados no primeiro dia do período patente da infecção. No tratamento com as associações os dois fármacos foram misturados imediatamente antes de serem administração aos animais e nas concentrações necessárias para atingir as doses desejadas, colocados na seringa de gavagem e administrados num volume máximo de 0,2 mL, sendo 0,1 mL da solução com SLB e 0,1 mL de BZ.

**Figura 7:** Delineamento experimental da avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de silibinina, benznidazol e associação silibilina+benznidazol em diferentes doses por via oral em camundongos *Swiss* fêmeas, inoculados com a cepa Y

**Delineamento: Estudo de eficácia terapêutica de Silibinina (SLB) e sua associação ao Benznidazol (BZ)**



SLB: Silibinina, BZ: Benznidazol, IP: Intrapertoneal, PCR: Polymerase Chain Reaction, ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, qPCR: qualitative Polymerase Chain Reaction;  
 A+D: BZ 100+SLB50 mg/kg/dia, A+E: BZ100+SLB150mg/kg/dia, B+D: BZ50+SLB50 mg/kg/dia, B+E: BZ50+SLB150 mg/kg/dia, C+D: BZ25+SLB50 mg/kg/dia, C+E: BZ25+SLB150mg/kg/dia

## **5.5. Avaliações pós-tratamento**

### **5.5.1 Avaliação Parasitológica**

#### **5.5.1.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)**

O ESF foi empregado na avaliação da infecção e da eficácia terapêutica e realizado segundo a técnica de Brener (1962). A contagem da parasitemia foi realizada diariamente, a partir do quarto dia de infecção, e até sua negatificação por cinco dias consecutivos. Estas avaliações permitiram traçar a curva de parasitemia observada nos grupos experimentais tratados e não tratados bem como os parâmetros derivados da curva de parasitemia tais como período pré-patente (PPP), período patente (PP), dia do pico máximo de parasitemia (DPMP), pico máximo de parasitemia (PMP), área sob a curva de parasitemia (ASC).

#### **5.5.1.2. Hemocultura (HC)**

A coleta de sangue para a avaliação por HC foi realizada 90, 180 e 240 dias pós-tratamento apenas nos animais que apresentaram exame de sangue a fresco (ESF) negativo. Para tal foi coletada do plexo venoso orbital uma amostra de 0,3 ml de sangue que foi adicionada a um volume de 3 mL de meio LIT (*Liver Infusion Triptose*), seguido de homogeneização e incubação a 28°C, (FILARDI; BRENER,1987). Os tubos foram homogeneizados a cada 48h e uma gota da hemocultura avaliada aos 30, 60, 90 e 120 dias após a coleta, entre lâmina e lamínula, ao microscópio ótico para verificar a presença de parasitos.

#### **5.5.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)**

A técnica molecular de PCR em Tempo Real foi realizada em amostras biológicas de sangue total e tecido cardíaco. O método de extração das diferentes amostras biológicas estão detalhadas separadamente a seguir. O método de amplificação e análise foi o mesmo para ambas as fontes biológicas de DNA.

##### **5.5.1.3.1. 1 Extração de DNA**

###### **5.5.1.3.1.1 Sangue total**

Foi realizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR) em paralelo com a HC nos tempos de 90, 180 e 240 dpt. Um volume de cerca de 300 µL de sangue foi coletado do plexo venoso retro-orbital e imediatamente armazenado em tubos tipo Eppendorf

contendo o anticoagulante EDTA (Hemstab<sup>®</sup>, Labtest) e mantidos em freezer até a extração.

Para obtenção do DNA foi utilizado o Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA), seguido as recomendações do fabricante, conforme brevemente descrito a seguir.

As amostras foram descongeladas e foram retirados 100 µL de sangue e o mesmo transferido para tubos de 1,5 mL. Foram adicionadas aos tubos 700 µL de solução de lise celular e as amostras foram homogeneizadas e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 16.000 g (Microcentrífuga Eppendorf<sup>®</sup>- Modelo 5418, NY, USA). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 200 µL de solução de lise nuclear e 75 µL de solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (Vision Scientific<sup>®</sup>, Korea), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 4 minutos a 16.000 g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 200 µL de isopropanol (Merck<sup>®</sup>, Darmstad, Alemanha). O tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200 µL de solução de etanol 70% (Merck<sup>®</sup>, Darmstad, Alemanha). Posteriormente foi realizada nova centrifugação a 16.000 g, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados 60 µL de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24h a temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (Nanovue Plus<sup>®</sup>, GE Healthcare, USA).

#### **5.5.1.3.1.2 Tecido cardíaco**

A técnica de qPCR em tecido cardíaco foi realizada em 240 dpt após a necropsia dos animais dos diferentes grupos experimentais. O protocolo padronizado por Caldas (2012) foi utilizado para realização da técnica. Os fragmentos do coração dos camundongos, previamente armazenados a -80°C, foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi e pesados fragmentos entre 15-30 mg. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA total utilizando o kit Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. Para a digestão enzimática dos fragmentos de coração, foram adicionados aos tubos 30,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) na concentração de 20,0 mg/mL. Para realizar a detecção do DNA do parasito em fragmentos de coração de camundongos por qPCR, fez-se necessário construir uma curva padrão para

determinar o número de cópias do DNA do parasito comparativamente. Utilizou-se formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura, até atingir o número total de  $1,0 \times 10^8$  parasitos contados em câmara de Neubauer, os quais foram submetidos ao mesmo protocolo de extração de DNA utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo todas as recomendações do fabricante (idem ao realizado com as amostras teste). Em seguida, a concentração e a qualidade do DNA obtido foram determinadas por espectrofotômetro (Nanodrop, GE Healthcare Products).

#### **5.5.1.3.2. Amplificação do DNA de *T. cruzi* e do gene endógeno**

As amostras foram analisadas em duplicata para amplificação do DNA de *T. cruzi* e em cada reação de qPCR foram utilizados 3,0 µL da amostra extraída diluída, contendo 30,0 ng de DNA genômico e 5,0 µL de “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega®) e 10uM de cada iniciador. Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3' (Caldas et al. 2012). Na mesma placa também foi realizada em unicata a reação para dosar o fator alfa de necrose tumoral murino-específico (TNF- $\alpha$ ), utilizado como controle endógeno. Os iniciadores para o TNF- $\alpha$  foram: TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3', e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCATAGCACTTAGACCCC-3' - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3' (Caldas et al. 2012). Cada placa de reação de 96 poços continha a curva padrão (em triplicata), criada a partir de uma solução obtida pela extração de DNA na concentração de  $1,0 \times 10^8$  epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Dessa solução, procederam-se diluições seriadas em água ultra-pura autoclada (1:10) para obter os pontos da curva, que foi medida a partir de DNA equivalente a  $1,0 \times 10^5$  até de  $1,0 \times 10^0$  parasito. A placa continha poços com controle negativo da reação, com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi analisada em triplicata (duplicata para *T. cruzi* e unicata para TNF- $\alpha$ ). O programa de termociclagem consistiu em três etapas: (i) aquecimento a 95 °C por 2 minutos; (ii) 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60,0 °C por 1 minuto; (iii) desnaturação inicial a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 30 segundos e resfriamento até 60 °C por 15 segundos (*melting curve stage*). As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp® Optical 96 - Well Reaction Plate (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos - Optical Adhesive Covers (Applied

Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA).

### **5.5.2. Avaliação Sorológica pela ELISA**

Amostras de soro de todos animais sobreviventes foram coletadas 90, 180 e 240 dias pós-tratamento. A reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T.cruzi* foi realizada segundo a metodologia de VOLLER *et al.* (1976) modificada e padronizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP (SANTOS *et al.*, 2012). Para a realização da reação foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com 100µl/poço de antígeno alcalino feito a partir de epimastigotas da cepa Y de *T.cruzi* (5,0µg/mL) diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas *overnight* em geladeira (4° C).

Após o período de incubação, as placas foram lavadas com solução salina contendo Tween-20 a 0,05% (solução de lavagem) para eliminação da solução diluente do antígeno e de seu excesso. A seguir elas foram bloqueadas com solução salina tamponada (PBS) e soro fetal bovino (SFB) na diluição 1:20 e incubadas a 37°C, por 30 minutos. Após esta etapa, elas foram lavadas com a solução de lavagem. A seguir, as placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C com as amostras de soros diluídas em 1:80. Após a incubação, elas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos a 37°C com conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (SIGMA, St. Louis, EUA) em solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween). Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de lavagem e adicionada de solução substrato constituída por orto-fenileno-diamino (OPD), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (volume 30) e tampão citrato-fosfato e incubadas a 37°C, durante 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5M.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (Bio-Rad Model 680 - microplate manager) com filtro a 490nm. As amostras contendo valores de absorvância superiores ao ponto de corte (média das absorvâncias de 10 soros padrões não reativos + 2 vezes o desvio padrão) foram consideradas reativas, e as que apresentaram valores de absorvância abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas. Todas as amostras foram testadas em duplicata, sendo o valor final da absorvância a média da leitura das duplicatas.

### **5.5.3. Critério de Cura**

A avaliação da resposta terapêutica frente ao tratamento com SLB, BZ, e suas associações foi definida como a porcentagem de negatividade simultânea dos resultados

dos métodos de avaliação parasitológicos e sorológico, sendo considerados curados os animais que apresentaram negatificação simultânea de todos os exames realizado (ESF, HC, qPCR em eluato de sangue, qPCR em tecido cardíaco e ELISA). Animais que apresentarem apenas ELISA positiva com queda intensa da reatividade considerados como animais em processo de cura.

#### **5.5.4 Análise estatística**

Os testes *in vitro* foram avaliados por Oneway Anova e múltiplas comparações pelo teste de Dunnet.

Nas avaliações *in vivo*, a parasitemia (PAR), período pré-patente (PPP), o período patente (PP) pico máximo de parasitemia (PMP) e dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) foram analisadas pelo teste Oneway ANOVA com múltiplas comparações pelo teste de Dunns. A área sob a curva (ASC) foi feita por Oneway Anova e múltiplas comparações pelo teste de Tukey. A sobrevida dos animais foi expressa em percentagem cumulativa. As diferenças foram consideradas como significativas quando  $P < 0,05$ .

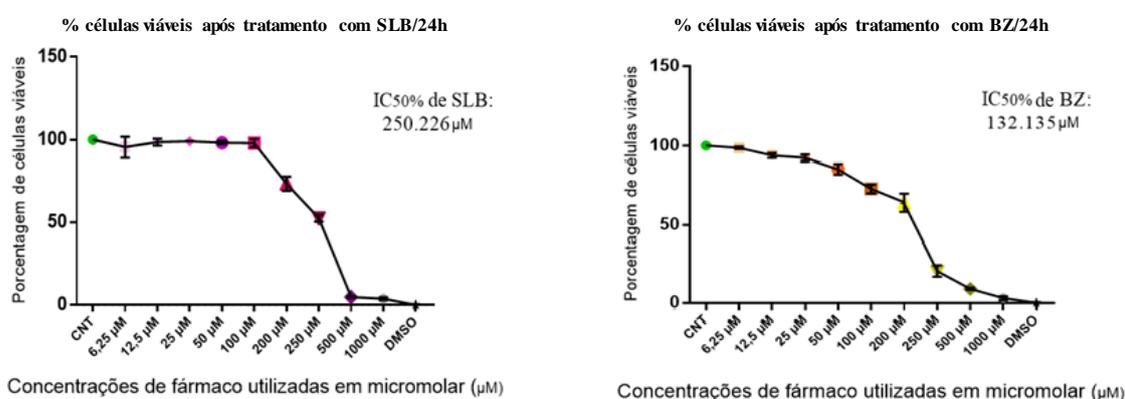
## 6.0. RESULTADOS

### 6.1. Resultados *in vitro*

#### 6.1.1. Ensaio de citotoxicidade em células VERO utilizando o MTT

A SLB nas concentrações de 6,25 a 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 8**) não apresentou diferença significativa de toxicidade para às células VERO. Considerando a avaliação de  $\text{IC}_{50}$  por meio do programa *Compusyn* (Materiais e Métodos, item 5.3.1.1.1) obteve-se o valor de 250.226  $\mu\text{M}$  para SLB e de 132.135  $\mu\text{M}$  para BZ.

