



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

LABORATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS – LADOC



ARTHUR MARQUES DO NASCIMENTO

**Avaliação da combinação dos fármacos silibinina e  
benznidazol na atividade anti - *Trypanosoma cruzi in vitro***

Dezembro/2019  
Ouro Preto – MG

ARTHUR MARQUES DO NASCIMENTO

**Avaliação da combinação dos fármacos silibinina e  
benznidazol na atividade anti - *Trypanosoma cruzi* in vitro**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

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

Co-orientadora: MSc. Fernanda Karoline V. S. Torchelsen

Dezembro/2019  
Ouro Preto – MG

N244a Nascimento, Arthur Marques.  
Avaliação da combinação dos fármacos silibinina e benznidazol na atividade anti - Trypanosoma cruzi in vitro [manuscrito] / Arthur Marques Nascimento. - 2019.

47f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Glenda Nicioli Silva.  
Coorientadora: Profª. MScª. Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Chagas, Doença de. 2. Medicamentos- Análise. I. Silva, Glenda Nicioli. II. Torchelsen, Fernanda Karoline Vieira da Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: [ficha.sisbin@ufop.edu.br](mailto:ficha.sisbin@ufop.edu.br)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

ARTHUR MARQUES DO NASCIMENTO

Avaliação da combinação dos fármacos silibinina e benznidazol na atividade anti-Trypanosoma cruzi in vitro

Membros da banca

Matheus Marques Milagre - UFOP  
Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa - UFOP  
Glenda Nicioli da Silva - UFOP

Versão final  
Aprovado em 13 de Dezembro de 2019

De acordo

Professor (a) Orientador (a)



Documento assinado eletronicamente por **Glenda Nicioli da Silva, COORDENADOR DO CURSO DE FARMACIA**, em 19/12/2019, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0029468** e o código CRC **255EBDC7**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.204158/2019-62

SEI nº 0029468

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

## **AGRADECIMENTOS**

Enfim Trabalho de Conclusão de Curso, uma das etapas mais críticas para a finalização de uma graduação. Lembro-me como se fosse ontem o dia em que iniciei minha jornada no curso de Farmácia da UFOP. Por todo o caminho que atravessei, agradeço primeiramente a Deus e ao meu anjo da guarda por terem me ajudado a superar todas as dificuldades e a tornar possível a realização de um sonho muito importante para mim. Agradeço também aos meus pais que batalharam arduamente desde a minha infância para me proporcionar sempre uma educação de qualidade. Não estaria onde estou sem o esforço de vocês. Agradeço profundamente a todos os meus familiares pelo apoio, em especial meus tios Ricardo e Eloísa, Dênis e Adeodata, Paulo Henrique e Yasmine e aos meus avós Mercês e Geraldino que foram fundamentais para que eu pudesse continuar o curso aqui em Ouro Preto. Amo muito vocês. Agradeço igualmente a todo apoio que a grande Universidade Federal de Ouro Preto e a gloriosa Escola de Farmácia me deram através dos recursos disponíveis e de toda estrutura que sempre contribuiu para uma graduação de qualidade. Agradeço imensamente ao grupo PET Farmácia por toda a experiência e crescimento proporcionados. Aos professores e orientadores de todos os departamentos, reconheço e agradeço profundamente a confiança e a orientação. Sem eles não teria conseguido. Em especial, agradeço muito à Renata e Fernanda por todas as orientações, puxões de orelha, conversas e risadas. Sem elas este trabalho não seria possível. Além delas, deixo aqui meu agradecimento ao pessoal do LADOC por todo o conhecimento transmitido durante a iniciação científica. A meus amigos tenho um agradecimento muito especial, pois acreditaram em mim desde o primeiro instante. Sou quem sou porque vocês estiveram e estão sempre ao meu lado. Levarei para sempre no coração meus companheiros de casa Vítor, Rafael, Adriano, André e Luan, os meus companheiros da incrível “Banda Bloopers” além do querido grupo do Café de Quarta – Grazi, Maíra e Larissa. Não posso deixar de agradecer a minha querida namorada Bethina, por todos os momentos vividos, conversas, conselhos, auxílios e muita música, além de toda a paciência para lidar comigo em momentos difíceis. Amo muito você. Por fim, mas não menos importante, deixo uma palavra de gratidão a todas as pessoas e aos meus gatos que de alguma forma tocaram meu coração e transmitiram força e confiança em mim.

Não há vantagem alguma em viver a vida correndo...  
**NARA, Shikamaru**

## RESUMO

A doença de Chagas (DCh) é uma doença parasitária endêmica na América Latina e encontrada em todo o mundo. Seu tratamento é feito com o benznidazol (BZ) e o nifurtimox (NF), substâncias incapazes de curar a maioria dos pacientes na fase crônica tardia da DCh, e que causam vários efeitos colaterais. Devido a estas limitações, a busca por novos fármacos para a DCh é estimulada e tem sido embasada em estudos sobre produtos naturais e estratégias como a associação de fármacos. A silibinina (SLB) é um composto natural capaz de inibir a proteína de efluxo (P-gp) 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* de SLB e de SLB associada à BZ (SLB+BZ) frente a um isolado da cepa Y de *T. cruzi*, parcialmente resistente ao tratamento com BZ. 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 µM, 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.

**Palavras-chave:** Silibinina; Atividade tripanocida; Combinação de fármacos; Benznidazol.

## ABSTRACT

The Chagas disease (DCh) is an endemic parasitic disease in Latin America and it is found worldwide. Its treatment is with benznidazole (BZ) and nifurtimox (NF), that are substances unable to cure most patients in the late chronic phase of DCh, which causes a lot of side effects. Due to these limitations, the search for new drugs for DCh is stimulated and has been based on natural products studies and strategies such as drug combination. Silibinin (SLB) is a natural compound capable of inhibiting the efflux protein (P-gp) in cell membranes, inducing the death of microorganisms and even has an anti-inflammatory quality. There are no reports in the literature of its activity in *T. cruzi*. In this research, the *in vitro* activity of SLB, and SLB associated with BZ (SLB + BZ) against a *T. cruzi* Y strain isolate, partially resistant to the BZ treatment, was evaluated. A cytotoxicity study was performed by the MTT method in VERO cells (24h), which revealed an IC<sub>50</sub> of 250.22 μM for SLB. The trypanocidal activity evaluated by the resazurin method in epimastigotes (24h) showed that 25 μM SLB inhibited parasite growth. The amastigote study showed selectivity index of 3.13 μM, in addition to showing the highest inhibition percentage (> 90%) when SLB was used in combination with SLB100 + BZ10μM, compared to SLB (100; 25; 6; 25 μM) or BZ (10; 5; 2.5 μM) isolated.

**Keywords:** Silibinin; Trypanocidal activity; Drug combination; Benznidazole.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular do fármaco nifurtimox .....	21
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular do fármaco benznidazol .....	21
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular da silibinina.....	26
<b>Figura 4:</b> Delineamento experimental da avaliação da atividade citotóxica e anti- <i>T.cruzi</i> de SLB, BZ e associação SLB + BZ em diferentes concentrações <i>in vitro</i> utilizando células VERO e a cepa Y.....	289
<b>Figura 5:</b> Porcentagens (%) de viabilidade celular das células VERO após tratamento com SLB e BZ no ensaio de MTT.....	33
<b>Figura 6:</b> Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com SLB e BZ por ensaio com resazurina. ....	34
<b>Figura 7:</b> Índices de inibição da infecção em células VERO com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento com SLB, BZ e diferentes associações de SLB e BZ em $\mu\text{M}$ . ....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Posologia do tratamento antiparasitário na doença de Chagas. ....	23
<b>Tabela 2:</b> Índice de seletividade de SLB e BZ oriundos da relação da citotoxicidade (IC50) e índice de inibição (IE50%) relativo à cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ	Benznidazol
CINT	Controle infectado e não tratado
DCh	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsilfóxido
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
ESF	Exame de sangue a fresco
FDA	U.S. Food and Drug Administration
IC <sub>50</sub>	Concentração da substância ativa que reduz o número de células ou amastigotas em 50%
IE	Índice endocítico
IS	Índice de Seletividade
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIT	"Liver infusion tryptose"
MTT	Solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
MS	Ministério da Saúde
NF	Nifurtimox
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico

PM	Peso Molecular
ROs	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SLB	Silibinina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGI	Trato gastrointestinal
WHO	"World Health Organization"

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1. A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
2.2. Sintomatologia e diagnóstico .....	18
2.3. Quimioterapia .....	20
2.4. Novos horizontes para o tratamento da doença de Chagas .....	24
2.5. Produtos naturais: a silibinina .....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivos específicos .....	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
5.1 Fármacos .....	28
5.1.1. <i>Silibinina</i> .....	28
5.1.2. <i>Benznidazol</i> .....	28
5.2. Cepa de <i>T. cruzi</i> .....	28
5.3. Linhagem celular .....	28
5.4. Estudos da eficácia <i>in vitro</i> .....	29
5.4.1. <i>Estudo da atividade citotóxica de SLB e BZ por MTT</i> .....	29
5.4.1.1. <i>Preparo de placas com as células VERO</i> .....	29
5.4.1.2. <i>Teste viabilidade celular por MTT</i> .....	30
5.4.2 <i>Avaliação da atividade anti-T.cruzi de SLB e BZ sobre formas epimastigotas de cepa Y.</i> .....	31
5.4.3 <i>Estudo da atividade anti-T. cruzi sobre formas amastigotas</i> .....	32
5.4.3.1 <i>Índice Endocítico (IE) e IC50</i> .....	32
5.4.3.2 <i>Índice de Seletividade</i> .....	33

6. RESULTADOS .....	33
6.1. Estudo de citotoxicidade em células VERO utilizando o MTT.....	33
6.2. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> em formas epimastigotas .....	33
6.3. Avaliação anti- <i>T. cruzi</i> em formas amastigotas em células VERO.....	34
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
9. CONCLUSÃO .....	42
10. REFERÊNCIAS.....	43

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DCh), também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e é a causa da morte de cerca de 10 mil pessoas todos os anos, além de mais de 25 milhões de pessoas correrem o risco de adquiri-la. Estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO, 2018). Atualmente, a DCh também representa um novo desafio mundial devido à sua expansão para países não endêmicos, resultado da migração de indivíduos infectados (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). Sem o tratamento, o paciente evolui do quadro de fase aguda para a fase crônica da doença. A infecção crônica pode persistir despercebida por mais de 30 anos antes de causar complicações e alterações anatomofisiológicas (CLAYTON, 2010).

