



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**FABIANA GONÇALVES LINO**

**Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da  
infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni***

Rio de Janeiro

2012

**FABIANA GONÇALVES LINO**

**Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da  
infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Rio de Janeiro

2012

## Ficha catalográfica

L758e Lino, Fabiana Gonçalves.  
Efeitos da silimarina e silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni*/ Fabiana Gonçalves Lino; orientador Alexandre dos Santos Pyrrho. — Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2012.  
76f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Esquistossomiase. 2. Silimarina. 3. Silibina. 4. *Schistosoma mansoni*.  
I. Pyrrho, Alexandre dos Santos. II. Título.

**CDD 615.718**

Este trabalho foi realizado no setor de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação do professor Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho.

Dedico este trabalho a minha mãe, Lili, e às minhas irmãs, Marcia e Angela, pelo exemplo, amor e apoio de todos esses anos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Alexandre dos Santos Pyrrho**, pela dedicação, orientação e oportunidade concedida;

À Prof<sup>a</sup> Dra. **Claudia Neto Paiva** e à Prof<sup>a</sup> Dra. **Suzana Guimarães Leitão** pela colaboração;

À Prof<sup>a</sup> Dra. **Gisela Maria Dellamora Ortiz**, pela valiosa contribuição para este trabalho e paciência;

Aos amigos de laboratório **Hilton Antônio Mata dos Santos**, **Carolina Carneiro Rocha**, **Fabíola Ramos Xavier**, **Rodrigo Batista dos Santos**, pela amizade, companheirismo e colaboração para realização deste trabalho, e em especial ao **Hilton Antônio** pelos ensinamentos e incentivo;

Ao meu querido padrinho **José Benjamin de Almeida Tebaldi**, pela palavra amiga e apoio de sempre;

Ao meu noivo **Fernando Lino Ferreira**, pela paciência, dedicação e companheirismo.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da  
infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni*

**Fabiana Gonçalves Lino**

Orientador: Alexandre dos Santos Pyrrho

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como  
parte dos requisitos necessários à obtenção do  
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

---

Orientador: Alexandre dos Santos Pyrrho

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Lúcia Martins da Silva

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Morgana Teixeira Lima Castelo Branco

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Luisa Palhares de Miranda

## Resumo

LINO, Fabiana Gonçalves. Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni*. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A esquistossomíase é uma infecção parasitária que causa grande morbidade e mortalidade no mundo. Vários países são afetados e muitas pessoas desenvolvem sequelas graves da infecção. O desenvolvimento ou a descoberta de fármacos que ajam minimizando as sequelas desta infecção são extremamente importantes. No presente trabalho, tem-se como objetivo avaliar a ação da silimarina / silibina (componente isolado, majoritário da silimarina), em DMSO (mais solúveis), na patogênese da infecção aguda murina. Foram utilizados camundongos BALB/c e C57BL/c de sete a oito semanas de vida e alguns deles foram infectados com 80 cercárias da cepa BH de *Schistosoma mansoni*. Foram divididos em grupos de forma a receberem diferentes tratamentos: silimarina (10 mg/kg), silimarina filtrada (10 mg/kg) ou silibina (5 mg/kg). Avaliou-se parâmetros parasitológicos, a hepatoesplenomegalia, a área de granuloma, o conteúdo de hidroxiprolina hepática (fibrose), as transaminases hepáticas e as citocinas séricas IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$ . Avaliações cromatográficas de alta eficiência visando identificar e quantificar as frações solúveis de silimarina ou silibina foram realizadas. Em todos os grupos de animais tratados observou-se significativa redução da hepatoesplenomegalia, da área de granuloma, da fibrose, dos níveis de transaminases hepáticas e de citocinas séricas avaliadas. Estes resultados foram observados nas duas linhagens de camundongos, apesar das diferenças genéticas entre elas. Através da cromatografia líquida de alta eficiência foi possível verificar diferentes proporções de silibina nas preparações empregadas, sendo observada a porcentagem de 93% de silibina na preparação de silibina; de 56% na preparação silimarina e de 22% na silimarina filtrada. Desta forma, apesar de concentrações distintas, a silibina foi o componente presente em todas as preparações com semelhantes ações sobre a patogênese desta infecção, sugerindo que ela seja a responsável pelos efeitos biológicos observados, em particular a sua fração solúvel. Assim, a silibina pode ser um candidato para o tratamento coadjuvante seguro, minimizando a morbidade causada pela esquistossomíase.

Palavras chaves: *Schistosoma mansoni*, silimarina, silibina.

## Abstract

LINO, Fabiana Gonçalves. Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni*. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The schistosomiasis is a parasite disease that causes morbidity and mortality in the world. Many countries are affected and many people have severe sequelae from the infection. The development of drugs that act in these sequelae is very important. The aim of this work was to evaluate the action of silymarin / silibin (isolated compound, major in silymarin) in DMSO preparations on the pathogenesis of acute murine infection. Seven or eight week old BALB/c and C57BL/6 mice were used and some of them were infected with 80 BH cercariae from *Schistosoma mansoni*. Groups were divided in treated with that preparations: silymarin (10 mg.kg<sup>-1</sup>), treated with filtered silymarin (10 mg.kg<sup>-1</sup>) or treated with silibin (5 mg.kg<sup>-1</sup>). The following parasitologic parameters were evaluated: hepatosplenomegaly, granuloma area, hydroxyproline content (fibrosis), hepatic transaminases, and seric cytokines (IL-4, IL-13 and IFN $\gamma$ ). High performance liquid chromatography was used to identify and quantify the soluble silymarin or silibin fraction. Significant reductions in hepatosplenomegaly, granuloma area, fibrosis, hepatic transaminases and seric cytokines levels were observed for all treated animal groups. These results were observed in both murine lineages, despite the genetic differences between them. High performance liquid chromatography showed different silibin proportions in the preparations, where 93% of silibin was observed in the silibin preparation; 56% in silymarin preparation and 22% in filtered silymarin. Therefore, although present in different concentrations, silibin was found in every preparation, which showed similar actions in the pathogenesis of infection, suggesting that silibin was responsible for the observed biologic effects, mainly its soluble fraction. Thus, silibin would be a candidate for an adjuvant safe treatment, minimizing the morbidity caused by schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni*, silymarin, silybin.

## ABREVIACÕES

<b>ALT</b>	Alanina transferase
<b>AST</b>	Aspartato transferase
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>COX</b>	Cicloxygenase
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ELISA</b>	“Enzyme-linked imunossorbent assay” - Ensaio Imunoenzimático
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina- Eosina
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Inibidor do fator NF $\kappa$ B
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>LT<sub>B4</sub></b>	Leucotrieno <sub>B4</sub>
<b>MMP</b>	Metaloproteinases
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	“Nuclear Factor $\kappa$ B” - Fator nuclear $\kappa$ B
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PG<sub>E2</sub></b>	Prostaglandina <sub>E2</sub>
<b>SEA</b>	“Soluble Egg Antigen” - Antígenos solúveis dos ovos
<b>Sil+ DMSO 1%</b>	Silimarina dissolvido em 1% de dimetilsulfóxido
<b>Sil+ DMSO 1% F</b>	Silimarina dissolvido em 1% de dimetilsulfóxido e filtrada
<b>Silibina+ DMSO 1%</b>	Silibina dissolvido em 1% de dimetilsulfóxido
<b>T<sub>H</sub></b>	“T helper cells” - Células T auxiliaadoras
<b>TIMP</b>	“Tissue inhibitor of metalloproteinases” - Inibidor tissular de metaloproteinases
<b>TNF</b>	“Tumoral Necrosis Factor” - Fator de necrose tumoral
<b>WHA</b>	“World Health Assembly” - Assembléia mundial de saúde

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa da distribuição mundial da esquistosomíase segundo a prevalência .....	1
<b>Figura 2</b> - Distribuição brasileira de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	3
<b>Figura 3</b> - Ciclo biológico do <i>Schistosoma</i> .....	4
<b>Figura 4</b> - Esquema de ativação das células esteladas.....	7
<b>Figura 5</b> – Estruturas químicas dos principais componentes da silimarina.....	9
<b>Figura 6</b> - Desenho experimental .....	14
<b>Figura 7</b> - Aspecto microscópico da preparação 2mg/mL em DMSO 5% .....	18
<b>Figura 8</b> - Aspecto microscópico da preparação 2mg/mL em DMSO 1% .....	19
<b>Figura 9</b> - Curva de sobrevivência (1º lote experimental) .....	24
<b>Figura 10</b> - Percentual de peso corporal (1º lote experimental) .....	25
<b>Figura 11</b> - Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i> distribuído no tecido hepático (1º lote experimental) .....	26
<b>Figura 12</b> - Índice de fígado (1º lote experimental) .....	27
<b>Figura 13</b> - Índice de baço (1º lote experimental) .....	27
<b>Figura 14</b> - Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (1º lote experimental).....	28
<b>Figura 15</b> - Área de granulomas hepáticos periovulares (1º lote experimental) .....	29
<b>Figura 16</b> – Cortes histológicos de granulomas hepáticos (1º lote experimental) .....	29
<b>Figura 17</b> - Curva de sobrevivência (2º e 3º lote experimental) .....	30
<b>Figura 18</b> - Percentual de peso corporal (2º e 3º lote experimental) .....	31
<b>Figura 19</b> -Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i> distribuído no tecido hepático (2º e 3º lote experimental) .....	32
<b>Figura 20</b> - Índice de fígado (2º e 3º lote experimental) .....	33
<b>Figura 21</b> - Índice de baço (2º e 3º lote experimental) .....	33
<b>Figura 22</b> - Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (2º e 3º lote experimental)..	34
<b>Figura 23</b> - Área do granuloma hepático periovular (2º e 3º lote experimental) .....	35
<b>Figura 24</b> – Cortes histológicos de granulomas hepáticos (2º e 3º lote experimental).....	35
<b>Figura 25</b> - Curva de sobrevivência (4º e 5º lote experimental) .....	36
<b>Figura 26</b> - Percentual de peso corporal (4º e 5º lote experimental) .....	37
<b>Figura 27</b> - Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i> distribuído no tecido hepático (4º e 5º lote experimental) .....	38
<b>Figura 28</b> - Índice de fígado (4º e 5º lote experimental) .....	39