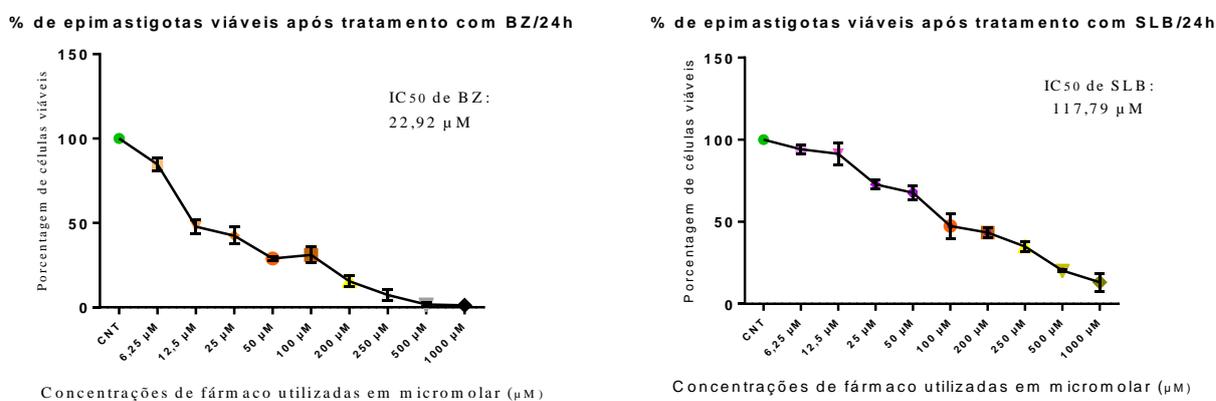
**Figura 8:** Porcentagens de viabilidade celular de células VERO após tratamento com Silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) no ensaio de MTT



#### 6.1.2. Avaliação da atividade anti- *T.cruzi* em formas epimastigota

A avaliação do efeito de SLB sobre as formas epimastigotas (**Figura 9**) demonstrou atividade potencial anti - *T. cruzi* deste composto, com redução significativa da viabilidade de parasitos a partir de 25  $\mu\text{M}$ , enquanto BZ a partir de 12,5  $\mu\text{M}$ .

**Figura 9:** Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com Silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) por ensaio com resazurina.

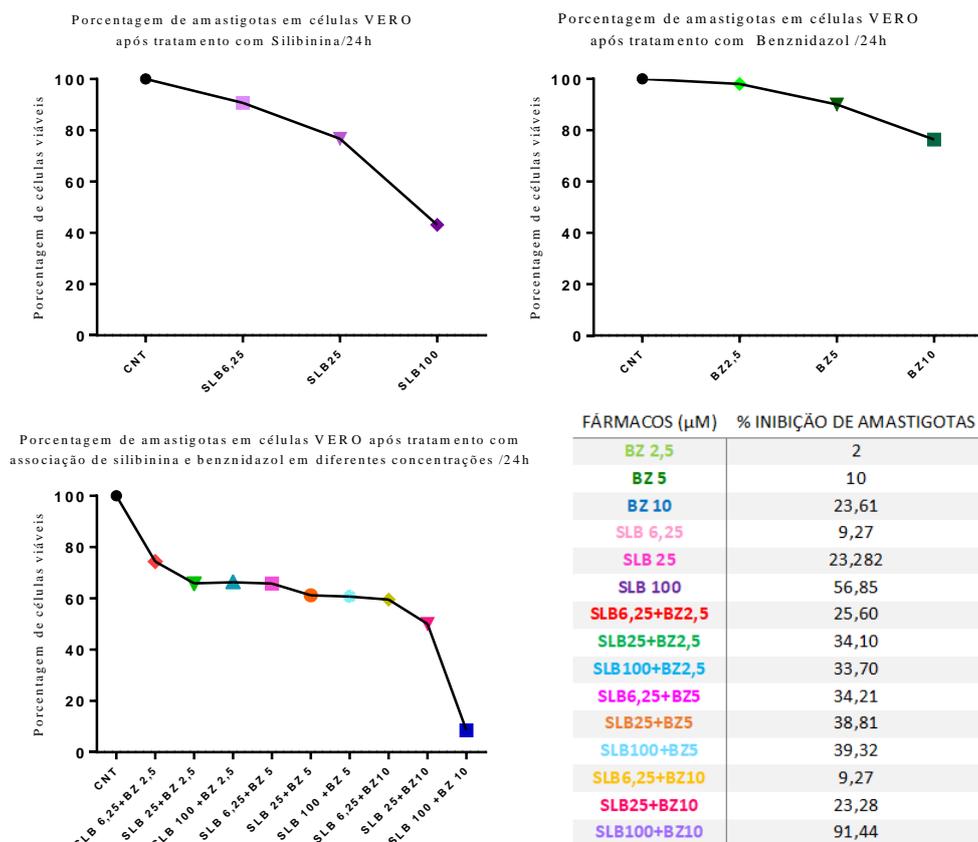


Utilizando do *software Compusyn* foi calculada a redução da viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* e obtido O IC50%. Para a SLB o IC50% foi de 117,79  $\mu\text{M}$ , enquanto para o BZ (**Figura 9**) o IC50% obtido foi de 22,92  $\mu\text{M}$ . Os resultados demonstraram que BZ foi capaz de eliminar maior número de epimastigotas em concentrações menores que SLB.

### 6.1.3. Avaliação anti *T-cruzi* em formas amastigotas em células VERO

A avaliação da atividade da SLB, BZ e as diferentes associações sob células VERO infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* foi estimada pelo cálculo do índice endocítico (IE) (Materiais e Métodos, item 5.3.3) (**Figura 10**). Nas células VERO infectadas e incubadas apenas com meio de cultura (controle infectado não tratado – INT) foi observado um índice de infectividade médio de 42,90%.

**Figura 10:** Índices de inibição da infecção em células VERO com a cepa Y de *Tripanosoma cruzi* após 24 horas de tratamento com silibinina (SLB), benznidazol (BZ) e diferentes associações de SLB e BZ em  $\mu\text{M}$ .



Foi verificado que houve diferença significativa entre os grupos tratados (BZ, SLB ou associações) e o controle não tratado a partir das menores concentrações (6,25 $\mu\text{M}$  para SLB e 2,5 $\mu\text{M}$  para BZ). As concentrações de SLB mais elevadas (100 e 25  $\mu\text{M}$ ) e que

garantiam 99% de sobrevivência das células VERO (segundo ensaio de citotoxicidade, item 6.1.1 em Resultados *in vitro*) induziram uma redução de **56,85** e **23,28** % da infecção celular, respectivamente, quando considerada a porcentagem de inibição do índice endocítico (% de células infectadas x o número de amastigotas/células infectadas). Este resultado foi superior ao encontrado com o BZ que apresentou **23,61%** de inibição da infecção em células VERO em sua maior concentração utilizada (10 µM) que por sua vez garantiu uma média de 99% da viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade.

O ensaio com fármacos associados mostrou que todas as associações foram estatisticamente diferentes em relação a INT. Sendo demonstrado que as menores concentrações de SLB e BZ apresentaram desempenho similar, até 40% de inibição de amastigotas em relação ao INT. A associação de SLB100+BZ10 µM apresentou o melhor resultado, superior às outras associações e aos fármacos SLB e BZ em monoterapia, resultando numa inibição de 91,44% de amastigotas em relação ao INT.

Foram calculados a seguir os índices de seletividade [IS = razão entre a IC50% de inibição da célula obtido pelo teste de citotoxicidade por MTT dividido pelo IC50% obtido de cada composto (SLB e BZ) em amastigotas] após 24 h de incubação.

Conforme detalhado no item **5.3.3.1 (Materiais e Métodos)**, foi calculado o índice de seletividade relativo a SLB e BZ, (**Tabela 1**) revelando maior seletividade do BZ, cerca de 2,5 vezes maior (IS = 7,68) frente a infecção por *T. cruzi* quando comparado à SLB cujo IS = 3,13.

**Tabela 1:** Índice de seletividade de silibinina (SLB) e benznidazol (BZ) oriundos da relação da citotoxicidade (IC50%) e índice de inibição (IE50% da infecção de células VERO com a cepa Y de *Tripanosoma cruzi*.

Fármaco	IC 50% MTT	IE 50% Infecção <i>in vitro</i>	Índice de seletividade
SLB	250,23	79.81	3,13
BZ	132,14	17.19	7,68

Índice de seletividade (IS = IC<sub>50</sub> em MTT / IE<sub>50</sub> em células infectadas); IC: concentração inibitória; IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando-se o software *CompuSyn* ; SLB: Silibinina; BZ: Benznidazol; Os valores foram calculados utilizando a média da triplicata de no mínimo dois experimentos independentes.

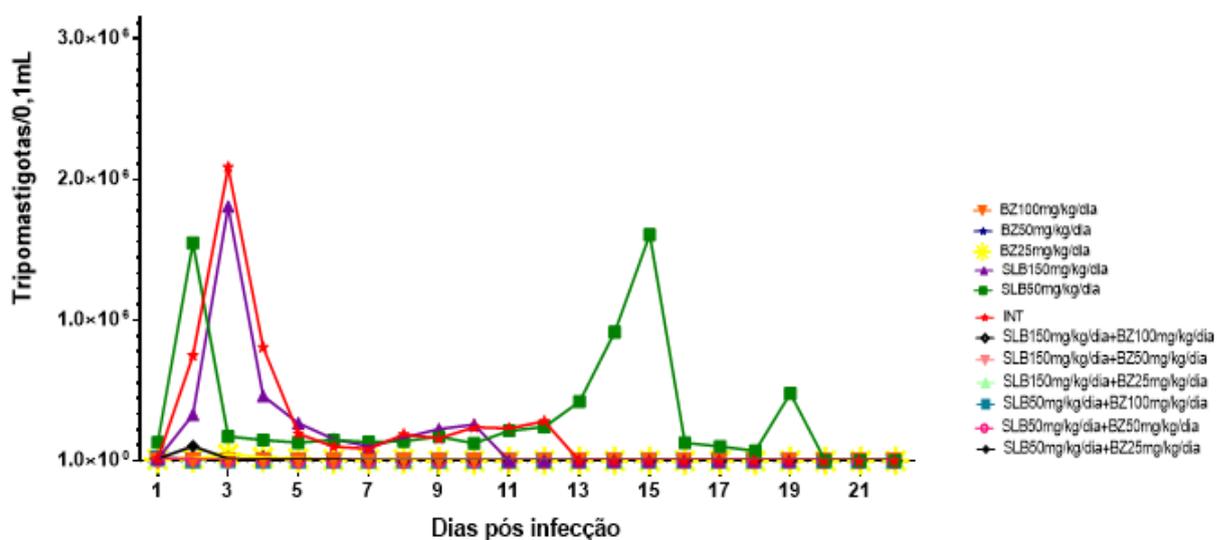
## 6.2. Testes *in vivo*

A seguir estão apresentados os resultados das avaliações da atividade terapêutica da SLB e das associações SLB+BZ em comparação ao tratamento com o BZ, fármaco de referência, e aos controles INT em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

### 6.2.1. Parasitemia e parâmetros derivados da curva de parasitemia

Com os resultados das avaliações diárias da parasitemia foi traçada a curva de parasitemia (**Figura 11**) e avaliados os parâmetros derivados da curva de parasitemia (ASC, PP, PPP, PMP, DPMP).

**Figura 10:** Curva de parasitemia média de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral durante 20 dias consecutivos na fase aguda da infecção



SLB+BZ: gupos infectads e tratados cm associação de fármacos; SLB: grupo de animais infectados e tratados com silibinina; BZ: grupos de animais infectados e tratados com beznidazol; INT: grupo d animais infectados não tratados;DPI: dias pós tratamento

A observação das curvas de parasitemia (**Figura 11**) foi possível verificar que os grupos de animais infectados que receberam tratamentos em associação SLB+BZ (todas as combinações utilizadas) ou de BZ (qualquer das doses empregadas) em monoterapia apresentaram níveis mais baixos de parasitemia, seguidos de sua negatificação. Foi então possível verificar que animais tratados com monoterapia (SLB 50 e SLB 150mg/kg/dia) e animais do grupo INT apresentaram as parasitemias mais elevadas.

A avaliação estatística da ASC (**Tabela 2**) revelou que a redução da parasitemia foi significativa ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com as associações (SLB+BZ em diferentes doses) e nos animais tratados apenas com BZ (em diferentes doses) quando comparadas aos grupos tratados com SLB (50 e 150mg/kg/dia) e controle INT.