Os principais meios de transmissão da DCh são oral, vetorial, transfusional e congênita (COURA & CASTRO, 2002; PEREIRA et al,2010). A transmissão vetorial ocorre principalmente na América Latina por insetos triatomíneos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros (COURA & CASTRO, 2002; WHO, 2018), embora existam esforços agregados de diferentes iniciativas governamentais (iniciativas de países do Cone Sul) e não governamentais (ex. DNDi e Médicos Sem Fronteiras-MSF) para eliminação dos vetores, e que resultam no declínio acentuado de novos casos agudos.

A DCh ainda apresenta muitos desafios, como a falta de terapias profiláticas e de esquemas efetivos de tratamento, especialmente para pacientes crônicos tardios (COURA & CASTRO, 2002). Além disso, mesmo decorridos mais de 100 anos da descoberta, ainda permanece epidemiologicamente relevante e com tratamento dependente de dois únicos medicamentos, benznidazol (BZ) e nifurtimox (NF), os quais não mostram resultados satisfatórios no tratamento de pacientes em fase crônica tardia da DCh.

BZ e NF são os dois compostos nitroheterocíclicos utilizados atualmente no tratamento humano, eficazes na fase aguda, infecção crônica recente, infecção congênita e acidentes de laboratório (COURA & CASTRO, 2002; DIAS, 2015). Entretanto, nenhum dos fármacos se mostra efetivo em todos os acometidos pela fase crônica tardia da infecção (GUEDES et al, 2006). Além disso, ambos são compostos tóxicos, que causam efeitos indesejáveis como alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência, náuseas, dentre outros, o que diminui a adesão ao protocolo terapêutico (COURA & CASTRO, 2002). É necessária então, a busca por novas formas de tratamento com fármacos que tenham a capacidade de

induzir a cura parasitológica em indivíduos tratados durante as diferentes fases da doença, com baixa toxicidade, que seja administrado por via oral em poucas doses, e com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência pelo parasito (COURA & CASTRO, 2002). Um dos possíveis horizontes a ser explorado é a busca por fármacos derivados de produtos naturais.

Segundo Barreiro e Fraga (1999), aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Este fato confirma a importância das pesquisas com substâncias naturais para a descoberta de novos fármacos efetivos no tratamento da DCh. A busca de ativos provenientes de produtos naturais para doenças parasitárias vem se tornando cada vez mais crescente, especialmente no Brasil, país com uma enorme biodiversidade.

Neste contexto, há o *Silybum marianum*, conhecido popularmente como cardo de leite, que tem sido usado há mais de 2000 anos na medicina europeia para tratar doenças hepáticas (ABC CLINICAL GUIDE, 2003). Das sementes do cardo de leite é obtido um extrato padrão constituído por quatro flavonolignanos: silibinina, isosilibinina, silidianina e silicristina (BIJAK, 2017).

A silibinina (SLB), principal componente do extrato das sementes, apresenta propriedades antifúngicas (SALEHI et al, 2011; YUN, LEE, 2016), antiedema cerebral, antidepressivas, anti-inflamatórias e anticancerígenas (GREENLEE, 2007) e atividade antimicrobiana (DE OLIVEIRA et al, 2015). Além disso, a SLB é inibidora da atividade da glicoproteína P, proteína transportadora presente nas membranas celulares que é responsável pelo efluxo de benznidazol (JABINI et al, 2015). Essa propriedade pode proporcionar um aumento da eficácia de BZ no combate ao *T. cruzi* com uma provável redução da dose.

Sendo assim, este trabalho busca explorar o potencial farmacoterápico da combinação de um produto natural, a SLB, ao BZ em ensaio *in vitro* em diferentes doses.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DCh) foi descoberta em 1909 pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2018) há cerca de 8 milhões de pessoas no mundo infectadas com o parasita *Trypanosoma cruzi*. Na América Latina a DCh é endêmica em 21 países, e é considerada uma das infecções parasitárias mais importantes, sendo capaz de trazer graves consequências para a saúde pública e economia nacionais. Nas regiões endêmicas a DCh afetava principalmente populações rurais e pobres (ZINGALES, 2012), porém devido ao êxodo rural, atualmente é também presente em áreas urbanas (PCDT, 2018).

Além da América Latina, devido às migrações de portadores da DCh oriundas de países endêmicos, houve a internacionalização da doença, sendo considerada um novo problema epidemiológico, econômico, social e político em países europeus, asiáticos e outros (SCHMUNIS, 2007).

No Brasil, dentre as doenças tropicais negligenciadas (DTN), a DCh foi a que causou o maior número de mortes, seguida de esquistossomose e leishmaniose (MARTINS-MELO, 2016). Esta situação epidemiológica foi consideravelmente transformada com ações de controle do inseto triatomíneo, além de controle da transmissão do *T. cruzi* por via transfusional (MARTINS-MELO, 2014; SILVEIRA, 2011).

Atualmente, segundo o Ministério da Saúde Brasileiro (2019), estima-se que existam cerca de um milhão de brasileiros infectados pelo *T. cruzi*, sendo que de 2008 a 2017 foram registrados casos confirmados de DCh aguda na maioria dos estados do país, sendo em torno de 95% oriundos da região Norte.

O parasito causador da DCh pertence a família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida* (HOARE e WALLACE, 1966) e possui ciclo heteroxênico (COURA & CASTRO, 2002). É um parasito hemoflagelado, caracterizado pela presença do cinetoplasto, uma mitocôndria única cujo DNA (denominado kDNA) se encontra regularmente condensado próximo à bolsa flagelar (DE LANA, TAFURI, BARTHOLOMEU, 2016). Além da forma flagelada há a forma conhecida como amastigota que é caracterizada por possuir um flagelo não exposto e formato oval.

Em seu ciclo natural, após o repasto sanguíneo do inseto vetor em um indivíduo infectado, o parasito alcança a região intestinal, ainda na forma tripomastigota sanguínea e passa por uma mudança morfológica transformando-se na forma epimastigota. Ao migrar para o intestino posterior, região pobre em nutrientes, devido à pressão ambiental, desencadela-se outra mudança morfológica, a metaciclogênese, em que as formas epimastigotas passam a formas tripomastigotas metacíclicas. Isto se dá em especial na porção final do intestino do inseto conhecido como ampola retal. Os parasitos na forma tripomastigotas metacíclicas possuem o potencial para infectar humanos e outros mamíferos. Assim, quando o inseto vetor realizar a hematofagia e depositar fezes contendo parasitos tripomastigotas metacíclicas sob o indivíduo, estas formas infectantes podem entrar na corrente sanguínea pelo local da picada e causar a infecção (GONÇALVES et al, 2018; LEWIS et al, 2018).

Uma vez no interior do organismo do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células e se transformam na forma evolutiva amastigota com capacidade de multiplicação por divisão binária. Após vários ciclos de replicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e, com a lise celular causada pela superpopulação de parasitos no interior da célula, são liberados na corrente sanguínea, onde são capazes de levar a novas infecções (GONÇALVES et al, 2018; LEWIS et al, 2018).

De acordo com Zingales (2017), o estabelecimento e evolução natural da DCh depende de uma série de fatores, dentre eles aspectos imunes do próprio hospedeiro e características genéticas do parasito. Por isso, deve-se buscar entender as complexas interações parasito-hospedeiro humano, especialmente pelo *T. cruzi* apresentar uma ampla diversidade genética (ZINGALES, 2017).

## **2.2. Sintomatologia e diagnóstico**

A DCh apresenta-se em duas fases distintas: aguda, que dura cerca de dois meses após a infecção, e a fase crônica (WHO, 2018). Na maioria dos casos, a **fase aguda** é assintomática ou possui sintomatologia não específica podendo apresentar mal-estar geral, febre, sudorese, dores musculares e em alguns casos aumento do fígado, baço e nodos linfáticos (DIAS et al, 1956). Em caso particular da transmissão vetorial, no local de entrada do *T. cruzi*, forma-se o chagoma de inoculação na pele ou o Sinal de Romana, quando o parasito se introduz pelas mucosas oculares (ROMAÑA, 1935) sendo sinais específicos denominados de “porta de entrada”. É importante ressaltar também que nesta fase de infecção o parasito é disseminado

pela corrente sanguínea do paciente e pode ser visto com relativa facilidade pelo exame de sangue a fresco (ESF), bem como esfregaços e exame de gota espessa (GOMES, LORENA e LUQUETTI, 2009; PRATA, 2001). O ESF pode ser visualizado diretamente ao microscópio em uma gota de sangue entre lâmina e lamínula, e a coleta deve ser realizada simultaneamente para métodos de concentração do sangue (DIAS, 2015).

A **fase crônica** é o período posterior à fase aguda, onde o paciente passa por um período de transição (fase subaguda) no qual as manifestações clínicas da fase aguda vão desaparecendo gradativamente. Esta fase pode apresentar-se de forma indeterminada, sem sinais e sintomas da doença, ou com manifestações clínicas nas formas cardíaca (cardiopatia), digestiva (principalmente megaesôfago e/ou megacólon) ou mista (associação de manifestações cardíacas e gastrointestinais) (RASSI, 2010).

Segundo Prata (2001), estudos realizados em áreas endêmicas demonstram que os pacientes que apresentam a **forma indeterminada** da doença não demonstram sentir sintomas e não têm redução da resposta imune celular. Além disso, o eletrocardiograma e o exame radiológico do coração, esôfago e cólon se mostram normais.

A **forma cardíaca** é o aspecto principal da DCh devido às suas características, frequência e consequências. Com a progressão da patologia o coração acometido pode apresentar diversas complicações graves como congestão, arritmias e desenvolvimento de um quadro progressivo de insuficiência cardíaca. Além disso, podem ser observadas leves alterações no eletrocardiograma (ECG), alta frequência de arritmias, bradicardia, edema e até morte súbita (PRATA, 2001).

Pacientes chagásicos acometidos pela **forma intestinal** podem desenvolver alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo e os principais órgãos acometidos são esôfago e cólon. As alterações na motilidade aparecem primeiramente com trânsito lento e dificuldade de esvaziamento, seguidas por aumento do diâmetro do órgão e maior dificuldade no esvaziamento, caracterizando a presença de megaesôfago ou megacólon. Além disso, é comum ocorrer algum grau de destruição do sistema nervoso autônomo, o que pode presumir-se que isto preceda as alterações na motilidade. A **forma mista** compreende a associação de manifestações cardíacas e gastrointestinais (PRATA, 2001).