<b>Figura 29</b> - Índice de baço (4° e 5° lote experimental) .....	40
<b>Figura 30</b> - Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (4° e 5° lote experimental) ..	41
<b>Figura 31</b> - Área do granuloma hepático periovular (4° e 5° lote experimental) .....	42
<b>Figura 32</b> - Cortes histológicos de granulomas hepáticos (4° e 5° lote experimental).....	42
<b>Figura 33</b> - Determinação de alanina aminotransferase sérica (4° e 5° lote experimental) ....	43
<b>Figura 34</b> - Determinação de aspartato aminotransferase sérica (4° e 5° lote experimental) .	44
<b>Figura 35</b> - Dosagem IL-4 sérico (4° e 5° lote experimental) .....	45
<b>Figura 36</b> - Dosagem IL-13 sérico (4° e 5° lote experimental) .....	46
<b>Figura 37</b> - Dosagem IFN- $\gamma$ sérico (4° e 5° lote experimental) .....	47
<b>Figura 38</b> - Curva de sobrevivência (6° e 7° lote experimental) .....	48
<b>Figura 39</b> - Percentual de peso corporal (6° e 7° lote experimental) .....	49
<b>Figura 40</b> - Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i> distribuído no tecido hepático (6° e 7° lote experimental) .....	50
<b>Figura 41</b> - Índice de fígado (6° e 7° lote experimental) .....	51
<b>Figura 42</b> - Índice de baço (6° e 7° lote experimental) .....	51
<b>Figura 43</b> - Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (6° e 7° lote experimental)..	52
<b>Figura 44</b> - Área do granuloma hepático periovular (6° e 7° lote experimental) .....	53
<b>Figura 45</b> - Cortes histológicos de granulomas hepáticos (6° e 7° lote experimental).....	53
<b>Figura 46</b> - Determinação de alanina aminotransferase sérica (6° e 7° lote experimental) ....	54
<b>Figura 47</b> - Determinação de aspartato aminotransferase sérica (6° e 7° lote experimental) .	55
<b>Figura 48</b> – Dosagem IL-4 sérico (6° e 7° lote experimental) .....	56
<b>Figura 49</b> - Dosagem IL-13 sérico (6° e 7° lote experimental) .....	57
<b>Figura 50</b> - Dosagem IFN- $\gamma$ sérico (6° e 7° lote experimental) .....	58
<b>Figura 51</b> - Cromatograma da preparação de silibina .....	59
<b>Figura 52</b> - Cromatograma da preparação de silimarina .....	59
<b>Figura 53</b> - Cromatograma da preparação de silimarina filtrada .....	60

## ÍNDICE

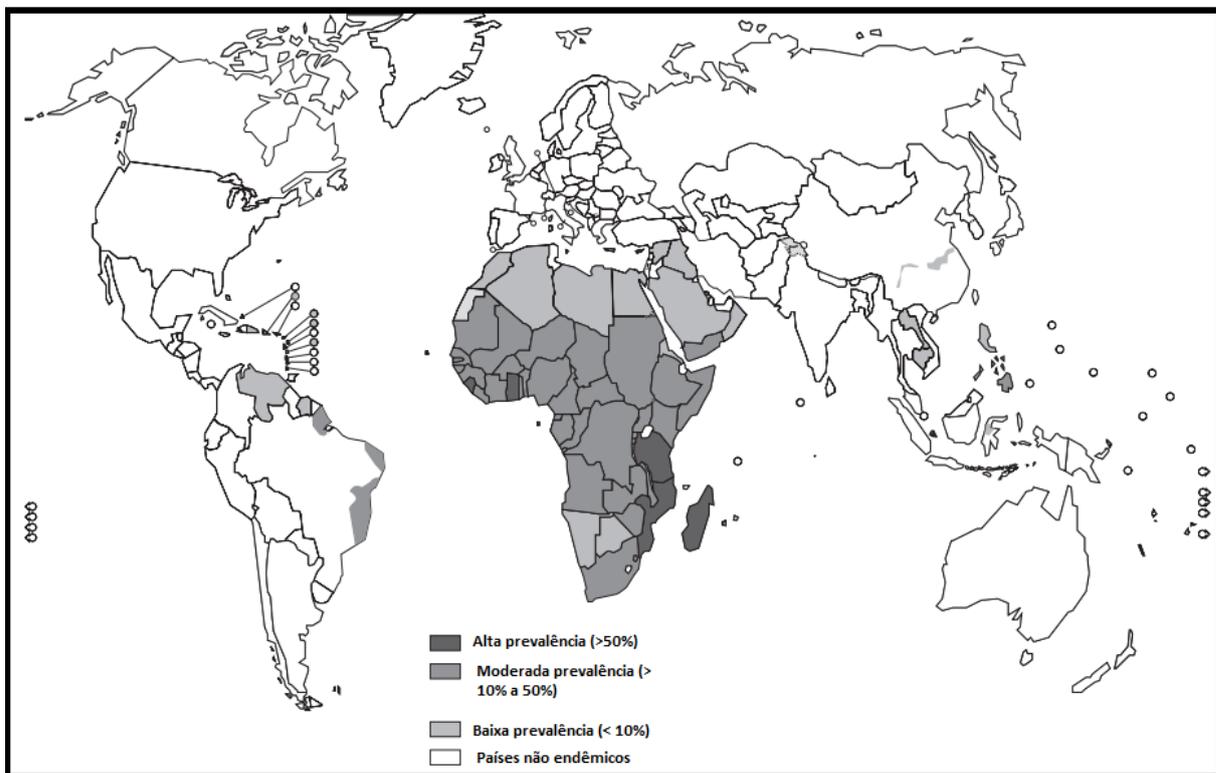
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
Visão geral sobre esquistossomíase .....	1
O ciclo biológico da esquistossomíase .....	4
Estágios da doença.....	5
<i>Silybum marianum</i> e Silimarina .....	8
Silibina .....	11
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
Camundongos/Grupos.....	14
Infecção .....	16
Pesagens dos camundongos.....	17
Fitoterápico.....	17
Preparações empregadas no tratamento .....	18
Tratamentos .....	20
Eutanásia .....	20
Quantificação de ovos nos tecidos.....	21
Dosagem de parâmetros bioquímicos clínicos .....	21
Dosagem de hidroxiprolina .....	21
Processamento histológico .....	22
Dosagem das citocinas .....	22
Cromatografia líquida de alta eficiência .....	23
Avaliação estatística.....	23
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>Primeiro lote experimental .....</b>	<b>24</b>
Curva de sobrevivência .....	24
Curva Ponderal .....	24
Contagem de ovos nos órgãos .....	25
Avaliação da hepatoesplenomegalia .....	26
Conteúdo de hidroxiprolina.....	28
Área de granulomas .....	28
<b>Segundo / Terceiro lote experimental.....</b>	<b>30</b>

Curva Ponderal .....	30
Contagem de ovos nos órgãos .....	31
Avaliação da hepatoesplenomegalia .....	32
Conteúdo de hidroxiprolina .....	34
Área de granulomas .....	34
<b>Quarto / Quinto lote experimental .....</b>	<b>36</b>
Curva de sobrevivência .....	36
Curva Ponderal .....	36
Contagem de ovos nos órgãos .....	37
Avaliação da hepatoesplenomegalia .....	38
Conteúdo de hidroxiprolina .....	40
Área de granulomas .....	40
Transaminases hepáticas .....	42
Alanina aminotransferase .....	42
Aspartato aminotransferase .....	42
Dosagem de citocinas .....	43
<b>Sexto / Sétimo lote experimental .....</b>	<b>46</b>
Curva de sobrevivência .....	46
Curva Ponderal .....	47
Contagem de ovos nos órgãos .....	48
Avaliação da hepatoesplenomegalia .....	49
Conteúdo de hidroxiprolina .....	51
Área de granulomas .....	51
Transaminases hepáticas .....	53
Alanina aminotransferase .....	53
Aspartato aminotransferase .....	53
Dosagem de citocinas .....	54
Cromatografia líquida de alta eficiência .....	57
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

# INTRODUÇÃO

## Visão geral sobre esquistossomíase

A esquistossomíase é uma doença que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo. Mais de 800 milhões vivem em áreas endêmicas e suas atividades laborais e recreativas os expõem ao risco de adquirirem a doença. Calcula-se que cerca de 280 mil indivíduos morrem por ano com esta doença (ENGELS *et al.*, 2002; STEINMANN *et al.*, 2006). A esquistossomíase está distribuída por 76 países e territórios, abrangendo América do Sul, Caribe, Oriente Médio, África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (CHITSULO, LOVERDE e ENGELS, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2011, a distribuição da doença está representada na figura 1(O.M.S., 2011).



**Figura 1** Mapa da distribuição mundial da esquistossomíase segundo a prevalência. O.M.S., 2011.

Existem fatores que contribuem para a grande prevalência da doença pelo mundo: extrema pobreza e ausência de educação sanitária; despreocupação das autoridades públicas com relação à implementação de saneamento básico nestas regiões (FENWICK *et al.*, 2003). Programas de combate para erradicação da doença têm sido realizados com sucesso em diversos países como Uganda e Nigéria, empregando o tratamento com praziquantel já descrito como eficaz(RICHARDS *et al.*, 2006; KOLACZINSKI *et al.*, 2007; OLSEN, 2007).

Embora a tentativa de tratamento em massa da população possa ser uma alternativa pertinente em áreas endêmicas, surge um grave problema de resistência do parasito ao quimioterápico quando se trata aleatoriamente (DOENHOFF e PICA-MATTOCCIA, 2006).

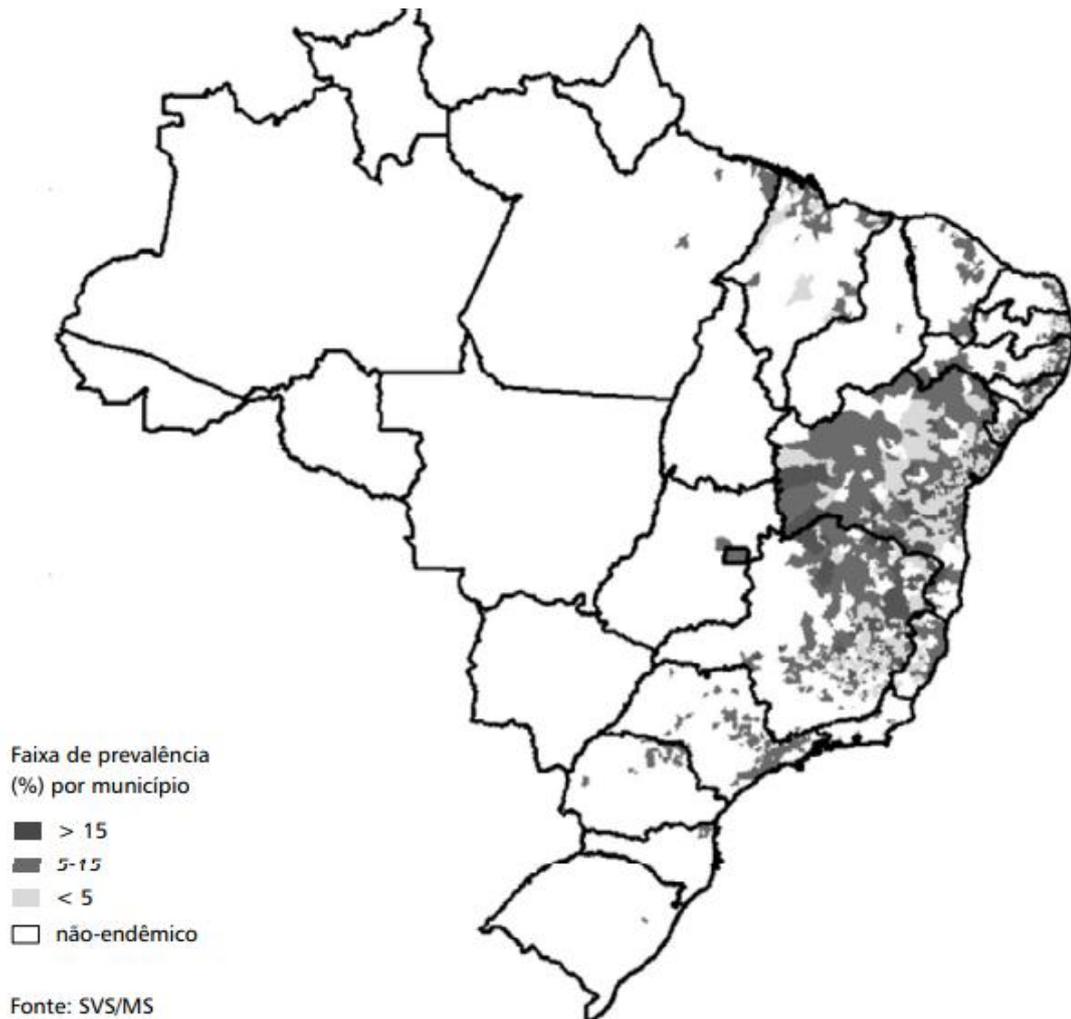
Na Assembléia Mundial de Saúde 54.19 (World Health Assembly – WHA) de 22 de maio de 2001, tinha como meta o combate da doença através da seguinte estratégia: no mínimo 75% das crianças em idade escolar seriam tratadas até 2010. Em alguns países como Egito, Síria, Líbia e Arábia Saudita, atualmente, há baixa endemicidade, a prevalência e a morbidade da doença nestas regiões foram reduzidas após esta meta citada (LAMMIE, FENWICK e UTZINGER, 2006; KING, 2009). Irã, Líbano, Marrocos e Tunísia eliminaram a esquistossomíase de seus territórios. No entanto, a OMS sugeriu que estes países mantivessem medidas de controle da doença a fim de erradicá-la (O.M.S., 2007).