**Tabela 2:** Parâmetros derivados da curva de parasitemia de camundongos *Swiss* experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações, via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção

Grupos (ttm mg/kg/dia)	ASC	PP (Dias) $\pm$ DP	PMP ( $\times 10^4$ ) $\pm$ DP	DPMP (Dias) $\pm$ DP
INT <sup>a</sup>	483,6 $\pm$ 234 b/c/d/g/h/i/j/k/l	11,85 $\pm$ 1,21 b/h/i/j/k	185,7 $\pm$ 153 b/i/h/c	7,85 $\pm$ 0,37 b/j
BZ100 <sup>b</sup>	1,067 $\pm$ 1,45 <sup>a/e/f</sup>	1,43 $\pm$ 0,53 <sup>a/e/f</sup>	0,85 $\pm$ 1,21 <sup>a/e/f</sup>	5,57 $\pm$ 0,78 <sup>a/f</sup>
BZ50 <sup>c</sup>	1,63 $\pm$ 4,45 <sup>a/e/f</sup>	2,57 $\pm$ 1,90	2,00 $\pm$ 1,85 <sup>a/c/e/f</sup>	6,57 $\pm$ 1,13
BZ25 <sup>d</sup>	16,5 $\pm$ 10,4 <sup>a/e/f</sup>	7 $\pm$ 4,47	5,88 $\pm$ 5,05	8,0 $\pm$ 2,23
SLB150 <sup>e</sup>	367 $\pm$ 143 b/c/d/g/h/i/j/k/l	9,71 $\pm$ 0,48 <sup>b/j/h</sup>	180,90 $\pm$ 110 <sup>b/c/h</sup>	7,71 $\pm$ 0,48
SLB50 <sup>f</sup>	355 $\pm$ 198 b/c/d/g/h/i/j/k/l	9,85 $\pm$ 3,33 <sup>b/j/h</sup>	155,0 $\pm$ 79,0 <sup>b/c/h/i</sup>	9,71 $\pm$ 4,53 <sup>b/j/h</sup>
SLB150+BZ100 <sup>g</sup>	2,80 $\pm$ 1,17 <sup>a/e/f</sup>	3,33 $\pm$ 2,73	3,37 $\pm$ 2,88	6,14 $\pm$ 1,06
SLB150+BZ50 <sup>h</sup>	0,866 $\pm$ 1,09 <sup>a/e/f</sup>	1,57 $\pm$ 0,78 <sup>a/e/f</sup>	1,48 $\pm$ 1,49 <sup>a/e/f</sup>	5,85 $\pm$ 0,89 <sup>f</sup>
SLB150+BZ25 <sup>i</sup>	2,23 $\pm$ 2,26 <sup>a/e/f</sup>	3,42 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>	1,71 $\pm$ 1,42 <sup>a/e/f</sup>	7,42 $\pm$ 2,76
SLB50+BZ100 <sup>j</sup>	1,46 $\pm$ 1,29 <sup>a/e/f</sup>	1,14 $\pm$ 0,377 <sup>a/e/f</sup>	2,22 $\pm$ 1,79	5,42 $\pm$ 1,13 <sup>a/f</sup>
SLB50+BZ50 <sup>k</sup>	4,26 $\pm$ 4,47 <sup>a/e/f</sup>	2,00 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	2,62 $\pm$ 2,00	6,57 $\pm$ 0,78
SLB50+BZ25 <sup>l</sup>	18,73 $\pm$ 19,40 <sup>a/e/f</sup>	6,28 $\pm$ 5,21	10,91 $\pm$ 15,5	7,28 $\pm$ 1,11

TTm: tratamento; ASC: Area Sob a Curva; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; DP: desvio padrão; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; BZ(mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com benznidazol nas doses descritas na tabela; SLB mg/kg/dia: grupos de animais infectados e tratados com silibinina nas doses descritas na tabela; SLB+BZ mg/kg/dia: grupos de animais infectados e tratados com associação de fármacos silibinina e benznidazol nas doses descritas na tabela; Diferença estatística consideradas quando  $p < 0,05$ . Grupos que apresentaram diferenças estatísticas tem apontados com letras os grupos aos quais foram diferentes.

O PPP, que significa o dia anterior ao primeiro dia de parasitemia patente, foi muito semelhante entre todos os grupos experimentais, 5 dias na maioria, e 6 dias em animais pertencentes ao grupo tratado com BZ100 mg/kg/dia.

O PP que representa o período no qual foi encontrado parasitos na corrente sanguínea observados no ESF, apresentou diferença estatística entre os grupos de animais tratados com BZ100, SLB150+BZ50, SLB50+BZ100 mg/kg/dia (menores PP) em relação aos grupos tratados com SLB150 e SLB50 mg/kg/dia e INT e em relação aos tratados com SLB150 e SLB50 mg/kg/dia, que por sua vez não foram diferentes do grupo INT que apresentou o maior PP. O grupo de animais tratados com SLB150+BZ25 mg/kg/dia também apresentou diferença estatística em relação ao grupo INT. Os grupos de animais infectados tratados com SLB50 e SLB150 foram significativamente diferentes

dos grupos de animais tratados com BZ100, SLB150+BZ50 e SLB50+BZ50 mg/kg/dia. Os demais grupos de animais, BZ50, BZ25, SLB150+BZ100 e SLB50+BZ25 mg/kg/dia não apresentaram diferença estatística de PP em relação aos demais grupos.

Em relação ao parâmetro PMP o tratamento dos animais com BZ100 mg/kg/dia apresentou a maior diferença estatística em relação ao grupo controle INT, mas o tratamento com BZ50 mg/kg/dia e as combinações SLB150+BZ50 mg/kg/dia e SLB150+BZ25 mg/kg/dia também apresentaram diferença significativa no PMP em relação ao grupo INT. Os demais grupos, BZ25, SLB150+BZ100, SLB50+BZ100, SLB50+BZ50, SLB50+BZ25 não apresentaram diferença estatística neste parâmetro em relação ao grupo controle.

Em relação ao parâmetro DPMP houve diferença estatística entre o grupo de animais tratados com BZ100 mg/kg/dia e o grupo INT e os tratados com SLB50 mg/kg/dia. Houve também diferença estatística entre o grupo de animais tratados com SLB50+BZ100 mg/kg/dia e os grupos de animais INT e SLB50 mg/kg/dia. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre si e o grupo INT. O grupo SLB 150+BZ50 mg/kg/dia apresentou diferença estatística em relação ao grupo SLB50 mg/kg/dia.

### **6.2.2. Hemocultura**

Na avaliação das amostras de sangue coletadas para hemocultura (**Tabela 4**) foi observado na primeira coleta (90 d.p.t) maior positividade geral, com três grupos tratados com associação farmacológica (SLB150+BZ50; SLB50+BZ50 e SLB50+BZ25), revelando falha terapêutica neste momento, enquanto os demais grupos de animais tratados apresentaram HC negativa. Aos 180 d.p.t nenhum animal de qualquer grupo apresentou positividade na HC. Aos 240 d.p.t, leitura até 30 dias pós coleta, foi observada negatividade em 100% dos animais dos grupos de camundongos infectados e tratados, exceto no grupo de animais tratados com SLB50+BZ25 mg/kg/dia, no qual a negatividade da hemocultura foi de 87,5%. De forma geral estes resultados em conjunto já sugerem a possibilidade de cura nos animais tratados com várias das associações SBL+BZ e ainda nos tratados com BZ isoladamente.

**Tabela 3:** Avaliação da hemocultura de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção

Grupos (ttm em mg/kg/dia)	Negatividade de HC 90 d.p.t	Negatividade de HC 180 d.p.t	Negatividade de HC 240 d.p.t
INT	ND	ND	ND
SLB50	ND	ND	ND
SLB150	ND	ND	ND
BZ100	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
BZ50	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
BZ25	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB150 + BZ 100	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB150 + BZ 50	85,71% (4/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB150 + BZ 25	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB50 + BZ 100	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB50 + BZ 50	57,14% (4/7)	100% (7/7)	100% (7/7)
SLB50 + BZ 25	85,71% (6/7)	100 (7/7)	87,5% (6/7)

BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB: grupos de animais infectados e tratados com silibinina em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB +BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; HC: hemocultura; d.p.t: dias pós tratamento; Ttm: tratamento

### 6.2.3. Avaliação molecular por qPCR em eluato de sangue

Os resultados obtidos pela reação de qPCR (**Tabela 6**) no eluato de sangue dos animais na avaliação de 90 d.p.t. mostrou que os grupos de animais tratados com BZ100, SLB50+BZ100, SLB150+BZ100 mg/kg/dia foram 100% negativos. Os animais tratados com SLB150+BZ50 e SLB150+BZ25 mg/kg/dia foram 85,71% negativos, e os animais tratados com BZ25, SLB50+BZ50, SLB50+BZ25 mg/kg/dia foram 57,14% negativos nesta avaliação. Aos 180 d.p.t os animais tratados com SLB50+BZ50 mg/kg/dia apresentaram piores resultados, com 57,1% de negatividade na qPCR. Já os grupos SLB150+BZ50, SLB50+BZ50 mg/kg/dia e BZ em diferentes doses apresentaram 71,42% de negatividade, enquanto animais tratados com SLB150+BZ100, SLB150+BZ25 e SLB50+BZ100 mg/kg/dia apresentaram maior negatividade da qPCR aos 180 d.p.t, com 85,71% de negatividade.

A avaliação final aos 240 d.pt mostrou que os grupos tratados em com a associação de fármacos ou monoterapia de BZ apresentaram resultados negativos na avaliação de

qPCR. Apenas os grupos tratados com BZ100, BZ100+SLB150 e BZ25+SLB50 apresentaram resultado indicando presença de DNA de *T. cruzi* em alguns animais.

De maneira geral foi possível observar que ao longo do tempo de avaliação (90, 180 e 240 d.p.t) as porcentagens de negatização pelo método qPCR de eluato sanguíneo aumentaram, exceto por SLB150+BZ100 que apresentou queda de negatividade (de 100% negativo a 85,71%) e BZ100 mg/kg/dia que teve uma queda maior na porcentagem de negatização (de 100% negativo a 71,42%).

**Tabela 4:** Avaliação de qPCR em sangue de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção

Grupos (ttm em mg/kg/dia)	Negatividade de qPCR		
	90 d.p.t	180 d.p.t	240 d.p.t
INT	ND	ND	ND
SLB50	ND	ND	ND
SLB150	ND	ND	ND
BZ100	100% (7/7)	71,42% (5/7)	71,42% (5/7)
BZ50	71,42% (5/7)	71,42% (5/7)	100% (7/7)
BZ25	57,14% (4/7)	71,42% (5/7)	100% (7/7)
SLB150+BZ100	100% (7/7)	85,71% (6/7)	85,71% (6/7)
SLB150+BZ50	85,71% (6/7)	71,42% (5/7)	100% (7/7)
SLB150+BZ25	85,71% (6/7)	85,71% (6/7)	100% (7/7)
SLB50+BZ100	100% (7/7)	85,71% (6/7)	100% (7/7)
SLB50+BZ50	57,14% (4/7)	57,1% (4/7)	100% (7/7)
SLB50+BZ25	57,14% (4/7)	71,42% (5/7)	85,71% (6/7)

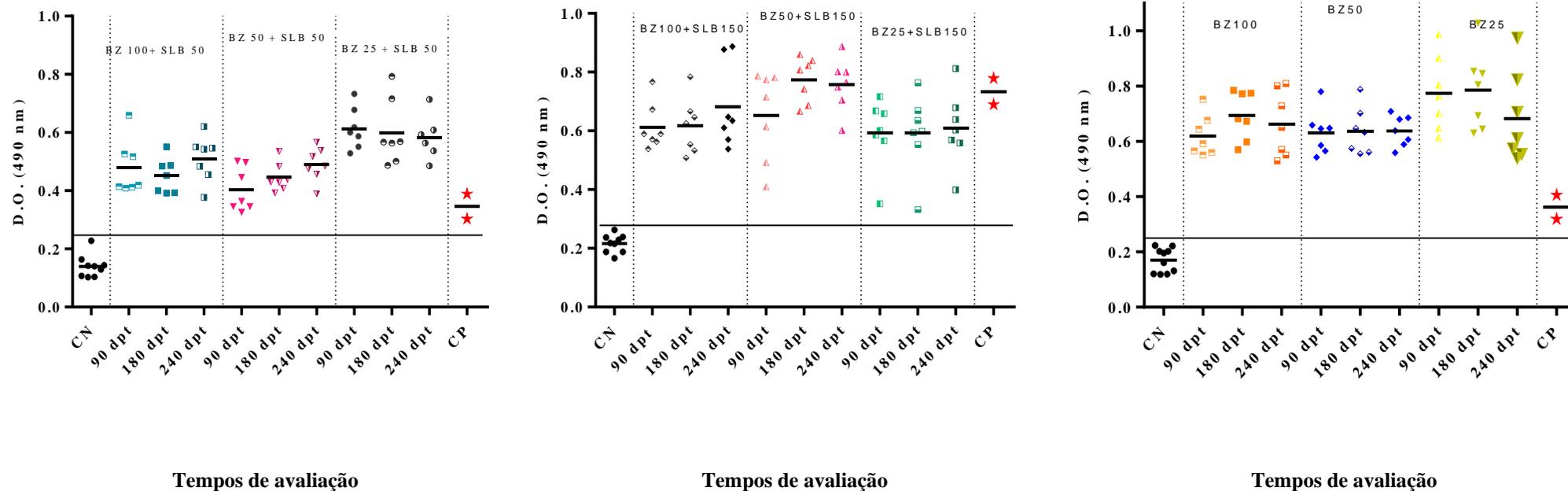
ttm: tratamento ; qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*; d.p.t: dias pós tratamento; BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB: grupos de animais infectados e tratados com silibinina em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB +BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas na tabela em mg/kg/dia.

É importante ressaltar que a quantificação pela qPCR sanguínea apresentou carga de DNA de *T. cruzi* muito baixa em todos os animais positivos (cerca de 1 parasito/ uL de sangue).

#### 6.2.4. Sorologia

Os resultados da análise da sorologia dos animais pelo método ELISA nos tempos de 90, 180 e 240 d.p.t. estão apresentados na **Figura 11** em três gráficos relativos às associações de BZ+SLB e BZ em monoterapia, nas diferentes doses avaliadas.