Seguindo a resolução da infecção aguda, a fase crônica da doença se caracteriza por nível de parasitas circulantes muito abaixo do limiar de detecção microscópica e também pelo

aparecimento de anticorpos IgG dirigidos contra os antígenos do *T. cruzi* (GOMES, LORENA e LUQUETTI, 2009). Sendo assim, o diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico, e deve ser realizado utilizando-se testes como o ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*), imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta. Há ainda a avaliação por meio de hemocultura (HC), um método parasitológico direto (FILARDI & BRENER, 1987), ou mesmo a realização de PCR o qual tem indicação quando os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou para o controle de cura após o tratamento antiparasitário (DIAS, 2015).

### 2.3. Quimioterapia

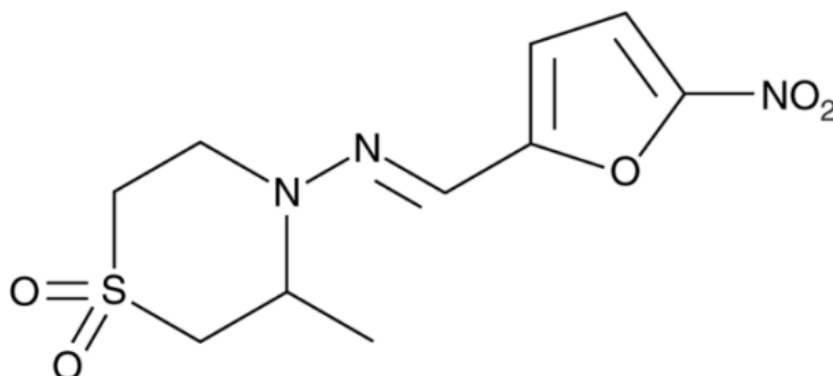
Desde a descoberta da doença por Carlos Chagas em 1909, iniciaram-se os testes experimentais com algumas substâncias para o tratamento (DIAS, et al, 2009). Foram testados atoxil (composto de arsênio), fucsina (rosanilina, um dos componentes da fucsina básica), tártato emético (antimonial pentavalente) e cloreto de mercúrio, todos sem sucesso terapêutico (COURA & CASTRO, 2002). A partir de 1936 até por volta dos anos 60 foram descritos resultados de mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos, porém todos sem atividade contra o *T. cruzi*. (DIAS, et al, 2009; COURA & CASTRO, 2002).

A partir de 1961, diversos estudos que demonstram a eficácia de alguns compostos, como por exemplo, a nitrofurazona, começaram a ser publicados. Desde o fim dos anos 60 e início dos anos 70, dois fármacos têm sido utilizados para o tratamento da DCh: nifurtimox (NF) e benznidazol (BZ) (COURA & CASTRO, 2002) os quais foram introduzidos na terapêutica de forma empírica (URBINA, 2002).

Muitos estudos demonstram que os resultados obtidos com NF e BZ podem variar de acordo com a fase da doença, o período e dose do tratamento, a idade do paciente e a cepa do parasito (COURA & CASTRO, 2002). Os dois fármacos demonstraram excelentes resultados com altas taxas de cura parasitológica durante a fase aguda da doença, porém sua eficácia diminui com a evolução da infecção (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011). A doença é curável caso o tratamento seja iniciado logo após a infecção (OLIVEIRA, FORY e OLIVEIRA, 2017). Ambas as substâncias são consideradas pró-fármacos que requerem ativação por enzimas nitroreduases. NF é o 3-metil-4-(5-nitro furfurilidenoamino)-tetra-hidro-4H-1, 4-tiazina-1,1 dióxido (Figura 1) e possui um mecanismo de ação que envolve a produção de radicais nitro-aniônicos, que na presença de oxigênio deixam o parasito incapaz de desintoxicar os radicais livres (DO CAMPO & MORENO 1986). Desde os anos 80, NF

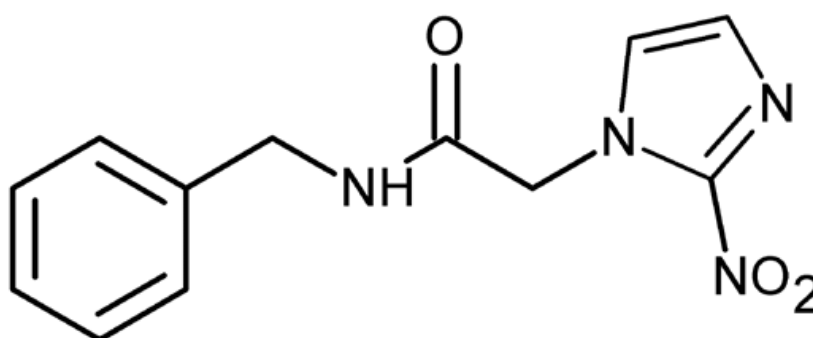
parou de ser comercializado, primeiramente no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai (COURA E CASTRO, 2002).

**Figura 1: Estrutura molecular do fármaco nifurtimox**



BZ (N-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida) (Figura 2) possui ação direta contra as formas circulantes (tripomastigota) e intracelulares (amastigota) do *T. cruzi* (MARIN-NETO et al, 2008). Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Porém, alguns autores sugerem que está relacionado à nitrorredução de componentes do parasito e à ligação de metabólitos ao DNA nuclear e ao k-DNA de *T. cruzi* e os lipídios e proteínas do parasita (POLACK E RICHLE, 1978). BZ foi inserido no mercado brasileiro com o nome de Rochagan e na Argentina como Rodanil.

**Figura 2: Estrutura molecular do fármaco benznidazol**



No Brasil apenas BZ é preconizado para o tratamento da DCh. Sua patente foi cedida pela Roche<sup>®</sup> ao Brasil e o governo brasileiro concedeu direito de sua produção ao laboratório LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco).

De acordo com Coura e Castro (2002), as reações adversas com o BZ podem ser sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas (geralmente entre o 7º e o 10º dia de tratamento), febre edema generalizada, linfadenopatia, dores articulares e

musculares, depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose, a manifestação mais grave, polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos. O fármaco possui boa eficácia na fase aguda da doença, mas eficácia limitada na fase crônica. Além disso, os inúmeros efeitos indesejáveis contribuem para a descontinuação do tratamento, além do questionamento sobre o uso destes compostos com o mesmo regime terapêutico entre a fase aguda e crônica (MUÑOS, MURCIA E SEGOVIA, 2011). Segundo Pérez-Molina e colaboradores (2015), BZ é preconizado como tratamento de primeira escolha, devido à melhor capacidade de penetração tecidual, melhor tolerabilidade e provavelmente um melhor perfil de segurança e eficácia do que NF.

Em adultos, BZ é utilizado na dose de 5 mg/kg/dia, em uma a três doses, por 60 dias. Para pessoas com peso acima de 60 kg, existe a alternativa de utilização da extensão do esquema terapêutico para adequar à dosagem alvo ideal, tendo como limite a dose máxima diária a 300 mg, a fim de reduzir a possibilidade de eventos adversos relacionados ao fármaco. Sendo assim, nesses casos, pode-se usar o esquema com 300 mg de BZ pelo número de dias equivalente ao peso do indivíduo, limitando a 80 dias (ANDRADE et al., 2011; DIAS et al., 2016).

Em crianças, as quais demonstram melhor tolerância, a dose utilizada é de 5 a 10 mg/kg/dia, dividida em duas tomadas diárias, por 60 dias. Existe ainda a formulação pediátrica de 12,5 mg em comprimidos solúveis, podendo ser diluída em água, suco de laranja ou leite (DIAS et al., 2016). A tabela 1 resume a posologia do tratamento antiparasitário na DCh.

**Tabela 1. Posologia do tratamento antiparasitário na doença de Chagas.**

<b>Medicamento</b>	<b>Público</b>	<b>Posologia</b>
<u>Benznidazol</u> Comprimidos de 12,5 mg (pediátrico) e de 100 mg (adulto)	Adulto	(1) 5 mg/kg/dia, 1 a 3x ao dia, por 60 dias, ou (2) 300 mg/dia, 2 a 3x ao dia, pelo número de dias equivalente ao peso do indivíduo (máximo 80 dias).
	Pediátrico	5 a 10 mg/kg/dia, 2x ao dia, por 60 dias. Esquemas sugeridos: <ul style="list-style-type: none"><li>• Entre 2,5 e 5 kg: 1 comprimido (12,5 mg), 2x ao dia;</li><li>• Entre 5 e 10 kg: 2 comprimidos (25 mg), 2x ao dia;</li><li>• Entre 10 e 15 kg: 3 comprimidos (37,5 mg), 3x ao dia.</li></ul>
<u>Nifurtimox</u> Comprimidos de 120 mg	Adulto	10 mg/kg/dia, 3x ao dia, por 60 dias.
	Pediátrico	15 mg/kg/dia, 3x ao dia, por 60 dias.

**Adaptado de Protocolos Clínicos e Diretrizes de Tratamento, 2018.**

No Brasil, a DCh é uma situação considerada relativamente comum (PCDT, 2018). Na grande maioria dos casos, os pacientes não apresentam quadro clínico grave, devendo ser acompanhados, majoritariamente, no âmbito da Atenção Primária à Saúde (APS). Também é encargo da equipe de APS o tratamento etiológico com BZ, quando indicado, para casos de DCh aguda ou crônica não grave. É preconizado também que a atenção em serviço especializado deva ser realizada principalmente em casos de pessoas com doença aguda grave, cardiopatia chagásica grave, doença digestiva candidatas a terapia específica, pessoas submetidas a transplantes ou com coinfeção facilitada pelo HIV, gestantes com cardiopatia ou com DCh aguda, ou ainda pessoas candidatas ao tratamento com NF (PCDT, 2018).

## 2.4. Novos horizontes para o tratamento da doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o fármaco ideal para a DCh deve seguir aos seguintes parâmetros: (i) capacidade de cura parasitológica de casos agudos e crônicos; (ii) ser efetivo em doses únicas ou poucas; (iii) estar acessível aos pacientes, ou seja, ser de baixo custo; (iv) não possuir efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) não há necessidade de internação hospitalar para o tratamento; (vi) sem indução de resistência. Esse fármaco ideal, porém, ainda não existe e é alvo de muitas pesquisas em quimioterapia da DCh.