A esquistossomíase tem como agente etiológico o Trematódeo das espécies *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mekongi*. Dentre estas apenas, a espécie *Schistosoma mansoni* ocorre no Brasil, sendo endêmica em algumas áreas do território: do Rio Grande do Norte à Bahia, bem como no interior do Espírito Santo e Minas Gerais, conforme a distribuição da figura 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No Brasil, segundo indicadores da OMS de 2011, o número de infectados chega a 6.800.000 pessoas. Em áreas endêmicas, segundo a OMS, apenas 0,09% dos indivíduos que precisam de quimioterapia preventiva são tratados adequadamente. Este fato se deve, principalmente, por conta do início do tratamento com o praziquantel ou o oxaminiquine ser feito apenas com diagnóstico positivo da infecção (O.M.S., 2011). Dessa forma, talvez seja possível justificar a queda na quantidade de indivíduos tratados de 154.394 em 2006 para 30.418 em 2009; bem como o acesso restrito ao diagnóstico e à própria medicação (REIS *et al.*, 2010). Em algumas regiões com programas específicos para este fim, pode-se perceber resultados positivos quanto ao controle da doença (DRUMMOND *et al.*, 2010). Entretanto, o controle da doença não sendo alvo de empenho do governo e da sociedade dificultará a erradicação da doença (PEREIRA *et al.*, 2010).

A esquistossomíase afeta principalmente regiões onde o acesso ao saneamento básico é precário. Além disso, as atividades recreativas e laborativas sendo efetuadas em lagos e represas contaminadas são fatores agravantes, propiciando a completa execução do ciclo do parasito (BARRETO, 1993; ANARUMA FILHO *et al.*, 2010). A migração é outro fator que tem levado a doença de áreas endêmicas para não endêmicas, bem como o eco-turismo (ENK *et al.*, 2010).

A infecção proporciona grave problema sócio-econômico. Devido à grande morbidade proporcionada em estágios avançados da doença, adultos em idade produtiva deixam de exercer suas atividades normais e crianças em idade escolar apresentam dificuldades de aprendizagem. Desta forma, a esquistossomíase constitui um grave problema de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

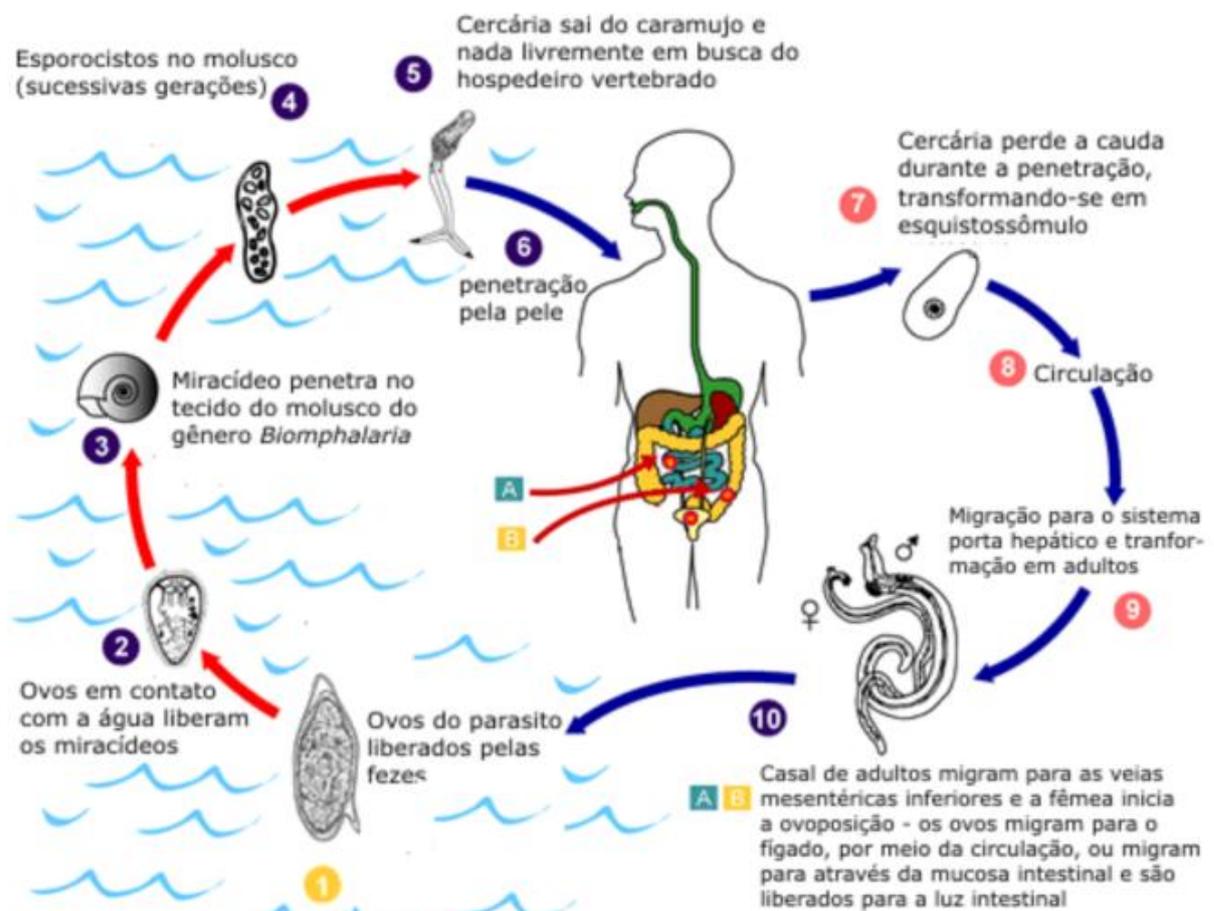


**Figura 2** Distribuição brasileira de *Schistosoma mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

## O ciclo biológico da esquistossomíase

O ciclo biológico deste parasito se dá em dois tipos de hospedeiros: o intermediário do gênero *Biomphalaria spp.* e hospedeiro definitivo, mamíferos incluindo o homem. No Brasil, as espécies de moluscos mais comuns por ser hospedeiro intermediário são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (REY, 2008).

Conforme figura 3, o ciclo inicia-se quando as fezes de indivíduos infectados contendo ovos de *S. mansoni* entram em contato com água. Em condições favoráveis de luminosidade solar e temperatura em torno de 40° C propiciam a eclosão do miracídeo do ovo. Na presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* inicia-se parte do ciclo deste parasito. O miracídeo após eclodir do ovo, nada ativamente em movimentos circulares até alcançar o tegumento do molusco, onde se adere e por movimentos rotatórios em torno do próprio eixo, auxiliado pela ação lítica das glândulas apicais, penetra e invade este tegumento (REY, 2008).



**Figura 3** Ciclo biológico do *Schistosoma*. Na imagem estão representados os dois tipos de hospedeiro: o molusco (intermediário) e o homem (definitivo). **A** representa o ciclo biológico de *Schistosoma*, exceto *Schistosoma haematobium*, **B** representa o ciclo biológico de *Schistosoma haematobium*. Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC). ([http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis_il.htm), acessado 29 de setembro de 2012).

No molusco, o parasito passa por alguns estágios evolutivos: esporocistos primários e secundários e cercárias. Após cinco semanas de infestação, inicia-se a saída destas cercárias do molusco, devido a estímulos como exposição à luz e água com altas temperaturas. Ao ganharem a água e dispor de seu hospedeiro definitivo (homem e outros mamíferos), as cercárias penetram através da pele do indivíduo, e algumas delas atingem os vasos sanguíneos cutâneos superficiais (REY, 2008).

No homem, as cercárias ao alcançarem os vasos sanguíneos passam a se denominar esquistossômulos. Posteriormente, são levados passivamente pela corrente sanguínea ao coração, e em seguida, aos pulmões, ganhando o sistema porta intra-hepático. Neste local, ocorre a maturação sexual dos vermes. A fêmea se posiciona no interior do canal ginecóforo do macho ocorrendo o seu amadurecimento sexual e acasalamento com o macho. Ainda juntos, se deslocam ativamente contra o fluxo sanguíneo do sistema porta para o interior de veias mesentéricas inferiores e adjacentes, atingindo em seguida o plexo hemorroidário. A fêmea fecundada sai do canal ginecóforo do macho e migra para ramos mais estreitos da mucosa intestinal para realizar a oviposição. Aproximadamente, 50% dos ovos se aderem ao endotélio do vaso e são eliminados para a luz intestinal e veiculados com as fezes, o restante é carregado a favor da corrente sanguínea para vasos intra-hepáticos. Dentro dos pequenos vasos contendo os ovos, começa uma intensa resposta inflamatória decorrente da liberação de antígenos solúveis dos ovos (SEA, do inglês, *Soluble Egg Antigens*). Desencadeia-se, então, a formação de granulomas que podem culminar com a fibrose hepática (REY, 2008).

### **Estágios da doença**

A infecção é dividida clinicamente em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda compreende o período assintomático ou aparecimento dos primeiros sintomas, neste período ocorre a eliminação de ovos nas fezes. Este fenômeno ocorre por volta da 6ª a 8ª semana de infecção (RABELLO, 1995).

Quando o indivíduo demonstra sintomas da infecção são relatados: a dermatite cercariana que corresponde à fase de penetração das larvas (cercárias) através da pele. Pequenas pápulas eritematosas e pruriginosas podem durar até 5 dias após o início da infecção. Em seguida, poderá ter sinais de linfadenopatia, febre, cefaleia, anorexia, dor abdominal, que são característicos da febre de Katayama. Além disso, também poderá ocorrer diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca de 3 à 7 semanas após o início da infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No entanto, esses sinais não são característica exclusiva

da doença e, portanto, ela pode não ser diagnosticada em tempo hábil para o tratamento, antes da evolução para a fase crônica.