**Figura 11:** Gráficos de dispersão de absorvância relativos à sorologia convencional (ELISA) em amostras de soro de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos



CN: controle negativo da reação; BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB+BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; d.p.t: dias pós tratamento; D.O.: densidade ótica; CP: controle positivo da reação.

Apesar das diferenças visíveis quanto a D.O., proporcional à quantidade de IgG presente no soro dos animais, ao se analisar estatisticamente os grupos, essas diferenças não foram significativas entre os grupos de animais infectados e tratados.

### 6.2.5. Avaliação molecular por qPCR em tecido cardíaco

A avaliação do parasitismo em tecido cardíaco (**Tabela 5**) pelo método de qPCR revelou ausência de material genético de nDNA de *T.cruzi* em todos os animais tratados com associação de fármacos ou monoterapia de BZ, com exceção dos grupos BZ25, SLB150+BZ100 e SLB50+BZ25, nos quais apenas um animal de cada um deles apresentou positividade na qPCR.

**Tabela 5:** Avaliação de qPCR em tecido cardíaco de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção

Infecção	Grupo Experimental	Negatividade de qPCR
Cepa Y de <i>T.cruzi</i>	INT	ND
	SLB50	ND
	SLB150	ND
	BZ100	100% (7/7)
	BZ50	100% (7/7)
	BZ25	85,71% (6/7)
	SLB50+BZ100	100% (7/7)
	SLB150+BZ100	85,71% (6/7)
	SLB50+BZ50	100% (7/7)
	SLB150+BZ50	100% (7/7)
	SLB50+BZ25	85,71% (6/7)
	SLB150+BZ25	100% (7/7)

Legenda: ttm: tratamento ; qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*; d.p.t: dias pós tratamento; BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB: grupos de animais infectados e tratados com silibinina em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB+BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas na tabela em mg/kg/dia

Mais uma vez, e como comentado em relação a qPCR em eluato de sangue, é importante ressaltar que a carga da qPCR sanguínea foi muito baixa em todos os animais positivos (média de 10 parasitos/ng de tecido).

### 6.2.6 Sobrevida

Foi observada sobrevida de 100% nos animais tratados com as associações de fármacos e com as monoterapias de benznidazol até 240 d.p.t. Os animais INT e tratados com monoterapia de SLB (50 e 150 mg/kg/dia) não sobreviveram (**Tabela 6**) até o final dos experimentos.

Animais do grupo INT apresentaram mortalidade a partir do 13º d.p.i., e o último animal morreu no 17º d.p.i.

Animais do grupo tratado com SLB50 mg/kg/dia apresentaram mortalidade a partir do 12º d.p.i, e últimos animais pertencentes a este grupo morreram até o 20º d.p.t.

Animais do grupo tratado com SLB150 mg/kg/dia apresentaram mortalidade a partir do 13º d.p.i e os últimos animais pertencentes a este grupo morreram no 14º d.p.t.

Foi demonstrado que SLB não protegeu os animais da mortalidade por *T. cruzi*.

**Tabela 6:** Sobrevida pós infecção de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral durante 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção avaliados por 260 d.p.i.

Infecção	Grupo Experimental	Sobrevida
Cepa Y de <i>T.cruzi</i>	INT	0%
	SLB50	0%
	SLB 150	0%
	BZ100	100%
	BZ50	100%
	BZ25	100%
	SLB50+BZ100	100%
	SLB150+BZ100	100%
	SLB50+BZ50	100%
	SLB150+BZ50	100%
	SLB50+BZ25	100%
	SLB150+BZ25	100%

Legenda: INT: infectado não tratado; SLB: silibinina em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB +BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas no gráfico em mg/kg/dia.

### 6.3. Visão geral dos resultados de avaliação pós-tratamento

A **Tabela 7** mostra o conjunto de resultados das avaliações pós-tratamento de todos os grupos experimentais avaliados no ensaio *in vivo*.

**Tabela 7:** Resultado global da avaliação aos 240 dias pós-tratamento de camundongos infectados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com silibinina, benznidazol e suas associações por via oral, 20 dias consecutivos, durante a fase aguda da infecção

Infecção	Grupo Experimental	Sobrevida	Negatividade dos testes laboratoriais				Cura
			HC	ELISA	qPCR sangue	qPCR tecido cardíaco	
Cepa Y	INT	0%	ND	ND	ND	ND	ND
	SLB50	0%	ND	ND	ND	ND	ND
	SLB150	0%	ND	ND	ND	ND	ND
	BZ100	100%	100%	0%	71,42%	100%	0%
	BZ50	100%	100%	0%	100%	100%	0%
	BZ25	100%	100%	0%	100%	85,71%	0%
	SLB50+BZ100	100%	100%	0%	100%	100%	0%
	SLB150+BZ100	100%	100%	0%	85,71%	85,71%	0%
	SLB50+BZ50	100%	100%	0%	100%	100%	0%
	SLB150+BZ50	100%	100%	0%	100%	100%	0%
	SLB50+BZ25	100%	85,71%	0%	85,71%	85,71%	0%
	SLB150+BZ25	100%	100%	0%	100%	100%	0%

ttm: tratamento ; HC: hemocultura; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*; d.p.t: dias pós tratamento; BZ: grupo infectado tratado com benznidazol em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB: grupos de animais infectados e tratados com silibinina em doses descritas na tabela em mg/kg/dia; SLB +BZ: grupo infectado tratado com a associação de fármacos em doses descritas na tabela em mg/kg/dia

Os resultados gerais do estudo *in vivo* (**Tabela 7**) demonstraram que o produto natural silibinina não foi capaz de *in vivo* apresentar confirmação da atividade em *T. cruzi* observada *in vitro* (item **6.1 Resultados in vitro**), ou seja, não foi capaz de diminuir a infecção ou mesmo erradicá-la e nem mesmo proteger os animais da mortalidade causada pela cepa do parasito em estudo. Porém, o efeito positivo da associação de

BZ+SLB verificado *in vitro*, foi novamente observado parcialmente *in vivo*, com diminuição de parasitos acessada pelo ESF, HC, ou da carga parasitaria acessada pela qPCR de eluato sanguíneo e de tecido cardíaco, o que também foi observado nos animais tratados com BZ.

A avaliação da eficácia terapêutica segundo o critério de cura clássico (PINTO DIAS et al., 2016b) revelou que, apesar de diversos animais nos grupos tratados com associação de fármacos apresentarem todas as avaliações parasitológicas (inclusive qPCR de tecido cardíaco) com resultado negativo por sucessivas vezes, a sorologia (ELISA) permaneceu positiva, indicando ausência de cura em todos os animais.

Ainda assim, observamos que a taxa de negatificação simultânea dos exames parasitológicos alcançaram 100% nos grupos de animais tratados com associação de fármacos (SLB50+BZ100; SLB50+BZ50; SLB150+BZ50; SLB150+BZ25 mg/kg/dia) e em monoterapia de BZ (BZ50 mg/kg/dia). Por outro lado outros grupos de animais tratados com SLB150+BZ 100, SLB50+BZ25 e BZ25 apresentaram valores de 85,71% de negatividade nos exames parasitológicos, enquanto os animais tratados com BZ100 mg/kg/dia apresentaram a menor taxa de cura, de 71,42%, porém essas diferenças não foram relevantes (diferença de 1/7 animal por grupo) e não foram distintas estatisticamente.

## 7.0. Discussão

A doença de Chagas após 110 anos de sua descoberta por Carlos Chagas (1909) permanece um desafio em termos de tratamento e assistência clínica dos pacientes afetados. No Brasil, somente em 2018 o Ministério da Saúde Brasileiro avançou na questão acompanhamento e tratamento da DC ao aprovar o primeiro Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas (CONITEC; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), mas mantém o BZ como o único fármaco para o tratamento desta enfermidade.

O benznidazol apesar de ser o único fármaco efetivo utilizado em nosso país, permanece aquém do necessário para o sucesso terapêutico. Vários aspectos afetam sua eficácia completa tais como a diversidade biológica do parasito (TIBAYRENC; AYALA, 1988; TOLEDO et al., 2002; ZINGALES, 2017) e resistência natural de muitas cepas deste parasito aos fármacos disponíveis (BRENER; COSTA; CHIARI, 1976; FILARDI; BRENER, 1987; ANDRADE; MAGALHÃES, 1997; DE LANA et al., 1998; REVOLLO et al., 1998; TOLEDO et al., 2003; DA COSTA et al., 2018). Além disso o momento em que se diagnostica e se inicia o tratamento da doença com o benznidazol é crucial para a sua eficácia, pois este fármaco se administrado na fase aguda recente (até dois anos) pode eliminar a infecção em até 100% dos casos (WHO, 2018), sua eficácia é também elevada na fase crônica recente (até 12 a 14 anos de infecção) (ANDRADE et al., 1996), mas não é capaz de exercer a mesma efetividade de cura em todos os pacientes na fase crônica tardia, que é o período quando a maioria dos casos é diagnosticada (TELLERIA; TIBAYRENC, 2017). O não oferecimento de tratamento à maioria dos pacientes na fase aguda se deve à ausência dos sinais ou sintomas específicos da doença chamados de Sinal de Romaña (ROMAÑA, 1935) ou chagoma de inoculação (MAZZA e FREIRE, 1940), e por que a maioria dos pacientes é assintomática ou oligosintomática nesta fase da doença (PRATA, 2001).

A questão do oferecimento do tratamento na fase crônica tardia da infecção é ainda muito mais complexa e polêmica. Não existe um consenso absoluto sobre seus reais benefícios para o paciente fato este que desestimula o clínico a oferece-lo aos pacientes nesta fase da doença (VIOTTI et al., 2014). Entretanto, há relatos na literatura demonstrando eficácia terapêutica e melhoria do prognóstico em pacientes tratados na fase crônica da doença, mesmo se não curados parasitologicamente (VIOTTI et al., 2006; DE LANA et al., 2009; MACHADO-DE-ASSIS et al., 2013). Por essa razão novas

avaliações dos pacientes envolvidos no projeto BENEFIT (MARIN-NETO et al., 2008; ANTONIO MARIN-NETO et al., 2009; RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017) serão fundamentais para maiores conclusões sobre este aspecto.

Somado aos problemas relativos a natureza do parasito e da doença de Chagas em si, há questões quanto ao perfil inadequado de segurança e tolerabilidade por parte do paciente (COURA; DE CASTRO, 2002). As doses padronizadas e utilizadas até então causam consideráveis efeitos adversos, e levam muitas vezes à descontinuação do tratamento.

Considerando o exposto, somado a ausência de medidas profiláticas farmacológicas (como coquetel ou fármaco preventivo para moradores e visitantes de áreas endêmicas) ou biológicas (como vacinas) (DURAN-REHBEIN et al., 2014), além da existência de diversos outros mecanismos de infecção, e a presença da DC endêmica em 21 países das Américas (WHO, 2017), e em diversos países de outros continentes como Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS; YADON, 2010), há necessidade de identificar estratégias terapêuticas que sejam mais eficazes e de maior segurança para o tratamento da infecção por *T. cruzi* (URBINA, 2010).

Ao longo dos anos vários estudos (COURA; DE CASTRO, 2002; GARCIA et al., 2005; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2006; JACKSON et al., 2010) tem demonstrado que a ineficácia dos tratamentos usuais com BZ e NF bem como de outras opções terapêuticas em estudo não se deve apenas à não ação dos fármacos sobre o parasito, mas a problemas relativos a sua a sua toxicidade (que leva a descontinuidade do tratamento), à não promoção de cura parasitológica em casos crônicos tardios, ao adotar esquema terapêutico longo e o fato do acesso ao tratamento não ser de fácil (COURA; DE CASTRO, 2002), o que em conjunto impede seu uso por tempo ainda maior, o que poderia exaurir completamente as formas sanguíneas do parasito (tripomastigotas) ou atingir seu estágio intracelular (as formas amastigotas) sem causar danos ao hospedeiro (efeitos adversos).

Além disso, é conhecido que muitas moléculas de superfície celular e complexos mecanismos intracelulares possibilitam que o *T. cruzi* escape da ação de fármacos, como proteínas de efluxo Pgp, e por fim prevaleça realizando seu ciclo replicativo no interior das células hospedeiras (MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012; CAMPOS et al., 2013).

As diversas descobertas no campo da parasitologia, biologia molecular e farmacologia passaram a motivar as pesquisas de terapias para a DC, e diversas propostas surgiram, como o reposicionamento de fármacos (BELLERA,2015), busca por novos fármacos entre produtos naturais (APT,2010), associação de fármacos (COURA,2009), entre outras.

A descoberta de novos fármacos é um campo vasto, com longo percurso até alcançar o paciente e ser usado efetivamente como uma forma de tratamento. Um novo fármaco pode ter origem natural ou ser derivado de síntese. Sendo os produtos de origem natural correspondentes a 11% dos 252 fármacos considerados essenciais e básicos pela OMS (VEERESHAM, 2012), e constituem hoje as grandes promessas de cura para diferentes enfermidades.