Segundo Coura e Castro (2002), o grande desafio no tratamento da DCh é focado na busca de drogas e terapias que tenham capacidade de induzir a cura parasitológica em indivíduos tratados durante as diferentes fases da doença, com baixa toxicidade, boa atividade por via oral em poucas doses e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência pelo parasito. Sendo assim, pesquisadores como Coura (2009) propõem a pesquisa de outros fármacos, como o alopurinol e agentes antifúngicos como o cetoconazol (um derivado do imidazol), fluconazol e itraconazol (derivados do triazol) e, mais recentemente, o posaconazol (também um derivado azólico) que já se mostraram ativos *in vitro* contra o *T. cruzi*. Dentre os planejamentos de novas terapias podem ser considerados alguns tópicos como: o redirecionamento de fármacos tal qual o uso de inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE), tipo de colesterol essencial para membrana de fungos e de tripanosomatídeos (FIUZA, 2018), a busca por novos fármacos entre as substâncias naturais, ou terapia combinada, em que se faz a associação de fármacos já existentes ao BZ e NF.

Dentre as propostas terapêuticas o redirecionamento de fármacos é promissor, pois consegue trazer novos usos para fármacos já conhecidos (COURA, 2009), acelerando o processo de chegada do medicamento ao público alvo.

A terapia de associação de fármacos para o tratamento de DCh têm sido cada vez mais preconizada. Uma combinação de fármacos de diferentes classes químicas pode ser capaz de reduzir doses e a duração do tratamento, ocasionando em menor incidência de efeitos colaterais. Ademais, com esta estratégia, existe a possibilidade de redução de custos gerais, gerando uma opção mais econômica (MARTINS et al, 2015). De acordo com Almeida (2013), a quimioterapia de associação se torna mais vantajosa do que a monoterapia para a DCh, devido à existência de cepas resistentes aos fármacos utilizados, além da toxicidade causada por eles.



Segundo Coura (2009), o controle de doenças como tuberculose, hanseníase e AIDS só foi possível através do tratamento com combinações de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Além disso, uma combinação efetiva de fármacos pode aumentar a ação dos diferentes compostos terapêuticos (sinergismo) e dificultar o desenvolvimento de resistência ao tratamento do parasito. É importante relatar também que dados da literatura confirmam muitos estudos envolvendo associações de fármacos como opção para quimioterapia da DCh como por exemplo BZ e cetoconazol (ARAÚJO et al., 2000), cetoconazol e terbinafina (MALDONADO et al., 1993), BZ e aspirina, NF e aspirina (LOPEZ-MUÑOZ et al., 2009), BZ e diamidinas aromáticas (BATISTA et al, 2011).

## **2.5. Produtos naturais: a silibinina**

Dentre as diversas propostas de novas terapias para a DCh encontra-se a busca de novos medicamentos entre os produtos naturais. Visto que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais (BARREIRO & FRAGA, 1999), as possibilidades de um novo fármaco tornam-se inúmeras, pois as substâncias naturais são uma rica fonte de compostos com potencial ativo.

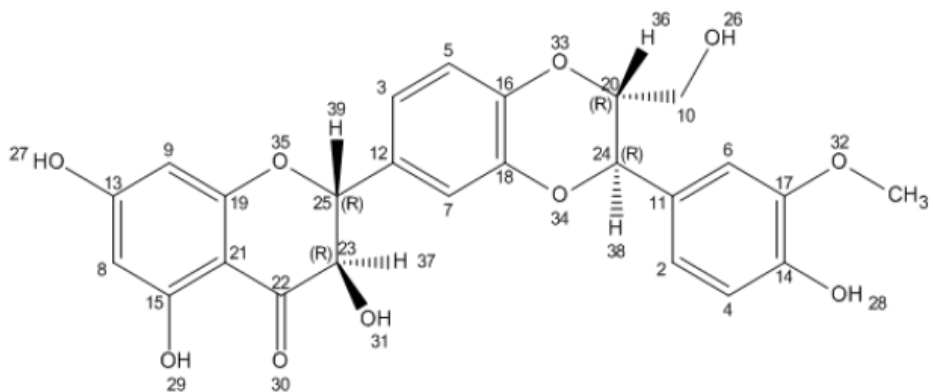
Dentro deste contexto, várias substâncias isoladas de plantas foram avaliadas como agentes anti-*T. cruzi*, com o objetivo de se encontrar fármacos com menor incidência de efeitos colaterais e maior eficácia para a quimioprofilaxia e quimioterapia da DCh. Segundo Saúde-Guimarães e Faria (2007), produtos naturais de diversas classes, como quinonas, flavonóides e terpenos mostraram-se ativas contra o *T. cruzi*.

Izumi e colaboradores (2011) demonstraram em um estudo de revisão uma relação de 136 compostos extraídos de produtos naturais contra formas infectantes do *T. cruzi*. Destes compostos, 13 são lignanas que se mostraram ativas contra o parasito. As lignanas podem sofrer processos de acoplamento oxidativo a flavonoides e formar os flavonolignanos (BIJAK, 2017).

A silibinina (SLB) (Figura 3) é um flavonolignano encontrado na planta *Silybum marianum* L. gaernt da família *Asteraceae*, conhecida popularmente como Cardo de leite. A planta é nativa do sul da Europa, sul da Rússia, Ásia Menor e norte da África e pode ser encontrada também na América do Norte e do Sul, bem como no sul da Austrália (ABENAVOLI et al, 2010).

Há mais de 2.000 anos, a Cardo de Leite tem sido utilizada na medicina europeia para tratar doenças hepáticas (ABC CLINICAL GUIDE, 2003). Atualmente seus usos são: doença hepática induzida por álcool; Hepatite viral; Cirrose hepática; Envenenamento por cogumelos; Pacientes diabéticos com doença hepática crônica, etc. (ABENAVOLI et al, 2010).

**Figura 3: Estrutura molecular da silibinina**



SLB é um potente antioxidante que pode estabilizar as membranas celulares, possui efeito anti-inflamatório, estimula as vias de desintoxicação, regenera o tecido do fígado, inibe o crescimento de algumas linhagens de células cancerosas e exerce atividade citotóxica direta em direção a linhas celulares de câncer selecionadas. Além disso, pode aumentar a eficácia de alguns agentes quimioterápicos (POST-WHITE, LADAS & KELLY, 2007), sendo esse efeito devido à ação de SLB ao inibir o efluxo celular mediado pela Glicoproteína – P (Pg-p), uma glicoproteína de membrana que atua como bomba de efluxo, com gasto de ATP (ZHANG & MORRIS, 2003). Assim, ao inibir a Pg-p, a SLB pode aumentar ou manter por mais tempo a concentração de fármacos dentro das células (JABINI et al, 2015).

Além disso, a SLB possui atividade fungicida causada por meio de uma perturbação na estrutura da membrana celular do microrganismo levando a formação de poros, trazendo um desequilíbrio no potencial de membrana, perda de íons intracelulares, e conseqüentemente à perda da integridade celular dos fungos (YUN; LEE, 2017). Considerando as premissas de busca de novos fármacos trazidas por Coura & Castro (2002), de estudos com fármacos antifúngicos, e considerando a capacidade fungicida de SLB, essa propriedade indica a possibilidade de SLB também ser tripanocida.

### 3. JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta da DCh existe o desafio de se encontrar um tratamento efetivo para todas as fases e formas da doença. Além disso, os fármacos atualmente utilizados – BZ e NF – causam uma série de efeitos adversos (MUÑOS, MURCIA E SEGOVIA, 2011) que contribuem para a descontinuação do tratamento. Dentre as diversas propostas de pesquisa por novos fármacos, este trabalho realizou um estudo *in vitro* preditor da atividade anti-*T.cruzi* de um produto natural e da associação de BZ a ele. O produto natural silibinina (SLB) é um flavonolignano que possui atividades anti-inflamatórias, antifúngicas, inibição da Pg-p, dentre outras (ZHANG e MORRIS, 2003; GREENLEE et al, 2007). A Pg-p é a principal proteína de efluxo do BZ que ao ser inibida, poderá trazer um aumento da biodisponibilidade do fármaco melhorando sua efetividade, além da possibilidade de redução de sua dose. Aliado a isso, a atividade anti-inflamatória de SLB é favorável em uma doença com perfil inflamatório como a DCh. Sendo assim, esta associação pode se mostrar uma estratégia interessante para se atingir um melhor efeito tripanocida e um tratamento mais efetivo para a DCh.

### 4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos de SLB e BZ livres e associados em diferentes concentrações *in vitro*.

#### 4.1. Objetivos específicos

- (i) Realizar estudo de citotoxicidade da SLB e BZ *in vitro*;
- (ii) Realizar estudo da atividade/eficácia de SLB e BZ *in vitro* sobre formas epimastigotas do *T.cruzi*;
- (iii) Realizar estudo da atividade/eficácia *in vitro* de SLB, BZ e associações sobre as formas amastigotas do *T.cruzi*.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Fármacos**

#### **5.1.1. *Silibinina***

A SLB, comercializada pela Sigma – Aldrich, foi utilizada nos testes *in vitro*. Para estes foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL de SLB com 2% DMSO e, a partir dessa solução, foram feitas as diluições desejadas para atingir as concentrações a serem testadas.

#### **5.1.2. *Benznidazol***

BZ (2-nitroimidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), 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 e colaboradores (2014) para permitir a condução dos testes *in vitro*.

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

Neste trabalho foi utilizada a cepa Y nos testes *in vitro*, 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 é considerada originalmente parcialmente resistente ao tratamento com Bz e Nif (FILARDI e BRENER, 1987).