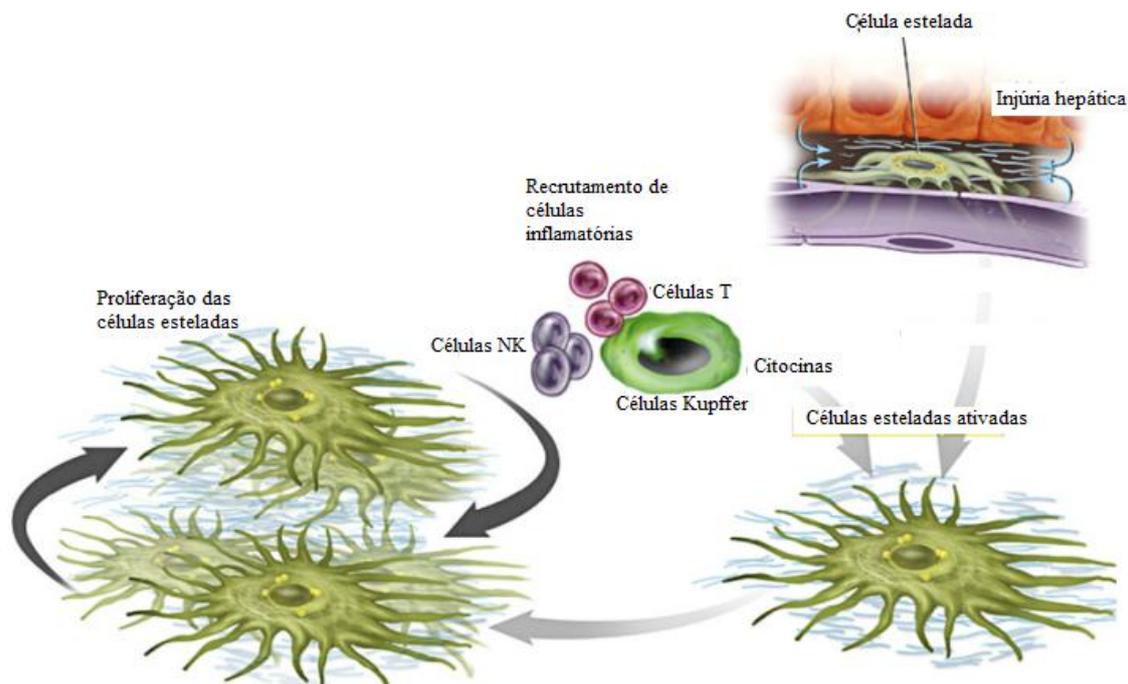
Durante esta fase, há uma reação do sistema imunológico frente à infecção, com a sensibilização do organismo aos antígenos dos ovos dos parasitos. As células do hospedeiro secretam grandes quantidades de TNF (Fator de necrose tumoral), interleucina-1(IL-1) e interleucina-6 (IL-6), o que caracteriza a prevalência do perfil T<sub>H</sub>1 neste período (DE JESUS *et al.*, 2002). Os ovos de *S. mansoni* que atingem o intestino e o fígado desencadeiam um processo inflamatório em torno de si, pela intensa liberação de SEA. O processo tem característica necrótico-exudativa, e é composto por eosinófilos, macrófagos e linfócitos (RASO *et al.*, 1983; ANDRADE, 1987; REIS *et al.*, 2001). Os granulomas, onde há predominância de eosinófilos, se organizam de modo a ser 100 vezes maiores que o ovo (ANDRADE e WARREN, 1964).

Após a formação do granuloma, as secreções liberadas pelo miracídeo proporcionam potente estímulo fibrogênico, que atua na produção direta de matrix extracelular (ANDRADE, 1991). No fígado, como existem vários ovos promovendo o estímulo, inicia-se a confluência de nódulos fibróticos, estabelecendo uma grande área cicatricial fibrótica (ANDRADE, 2005; REY, 2008). Nesta etapa da fase aguda, há início da predominância do perfil T<sub>H</sub>2, citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis pelo estímulo pró-fibrogênico.

As células estreladas hepáticas sofrem mudança de fenótipo, deixando seu papel de armazenamento de gordura para assumir a morfologia de miofibroblastos e fibroblastos (ANDRADE, 1998). Os miofibroblastos são responsáveis pela produção de matrix extracelular e também a degradação. Portanto, ao mesmo tempo em que há síntese, também há destruição desta matrix que é composta por fibras de colágeno, proteínas e proteoglicanos (BURT, 1993). Assim, quando há um desequilíbrio entre os dois processos, passando a síntese a ser maior; ocorre um desbalanço e o tecido torna-se fibrosado (Figura 4). Este processo é mais marcante da fase crônica.

A fase crônica é dividida em hepatointestinal, hepática e hepatoesplênica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), sendo que a hepatoesplência é subdividida em compensada e descompensada (SOUZA *et al.*, 2007).

A fase hepatointestinal caracteriza-se por sinais inespecíficos, tais como, diarreia, epigastralgia e fígado palpável com nodulações. A fase hepática é semelhante à anterior, no entanto, em sonografia é possível verificar presença de fibrose hepática.



**Figura 4:** Esquema de ativação das células esteladas. Adaptado de Rockey, D.C. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*, v.10, n.3, p.459-479. 2006.

Já na fase hepatoesplênica compensada, o fígado fica aumentado com preponderância do lóbulo esquerdo e esplenomegalia; também é possível evidenciar hipertensão portal levando à hepatoesplenomegalia e varizes esofagianas. O sinal da fase hepatoesplênica descompensada é melena e hematêmese, podendo haver hemorragias digestivas, isquemia e perda de função do fígado. Nesta etapa, é possível verificar a ocorrência de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Durante a fase crônica pode ocorrer grande comprometimento hepatoesplênico, caracterizado por fibrose hepática e periportal, hipertensão portal e formações de novos “shunting” venosos no sistema porta-hepático (DUNNE e PEARCE, 1999). Nesta fase da doença há predominância do perfil imunológico  $T_H2$ , com prevalência de citocinas IL-4 e IL-13 (GRZYCH *et al.*, 1991; SHER *et al.*, 1991). A IL-13 atua estimulando a fibrose, pois induz a expressão de arginase em macrófagos. A arginase utiliza a L-arginina como substrato convertendo-a em L-ornitina. Esta, por sua vez, é convertida a prolina pela ornitina-aminotransferase. Desta forma, a prolina é o aminoácido essencial na composição do colágeno, presente na matriz extracelular de processos fibróticos (HESSE *et al.*, 2001).

Como já citado, embora exista tratamento efetivo para esta infecção já empregado na clínica, o praziquantel, sua ação é aumentar a atividade da musculatura dos parasitos adultos até atingirem a paralisia estática (DOENHOFF, CIOLI e UTZINGER, 2008). Entretanto, esta

ação é limitada, pois o praziquantel não atua sobre os ovos liberados durante a oviposição, os quais são responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório, que pode culminar em eventos de maior gravidade. Desta forma, já que o praziquantel não tem ação sobre esta forma evolutiva, torna-se necessário o estudo de novos fármacos que atuem revertendo ou minorando o processo fibrótico. Além disso, soma-se a dificuldade no desenvolvimento de vacinas eficazes, devido à complexidade das estratégias de evasão imunológica do *Schistosoma* (PEARCE e MACDONALD, 2002). Todos estes fatores contribuem para a disseminação desta parasitose, dificultando o controle e a erradicação.

### ***Silybum marianum* e Silimarina**

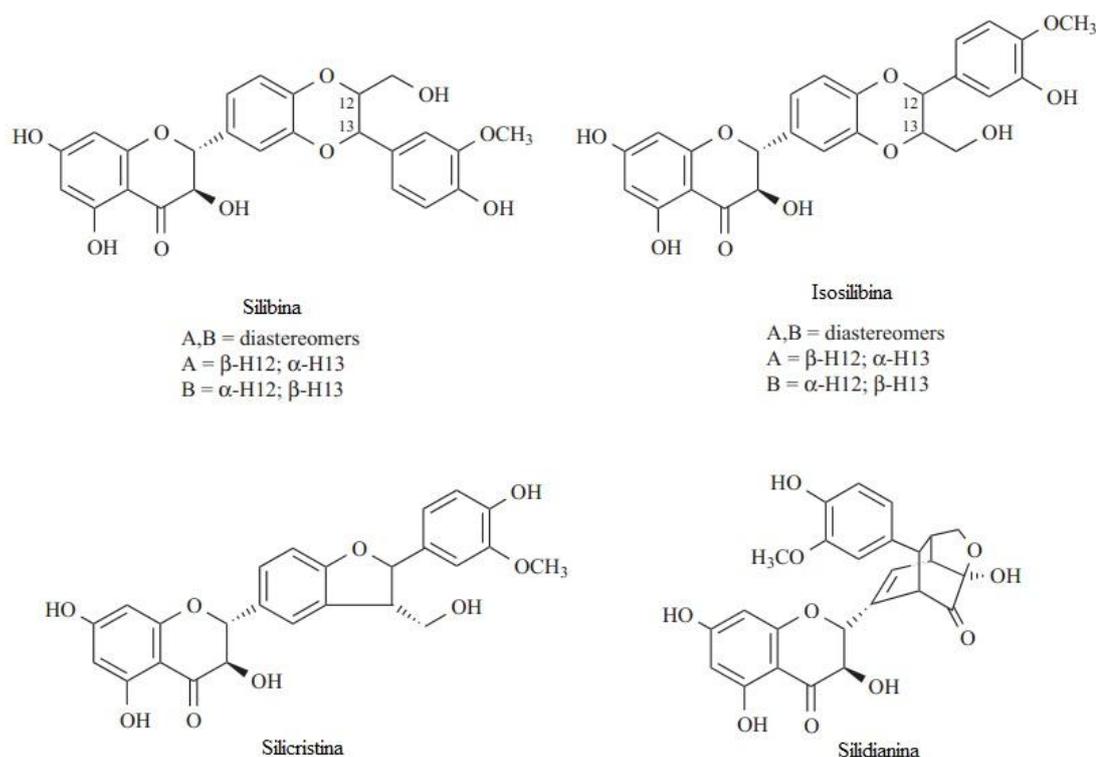
*Silybum marianum* (L.) Gaertn é uma planta pertencente à família das Asteraceae. Possui cardo robusto, crescendo em solos rochosos podendo atingir até um metro e meio de altura, apresentando flor de cor arroxeadas e folhas com nervuras de aspecto leitoso, o que confere o nome vulgar da planta “Milk thistle”. O fruto tem de 5-7 mm de comprimento, 2-3 mm de largura e 1,5 mm de espessura, de cor castanha brilhosa (CAPASSO, 2003). *Silybum marianum* é nativo do sul da Europa, sul da Rússia, Ásia Menor e norte da África e se adaptou ao norte e sul da América, bem como no sul da Austrália.