A associação de fármacos por sua vez é uma das estratégias utilizada em outras doenças parasitárias que já levou ao controle e melhoria no prognóstico da DC (WHO, 2001). A associação farmacológica tem sido proposta, pois produz maiores índices de cura, menor tempo de tratamento e menos efeitos adversos (BARRETT; CROFT, 2012; MARTINS et al., 2015).

Assim, neste estudo, buscamos avaliar um produto natural, a SLB, isolada e combinada ao fármaco padrão BZ, explorando a estratégia de associação de fármacos.

A SLB por sua ação antifúngica, promovendo poros na membrana deste micro-organismo, poderia apresentar atividade sobre *T.cruzi*, da mesma forma como ocorre com os antifúngicos da classe dos inibidores da síntese do ergosterol (itraconazol, cetoconazol, posaconazol, etc). Além disso, a SLB com sua capacidade de inibição da Pgp (ZHANG; MORRIS, 2003; LEE; CHOI, 2010) poderia permitir que o BZ seja eliminado mais lentamente, permanecendo mais tempo na circulação, exercendo assim maior atividade terapêutica, e assim permitir a redução da dose usual empregada que causa efeitos adversos graves, especialmente quando atinge concentrações plasmáticas elevadas (>20 mg/litro) (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979; COURA; DE CASTRO, 2002; PINAZO et al., 2010). Somado a isso, a SLB poderia também inibir a proteína de efluxo presente na membrana do parasito, a Pgp (CAMPOS et al., 2013), permitindo que o fármaco BZ permaneça no interior celular e leve à morte do *T. cruzi* com maior eficiência. Somado a essas possibilidades, a SLB possui ainda atividade anti-inflamatória

(ABASCAL; YARNELL, 2003a; AHMED AZIZ et al., 2014), que pode contribuir para a melhora das lesões teciduais causadas pelo *T. cruzi*.

Para iniciar o estudo foi feita a avaliação *in vitro* de toxicidade da silibinina sobre células VERO, e assim verificar o nível de segurança da ação do fármaco sobre as células e obter parâmetros para traçar as doses a serem utilizadas na avaliação de atividade sobre formas amastigotas. Em paralelo foi realizada a avaliação das mesmas concentrações do fármaco de referência, o BZ. Assim, foi obtido o IC50% de 250,226 $\mu$ M para a SLB e de 132,135 $\mu$ M para o BZ, mostrando que a SLB foi quase 2x menos tóxica que o BZ para as células VERO.

Vários trabalhos avaliam a viabilidade celular ao trabalhar com SLB, mas nem todos apontam os valores de IC50%. Elhag e colaboradores (2015), por exemplo, trazem diversos valores de IC50% da SLB, variando de acordo com a linhagem celular testada, como 40  $\mu$ M para a linhagem A127 e 200  $\mu$ M para LN229. O IC50 encontrado neste nosso estudo foi superior ao do grupo de Elhag em outras linhagens celulares.

Já ao considerar a viabilidade celular como um todo, e lembrando que no ensaio aqui realizado as células VERO estavam 100% viáveis até a concentração de 100  $\mu$ M de SLB após 24h, os dados obtidos se assemelham com outros da literatura. No artigo de De Oliveira e colaboradores (2017), a diminuição de viabilidade celular só foi observada após 48h na concentração de 150  $\mu$ M de SLB, utilizando células *T24* com ensaio por XTT. Yang e colaboradores (2003) mantiveram 80% da viabilidade de células endoteliais humanas *EA.hy 926* tratadas com 220  $\mu$ M de SLB após 24h de exposição ao fármaco. Já Kauntz e colaboradores (2013) utilizando linhagens SW480 e SW620 ao avaliarem morte celular induzida por SLB utilizando a técnica em citômetro de fluxo, observaram sobrevivência de pouco mais de 90% das células quando tratadas com a concentração de 300  $\mu$ M deste composto. Podemos observar que os valores encontrados nos diferentes trabalhos divergem, o que pode ser explicado pelas diferenças nas linhagens celulares, método de avaliação e instrumentação empregados.

Outros trabalhos na literatura (ENTEZARI; MOKHTARI; HASHEMI, 2011; AKHTAR et al., 2014; BOOJAR et al., 2016; TALBOTT, 2017) realizaram avaliação de citotoxicidade da SBL e cálculo de IC50, porém utilizando outra unidade de concentração, em  $\mu$ g/mL, que variaram de 0 a 1600  $\mu$ g/mL e encontrando taxas de viabilidade celular de 80 a 100%.

Quanto ao cálculo de IC<sub>50</sub>, os valores encontrados nestes trabalhos (ENTEZARI; MOKHTARI; HASHEMI, 2011; AKHTAR et al., 2014; BOOJAR et al., 2016; TALBOTT, 2017) não são comparáveis aos aqui encontrados, uma vez que o cálculo de IC<sub>50</sub> envolveu uma varredura que demonstrou os efeitos do princípio ativo em diferentes concentrações (6,25µM a 1000µM), o que gerou grande mortalidade celular, de maneira a tornar possível o cálculo adequado de IC<sub>50</sub>. Sendo 1 µM de SLB equivalente a 482,3 µg/mL, a maioria dos trabalhos (ENTEZARI; MOKHTARI; HASHEMI, 2011; AKHTAR et al., 2014; BOOJAR et al., 2016; TALBOTT, 2017) que utilizaram concentrações em µg/mL nem sequer atingiram a menor das concentrações ensaiadas em nosso estudo (6,25µM).

Após o experimento de citotoxicidade a próxima etapa foi avaliar se de fato a SLB teria ação sobre parasitos *in vitro*. Para isso foi utilizado um isolado da cepa Y de *T. cruzi* de escolha para ensaios *in vivo* (ROMANHA et al., 2010).

A cepa Y de *T. cruzi* é uma cepa do grupo genético TcII, delgada, de alta infectividade, que se multiplica com facilidade em meio LIT, mas que não apresenta grande taxa de diferenciação em tripomastigotas em meio GRACE (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001). Devido a esta dificuldade de obter tripomastigotas na quantidade necessária para os testes com ambos os compostos, SBL e BZ, e nas diversas concentrações avaliadas, optamos por realizar o ensaio sobre formas epimastigotas, à semelhança de diversos trabalhos que avaliaram atividade tripanocida de vários compostos (LUNA et al., 2009; MORENO et al., 2010; MOREIRA et al., 2013; FONSECA-BERZAL et al., 2018; LOURENÇO et al., 2018).

Nesse trabalho a escolha foi pelo método colorimétrico com a resazurina, que já foi validado em estudo para avaliação da sensibilidade de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei* a outros compostos (ROLÓN et al., 2006), mostrando alta correlação com outras metodologias, como o MTT, e que vem sendo empregado em diversos trabalhos da literatura em *screenings* de drogas com atividade tripanocida (ROLÓN et al., 2006; SYKES; AVERY, 2015; UENO et al., 2018).

Os resultado aqui encontrados na avaliação da atividade anti *T. cruzi* sobre formas epimastigotas da cepa Y gerou um valor de IC<sub>50</sub>% de 117,79 µM para SLB, um dado inédito, uma vez que a literatura não traz avaliação da SLB sobre qualquer forma evolutiva de *T. cruzi*. Já o resultado encontrado para o IC<sub>50</sub>% de BZ foi de 22,92 µM, um valor maior que o encontrado em alguns trabalhos da literatura que utilizaram a cepa Y.

Estes trabalhos encontraram IC50% de 12  $\mu\text{M}$  (SÜLSEN et al., 2006); 20.35 $\pm$ 3.04  $\mu\text{M}$  (LUNA et al., 2009); 16,3  $\mu\text{M}$  (MORENO et al., 2010), 9 $\mu\text{g/mL}$  (MOREIRA et al., 2013).

A diferença de resultados encontradas pode ser explicada pelos métodos utilizados na avaliação da atividade dos compostos, que em sua maioria (exceto no trabalho de Moreira e colaboradores (2013) que utilizou MTT), fez contagem manual dos parasitos em câmara de Neubauer. No trabalho aqui apresentado a quantificação foi indireta por meio de método colorimétrico (D.O.) com resazurina. De toda forma, o resultado obtido com SLB, demonstrando sua atividade frente a formas epimastigotas da cepa Y, motivou a condução das demais etapas do projeto.

Partindo do experimento de citotoxicidade foram definidas as concentrações de SLB a serem utilizadas no ensaio em células infectadas com o *T. cruzi* (forma amastigota). A opção foi utilizar as maiores concentrações que mantivessem 100% da viabilidade celular. Assim, confirmamos a atividade da SLB em *T. cruzi*, obtendo redução de 56,85% (utilizando concentração de 100 $\mu\text{M}$ ) e de 23,28% (utilizando a concentração de 25 $\mu\text{M}$ ) dos parasitos em células VERO. Utilizando BZ em sua maior concentração que mantinha viabilidade de 100% das células (10 $\mu\text{M}$ ), a porcentagem de redução da infecção foi de apenas 23,61%, o mesmo observado com a concentração de 25 $\mu\text{M}$  de SLB. Este resultado também motivou a continuidade do estudo *in vivo*.

Foi concluído que o BZ frente a SLB foi mais ativo sobre as formas amastigotas em concentração 2,5 vezes menor (10  $\mu\text{M}$  de BZ, frente a 25  $\mu\text{M}$  de SLB). O melhor resultado obtido foi proveniente da associação de fármacos SLB100+BZ10  $\mu\text{M}$  quando foi observada uma inibição da infecção celular superior a 90%. Esse resultado sugeriu que a hipótese de efeito combinado de ambos os compostos foi corroborada, o que foi a seguir avaliado nos ensaios *in vivo*.

No estudo *in vivo* em camundongos *Swiss* fêmea com o isolado da cepa Y resistente ao BZ optamos por avaliar 3 doses de BZ: a usual (100mg/kg/dia), 50 e 25mg/kg/dia associadas a SLB. Já para a SLB a decisão de posologia foi baseada na literatura, sendo testada a maior dose segura encontrada e utilizada em camundongos (150mg/kg/dia) segundo Yan et al. (2015) e outra dose 3x menor (50mg/kg/dia).

O que foi visto de uma maneira geral é que a SLB isoladamente não foi capaz de reproduzir o efeito tripanocida observado *in vitro* sobre as formas epimastigotas e

amastigotas. Os animais pertencentes aos grupos tratados com SLB isolada apresentaram valores similares de parasitemia ao dos animais controle INT (infectados e não tratados), não havendo diferença estatística entre eles. Porém os animais tratados com SLB50mg/kg/dia tiveram sobrevida maior (dados não mostrados). Este resultado foi intrigante, pois o que se esperava era que a sobrevida fosse maior e a parasitemia menor nos animais tratados com maior dose de SLB (150 mg/kg/dia), o que não aconteceu.

A literatura revela que uma das ações da SLB, a ação anti-inflamatória, se dá por sua inibição do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB). O NF-kB é responsável pela transcrição de genes relacionados com a inflamação e considerado como um dos principais reguladores das respostas imunes inata e adaptativa na infecção murina com *T. cruzi* (BONIZZI; KARIN, 2004). Assim, essa inibição quando exacerbada (como possivelmente observado com a maior dose de SLB (150mg/kg/dia), ao modular a resposta inflamatória, ela poderia alterar a correta ativação do sistema imune, comprometendo assim os passos essenciais à montagem de uma resposta imune efetiva, tanto inata quanto adaptativa, à infecção por *T. cruzi*, favorecendo a infecção que prevaleceria sendo mais elevada na ausência de outro fármaco ativo contra este parasito.

Todos os outros grupos de animais apresentaram diferença estatística na parasitemia em relação ao grupo INT, mostrando que as diferentes doses de monoterapia de BZ ou associadas a SLB foram capazes de suprimir a parasitemia inicial. Isso levaria a questionar se SLB realmente exerceu algum efeito sobre a parasitemia em associação a BZ, como visto *in vitro*. Para tanto, as contínuas avaliações pós-tratamento ajudaram a esclarecer esta questão.

Pudemos observar que a parasitemia dos animais foi rapidamente supressa mesmo com o tratamento em doses mínimas de BZ (25 mg/kg/dia) associadas a SLB 50 ou 150 mg/kg/dia. Além disso os animais tratados com associações de BZ a SLB 50mg/kg/dia tiveram 100% de negatificação em suas avaliações parasitológicas (HC) e moleculares (qPCR) em eluato de sangue. Já nas avaliações parasitológicas e moleculares de todos os grupos de animais tratados com BZ (em diferentes doses) associado a SLB 150mg/kg/dia houve em média 95,23% de negatificação.