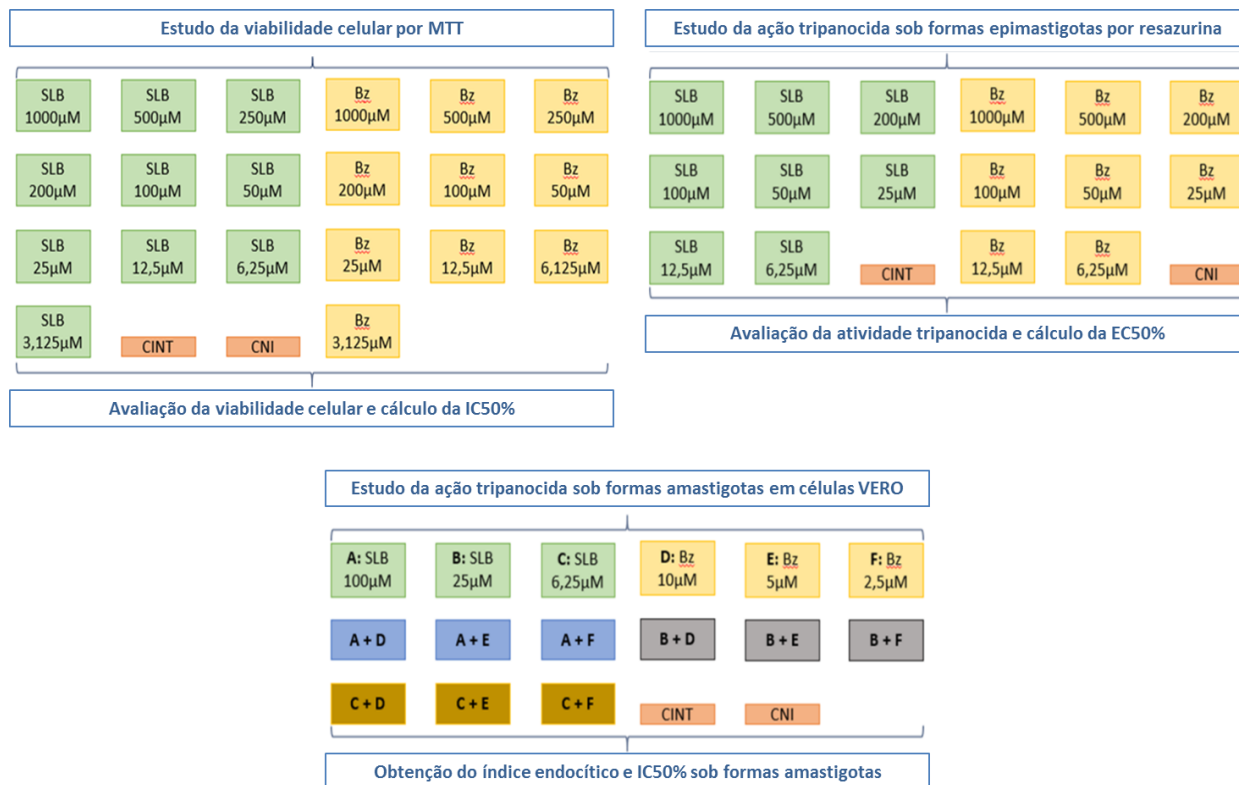
### **5.3. Linhagem celular**

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a VERO, células imortalizadas, oriundas de rins de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) estabelecida por Nakamura e colaboradores, 1962. A manutenção da cultura celular foi realizada de acordo com a metodologia de Da Silva e colaboradores, 2013. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco Modification of Minimum Essential Media) suplementado com, 5% de soro fetal bovino (SFB). As culturas de células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura foi tripsinizada semanalmente e repicada até as células atingirem confluência ideal para realização dos experimentos.

## 5.4. Estudos da eficácia *in vitro*

Todos os estudos *in vitro* foram realizados conforme o Delineamento Experimental (Figura 4).

**Figura 4: Delineamento experimental da avaliação da atividade citotóxica e anti-*T.cruzi* de SLB, BZ e associação SLB + BZ 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.

### 5.4.1. Estudo da atividade citotóxica de SLB e BZ por MTT

#### 5.4.1.1. Preparo de placas com as células VERO

Para o preparo de placas teste, as células contidas nas garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> foram lavadas com PBS estéril, seguidas por adição de 3 mL de Tripsina e incubadas a 37°C por 5 minutos. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 6 mL de meio DMEM F12, seguido de centrifugação a 1700 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspensionado em meio DMEM F12. 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 adicionadas diferentes concentrações do composto ativo SLB diluído 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, Figura 4). As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade.

#### **5.4.1.2. Teste viabilidade celular por MTT**

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* por MTT é um teste padrão-ouro utilizado pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) baseado em normas sugeridas pela *International Organization for Standardization*, ISO 10993-5: 2009, para avaliação biológica de dispositivos médicos (FDA, 2012). Este ensaio baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas converterem a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT, em sal formazan, formado por cristais, com uma coloração azul-escuro/roxo, insolúveis em água. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997). A metodologia utilizada foi a de acordo com a descrita em Mosmann, 1983: dissolve-se o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) em PBS a 5 mg/ml e filtra-se para esterilizar e remover pequenas quantidades de resíduo insolúvel presente em alguns lotes de MTT.

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<sub>50</sub> (concentração do fármaco que reduz a viabilidade das células em 50%), utilizando o programa *CompuuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 2 repetições.

#### **5.4.2 Avaliação da atividade anti-*T.cruzi* de SLB e BZ sobre formas epimastigotas de cepa Y.**

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 (Figura 4). Este método baseia-se na detecção de alterações colorimétricas causadas pelas capacidades de oxidação (azul) e redução (rosa) do corante resazurina, um indicador da função celular metabólica (ROLÓN et al, 2006).

Inicialmente foi ajustado o número de parasitos para a concentração de 1,0 x10<sup>6</sup>/mL. 100 µL 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 = absorbância a 570nm, A600 = absorbância a 600nm e R0 = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância 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 IC<sub>50</sub> (concentração inibitória do fármaco, que induz 50% do efeito analisado, inibição da

proliferação celular), utilizando o programa *CompuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 2 repetições.

### **5.4.3 Estudo da atividade anti-*T. cruzi* sobre formas amastigotas**

Este estudo foi realizado segundo o Delineamento Experimental (Figura 4). 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, Figura), 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.

#### **5.4.3.1 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 àquelas 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.



### 5.4.3.2 Índice de Seletividade

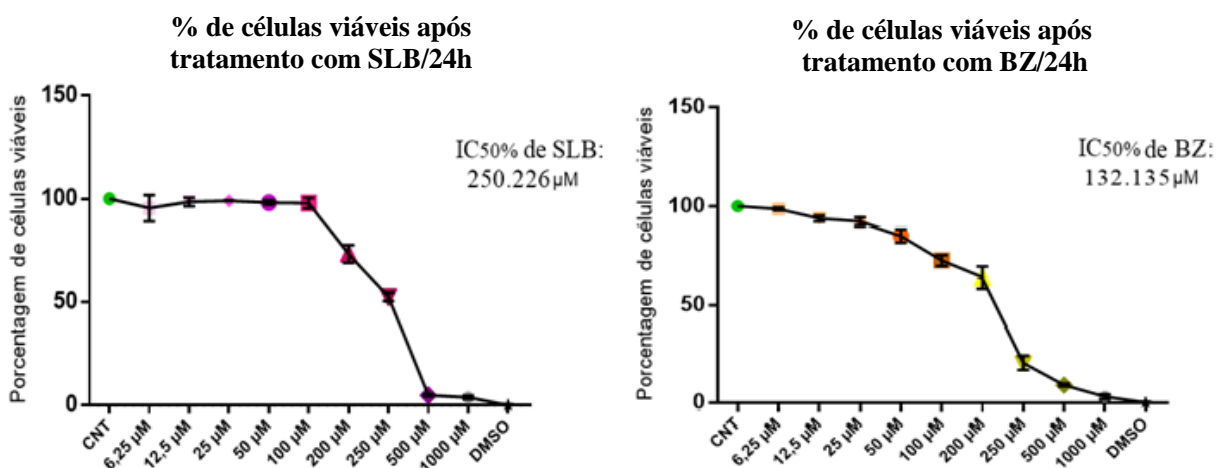
O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando a razão entre o valor de  $IC_{50}$  do ensaio de MTT (concentração do fármaco ou substância ativa que reduz a viabilidade celular em 50%) e o valor de  $IC_{50}$  do teste de atividade anti-*T. cruzi* em amastigotas (concentração 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.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estudo de citotoxicidade em células VERO utilizando o MTT

O fármaco SLB nas concentrações de 6,25 a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 5) não demonstrou diferença de toxicidade para as células VERO, assim como BZ nas concentrações de 6,25 a 10  $\mu\text{M}$ . A partir do percentual de inibição, foi calculado o  $IC_{50}$  por meio do programa *Compusyn* (Materiais e Métodos, item 4.4.1.2) e obteve-se o valor de 250.226  $\mu\text{M}$  para SLB e de 132.135  $\mu\text{M}$  para BZ.

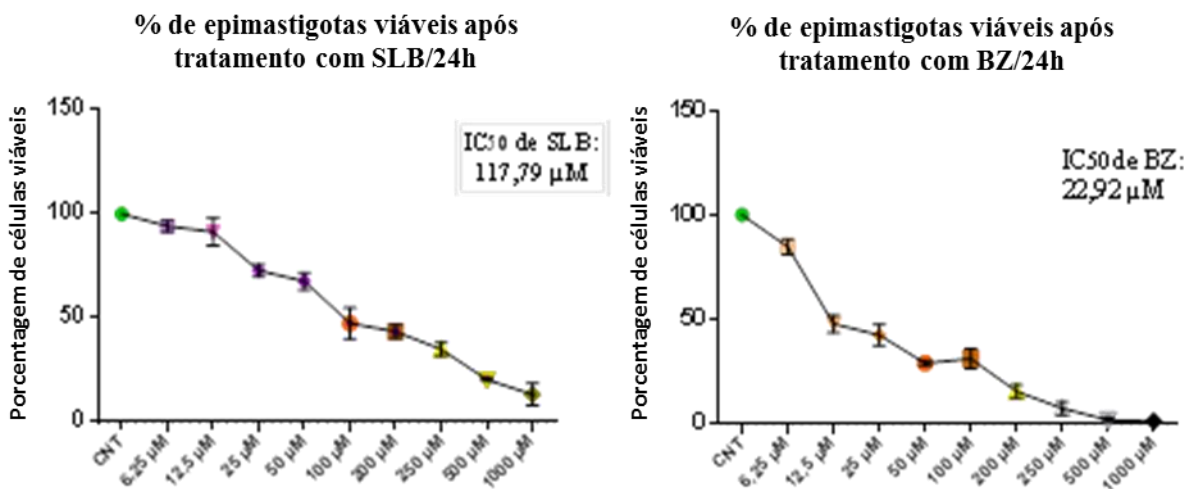
**Figura 5: Porcentagens (%) de viabilidade celular das células VERO após tratamento com SLB e BZ no ensaio de MTT.**



### 6.2. Avaliação da atividade anti- *T. cruzi* em formas epimastigotas

O fármaco SLB demonstrou atividade potencial sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 6), com redução significativa da viabilidade de parasitos a partir de 25  $\mu\text{M}$ , enquanto o fármaco de referência (BZ) a partir de 12,5  $\mu\text{M}$ .