Segundo Morazzoni, 1995 a origem do nome da espécie deve-se: “*Silybum*”, nomeado por Dioscorides, significa cardo comestível e “*marianum*” vem de Maria (mãe de Jesus Cristo). A lenda foi criada durante o período de fuga da Virgem Maria para o Egito para dar a luz ao menino Jesus; ela abrigou-se em uma habitação rudimentar formada por folhas espinhosas de “Milk Thistle” e houve gotejamento de seu leite sobre as folhas e, a partir daí, as folhas passaram a apresentar veias esbranquiçadas, portanto denotando a tradução do inglês do nome vulgar da espécie (MORAZZONI, 1995).

O primeiro a descrever a silimarina foi Theoprastus, no século IV A.C. sendo denominada por ele de “Pternix”. Posteriormente, Dioscórides (Século I D.C.), em sua matéria Medica com a denominação de *Silybum* foi o primeiro a descrever a planta com uso medicinal, empregando o chá da planta para tratar o envenenamento por picadas de serpentes. Em 77 D.C., o naturalista Plínio “o Velho” descreveu que a mistura da planta com mel melhorava a secreção biliar (ROSS, 2008). Recentemente, muitos estudos vêm corroborando as demonstrações da atividade do *Silybum marianum* em doenças hepáticas agudas e crônicas (PRADHAN e GIRISH, 2006).

Dos frutos e sementes do *Silybum marianum* se extrai a silimarina, que é um composto complexo. A princípio achava-se que silimarina fosse um composto puro, o 7-cromanol-3

metil-taxifolina (HAHN *et al.*, 1968); entretanto com avanço de técnicas de separação, verificou-se que a silimarina é composta pelas seguintes flavolignan: silibina (60-70%), silicristina (20%), silidianina (10%) e isosilibina (5%). Ao se conseguir isolar isosilibina e silibina foi verificado que apresentam dois diastereoisômeros: silibina A, silibina B na proporção 1:1 (GAZAK, WALTEROVA e KREN, 2007), isosilibina A e isosilibina B (SIMANEK *et al.*, 2000; GAZAK, WALTEROVA e KREN, 2007) (Figura 5).



**Figura 5:** Estruturas químicas dos principais componentes da silimarina: Silibina A e B, Isosilibina A e B, Silicristina e Silidianina (CROCENZI e ROMA, 2006).

O uso da silimarina é seguro, com raras ocorrências de efeitos adversos, como o uso de 1,5g em humanos pode provocar efeito laxativo (LUPER, 1998). Um produto vegetal sofre variações em relação ao período em que é cultivado, modificando a composição do produto (SIMANEK *et al.*, 2000).

A silimarina tem diversas ações descritas na literatura como hepatoprotetora e regeneradora (DESPLACES *et al.*, 1975; RAMELLINI e MELDOLESI, 1976; MACHICAO e SONNENBICHLER, 1977; CARINI *et al.*, 1992; CROCENZI e ROMA, 2006), antioxidante (BINDOLI, CAVALLINI e SILIPRANDI, 1977; MURIEL *et al.*, 1992; WELLINGTON e JARVIS, 2001; SANGEETHA, ARANGANATHAN e NALINI, 2010), antifibrótica (FLORA *et al.*, 1998; JIA *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2008) e antiinflamatória (SCHUMANN *et al.*, 2003), portanto trata-se de um fitoterápico de uso promissor na infecção por *Schistosoma mansoni*.

Sua ação hepatoprotetora se deve pela captura de radicais livres produzidos por eventos diversos das células, evitando outros danos promovidos pela peroxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados da dupla membrana lipídica celular, e consequente promoção de lesão da membrana e às estruturas intracelulares importantes (DNA, RNA) (WISEMAN, 1996). A silimarina interage diretamente com a fração lipídica, mantendo a fluidez característica e impedindo possíveis danos provocados pelos radicais livres (MURIEL, 1990). Outra ação relevante é a hepatoregeneração, no qual ela atua na RNA polimerase, aumentando a formação de ribossomos 28S, 18S e 5,8S, acelerando a incorporação do RNAr nos ribossomos, desta forma, estimulando a síntese de DNA e proteínas (SONNENBICHLER e ZETL, 1984; SONNENBICHLER e ZETL, 1986). Além disso, a ação antiinflamatória atribuída à silimarina pode auxiliar na modulação do processo inflamatório decorrente da infecção. Estudos demonstram que a silimarina em altas concentrações inibe a via da 5-lipooxigenase, resultando na inibição da síntese de leucotrienos B<sub>4</sub> (LT<sub>B4</sub>), sem interferir na síntese de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PG<sub>E2</sub>) (SALLER, MEIER e BRIGNOLI, 2001). Em células de Kupffer isoladas observou-se inibição do efeito de LT<sub>B4</sub> com IC<sub>50</sub> de 15µmoles/L, sem nenhum efeito sobre a formação do fator de necrose tumoral alfa (TNFα) (DEHMLow, ERHARD e DE GROOT, 1996). Estudos com camundongos BALB/c machos tratados com silimarina sugerem que a administração via parenteral em baixas concentrações resulta na supressão de linfócitos T, enquanto altas concentrações promovem o estímulo do processo inflamatório (JOHNSON *et al.*, 2002). Na esquistossomíase, em estágios avançados, o processo inflamatório comum na infecção promove uma reação granulomatosa e posterior remodelamento da arquitetura hepática decorrente da fibrose que se estabelece, desencadeando a insuficiência hepática e a hipertensão portal. O processo fibrótico se dá por uma via complexa de sinalização celular e outros mediadores (GEBHARDT, 2002). Inicialmente, há a proliferação do parênquima hepático e posterior ativação das células esteladas hepáticas, que se diferenciam em miofibroblastos iniciando uma produção exacerbada de matriz extracelular (principalmente, colágeno tipo I, III, IV e laminina), além da inibição de metaloproteinases I (MMP-I, do inglês, metaloproteinases *I*) responsáveis pela homeostase de produção e degradação de matriz extracelular. Esta inibição é realizada pelo inibidor tecidual de metaloproteinases I (TIMP-I, do inglês, *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*) (IREDALE, 2001; UEBERHAM *et al.*, 2003; BREITKOPF *et al.*, 2005). Sendo assim, a silimarina é muito empregada em doenças hepáticas como cirrose, em hepatite crônica e doenças hepáticas por consumo de álcool, e também é utilizada em outros distúrbios gastrointestinais (FLORA *et al.*, 1998; DE GROOT e RAUEN, 1998).

Há descrição da sua ação quimiopreventiva e anticancerígena pela captura de radicais livres (DORAI e AGGARWAL, 2004), modulação de reguladores como mitogénos, sinalizadores de ciclo celular e consequente ação antineoplásica (ZI, FEYES e AGARWAL, 1998; ZI e AGARWAL, 1999; KANG *et al.*, 2001; SINGH e AGARWAL, 2002; TYAGI *et al.*, 2004). Além disso, o uso da silimarina já foi proposto na terapia adjuvante do câncer, protegendo os tecidos do stress oxidativo gerado pelos quimioterápicos e reduzindo a hepatotoxicidade (INVERNIZZI *et al.*, 1993; SCAMBIA *et al.*, 1996); bem como nova possibilidade para tratamento do diabetes mellitus por aumentar os níveis de insulina em hiperglicemias e recuperar a função pancreática (SOTO *et al.*, 1998; SOTO *et al.*, 2003; SOTO *et al.*, 2004).

Sendo a silimarina utilizada em estudos na terapia de lesões hepáticas, avaliaremos a ação desta na terapia da fibrose hepática decorrente da infecção por *Schistosoma mansoni* em modelo murino, que pode ser agravada caso não haja reversão ou ao menos amenização do processo fibrótico, podendo desencadear hipertensão periportal, insuficiência hepática grave, hemorragias esofagianas, caquexia ou mesmo o óbito.

### **Silibina**

Silibina representa cerca de 60% do extrato de silimarina, dependendo do material botânico usado para extração do mesmo (WAGNER, DIESEL e SEITZ, 1974; SONNENBICHLER e ZETL, 1986; SCHUPPAN *et al.*, 1999).

Silibina é pouco solúvel em água, dispondo de baixa biodisponibilidade e pequena absorção intestinal. Para melhor empregabilidade deste composto na terapêutica, foram sintetizados vários derivados com a finalidade de amenizar tal insolubilidade, assim como: silibina bis-hemisuccinato, complexo de  $\beta$  ciclo dextrina, silibina N- metil glucamina, silibina 11- orto fostato e silibina fosfatidilcolina, silibina  $\beta$ - galactosidase, silibina  $\beta$ -glicosidase, silibina  $\beta$ -maltosidase, silibina  $\beta$ -lactosidase e polímero com polietilenoglicol (YANYU *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2008; KIDD, 2009; VOINOVICH *et al.*, 2009; BAI *et al.*, 2006).

A ação da silibina está muito associada a da silimarina, pois sendo o componente de maior representatividade no extrato, grande parte dos efeitos da silimarina é atribuída a silibina (WAGNER, DIESEL e SEITZ, 1974; SONNENBICHLER e ZETL, 1986).

Segundo Trappolieri (2009), a silibina tem ação antiinflamatória por inibir a produção de citocinas pró inflamatórias e ação anti fibrótica pela redução direta e indireta no potencial pró fibrogênico das células esteladas hepáticas (TRAPPOLIERE *et al.*, 2009). Em outros trabalhos, a silibina atua inibindo a formação de radicais aniônicos de superóxido e óxido

nítrico, diminuindo a formação de malondialdeído, previne o decréscimo dos níveis de superóxido dismutase, catalase e glutatona redutase, que são fatores que promovem proteção celular (DEHMLow, ERHARD e DE GROOT, 1996; BOSISIO, BENELLI e PIROLA, 1992; FU *et al.*, 2008; TAGER *et al.*, 2001). Derivados da silibina com apresentações mais solúveis tais como: a silibina fosfatidilcolina, na dose de 20  $\mu\text{mol/L}$ , que em alguns trabalhos, atuam na captura de radicais do tipo hidroxil, hidroxietil, lipodienil e triclorometil (COMOGLIO *et al.*, 1990; VAN PELT *et al.*, 2003). Outros trabalhos demonstram que a dehidrosilibina (DHS) apresenta melhor atividade que a silibina por conta de sua maior lipofilicidade, interagindo com as ligações insaturadas dos lipídeos da membrana celular; desta forma, os radicais livres são impedidos de promover a peroxidação (HUBER *et al.*, 2008; TROUILLAS *et al.*, 2008).

Conjuntamente com a atividade antioxidante, a silibina apresenta atividade anti-inflamatória importante (YOO *et al.*, 2004; MOMENY *et al.*, 2008; GHARAGOZLOO *et al.*, 2010), pois promove a modulação negativa da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CHITTEZHATH *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2009; SHANMUGAM *et al.*, 2008), a inibição da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a inibição da formação de leucotrienos em plaquetas, leucócitos e células endoteliais (VERSCHOYLE *et al.*, 2008; DEEP *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008, SINGH, GU e AGARWAL, 2008).