Assim, é possível dizer que houve ganho relativo ao demonstrar que menores concentrações de BZ+SLB (BZ25+SLB150, BZ50+SLB150, BZ50+SLB50) resultaram em maior número de análises parasitológicas e moleculares negativas (100% negativas),

e portanto aparentemente mais vantajosas, em relação aos grupos de animais tratados com BZ100 isolado, que apresentou negatividade de 71,42% e BZ100+SLB150 com 85,71%, mas estas diferenças não são estatisticamente suportadas. Houve exceções tais como BZ25+SLB50 e BZ100+SLB50 com 85,7 % e 100% de negatividade, respectivamente. Merece ser destacado que os melhores resultados do tratamento, ao considerarmos a sorologia - ELISA (menores D.O. aos 240 d.p.t.) e qPCR sanguínea com 100% de negatividade), foram obtidos nos grupos tratados com menores doses de BZ (BZ25 e BZ50 ) que no grupo tratado com a dose clássica de 100mg/kg/dia que apresentou alta D.O. na avaliação sorológica e negatividade de 71,42% da qPCR.

Quanto a cura dos animais, é importante ressaltar que em modelo murino a avaliação por hemocultura pode ser considerada um critério de cura (BRENER,1962), que é de alta sensibilidade em camundongos avaliados na fase aguda, mas que na fase crônica requer outras avaliações complementares (TOLEDO et al,1997). Nesse trabalho observamos um único grupo de animais com HC positiva (14,29% de positividade). Com base no critério HC todos os demais grupos de animais foram 100% curados.

Ao se comparar a negatividade da HC com a qPCR sangue e de tecido cardíaco foi possível observar diferenças, pois em alguns grupos com HC 100% negativa a qPCR apresentou 85,71% de negatividade. Isso pode se explicar pela elevada sensibilidade da qPCR em identificar nDNA do parasito, sendo possível especular que este material genético seja oriundo de parasitos mortos (BENVENUTI et al, 2008; CANCINO-FAURE et al, 2016) ou resquícios de material parasitário ainda em processo de eliminação do organismo hospedeiro, não significando necessariamente infecção ativa. Sendo assim, os resultados iniciais e progressivos de negatividade da hemocultura observados já sinalizavam a cura parasitológica destes animais.

Ao considerarmos o critério de cura proposto neste trabalho, similar ao critério de cura clássico utilizado em humanos (PINTO DIAS et al, 2016), de negatividade simultânea em todas as avaliações laboratoriais realizadas, nenhum animal tratado foi considerado curado, devido a não negatividade da sorologia (ELISA). Essa ausência de negatividade sorológica se deve ao fato de que os anticorpos anti-*T. cruzi* serem persistentes por muitos anos pós-tratamento (KRETLI et al., 1982; GALVAO et al., 1993; DE LANA ; MARTINS-FILHO, 2015) devido à existência de antígenos de *T. cruzi* remanescentes no baço (ANDRADE,1991) que levam a uma continua estimulação de anticorpos de memória de longa duração, que assim persistem (DE LANA; MARTINS-FILHO, 2009),

além várias outras razões (KRETTLI, 2009), o que implica que a reatividade sorológica residual não é indicativa necessariamente da permanência de infecção ativa no hospedeiro.

Ao eliminar das considerações das avaliações pós-tratamento os resultados da sorologia, que não pode ser considerada como indicativa segura de permanência da infecção por *T. cruzi* no hospedeiro (KRETTLI, 2009), verificamos que aqueles animais que passaram a apresentar, ao longo do tempo pós-tratamento, total negatificação de todos os exames parasitológicos (ESF, HC) e parasitológicos moleculares (qPCR) tanto no compartimento sanguíneo como em tecido cardíaco simultaneamente, estariam curados parasitologicamente tendo em vista a alta sensibilidade e especificidade da metodologia de qPCR em detectar o nDNA do parasito. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira e colaboradores (2015) que ao acompanhar as avaliações sorológicas e parasitológicas mais tempo pós-tratamento (360 d.p.t) observaram uma elevação progressiva da negatividade dos exames parasitológicos (HC, PCR), acompanhada ainda pela negatificação do teste de pesquisa de anticorpos anti-tripomasigota vivo (AATV-CF) de Martins Filho e colaboradores (1995) e modificado por Molina e colaboradores (2000) mais precocemente que a ELISA convencional. Neste estudo onde a avaliação dos animais pós-tratamento foi feita até 240 dias, os resultados obtidos apresentaram a mesma tendência em relação aos exames parasitológicos.

Em conjunto estes dados sugerem que havendo ação terapêutica, mesmo que parcial, ocorre aparentemente uma mudança da resposta imunológica que passa a reduzir progressivamente a parasitemia até chegar à cura definitiva nos casos de sucesso do tratamento.

Achamos importante ressaltar que aqueles animais nos quais a carga de nDNA pela qPCR sanguínea e em tecido cardíaco foi muito baixa ( 1/7 animal do grupo BZ25 com 9 parasitos/mg de tecido, 1/7 animal do grupo SLB50+BZ25 com 10 parasitos/mg de tecido e em 1/7 animal do grupo SLB150+BZ100 3 parasitos/mg de tecido cardíaco) e que influenciou na queda da porcentagem de animais negativos não deve ser considerada como indicação segura de parasitos vivos, e sim de nDNA de *T. cruzi* degenerado, um fato possível principalmente em animais submetidos a tratamento etiológico.

Assim, ao avaliarmos a eficácia terapêutica desconsiderando a sorologia (ELISA), observamos que as taxas de negatificação parasitológica se elevam, alcançando 100% nos grupos de animais tratados com associação de fármacos (SLB50+BZ100; SLB50+BZ 50; SLB150+BZ50; SLB150+BZ25 mg/kg/dia) e em monoterapia de BZ (BZ50 mg/kg/dia). Isso pode ter se dado pelo efeito de SLB sobre o efluxo de BZ no organismo hospedeiro. Há a possibilidade de que a diminuição do efluxo por inibição de Pgp por SLB (ZHANG; MORRIS, 2003) no TGI tenha propiciado o aumento da concentração de BZ na corrente sanguínea, mesmo quando em doses menores como BZ25 e BZ50 associadas a SLB, alcançando concentração sérica igual ou superior à de BZ100 mg/kg/dia.

Apesar das diferenças de negatificação parasitológica entre os grupos experimentais não suportar uma análise estatística confirmatória, o exposto no parágrafo anterior se reforça ao compararmos a taxa de negatividade dos exames parasitológicos de BZ25 (85,71%) em relação a SLB150+BZ25 (100%), em que a alta dose da associação com SLB mostrou ganho no combate ao parasito, enquanto que a associação com menor dose de SLB (SLB50+BZ25) não apresentou melhor atividade terapêutica, pois a taxa de negatividade parasitológica foi a mesma (85,71%) obtida com BZ25 isolado.

Quanto às associações de SLB à BZ100 (SLB50+BZ100, SLB150+BZ100) e BZ100 em monoterapia foi observado ganho da associação. Enquanto BZ100 apresentou negatificação parasitológica de apenas 71,42%, grupos de animais tratados com SLB150+BZ100 apresentaram 85,71% de negatificação, e os tratados com SLB50+BZ100 100%, indicando possível ganho terapêutico da associação, ainda que o esperado (melhor resultado utilizando maior concentração de SLB na associação) não tenha sido observado.

Nas associações de SLB a BZ50 era esperado ganho da associação frente a monoterapia, assim como observado nas associações com BZ25, e de fato, ao avaliarmos as associações de SLB à BZ50 (SLB50+BZ50, SLB150+BZ50) e BZ50 em monoterapia observamos taxas de 100% de negatividade em todas as avaliações parasitológicas.

Seria possível então levantar a hipótese de que a dose de BZ50 mg/kg/dia seja a ideal em monoterapia, contrariando a padronização empírica de BZ100 mg/kg/dia em tratamento de fase aguda de DC em modelo murino (BRENER, 1962; ROMANHA et al., 2010), o que pode ser reforçado ao considerarmos que a dose BZ100 mg/kg/dia é alta, por alcançar concentração plasmática de 41,61 µg/mL (PERIN, 2017) em camundongos *Swiss*, muito superior ao pico de concentração plasmática de 2,2–2,8 µg/mL encontrada

em humanos utilizando dose usual e efetiva para o tratamento da DC fase aguda - 5 mg/kg (LAFEPE, 2013; MARTINDALE, 2005).

Ainda não há como afirmar ou mesmo descartar se houve ganho terapêutico pelo uso de associação com SLB nos tratamentos empregando BZ50, uma vez que estas diferenças não foram confirmadas estatisticamente. É esperado que avaliações histopatológicas (ainda em curso) possam apresentar diferenças significativas na redução da intensidade das reações inflamatórias e fibrose, e auxiliar na conclusão quando ao uso de associação da SLB nessa dose de BZ específica (50mg/kg/dia). A histopatologia poderá também indicar se houve maior ganho terapêutico nas demais associações empregadas neste trabalho.

Finalmente, temos que considerar a relatividade dos resultados aqui alcançados tendo em mente que o isolado de *T. cruzi* da cepa Y empregado se apresentou resistente ao BZ segundo o critério clássico de cura empregado. Este fato sugere que os resultados de eficácia terapêutica obtidos poderiam ser diferentes se isolado do parasito fosse parcialmente sensível ou totalmente sensível ao tratamento com o BZ. Atenção análoga tem que ser feita em relação a atividade terapêutica da SLB em *T. cruzi*.

## 8.0. Conclusão

- Ao final deste trabalho concluímos que a SLB foi ativa *in vitro*, porém BZ foi superior a ela, e as associações apresentaram as melhores respostas de atividade anti-epimastigota e anti- amastigota;
- Nos ensaios *in vivo* em monoterapia, a SLB não apresentou ação efetiva contra a cepa Y de *T. cruzi* resistente ao tratamento com BZ, mas associada a BZ (mesmo na menor concentração de BZ estada) foi capaz de levar a negatificação simultânea dos exames parasitológicos dos animais, o que por sua vez foi também obtido com o tratamento com BZ, principalmente em menores doses;
- Foi demonstrado também *in vivo* que há potencial para a associação SLB+BZ, e que BZ em menores doses (25 e 50 e mg/kg/dia) aparentemente traz ganhos ao tratamento etiológico da DC em modelo murino, pois levaram a maior negatificação dos exames parasitológicos (ESF, HC e qPCR em eluato sanguíneo e em tecido cardíaco).

## 9.0. Perspectivas

Estão sob avaliação amostras de tecido coletado durante eutanásia dos animais. Esperamos que os resultados obtidos com avaliações parasitológicas e sorológicas sejam enriquecidos com as informações da avaliação histopatológica, em que será possível verificar se houve ganho com a ação anti-inflamatória de SLB aliada a redução de dose de BZ.

Este projeto levantou questões que serão exploradas em um trabalho de doutorado.

A SLB e BZ são fármacos rapidamente eliminados na corrente sanguínea em roedores, SLB possui  $\frac{1}{2}$  vida de apenas 2.11h (ZHAO; AGARWAL, 1999) e BZ possui  $\frac{1}{2}$  vida de 2.03h (PERIN et al., 2017), o que tornaria necessária administrações várias vezes ao dia para manutenção da faixa terapêutica necessária. A frequência de administração dos fármacos por gavagem seria algo inviável, pois mesmo quando feita apenas uma vez ao dia é capaz de levar a lesões esofágicas (JONES; BOYD; WALLACE, 2016) e morte de 15% dos animais (ARANTES-RODRIGUES et al., 2012).

Assim a preparação de formulação de liberação prolongada surge como uma possibilidade de correção para a curta meia vida de ambos os fármacos. Mosqueira e colaboradores demonstraram que BZ em formulação nano auto-emulsionável (SNEEDs) apresentou faixa terapêutica prolongada na corrente sanguínea dos camundongos tratados (BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014).

Acreditamos que em formulação SNEDDs o tempo de liberação aumente para SLB e BZ, possibilitaria maiores intervalos de doses o que associada a inibição de Pgp por SLB prolongaria a faixa terapêutica, atingindo o necessário para cura dos animais. Assim é possível obter maiores ganhos que com os fármacos utilizados de forma livre.

## 10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, K.; YARNELL, E. The Many Faces of Silybum marianum ( Milk Thistle ): Part 1. **Phytotherapy Research**, p. 170–175, 2003a. Disponível em: <[https://www.academia.edu/1445176/The\\_many\\_faces\\_of\\_silybum\\_marianum\\_Milk\\_Thistle\\_Part\\_1-Treating\\_cancer\\_and\\_hyperlipidemia\\_and\\_restoring\\_kidney\\_function](https://www.academia.edu/1445176/The_many_faces_of_silybum_marianum_Milk_Thistle_Part_1-Treating_cancer_and_hyperlipidemia_and_restoring_kidney_function)>.

ABASCAL, K.; YARNELL, E. The Many Faces of Silybum marianum (Milk Thistle): Part 2 - Clinical Uses, Safety, and Types of Preparations. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 9, n. 5, p. 251–256, out. 2003b. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107628003322490698>>.

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. In: Critical Care Medicine, **Anais...**2007.

AHMED AZIZ, T.; HASAN MAROUF, B.; AORAHMAN AHMED, Z.; ABDULRAHMAN HUSSAIN, S. Anti-Inflammatory Activity of Silibinin in Animal Models of Chronic Inflammation. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 7–11, 2014. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ajps/2/1/2>>.