**Figura 6: Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com SLB e BZ por ensaio com resazurina.**

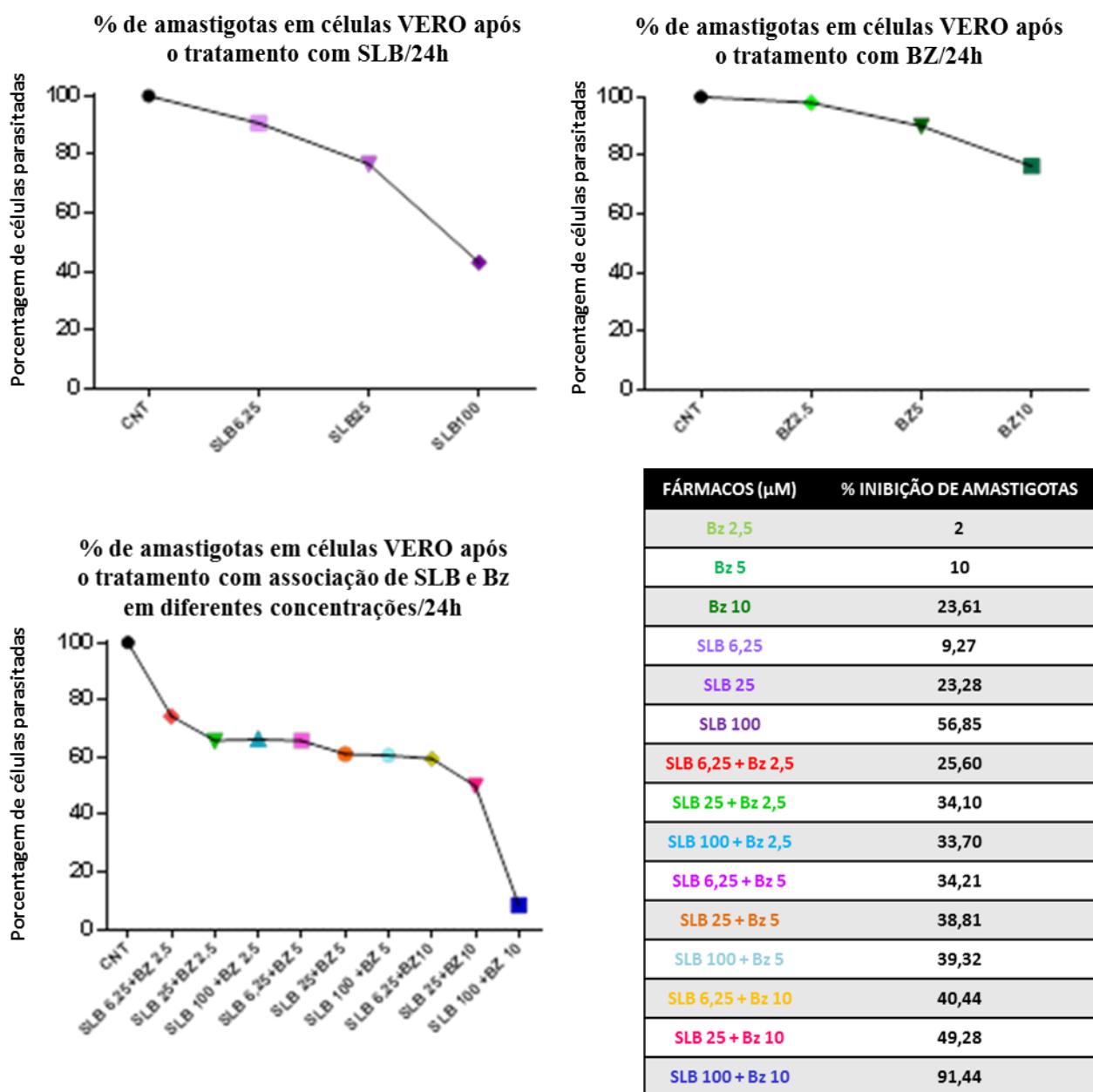


Utilizando do *software Compusyn* foi calculada a redução da viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* e obtido o  $IC_{50}$ . Para a SLB o  $IC_{50}$  foi de 117,79  $\mu M$ , enquanto para o BZ (Figura 6) o  $IC_{50}$  obtido foi de 22,92  $\mu M$ . Os resultados apresentados evidenciam que BZ foi capaz de eliminar maior número de epimastigotas em concentrações menores que SLB.

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

Foi calculado o índice endocítico (IE) para se determinar o efeito do tratamento das células infectadas, tratadas com as diferentes concentrações dos compostos SLB, BZ e associações (Materiais e Métodos, item 5.4). 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 7: Índices de inibição da infecção em células VERO com a cepa Y de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com SLB, BZ e diferentes associações de SLB e BZ em  $\mu\text{M}$ .**



Observou-se uma diferença na porcentagem (%) de amastigotas entre o controle não tratado e os grupos tratados com os fármacos SLB e BZ a partir das menores concentrações (6,25 $\mu\text{M}$  para SLB e 2,5 $\mu\text{M}$  para BZ). As maiores concentrações de SLB (100 e 25  $\mu\text{M}$ ) que garantiram 99% de sobrevivência das células VERO (segundo ensaio de citotoxicidade, item 6.1) induziram inibição de **23,28** e **56,85%** de amastigotas em células VERO, respectivamente, quando considerada a porcentagem de inibição do índice endocítico (média da % de células infectadas x número médio de amastigotas por células infectadas). Já o

fármaco BZ demonstrou porcentagem de inibição de amastigotas em células VERO de **23,61%** em sua maior concentração testada, 10 µM (a qual também garantiu uma média de 99% da viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade).

De acordo com o ensaio com os fármacos em associação observou-se que todas as diferentes associações demonstraram alguma atividade anti *T. cruzi* em formas amastigotas em células VERO. A associação de SLB100+BZ10 µM foi a que apresentou o melhor resultado, superior às outras associações e aos fármacos SLB e BZ em monoterapia, resultando em uma inibição de **91,44%** de amastigotas em relação ao CNT.

Foram calculados a seguir os índices de seletividade (IS - razão entre a IC<sub>50</sub> de obtido pelo teste de citotoxicidade por MTT, dividido pelo IC<sub>50</sub> obtido de cada composto (SLB e BZ) em amastigotas após 24h de incubação).

Conforme detalhado no item 5.4.3.2 (Materiais e Métodos), foi calculado o índice de seletividade relativo à SLB e BZ, (Tabela 2). Observou-se uma maior seletividade de BZ, cerca de 2,5 vezes maior (**IS = 7,68**) quando comparado à SLB cujo **IS = 3,13**.

**Tabela 2: Índice de seletividade de SLB e BZ oriundos da relação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e índice de inibição (IE<sub>50</sub>%) relativo à cepa Y de *T. cruzi*.**

Fármaco	IC <sub>50</sub> MTT	IE <sub>50</sub> Infecções <i>in vitro</i>	Índice de Seletividade (IS)
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.

## 7. DISCUSSÃO

Após mais de 100 anos da sua descoberta por Carlos Chagas (1909), a DCh ainda é considerada negligenciada e “silenciosa” por afetar majoritariamente populações pobres que não têm voz política ou acesso a cuidados de saúde e devido à progressão lenta de seu curso clínico (WHO, 2018). Sendo assim, a DCh ainda se apresenta como um desafio em questão de tratamento e assistência clínica dos pacientes afetados.

A busca por um tratamento para a DCh foi iniciada logo após a sua descoberta, e várias substâncias passaram por triagens experimentais. Mesmo assim, os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da DCh são nifurtimox e benznidazol, ambos com eficácia comprovada principalmente na fase aguda e crônica recente da infecção (COURA, 2009). Ainda que tenha ocorrido a inclusão dos pacientes chagásicos crônicos nas diretrizes nacionais para o tratamento da DCh (PCDT, 2018), a maioria das prescrições médicas visam apenas o tratamento sintomático da cardiomiopatia e sintomas digestivos, evitando medicamentos antiparasitários (VIOTTI et al, 2014).

Frequentemente são obtidos resultados diferentes após o tratamento com os dois fármacos e isso pode ser explicado pela existência de diferentes cepas de *T. cruzi* (GUEDES et al, 2006) sendo algumas delas resistentes ao tratamento (COURA, 2009), fase da doença, o período de tratamento, a dose, a idade e a origem geográfica dos pacientes (COURA & CASTRO, 2002). Além disso, ambos os fármacos induzem efeitos colaterais significativos aos pacientes, o que leva a descontinuação do tratamento.

Devido aos fatos explicitados e, considerando a existência de diversos outros mecanismos de infecção, além da presença da DCh em 21 países das Américas (WHO, 2018) e em diversos países de outros continentes como Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS, 2007), é evidente a necessidade de mais incentivo às pesquisas, para se encontrar alternativas terapêuticas ou novos compostos que demonstrem maior potência e seletividade nas duas fases da doença (MUÑOZ, MURCIA & SEGOVIA, 2011).

Algumas alternativas terapêuticas propostas são promissoras como: o redirecionamento de fármacos, tal qual o uso de inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE) (FIUZA, 2018), a busca por novos fármacos entre as substâncias naturais (BARREIRO & FRAGA, 1999), o uso de fármacos tradicionais como o BZ inseridos em sistemas farmacêuticos mais modernos (CUNHA-FILHO et al, 2012) e a terapia combinada

(MARTINS et al, 2015), em que se faz a associação de fármacos ao BZ ou NF. Esta última alternativa é uma das estratégias utilizada em outras doenças parasitárias (WHO, 2001), pois é possível alcançar maiores índices de cura, menor tempo de tratamento e menor incidência de efeitos adversos (MARTINS et al, 2015).

Sendo assim, neste estudo, buscamos avaliar por meio de ensaios *in vitro* um produto natural, a SLB, isolada e também combinada ao fármaco de referência BZ, investigando a estratégia de associação de fármacos.