A silibina ainda atua como antifibrótico, reduzindo a ativação e proliferação de células estreladas hepáticas em ratos com modelo de fibrose induzida por dimetilnitrosamina. Ela age reduzindo a fibrose em desenvolvimento através da diminuição de citocinas específicas de estímulo a síntese da matrix extracelular (TGF $\beta$  e IL-13) e também atua em outros fatores relacionados como MMP-2 e TIMP-2; além de reduzir diretamente a síntese de RNAm do procolágeno  $\alpha 1$  (DI SARIO *et al.*, 2005). Desta forma, devido ao fato da silibina ter atividade antifibrótica descrita em outros modelos (JIA *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2008); por analogia, talvez ela possa atuar na fibrose promovida pela esquistossomose murina.

Este trabalho visa verificar se as ações biológicas encontradas em resultados anteriores do nosso grupo são intensificadas com o aumento da solubilidade da silimarina e silibina através do emprego do DMSO como diluente. Além disso, visa comparar os tratamentos em camundongos de diferentes linhagens isogênicas: BALB/c e C57BL/6.

## **OBJETIVOS**

### **Gerais**

- Evidenciar qual componente da silimarina é responsável pelos efeitos na patogênese da infecção experimental murina através da melhor solubilidade da silimarina;

### **Específicos**

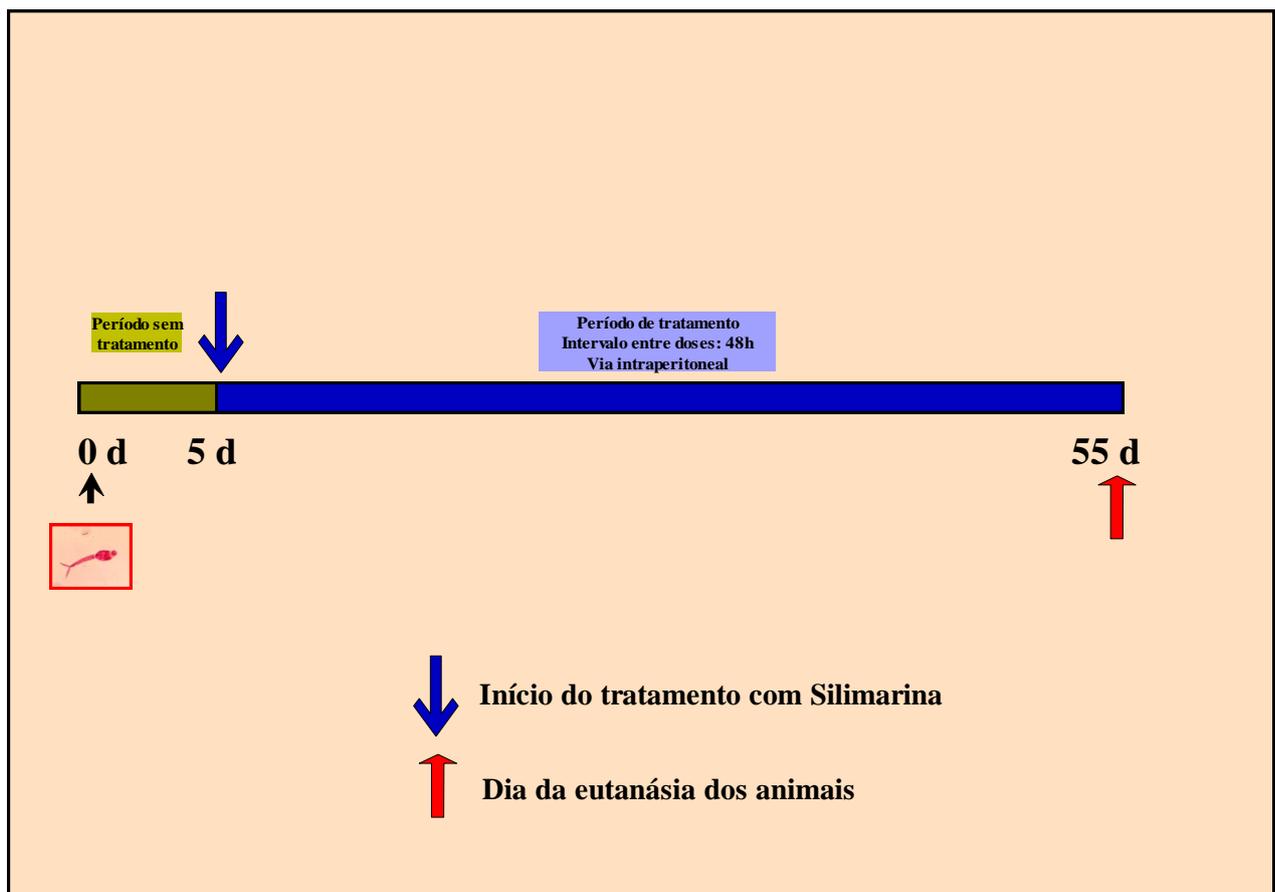
- Verificar alterações parasitológicas nos animais infectados/tratados com as preparações de silimarina, silimarina filtrada ou silibina solubilizada em DMSO 1%;
- Analisar cortes histológicos do tecido hepático corados com H&E quanto ao desenvolvimento da área dos granulomas dos animais tratados em relação aos não tratados;
- Analisar as alterações no processo fibrótico decorrentes da esquistossomíase nos animais tratados com silimarina, silimarina filtrada ou silibina;
- Avaliar alterações de algumas citocinas que possam ocorrer nos animais infectados/tratados com as preparações de silimarina, silimarina filtrada ou silibina;
- Evidenciar, através de CLAE, quais compostos, e respectivas concentrações, foram empregados durante o tratamento nos animais infectados/tratados com as preparações de silimarina, silimarina filtrada ou silibina;
- Avaliar se a atividade biológica da silibina é equivalente a da silimarina e da silimarina filtrada;
- Comparar os efeitos biológicos da silimarina, silimarina filtrada ou silibina em diferentes linhagens de camundongos (C57BL/6 e BALB/c).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Camundongos/Grupos

Empregou-se fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c (do primeiro ao quinto lote experimental) e C57BL/6 (no sexto e sétimo lote experimental), sempre com 7 a 8 semanas de vida, oriundas do Biotério Central do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ. Esses animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Todos os procedimentos de utilização dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais através do protocolo DFBCICB032.

Os animais receberam alimentação balanceada e água *ad libitum*, foram divididos em dois grandes grupos: normais e infectados. Posteriormente, subdivididos em grupos que variaram de acordo com o lote experimental a que pertenciam. Cada grupo continha no mínimo seis animais, com o desenho experimental sendo demonstrado na figura 6.



**Figura 6.** Desenho experimental. Camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram distribuídos em grupos experimentais de acordo ao lote a que pertenciam. Os animais foram tratados por via intraperitoneal, com dose de 10mg/ kg de silimarina ou 5mg/kg de silibina. O dia 0 foi o dia da infecção com cercárias de *S. mansoni*. Os tratamentos se iniciaram no 5º dia, terminando no 54º dia de infecção. Após o 55º dia de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia.

### *Primeiro lote experimental*

Os animais BALB/c foram divididos em grupos normais e infectados. A distribuição dos grupos normais foi: Normal controle (N) e Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%) por via intraperitoneal. Já os grupos infectados foram: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), sempre por via intraperitoneal. Os animais tratados com silimarina receberam a dosagem de 10mg/kg, variando apenas a concentração de DMSO na preparação; portanto, a solubilidade da silimarina.

Iniciou-se o tratamento após o 5º dia de infecção, respeitando um intervalo de 48/48 horas entre os tratamentos, totalizando uma sequência de 25 tratamentos. Desta forma, ao 54º dia de infecção se executou o último tratamento. Ao 55º de infecção, foi realizada a eutanásia dos animais.

### *Segundo/terceiro lote experimental*

Os camundongos BALB/c foram agrupados em normais e infectados. Os animais normais foram separados em: Normal controle (N) e Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%). Os animais infectados foram agrupados em: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). Os grupos tratados com silimarina receberam a dosagem de 10mg/kg. A filtração da preparação silimarina em DMSO 1% filtrada foi efetuada em filtro BIOFIL<sup>®</sup> com membrana de polietersulfona de 0,22 µm.

Após as separações nos respectivos grupos, os tratamentos tiveram início no 5º dia após a infecção, com intervalos entre os tratamentos de 48/48 horas. Assim, foram totalizadas 25 tratamentos durante o experimento.

No intuito de confirmar os dados obtidos durante o segundo experimento, foi repetido o mesmo desenho experimental para o terceiro experimento.

#### *Quarto/ Quinto lote experimental*

Os camundongos BALB/c foram agrupados em normais e infectados. Os animais normais foram separados em: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%) e Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%). Os animais infectados foram agrupados em: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Os grupos que receberam silimarina foram tratados com dose de 10mg/kg, enquanto os que fizeram silibina, 5mg/kg (esta dose de silibina foi utilizada uma vez que aproximadamente 50% da silimarina é representada pela silibina). Após as separações nos respectivos grupos, os tratamentos tiveram início no 5º dia, e a última no 54º dia, com intervalos entre as doses de 48 horas. Assim, foram feita 25 tratamentos durante o experimento.

#### *Sexto/ sétimo lote experimental*

A distribuição dos grupos foi exatamente a mesma do quarto e quinto lotes experimentais, entretanto foi empregada uma outra linhagem de camundongos isogênica, C57BL/6, que segundo a literatura trata-se da linhagem mais frequentemente utilizada na infecção experimental esquistossomótica e modelo ideal (FANNING *et al.*, 1981).

### **Infecção**

O processo de infecção dos animais foi feito com cercárias de *Schistosoma mansoni*, oriundas do *Laboratório de Malacologia* da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A cepa de cercárias utilizada foi a BH (Belo Horizonte, Minas Gerais).

Os camundongos foram infectados por via transcutânea em banho individual com, aproximadamente, 80 cercárias viáveis por 30-40 minutos em água destilada (PYRRHO *et al.*, 2004). Esta carga parasitária garantiu a infecção de todos os animais sem levar a uma elevada mortalidade.

## **Pesagens dos camundongos**

Os camundongos foram marcados para tornar possível a identificação individual. Duas vezes por semana (terças e sextas) foi efetuada a pesagem dos animais para confecção de uma curva ponderal, e assim, obter a avaliação de eventual caquexia provocada pela infecção e/ou tratamento. Observou se eventuais mudanças comportamentais que ocorreu durante o experimento.

Foram anotadas as datas das eventuais mortes para a confecção de uma curva de sobrevivência.

## **Fitoterápico**

Foram usados os extratos seco de silimarina e a silibina adquiridos do Sigma/Aldrich (EUA), com os respectivos lotes 1410945 e BCBB4662.

Dados preliminares do nosso grupo demonstraram que a dose de 10 mg/kg/animal de silimarina apresentaram resultados relevantes como a redução da hepatomegalia, do tamanho dos granulomas hepáticos e da fibrose dos animais infectados com *S. mansoni* (MATA-SANTOS *et al.*, 2010).

Devido à insolubilidade em água da silimarina e silibina, utilizou-se o dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) como agente solubilizador. Procurou-se utilizar diluições onde as concentrações de DMSO fossem a mais baixa possível ( $\leq 1\%$ ), em solução aquosa, de modo reduzir a quanto possível à ocorrência de eventual interferência do DMSO.