AKHTAR, R.; ALI, M.; MAHMOOD, S.; NATH SANYAL, S. Anti-Proliferative Action of Silibinin on Human Colon Adenomatous Cancer Ht-29 Cells. **Nutricion hospitalaria**, 2014.

ANDRADE, A. L. S. S. de; ZICKER, F.; DE OLIVEIRA, RENATO MAURICIO SILVA, S. A.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, J. G. de; MARTELLI, C. M. T. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407–13, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8937280>>.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of Trypanosoma cruzi strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 27–35, fev. 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86821997000100006&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000100006&lng=en&tlng=en)>.

ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 4, p. 721–726, 1985.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FILHO, F. F.; LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of chagas disease: A comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1992.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 71–80, 1999.

ANTONIO MARIN-NETO, J.; RASSI, A.; AVEZUM, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The Benefit trial: Testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009.

- APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 4, p. 243–253, 2010.
- ARANTES-RODRIGUES, R.; HENRIQUES, A.; PINTO-LEITE, R.; FAUSTINO-ROCHA, A.; PINHO-OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA-GUEDES, C.; SEIXAS, F.; GAMA, A.; COLAÇO, B.; COLAÇO, A.; OLIVEIRA, P. A. The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice. **Lab Animal**, 2012.
- ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E. S.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2000.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. de F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2014.922952>>.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, 2009.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- BELLERA, C.; SBARAGLINI, M.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.; VANRELL, M.; CASASSA, A.; LABRIOLA, C.; ROMANO, P.; CARRILLO, C.; TALEVI, A. High-throughput Drug Repositioning for the Discovery of New Treatments for Chagas Disease. **Mini Rev Med Chem**, 2015.
- BENAIM, G.; SANDERS, J. M.; GARCIA-MARCHÁN, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A. R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J. M.; LEON-ROSSELL, A.; CONCEPCION, J. L.; SCHIJMAN, A. G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Amiodarone Has Intrinsic Anti- Trypanosoma cruzi Activity and Acts Synergistically with Posaconazole †. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 892–899, fev. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm050691f>>.
- BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–11, 2017.
- BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 280–288, 2004.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537–1547, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>>.
- BOOJAR, M. M. A.; HASSANIPOUR, M.; MEHR, S. E.; BOOJAR, M. M. A.; DEHPOUR, A. R. New aspects of silibinin stereoisomers and their 3-o-galloyl derivatives on cytotoxicity and ceramide metabolism in hep G2hepatocarcinoma cell line. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2016.
- BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; DE OLIVEIRA-SILVA, J. C. V.; SIMÕES-SILVA, M. R.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; DE LANA, M. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2067–2075, 2014.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1962.

BRENER, Z.; COSTA, C. A. G.; CHIARI, C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, n. 6, p. 450–455, 1976.

BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L.; BLUMENTHAL, D. k.; BUXTON, I. L. O. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. [s.l: s.n.]

CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; CECÍLIO, A. B.; DINIZ, L. D. F.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1628–1637, 2014.

CAMPOS, M. C. O.; CASTRO-PINTO, D. B.; RIBEIRO, G. A.; BERREDO-PINHO, M. M.; GOMES, L. H. F.; DA SILVA BELLIENY, M. S.; GOULART, C. M.; ECHEVARRIA, Á.; LEON, L. L. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. **Parasitology Research**, v. 112, n. 6, p. 2341–2351, 2013.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CANÇADO, R.; COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L.; MUÑOZ, M. J.; MURCIA, L.; SEGOVIA, M.; SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Terapêutica específica. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 97, n. 1, p. 5–7, 2011.

CARDONA, M. L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R.; SINISTERRA, J. F. Flavonoids, flavonolignans and a phenylpropanoid from *Onopordon corymbosum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 629–631, 1990.

CARLOS PINTO DIAS, J.; NOVAES RAMOS, A.; DIAS GONTIJO, E.; LUQUETTI, A.; APARECIDA SHIKANAI-YASUDA, M.; RODRIGUES COURA, J.; MORAIS TORRES, R.; RENAN DA CUNHA MELO, J.; ANTONIO DE ALMEIDA, E.; DE OLIVEIRA JR, W.; CARLOS SILVEIRA, A.; MARCONDES DE REZENDE, J.; SCALABRINI PINTO, F.; WALTER FERREIRA, A.; RASSI, A.; AUGUSTO FRAGATA FILHO, A.; SILVESTRE DE SOUSA, A.; CORREIA FILHO, D.; MARIA JANSEN, A.; MANZAN QUEIROZ ANDRADE, G.; FELÍCIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO, C.; YECÊ DAS NEVES PINTO, A.; RASSI JR, A.; ELISABETH CAMPOS, D.; ABAD-FRANCH, F.; ELOI SANTOS, S.; CHIARI, E.; MARCEL HASSLOCHER-MORENO, A.; FURTADO MOREIRA, E.; SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D.; SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D.; LAGES SILVA, E.; ANTONIO MARIN-NETO, J.; MARIA DA CUNHA GALVÃO, L.; SALLES XAVIER, S.; ALDO DA SILVA VALENTE, S.; BARBOSA CARVALHO, N.; VIANA CARDOSO, A.; ALBUQUERQUE E SILVA, R.; MAIA DA COSTA, V.; MONZANI VIVALDINI, S.; MAMEDE OLIVEIRA, S.; DA COSTA VALENTE, V.; MAIA LIMA, M.; VIEIRA ALVES, R. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007)>.

CONITEC, COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, B. ESCOPO: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Doença de Chagas. p. 23, 2016. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/PropostaEscopo\\_PCDT\\_DoencaChagas.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/PropostaEscopo_PCDT_DoencaChagas.pdf)>.

CONITEC; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. p. 1–144, 2018.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549–554, 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P.; FRASCH, A. C. C.; GUHL, F.; LAZZARI, J. O.; LORCA, M.; MONROY ESCOBAR, C.; PONCE, C.; SILVEIRA, A. C.; VELAZQUEZ, G.; ZINGALES, B. Control of Chagas disease. **World Health Organization - Technical Report Series**, n. 905, p. 1–99, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

CROCENZI, F. A. F. A.; ROMA, M. G. M. G. Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possibilities for an ancient medication. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 9, p. 1055–1074, 2006.

DA COSTA, K. M.; VALENTE, R. C.; SALUSTIANO, E. J.; GENTILE, L. B.; DELIMA, L. F.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O. Functional characterization of ABCC proteins from *Trypanosoma cruzi* and their involvement with thiol transport. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, 2018.

DA SILVA, R. M.; OLIVEIRA, L. T.; BARCELLOS, N. M. S.; DE SOUZA, J.; DE LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344–3348, 2012.

DALLAGIOVANNA, B.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Trypanosoma cruzi*: Sequence of the ATP-Binding site of a P-glycoprotein gene. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 63–67, 1994.

DALLAGIOVANNA, B.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Molecular characterization of a P-glycoprotein-related tcPgp2 gene in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 145–157, 1996.

DAVANÇO, M. G.; DE CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: Application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 7, p. 1008–1015, 2015.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-

RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, Â. C. V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, 2006.

DE LANA, M.; DE MENEZES MACHADO, E. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**. [s.l.: s.n.]

DE LANA, M.; LOPES, L. A.; MARTINS, H. R.; BAHIA, M. T.; MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; WENDLING, A. P.; MARTINS-FILHO, O. A.; MONTOYA, R. A.; DIAS, J. C. P.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; COURA, J. R. Clinical and laboratory status of patients with chronic chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1139–1147, 2009.

DE LANA, M.; MARTINS-FILHO, O. A. Serological methods as a tool to monitor post-therapeutic cure in Chagas disease. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 73–75, 2009.

DE LANA, M.; PINTO, A. D. S.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: Compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 20–25, 1998.

DE OLIVEIRA, D. R. akell.; TINTINO, S. R. eliso.; BRAGA, M. F. lavian. B. M. orai.; BOLIGON, A. A. ugust.; ATHAYDE, M. L. ind.; COUTINHO, H. D. ougla. M.; DE MENEZES, I. R. os. A.; FACHINETTO, R. In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. **BioMed research international**, v. 2015, p. 292797, 2015.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S.; TRYPANOSOMIASIS, A.; DISEASE, C.; DE LANA, M.; MACHADO, E. M. de M.; DINIZ, L. de F.; URBINA, J. A.; DE ANDRADE, I. M.; MAZZETI, A. L.; MARTINS, T. A. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T.; ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L. De; NAZARÉ, M. De; SOEIRO, C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. D. A. **Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 105

DIAS, J. C. P. Chagas disease: still a challenge around the World. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 367–369, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312924>>.

DINIZ, L. de F. Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. p. 112, 2013.

DINIZ, L. de F.; URBINA, J. A.; DE ANDRADE, I. M.; MAZZETI, A. L.; MARTINS, T. A. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant

- and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J.; STOPPANI, A. O. M.; LEON, W.; CRUZ, F. S.; VILLALTA, F.; MUNIZ, R. F. A. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, n. 14, p. 1947–1951, 1981.
- DOS SANTOS, A. O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, É. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, 2010.
- DURAN-REHBEIN, G. A.; VARGAS-ZAMBRANO, J. C.; CUÉLLAR, A.; PUERTA, C. J.; GONZALEZ, J. M. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. **Parasite**, v. 21, n. c, p. 38, 2014. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2014040>>.
- ENTEZARI, M.; MOKHTARI, M. J.; HASHEMI, M. Evaluation of Silibinin on the Viability of MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma and HUVEC ( Human Umbilical Vein Endothelial ) cell lines. **Breast**, v. 3, n. 6, p. 283–288, 2011.
- FABBRO, D. de S.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 2, p. 99–109, 2000.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.
- FONSECA-BERZAL, C.; ARÁN, V. J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*</i>. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3367–3380, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6084-3>>. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-018-6084-3>>.
- FUHR, U. Induction of drug metabolising enzymes. Pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 38, n. 6, p. 493–504, 2000.
- GALLERANO, R. R.; SOSA, R. R. [Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy]. **Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)**, 2000.
- GALVAO, L. M. C.; CANÇADO, J. R.; NUNES, R. M. B.; BRENER, Z.; KRETTLI, A. U. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: A 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 220–223, 1993.
- GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F. V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; ANTONIO, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P.; RODRIGUES, M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas ' Disease Decreases Cardiac Alterations Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas ' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

GREENLEE, H.; ABASCAL, K.; YARNELL, E.; LADAS, E. Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 2, p. 158–165, 2007.

GUEDES, P. M.; FIETTO, J. L. R.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T. **Advances in Chagas disease chemotherapy** **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, 2006.

HIGGINS, C. F. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. **Annual Review of Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 67–113, 1992. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>>.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. **Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology [48]** **Nature**, 1966. .

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: A review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 809–823, 2011.

JABINI, R.; JAAFARI, M. R.; VAHDATI HASANI, F.; GHAZIZADEH, F.; KHAMESIPOUR, A.; KARIMI, G. Effects of combined therapy with silymarin and glucantime on Leishmaniasis induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. **Drug Research**, v. 65, n. 3, p. 119–124, 2015.

JACKSON, Y.; ALIROL, E.; GETAZ, L.; WOLFF, H.; COMBESURE, C.; CHAPPUIS, F. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, 2010.

JONES, A. J.; GRKOVIC, T.; SYKES, M. L.; AVERY, V. M. Trypanocidal activity of marine natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 10, p. 4058–4082, 2013.

JONES, C. P.; BOYD, K. L.; WALLACE, J. M. Evaluation of Mice Undergoing Serial Oral Gavage While Awake or Anesthetized. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, 2016.

KIKUCHI, Y.; MIYAICHI, Y.; TOMIMORI, T. Total Synthesis of Flavonolignans, Scutellaprostins A,B,C,D,E e F. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 11, p. 1899–901, nov. 1991.

KREN, V.; WALTEROVÁ, D. Silybin and silymarin--new effects and applications. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 149, n. 1, p. 29–41, 2005.

KRETTLI, A. U. The utility of anti-trypanomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: An overview and perspectives. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 142–151, 2009.

LEE, C. K.; CHOI, J. S. Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats. **Pharmacology**, 2010.

LEE, F. Y. F.; WORKMAN, P. Nitroimidazoles as modifiers of nitrosourea pharmacokinetics. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 10, n. 9, p. 1627–1630, 1984.

LOURENÇO, A. M.; FACCINI, C. C.; COSTA, C. A. de J.; MENDES, G. B.; FILHO,

A. A. F. Evaluation of in vitro anti-trypanosoma cruzi activity of medications benznidazole, amiodarone hydrochloride, and their combination. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 1, p. 52–56, 2018.

LUNA, K. P.; HERNÁNDEZ, I. P.; RUEDA, C. M.; ZORRO, M. M.; CROFT, S. L.; ESCOBAR, P. In vitro susceptibility of Trypanosoma cruzi strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 29, n. 3, p. 448–55, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436996>>.

LUPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. **Altern Med Rev**, v. 3, n. 6, p. 410–421, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

M.S, M. da S. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007)>.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; DINIZ, G. A.; MONTOYA, R. A.; DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; TORRES, R. M.; DE LANA, M. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 873–880, 2013.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during Trypanosoma cruzi invasion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. NOV, p. 1–7, 2012.

MALDONADO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1993.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A.; MORILLO, C. A.; AVEZUM, A.; CONNOLLY, S. J.; SOSA-ESTANI, S.; ROSAS, F.; YUSUF, S. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, 2008.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological Characterization of Trypanosoma cruzi Strains. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 53–59, 2001.

MARTINS, T. A. F.; DINIZ, L. D. F.; MAZZETI, A. L.; DO NASCIMENTO, Á. F. D. S.; CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; DE ANDRADE, I. M.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-Trypanosoma cruzi activity in experimental Chagas disease. **PLoS ONE**, 2015.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. **Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host** *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 2007. .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brazilian Consensus on Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 Suppl 3, n. January, p. 7–29, 2005.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416933>>.

MORAES, C. B.; GIARDINI, M. A.; KIM, H.; FRANCO, C. H.; ARAUJO-JUNIOR, A. M.; SCHENKMAN, S.; CHATELAIN, E.; FREITAS-JUNIOR, L. H.

Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, 2014.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O.; ALMEIDA, A. E.; PIETRO, R. C. L. R.; SILVA, F. A. J.; CICARELLI, R. M. B. In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of brazilian cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 903–907, 2013.

MORENO, M.; D'ÁVILA, D. A.; SILVA, M. N.; GALVÃO, L. M.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E. D.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* benzimidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MURTA, S. M. F.; DOS SANTOS, W. G.; ANACLETO, C.; NIRDÉ, P.; MOREIRA, E. S. A.; ROMANHA, A. J. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 223–228, 2001.

PANG, K. S.; RODRIGUES, A. D.; PETER, R. M. Enzyme- and transporter-based drug-drug interactions: Progress and future challenges. **Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions: Progress and Future Challenges**, p. 1–746, 2010.

PERDOMO, V. G.; RIGALLI, J. P.; VILLANUEVA, S. S. M.; RUIZ, M. L.; LUQUITA, M. G.; ECHENIQUE, C. G.; CATANIA, V. A. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benzimidazole in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4894–4902, 2013.

PEREZ-MAZLIAH, D. E.; ALVAREZ, M. G.; COOLEY, G.; LOCOCO, B. E.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALBAREDA, M. C.; ARMENTI, A. H.; TARLETON, R. L.; LAUCELLA, S. A.; VIOTTI, R. Sequential combined treatment with allopurinol and benzimidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: A pilot study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 424–437, 2013.

PERIN, L.; DA SILVA, R. M.; DA SILVA FONSECA, K.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A. S.; REIS, L. E. S.; MOLINA, I.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; CARNEIROA, C. M. Pharmacokinetics and tissue distribution of benzimidazole after oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85016461912&doi=10.1128%2FAAC.01912-16&partnerID=40&md5=4f67a2fee1a989a4cc87d97482395319>>.

PETTIT, G. R.; MENG, Y.; STEVENSON, C. A.; DOUBEK, D. L.; KNIGHT, J. C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R. K.; CHAPUIS, J. C.; SCHMIDT, J. M. Isolation and

structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 259–262, 2003.

PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; DEL CACHO, E.; SOY, D.; GASCON, J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896–4899, 2010.

PINTO DIAS, J. C.; DEL GRANDE CLÁUDIO, L.; MAIA LIMA, M.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; ALBUQUERQUE E SILVA, R.; VIEIRA ALVES, R.; MAIA DA COSTA, V. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016a. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500087&scielo=S2237-96222016000500087](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500087&scielo=S2237-96222016000500087)>.

PINTO DIAS, J. C.; NOVAES RAMOS, A.; DIAS GONTIJO, E.; LUQUETTI, A.; APARECIDA SHIKANAI-YASUDA, M.; RODRIGUES COURA, J.; MORAIS TORRES, R.; RENAN DA CUNHA MELO, J.; ANTONIO DE ALMEIDA, E.; DE OLIVEIRA JR, W.; CARLOS SILVEIRA, A.; MARCONDES DE REZENDE, J.; SCALABRINI PINTO, F.; WALTER FERREIRA, A.; RASSI, A.; AUGUSTO FRAGATA FILHO, A.; SILVESTRE DE SOUSA, A.; CORREIA FILHO, D.; MARIA JANSEN, A.; MANZAN QUEIROZ ANDRADE, G.; FELÍCIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO, C.; YECÊ DAS NEVES PINTO, A.; RASSI JR, A.; ELISABETH CAMPOS, D.; ABAD-FRANCH, F.; ELOI SANTOS, S.; CHIARI, E.; MARCEL HASSLOCHER-MORENO, A.; FURTADO MOREIRA, E.; SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D.; SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D.; LAGES SILVA, E.; ANTONIO MARIN-NETO, J.; MARIA DA CUNHA GALVÃO, L.; SALLES XAVIER, S.; ALDO DA SILVA VALENTE, S.; BARBOSA CARVALHO, N.; VIANA CARDOSO, A.; ALBUQUERQUE E SILVA, R.; MAIA DA COSTA, V.; MONZANI VIVALDINI, S.; MAMEDE OLIVEIRA, S.; DA COSTA VALENTE, V.; MAIA LIMA, M.; VIEIRA ALVES, R. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016b. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007)>.

POLACHI, N.; BAI, G.; LI, T.; CHU, Y.; WANG, X.; LI, S.; GU, N.; WU, J.; LI, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, S.; SUN, H.; LIU, C. Modulatory effects of silibinin in various cell signaling pathways against liver disorders and cancer – A comprehensive review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 577–595, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.070>>.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease** *Lancet Infectious Diseases*, 2001. .

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-Forschung**, v. 30, n. II, p. 2192–2194, 1980.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-Forschung**, v. 29, n. 10, p. 1611–1614, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/583230>>.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90 Supp 1, p. S19–S39, 2003.

- RAGHAVA, K. M.; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: A rational outlook. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 353–367, 2012.
- RASSI, A. Predicting prognosis in patients with Chagas disease: Why are the results of various studies so different? **International Journal of Cardiology**, v. 145, n. 1, p. 64–65, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.04.034>>.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. **Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2017. .
- REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J. P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRE, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. Trypanosoma cruzi: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Experimental Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 30–39, 1998.
- RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. **New antileishmanial candidates and lead compounds** *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010. .
- ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103–107, 2006.
- ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L. De; NAZARÉ, M. De; SOEIRO, C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. D. A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. v. 105, n. March, p. 233–238, 2010.
- SALEHI, M.; HASANLOO, T.; MEHRABIAN, S.; FARAHMAND, S. Effects of Silybum marianum (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi in vitro compare to clotrimazol. **Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4, p. 203–210, 2011.
- SAUVAGE, V.; AUBERT, D.; ESCOTTE-BINET, S.; VILLENA, I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 81–94, 2009.
- SCAMBIA, G.; DE VINCENZO, R.; RANELLETTI, F. O.; PANICI, P. B.; FERRANDINA, G.; D'AGOSTINO, G.; FATTOROSSO, A.; BOMBARDELLI, E.; MANCUSO, S. Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: Synergism with cisplatin and doxorubicin. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 5, p. 877–882, 1996.
- SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. In: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **Anais...**2007.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>>.

- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, dez. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492206002601>>.
- SHARMA, D. K. Bioprospecting for drug research and functional foods for the prevention of diseases - Role of flavonoids in drug development. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 65, n. 5, p. 391–401, 2006.
- SILVEIRA, A. C.; SILVA, G. R. da; PRATA, A. O Inquérito de soroprevalência da infecção chagásica humana (1975-1980). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. suppl 2, p. 33–39, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822011000800006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000800006&lng=pt&tlng=pt)>.
- SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina 8. **Curr.Opin.Infect.Dis.**, v. 19, n. 0951–7375 (Print), p. 583–587, 2006.
- STREETER, A. J.; KRUEGER, T. R.; HOENER, B. A. Oxidative metabolites of 5-nitrofurans. **Pharmacology**, 1988.
- SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, J.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology Research**, v. 98, n. 4, p. 370–374, 2006.
- SYKES, M. L.; AVERY, V. M. Development and application of a sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 215–228, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.10.001>>.
- TALBOTT, G. Effects of Silymarin Fractions on Pro-Inflammatory Cytokine Secretion from Macrophage and Colonic Epithelial Cell Lines. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 5, n. 4, p. 6–11, 2017. Disponível em: <<http://medcraveonline.com/PPIJ/PPIJ-05-00128.php>>.
- TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and chagas disease: Some mechanisms and relevance. **Advances in Parasitology**, v. 76, p. 171–194, 2011.
- TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American Trypanosomiasis Chagas Disease : One Hundred Years of Research**. [s.l: s.n.]
- THAO, N. P.; NO, J. H.; LUYEN, B. T. T.; YANG, G.; BYUN, S. Y.; GOO, J.; KIM, K. T.; CUONG, N. X.; NAM, N. H.; VAN MINH, C.; SCHMIDT, T. J.; KANG, J. S.; KIM, Y. H. Secondary metabolites from vietnamese marine invertebrates with activity against *trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7869–7880, 2014.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isozyme Variability in *Trypanosoma cruzi*, The Agent of Chagas' Disease: Genetical, Taxonomical, and Epidemiological Significance. **Evolution**, v. 42, n. 2, p. 277, 1988. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2409232?origin=crossref>>.
- TOLEDO, M. J. D. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W. L.; DE LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi*

clonal genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 223–230, 2003.

TOLEDO, M. J. D. O.; DE LANA, M.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VELOSO, V. M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; TAFURI, W. L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 3, 2002.

UENO, A. K.; BARCELLOS, A. F.; COSTA-SILVA, T. A.; MESQUITA, J. T.; FERREIRA, D. D.; TEMPONE, A. G.; ROMOFF, P.; ANTAR, G. M.; LAGO, J. H. G. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, n. December 2017, p. 55–58, 2018.

URBINA, J. Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 287–295, 1 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=8&issue=4&spage=287>>.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, 2010.

URBINA, J. a. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 6, p. 733–41, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964893>>.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200, 2012. Disponível em: <<http://www.japtr.org/text.asp?2012/3/4/200/104709>>.

VILAR-PEREIRA, G.; RESENDE PEREIRA, I.; DE SOUZA RUIVO, L. A.; CRUZ MOREIRA, O.; DA SILVA, A. A.; BRITTO, C.; LANNES-VIEIRA, J. Combination chemotherapy with suboptimal doses of benznidazole and pentoxifylline sustains partial reversion of experimental Chagas' heart disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4297–4309, 2016.

VIOTTI, R.; ALARCÓN DE NOYA, B.; ARAUJO-JORGE, T.; GRIJALVA, M. J.; GUHL, F.; LÓPEZ, M. C.; RAMSEY, J. M.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G.; SOSA-ESTANI, S.; TORRICO, F.; GASCON, J. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 635–639, 2014.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 10, p. 724–734, 2006. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16702588](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16702588)>.

WAGNER, H.; DIESEL, P.; SEITZ, M. Chemistry and analysis of silymarin from {*Silybum*} marianum. **Arzneim.-Forsch.**, v. 24, n. Copyright (C) 2016 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 466–471, 1974.

WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the

- heterozygous hybrids. **International Journal for Parasitology**, 2006.
- WHO. ANTIMALARIAL DRUG COMBINATION THERAPY Report of a WHO Technical Consultation. **World Health Organization, Geneva WHO**, 2001.
- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, p. 1–184, 2010.
- WHO. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.
- WHO. Chagas disease – american trypanosomiasis. **Polish Annals of Medicine**, v. 18, n. 1, p. 156–167, 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>.
- YAN, W.-J.; TAN, Y.-C.; XU, J.-C.; TANG, X.-P.; ZHANG, C.; ZHANG, P.-B.; REN, Z.-Q. Protective Effects of Silibinin and Its Possible Mechanism of Action in Mice Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 245–250, 2015. Disponível em: <<http://www.biomolther.org/journal/DOIx.php?id=10.4062/biomolther.2014.138>>.
- YASINZAI, M.; KHAN, M.; NADHMAN, A.; SHAHNAZ, G. **Drug resistance in leishmaniasis: Current drug-delivery systems and future perspectives** **Future Medicinal Chemistry**, 2013. .
- YUN, D. G.; LEE, D. G. Assessment of silibinin as a potential antifungal agent and investigation of its mechanism of action. **IUBMB Life**, v. 69, n. 8, p. 631–637, 2017.
- ZHANG, S.; MORRIS, M. E. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 1258–67, 25 mar. 2003. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.102.044412>>.
- ZHAO, J.; AGARWAL, R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: Implications in cancer chemoprevention. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2101–2108, 1999.
- ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>>.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific no- menclature: second revision meeting recommends TcI to Tc. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. November, p. 1051–1054, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104n7/21.pdf>>.