Nos últimos anos a quantidade de estudos investigativos sobre as atividades biológicas de SLB aumentou devido a grande diversidade de efeitos farmacológicos importantes associados a esse composto (DE OLIVEIRA et al, 2015). Em uma revisão, Kren e Walterová (2005) listam efeitos terapêuticos da SLB como hepatoproteção, anticâncer, neuroproteção, além disso, há atividade antifúngica (YUN; LEE 2017), dentre outros.

A ação antifúngica de SLB torna-se interessante para DCh pois de forma semelhante ao que acontece com os antifúngicos da classe dos IBE (itraconazol, cetoconazol, posaconazol, etc) por meio de alteração na estrutura membranar e assim poderia causar a morte do parasito. SLB em fungos promove poros na membrana do microorganismo, o que o desequilibra eletrostaticamente causando morte (YUN; LEE, 2017), que .

Aliada ao efeito antifúngico, a SLB pode aumentar a eficácia de alguns fármacos (POST-WHITE, LADAS & KELLY, 2007) ao inibir o efluxo celular mediado pela Glicoproteína – P (Pg-p), uma glicoproteína de membrana que atua como bomba de efluxo dependente de ATP (ZHANG & MORRIS, 2003). Assim, considerando que a Pg-p é uma das principais responsáveis pelo efluxo de BZ, ao inibi-la, SLB poderia permitir que o BZ fosse eliminado mais lentamente, permanecendo mais tempo na circulação, exercendo então maior atividade terapêutica, possibilitando redução da dose usual do fármaco e uma diminuição da incidência de reações adversas.

Somado a isso, a SLB poderia também inibir a P-gp presente na membrana do parasito (CAMPOS et al., 2013), permitindo que BZ permaneça no interior do microorganismo e leve à morte dele mais rapidamente.

Além dessas possibilidades, a SLB possui ainda uma atividade anti-inflamatória (GREENLEE, 2007), que pode contribuir para a melhoria das lesões teciduais causadas pelo *T. cruzi*.

Iniciou-se este estudo avaliando a toxicidade *in vitro* do composto silibinina sobre células VERO pelo método MTT. O objetivo desta avaliação foi obter um nível de segurança da ação do fármaco sobre as células, além de se obter parâmetros para traçar as doses a serem utilizadas na avaliação de atividade sobre formas amastigotas do *T. cruzi*. Paralelamente foi realizada a avaliação das mesmas concentrações do fármaco de referência, o BZ. Assim, foi obtido o IC<sub>50</sub> de 250,226µM para a SLB e de 132,135µM para o BZ, mostrando que a SLB foi quase duas vezes menos tóxica que o BZ para as células VERO. Este dado é promissor no contexto da DCh, já que os fármacos para o tratamento, NF e BZ, possuem altas taxas de toxicidade. Em relação ao IC<sub>50</sub> de SLB encontrado neste estudo, o resultado foi superior ao do grupo de Elhag e colaboradores (2015) que encontrou valores de IC<sub>50</sub> da SLB como 40 µM para a linhagem A127 e 200 µM para LN229. Já Marchiori e colaboradores (2017) demonstraram que SLB era tóxica em concentrações acima de 150 µM para células da linhagem Huh 7,5. É importante ressaltar que esta divergência de resultados encontrados pelos autores pode ser explicada pelas diferenças nas linhagens celulares, método de avaliação e instrumentação empregados.

Após o estudo de citotoxicidade pelo método MTT, foi avaliado o efeito tripanocida de SLB sobre parasitos *in vitro*. Para tal, foi utilizado o método colorimétrico com resazurina e um isolado da cepa Y de *T. cruzi*, considerado parcialmente resistente ao BZ (FILARDI & BRENER, 1987). O método com resazurina 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) e mostra alta correlação com outras metodologias, como o MTT.

A escolha de trabalhar com as formas epimastigotas do *T. cruzi* baseou-se nos estudos de Martínez-Díaz e colaboradores (2001). O grupo demonstrou em um estudo de caracterização biológica de cepas do parasita, que a cepa Y, uma cepa do grupo genético TcII, delgada e de alta infectividade, se multiplica com facilidade em meio LIT, mas apresenta baixas taxas de diferenciação em tripomastigotas em meio Grace. Em consequência dessa dificuldade de se obter tripomastigotas na quantidade necessária para realização de todos os testes com ambos os compostos, SLB e BZ, optou-se por realizar o ensaio sobre formas

epimastigotas. Existem diversos trabalhos na literatura que demonstram metodologias de avaliação de atividade tripanocida de vários compostos em formas epimastigotas do *T. cruzi* (REIGADA et al, 2019; HERNÁNDEZ et al, 2019; ROBLES et al, 2019; BOMBAÇA et al., 2018).

Os resultados encontrados nesta avaliação da atividade anti *T. cruzi* sobre formas epimastigotas da cepa Y demonstraram um valor de IC<sub>50</sub> de 117,79 µM para SLB. Este resultado é um dado inédito, já que não há na literatura qualquer avaliação da SLB sobre forma evolutiva de *T. cruzi*. A hipótese para esta situação é que a SLB demonstrou atividade semelhante aos antifúngicos da classe dos inibidores da síntese do ergosterol (itraconazol, cetoconazol, posaconazol), promovendo ação tripanocida. Paralelamente, o resultado de IC<sub>50</sub> encontrado para o BZ foi de 22,92 µM, um valor maior do que o encontrado em alguns trabalhos que utilizaram cepa Y. Sulsen e colaboradores (2006) encontraram IC<sub>50</sub> para BZ de 12µM, enquanto Moreno e colaboradores (2010) encontraram um valor de IC<sub>50</sub> de 16,3 µM. Ambos os trabalhos utilizaram contagem manual dos parasitos em câmara de Neubauer como método para avaliação da atividade dos compostos, o que pode explicar a diferença de resultados encontrada. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que BZ foi mais capaz de eliminar um maior número de epimastigotas do que SLB, que precisou de concentrações maiores para ter efeito semelhante ao BZ. Analisando por outro lado, os resultados de citotoxicidade demonstraram que BZ foi quase duas vezes mais tóxico do que SLB. Isto pode levar a pensar que a estratégia de associação destes fármacos, pode alcançar resultados positivos na atividade anti- *T. cruzi*.

Por fim, fundamentando-se nos resultados do experimento de citotoxicidade por MTT, foram definidas as concentrações de SLB e BZ a serem utilizadas no ensaio em células infectadas com formas amastigotas do *T. cruzi*. A opção foi utilizar as maiores concentrações que mantivessem 100% da viabilidade celular. Assim, nas concentrações de 100 e 25 µM, a SLB demonstrou-se ativa contra *T. cruzi*, obtendo redução de 56,85% e de 23,28% dos parasitos em células VERO, respectivamente. Por outro lado, BZ em sua maior concentração que mantinha viabilidade de 100% das células (10µM), demonstrou porcentagem de redução da infecção de 23,61%, o mesmo observado com a concentração de 25µM de SLB. Se comparado desta maneira, pode-se concluir que o fármaco de referência BZ, frente ao composto natural SLB, foi mais ativo sobre as formas amastigotas em concentração 2,5 vezes menor (10uM de BZ, frente a 25uM de SLB). Além disso, observou-se que BZ, mesmo sendo



mais citotóxico, obteve uma maior seletividade, cerca de 2,5 vezes maior (IS = 7,68) se comparado à SLB cujo IS = 3,13.

Avaliando as associações testadas, notou-se que todas demonstraram alguma atividade anti *T. cruzi* em formas amastigotas intracelulares em células VERO. Os melhores resultados obtidos foram com as associações onde a concentração de BZ era 10  $\mu$ M (SLB6,25 + BZ10  $\mu$ M; SLB25 + BZ10  $\mu$ M; SLB100 + BZ10  $\mu$ M). Dentre todas as associações, o melhor resultado obtido foi com a associação de SLB e BZ nas maiores concentrações de ambos: SLB100 + BZ10  $\mu$ M, onde foi observada uma inibição da infecção celular superior a 90%. Esse resultado sugere a hipótese de efeito combinado dos compostos. Neste caso, SLB pode ter apresentado ação inibitória da glicoproteína – P (Pg-p) das células, permitindo menor efluxo celular de BZ, o qual permaneceu por mais tempo e em maior concentração intracelular, promovendo ação tripanocida. Não existem dados na literatura referentes à combinação entre os fármacos SLB e BZ. Porém, muitos estudos foram realizados com esta estratégia utilizando BZ. Estudos de Mazzeti (2014) alcançaram resultados que evidenciaram aumento da atividade anti – *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* com associação de BZ e alopurinol. Lourenço e colaboradores, 2018, demonstraram que a combinação de BZ e cloridrato de amiodarona foi eficaz na eliminação de cepas Y do *T. cruzi* em cultura.

Segundo Mazzeti (2014), não se pode esperar que os estudos de terapia combinada *in vitro* determinem a eficácia de certa combinação no tratamento clínico futuro. Isto pode ser explicado devido à alguns fatores, dentre eles a farmacocinética dos compostos. Por outro lado, os efeitos e interações observados *in vitro* fundamentam os estudos pré-clínicos *in vivo*. Neste trabalho observamos que SLB demonstrou atividade anti – *T. cruzi* e que a associação com BZ aumentou esta atividade. Isso pode dar margem para futuros delineamentos *in vivo* utilizando estes fármacos.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

(i) Observamos que a substância natural SLB apresentou menor citotoxicidade *in vitro* do que o fármaco de referência BZ;

(ii) SLB demonstrou atividade *in vitro* sobre as formas epimastigotas do *T. cruzi*, porém menor que BZ;

(iii) Por fim foi demonstrado que a SLB também foi ativa contra formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*, porém menos ativa que BZ e as associações apresentaram atividade contra os amastigotas, sendo SLB100 + BZ10 uM a melhor associação mesmo frente a melhor concentração testada de BZ.

## 9. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho concluímos que SLB apresenta ação tripanocida e que em associação ao BZ (maior concentração SLB100+ BZ10 uM) demonstrou melhores resultados que dos fármacos avaliados isoladamente, indicando que há potencial para avaliação *in vivo*.