O preparo das suspensões administradas foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. Anterior à administração aos animais, as preparações foram avaliadas microbiologicamente. Esta avaliação foi realizada no setor de Bacteriologia, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

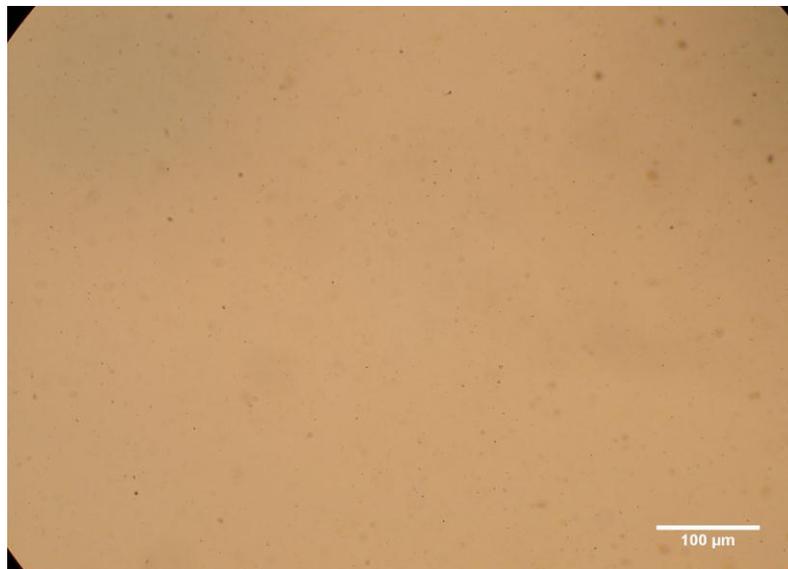
## Preparações empregadas no tratamento

Diferentes preparações de silimarina e de silibina foram realizadas nos diversos lotes experimentais ensaiados.

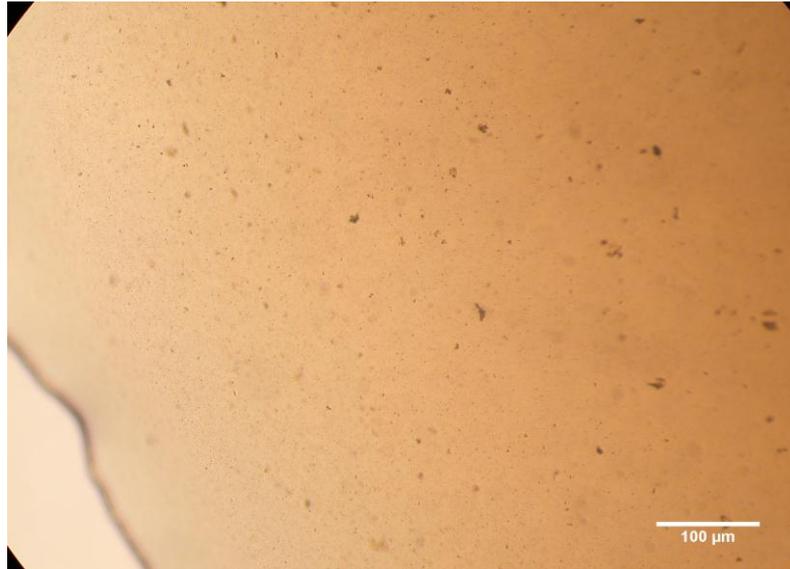
### *Primeiro lote experimental*

Foram realizadas preparações contendo apenas o veículo empregado para diluição do fitoterápico (solução aquosa de DMSO 5%) a serem administradas em um primeiro grupo de animais. A silimarina foi solubilizada em DMSO, posteriormente foi adicionada água, produzindo uma concentração de 2mg/mL do fitoterápico em DMSO 5% (equivalente a dosagem de 10 mg/kg, considerando o peso médio do camundongo de 20g) (Figura 4). Esta se destinou para tratamento via intraperitoneal de um segundo grupo de animais. Foi preparada silimarina na mesma concentração (2mg/mL), entretanto em concentração menor de DMSO, 1%, a ser administrada em um terceiro grupo de animais (Figura 5).

O experimento durou 55 dias e os tratamentos ocorreram entre o 5° e 54° dia de infecção, respeitando o desenho experimental que será detalhado posteriormente, totalizando 25 tratamentos com intervalo de 48 horas entre um e outro.



**Figura 7.** Aspecto microscópico da preparação 2mg/ mL em DMSO 5%. Esta foi administrada aos camundongos BALB/c somente ao grupo do primeiro lote experimental (I+ Sil DMSO 5%).



**Figura 8.** Aspecto microscópico da preparação 2mg/ mL em DMSO 1%. Esta foi administrada a um grupo de animais de todos os lotes experimentais.

#### *Segundo / Terceiro lote experimental*

Efetuuou-se a preparação de solução aquosa de DMSO a 1% para tratamento no primeiro grupo de animais. Preparou-se silimarina 2mg/mL em DMSO 1% para posterior tratamento em um segundo grupo de animais a dose de 10 mg/kg. Parte desta mesma preparação foi destinada para filtração em filtro BIOFIL<sup>®</sup> com membrana de polietersulfona de 0,22 μm para filtragem com seringa, a fim de reter resíduos não solubilizados de silimarina como já apresentados na Figura 5. A amostra filtrada foi destinada também para tratamento de um terceiro grupo de animais distinto do segundo.

O experimento durou 55 dias. Todos os tratamentos ocorreram durante o período do 5° ao 54° dia de infecção, respeitando o desenho experimental, completando um total de 25 tratamentos com intervalo de 48/48 horas.

No terceiro lote experimental foi feita a confirmação dos resultados obtidos no segundo, desta forma foi feita a mesma disposição de grupos de animais.

#### *Quarto / Quinto lote experimental*

Um novo grupo de animais foi adicionado nestes lotes. Realizou-se a preparação de silibina a 1mg/mL em solução aquosa de DMSO a 1% para que os animais recebessem a dose de 5mg/kg, considerando camundongos com média de peso de 20g. Foram mantidos os

grupos de animais estudados no segundo/ terceiro lote experimental, além do novo grupo citado.

Todos os tratamentos ocorreram durante o período do 5º ao 54º dia de infecção, respeitando o desenho experimental, completando um total de 25 tratamentos com intervalo de 48 horas entre eles.

No quinto lote experimental foi feita a confirmação dos resultados obtidos no quarto lote, desta forma foi feita a mesma disposição de grupos de animais.

#### *Sexto/ Sétimo lote experimental*

Foram administradas a estes grupos experimentais as mesmas preparações utilizadas para os Quarto/ Quinto lotes. Entretanto, os camundongos empregados nestes experimentos (C57BL/6) foram diferentes dos utilizados nos anteriores (BALB/c). O intervalo e a duração do tratamento também foram realizados da mesma forma.

### **Tratamentos**

Os camundongos foram tratados com solução controle (DMSO 5% ou 1%), 10 mg/kg/animal de silimarina, solução filtrada de silimarina ou 5mg/kg/animal de silibina de acordo com o grupo a que pertenciam, num intervalo de 48/48 horas. Os tratamentos foram aplicadas na cavidade peritoneal (intraperitoneal), sendo o volume de 100 µL.

### **Eutanásia**

Após o 55º dia de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia. Os órgãos (fígado, intestino e baço) desses animais foram pesados e armazenados em placas de Petri. Os fígados foram fracionados em três partes: uma destinada à histologia foi preservada em formol tamponado; outra parte, para realização da dosagem de hidroxiprolina, foi submersa em acetona para desidratação e a última, que se destinou para contagem dos ovos de *S. mansoni* no tecido. O baço e intestino também foram submetidos à última técnica.

## **Quantificação de ovos nos tecidos**

A digestão do terço inferior hepático, do tecido esplênico e intestinal foi realizada visando à quantificação dos ovos presentes nestes tecidos. Desta forma, avaliou-se a carga parasitária individualmente para averiguar a possibilidade de comparação entre os animais dentro de um grupo, bem como os grupos entre si. Para tal procedimento, empregou-se a técnica descrita por Cheever (CHEEVER, 1968), que consiste em manter os tecidos em solução de KOH 4% à temperatura ambiente por no mínimo 12 horas, com posterior incubação a 37 °C em banho-maria por 1 hora. Após este processo, aplicaram-se as amostras individualmente numa placa de 96 poços de fundo chato, e efetuou-se a contagem dos ovos em octuplicatas em microscópio óptico invertido.

## **Dosagem de parâmetros bioquímicos clínicos**

Uma fração dos soros foi armazenada em freezer (-20 °C) para o momento da dosagem de marcadores hepáticos clássicos: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), com kits comerciais de acordo com as especificações do fabricante.

## **Dosagem de hidroxiprolina**

A hidroxiprolina, um aminoácido presente quase exclusivamente no colágeno, compõe a matriz extracelular de processos fibróticos. A dosagem deste aminoácido estima o grau do processo fibrótico em curso (DUNN *et al.*, 1979).

O terço médio do fígado foi submetido à desidratação completa com acetona e aquecimento em estufa a 70 °C para posterior trituração. Após esta etapa, realizou-se a hidrólise ácida com HCl 6N “overnight” a 107 °C. Removeu-se todo o ácido através de rotavapor seco. Adicionou-se tampão apropriado para ressuspensão do material hidrolisado. Recolheu-se uma alíquota, adicionou-se cloramina T, e em seguida, a solução de aldeído ácido perclórico. Posteriormente, levou-se ao banho-maria a 60 °C por 15 minutos. Finalmente, efetuou-se a leitura das amostras, bem como do padrão de concentração conhecida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (STEGEMANN e STALDER, 1967). A partir dos valores de absorbância obtidos, plotou-se os valores em um

gráfico; estimando assim a concentração de hidroxiprolina presente nas alíquotas. Este valor foi ajustado através do fator de correção, com a finalidade de se obter a concentração do aminoácido no tecido hepático.

### **Processamento histológico**

Os ensaios histopatológicos foram feitos a partir do terço superior dos fígados de camundongos. Estes materiais foram fixados inicialmente em solução de formol tamponado 10%, e posteriormente incluídos em parafina histológica. A partir dos blocos parafinizados, efetuou-se cortes de 5µm de espessura em micrótomo. Com os cortes prontos se procedeu a coloração utilizando-se Hematoxilina-Eosina (HE). O objetivo foi avaliar a área do infiltrado celular inflamatório dos granulomas hepáticos.

Para esta análise, utilizou-se microscopia de campo claro seguida da captura das imagens. Efetuaram-se marcações nos granulomas que apresentassem um ovo em seu centro. Através dessa técnica, foi possível avaliar alterações quanto ao tamanho e a dispersão de granulomas no tecido hepático. O processamento das imagens foi feito com o auxílio do programa ImageJ 1.45 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **Dosagem das citocinas**

A dosagem das citocinas foi realizada utilizando soros dos animais submetidos à eutanásia e refrigerados a -20 °C. A metodologia utilizada para esta dosagem foi o ensaio imuno-enzimático (ELISA).