## 10. REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L. et al. **Milk thistle in liver diseases: past, present, future.** *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423–1432, jun. 2010.
- ALMEIDA, M. C. **Avaliação da associação do quimioterápico Benzonidazol a outros fármacos com ação anti-T. cruzi no tratamento da doença de chagas experimental.** Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Mestrado em Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8003/1/Marcio%20Cerqueira%20de%20Almeida%2c%20Avalia%2c%20a7%2c%20a3o%20da%20associa%2c%20a7%2c%20a3o...%202013.pdf>>.
- ARAÚJO, M. S. S., et al. **A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 45,p.819-824, jun. 2000.
- BARBOSA, B. S. et al. **History of development of the cultivation animal cells.** *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 9, jan. 2015.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. **A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos.** *Química Nova*, 22, 744-759, set. 1999.
- BATISTA, D. G. J., et al. **Combined Treatment of Heterocyclic Analogues and Benznidazole upon Trypanosoma cruzi In Vivo.** *Plos One*, v. 6 (7), p. e22155, jul. 2011.
- BIJAK, M. **Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (Silybum marianum L. Gaernt.) — Chemistry, Bioavailability, and Metabolism.** *Molecules*, 22(11), nov. 2017.
- BOMBAÇA, A. C. S., et al. **Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in Trypanosoma cruzi.** *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 23,11 2800, out. 2018.
- CHAGAS, C. R. J. **Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, aug. 1909.
- CLAYTON, J. **Chagas Disease 101.** *Nature*, 465, S4—S5,jun. 2010.
- COURA, J. R. **Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 549-554, jul. 2009.
- COURA, J. R., & BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review.** *Acta Tropica*, 115(1-2), 5–13, mar. 2010.
- COURA, J. R., & DE CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 3-24, jan. 2002.
- CUNHA-FILHO, M. S. S., et al. **Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas.** *Brasília Med*;49(4):279-283, dez. 2012.

DA SILVA, C. F. et al. **Activities of psilostachyin A and cynaropicrin against Trypanosoma cruzi in vitro and in vivo.** Antimicrobial agents and chemotherapy. vol. 57,11 (2013): 5307-14, nov. 2013.

DE LANA, M., TAFURI, W. L., BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana.** 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016. cap.11, p. 91-118.

DE OLIVEIRA, D. R. et al. **In Vitro Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin.** BioMed Research International, fev. 2015.

DIAS, E. et al. **Chagas disease;** a clinical, epidemiologic, and pathologic study. Circulation 14 6, dez. 1956.

DIAS, L. C. et al . **Quimioterapia da doença de Chagas:** estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, nov. 2009.

DIAS, J. C. P. et al. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.** Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 25, n. spe, p. 7-86, jun. 2016.

DO CAMPO, R., & MORENO, S. N. J. **Free radical metabolism of antiparasitic agents.** Fed Proceed 45: 2471-2476, set. 1986.

Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. **Ministério da Saúde,** 2019. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 21 out. 2019.

'Doenças Negligenciadas e a Agenda 2030' é tema de seminário na Fiocruz. **Coordenação de Comunicação Social/Fiocruz,** 2019. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/doencas-negligenciadas-e-agenda-2030-e-tema-de-seminario-na-fiocruz>>. Acesso em: 24 out. 2019.

ELHAG, R., MAZZIO, E. A., & SOLIMAN, K. F. **The effect of silibinin in enhancing toxicity of temozolomide and etoposide in p53 and PTEN-mutated resistant glioma cell lines.** Anticancer research, 35(3), 1263–1269, mar. 2015.

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, 81(5), 755–759, out. 1987

FIUZA, L. F. A. **Identificação de novos compostos inibidores da síntese de ergosterol como potenciais à fármacos para terapia da Doença de Chagas.** Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária. Rio de Janeiro, jan. 2018. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/31857/2/ludmila\\_fiuza\\_ioc\\_mest\\_2018.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/31857/2/ludmila_fiuza_ioc_mest_2018.pdf)>. Acesso em: 21 out 2019.

GOMES, Y.M., LORENA, V.M., LUQUETTI, A.O. **Diagnosis of Chagas disease:** what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104 (suppl 1): 115–21, jul. 2009.

- GONÇALVES, C. S., et al. **Revisiting the Trypanosoma Cruzi Metacyclogenesis: Morphological and Ultrastructural Analyses during Cell Differentiation.** *Parasites & Vectors* 11, fev. 2018.
- GREENLEE, H et al. **Clinical Applications of Silybum marianum in Oncology.** *Integrative Cancer Therapies*, 6 (2): 158-165, jun. 2007.
- GUEDES, P.M.M. et al. **Advancens in Chagas Disease Chemotherapy.** *Antiinfective Agents in Medicinal Chemistry*, 5(2), 175-185, maio 2006.
- HOARE, C. A., & WALLACE, F. G. **Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology.** *Nature*, 212(5068), 1385–1386, dez. 1966.
- HERNÁNDEZ, K.D.R., et al. **Coumarins isolated from Calophyllum brasiliense produce ultrastructural alterations and affect in vitro infectivity of Trypanosoma cruzi.** *Phytomedicine*. 61, 152827, ago. 2019.
- IZUMI, E., et al. **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, abr. 2011.
- JABINI, R. et al. **Effects of Combined Therapy with Silymarin and Glucantime on Leishmaniasis Induced by Leishmania major in BALB/c Mice.** *Drug Research*, 65(03), 119–124, mar. 2015.
- KREN, V., WALTEROVÁ, D. **Silybin and silymarin--new effects and applications.** *Biomed Papers Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*149(1):29-41, jun. 2005.
- LEWIS, Michael D. et al. **Imaging the Development of Chronic Chagas Disease after Oral Transmission.** *Scientific Reports* 8, jul. 2018.
- LIU, Y. et al. **Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction.** *Journal Neurochem*, 69,581-593, ago. 1997.
- LÓPEZ-MUÑOZ, R., et al. **Trypanosoma cruzi: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole.** *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 167-171, set. 2009.
- LOURENÇO, A. M., et al. **Evaluation of in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of medications benznidazole, amiodarone hydrochloride, and their combination.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba* , v. 51, n. 1, p. 52-56, fev. 2018.
- MALDONADO, R. A., et al. **Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, USA*, v. 37, n. 6, p. 1353-1359, jun. 1993.
- MARCHIORI, M. C. L., et al. **Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association.** *AAPS PharmSciTech* 18: 3236, jun. 2017.
- MARIN-NETO, J. A. et al. **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*, 156(1), 37–43, jul. 2008.

- MARTINS, T. A. F., et al. **Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-Trypanosoma cruzi activity in experimental Chagas disease.** PLoS One. 2015; 10(6), jun. 2015.
- MARTINS-MELO, F.R., et al. **Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011.** Bull World Health Organ.94(2):103–110, fev. 2016.
- MARTINS-MELO, F.R., et al. **Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis.** Acta Tropica. v. 130, 167-174, fev. 2014.
- MARTINEZ-DIAZ, R. A., et al . **Biological characterization of Trypanosoma cruzi strains.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 96, n. 1, p. 53-59, jan. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT).** Relatório de Recomendação, jul. 2018. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2018/Relatorio\\_PCDT\\_DoencaChagas\\_C P42\\_2018.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2018/Relatorio_PCDT_DoencaChagas_C P42_2018.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2019
- MORENO, M., et al. **Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105(7):918-24, nov. 2010.
- MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** Journal of Immunological Methods, 65 (1-2), 55–63, dez. 1983.
- MUÑOZ, M. J., MURCIA, L., & SEGOVIA, M. **The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease.** Expert Review of Anti-Infective Therapy, 9(1), 5–7, jan. 2014.
- OLIVERA, M. J., FORY, J. A., OLIVERA, A. J. **Therapeutic drug monitoring of benznidazole and nifurtimox: a systematic review and quality assessment of published clinical practice guidelines.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 50, n. 6, p. 748-755, dez. 2017.
- PEREIRA, K. S., et al. **Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food.** Advances in Food and Nutrition Research, 63–85, jun. 2010.
- POLAK, A., & RICHLE, R. **Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 72(1), 45–54, fev. 1978.
- POST-WHITE, J., LADAS, E. J., & KELLY, K. M. **Advances in the Use of Milk Thistle (Silybum marianum).** Integrative Cancer Therapies, 6(2), 104–109, jun. 2007.
- PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** Lancet Infectious Diseases, v. 01, set. 2001.
- RASSI, A., RASSI, A., & MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease.** The Lancet, 375(9723), 1388–1402, abr. 2010.
- REIGADA, C., et al. **Repurposing of terconazole as an anti Trypanosoma cruzi agent.** Heliyon, 5(6), e01947. eCollection, jun. 2019.

ROBLES, O.S., et al. **Trypanocidal and toxicological assessment in vitro and in silico of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species.** Food and Chemical Toxicology. 125, Pages 55-61, mar. 2019.

SALEHI A., et al. **Epidemiologic status of bladder cancer in Shiraz, southern Iran.** Asian. Pac J Cancer Prev.;12:1323–1327, maio 2011.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A., FARIA, A. R. **Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 17(3): 455-465, jul./set. 2007.

SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, supl. 1, p. 75-86, out. 2007.

SILVEIRA, A.C. **Os novos desafios e perspectivas futuras do controle.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44 Suppl 2(suppl 2):122-4, jan. 2011.

SÜLSEN, V., et al. **In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine.** Parasitology Research, v. 98, n. 4, p. 370–374, abr. 2006.

THE ABC CLINICAL GUIDE TO HERBS. **Milk Thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertner).** Clinical Overview. 2003. Disponível em: <[http://cms.herbalgram.org/ABCGuide/GuidePDFs/Milk\\_Thistle.pdf](http://cms.herbalgram.org/ABCGuide/GuidePDFs/Milk_Thistle.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2018.

VIOTTI R., et al. **Towards a paradigm shift in the treatment of chronic chagas disease.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, n. 2, p. 635–639, fev. 2014.

WHO – World Health Organization 2018. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 12 out. 2018.

WHO – World Health Organization 2017. **Report of the Tenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases, 2017.**

YUN, D. G., & LEE, D. G. (2017). **Assessment of silibinin as a potential antifungal agent and investigation of its mechanism of action.** IUBMB Life, 69(8), 631–637, jun. 2017.

ZHANG, S., MORRIS, ME. **Effects of the Flavonoids Biochanin A, Morin, Phloretin, and Silymarin on P-Glycoprotein-Mediated Transport.** Journal of Pharmacology e Experimental Therapeutics, 304 (3) 1258-1267, mar. 2003.

ZINGALES, B. **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** Infect Genet Evol,12(2):240-53, mar 2012.

ZINGALES, B. **Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.** Acta Tropica <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica>, set. 2017.