Inicialmente, os anticorpos de captura (1º anticorpo) com especificidade para as citocinas murinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 foram adsorvidos às placas de ELISA. Em seguida, os soros dos camundongos foram aplicados em cada poço, em suas respectivas posições previamente estabelecidas; o mesmo procedeu-se com os padrões. Em seguida, anticorpos biotinizados específicos para outros epítomos das citocinas foram adicionados à reação. Entre cada etapa efetuou-se três lavagens dos poços com tampão fosfato. Posteriormente, foi adicionada estreptavidina conjugada a peroxidase/fosfatase e, em seguida, o substrato da enzima empregada.

As concentrações séricas destas citocinas foram calculadas a partir das respectivas curvas padrão. Estas foram extraídas a partir da leitura das transmitâncias das citocinas recombinantes de concentrações conhecidas (padrão). Os anticorpos foram adquiridos da R&D Systems ou Peptotech (EUA).

### **Cromatografia líquida de alta eficiência**

Foi realizada cromatografia das preparações que foram empregadas nos tratamentos dos camundongos, silimarina (2mg/mL) e silibina (1mg/mL), com a finalidade de analisar qualitativamente e quantitativamente os compostos inoculados em cada grupo experimental. A preparação de silimarina foi dividida em duas partes, uma foi submetida à filtração em filtro BIOFIL<sup>®</sup> com membrana de polietersulfona de 0,22 µm, e a outra injetada integralmente.

Efetuuou-se a liofilização das preparações e filtração antes de serem submetidas à cromatografia propriamente dita. As amostras foram injetadas no equipamento Merck Hitachi LaChrom<sup>®</sup>, detector diodo L-7450A, sendo a varredura executada em 220-400nm e o monitoramento em 288nm. A eluição foi realizada em coluna de fase reversa 18 (Lichrosorb RP 18 Merck<sup>®</sup>) com a fase móvel nas seguintes proporções 40% metanol/ 60% água (0-35 min); 60% metanol/40% água (35-35,2 min) e 100% metanol (35,2-40 min) com fluxo 1mL/min adaptada de Shibano *et al* (2007) e Wen *et al.* (2008).

### **Avaliação estatística**

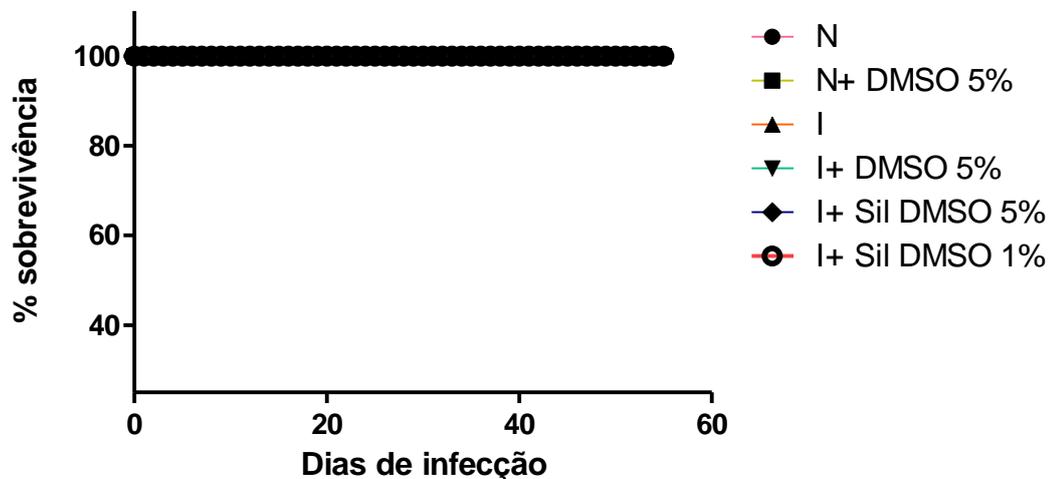
A avaliação estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa Prisma 5 for Windows (GraphPad Software Inc.). Calcularam-se as médias, desvios padrão e erros padrão. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste não pareado *t* Student ou ANOVA com post teste Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

### Primeiro lote experimental

#### Curva de sobrevivência

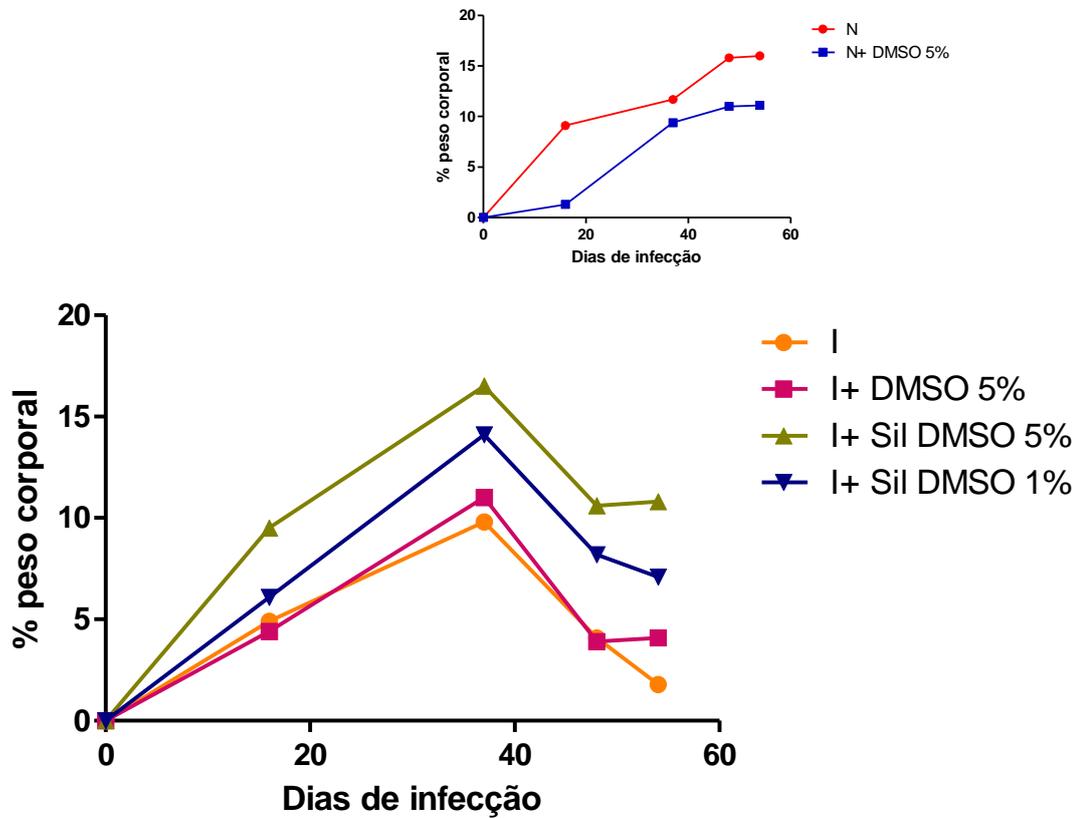
Não foi observada morte de animais durante o período experimental em qualquer grupo, como demonstrado na figura 9.



**Figura 9.** Curva de sobrevivência (1º lote experimental). Relação percentual de sobrevivência durante o período de avaliação (0-55 dia de infecção) nos grupos experimentais: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%).

#### Curva Ponderal

Quanto à variação do peso corporal dos animais foi possível observar uma redução acentuada do peso nos animais: Infectado controle (I) e Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%). No entanto, os animais dos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) a redução ponderal tende a ser amenizada, como visto na figura 10. Como era esperado, no grupo Normal controle (N) apresentaram resultados tendendo a ser crescente. O tratamento com DMSO 5% não foi capaz de alterar esse ganho em animais normais (N+ DMSO 5%) como se verifica no *inset* da mesma figura.

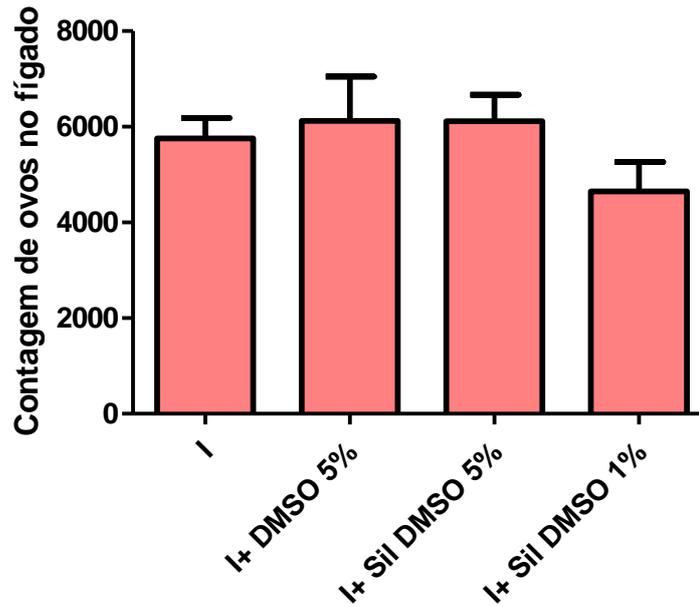


**Figura 10.** Percentual de peso corporal (1º lote experimental). Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%). *Inset* Avaliação do peso corporal dos animais normais no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%).

## Contagem de ovos nos órgãos

Ao avaliar a distribuição homogênea dos ovos no tecido hepático foi possível verificar homogeneidade em todos os grupos infectados, conforme figura 11. A contagem de ovos no intestino e no baço também não apresentou diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados). Logo, o tratamento com silimarina, como esperado segundo trabalhos anteriores, não foi capaz de agir interferindo no desenvolvimento ou na oviposição dos parasitos (MATA-SANTOS *et al.*, 2010).

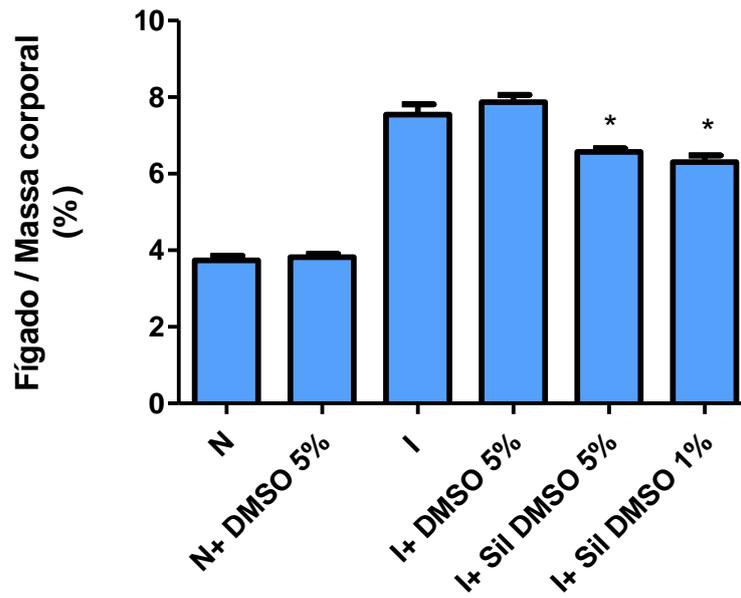
Sendo assim, trata-se de grupos infectados com mesma carga parasitária; portanto, os demais parâmetros estudados puderam ser comparados.



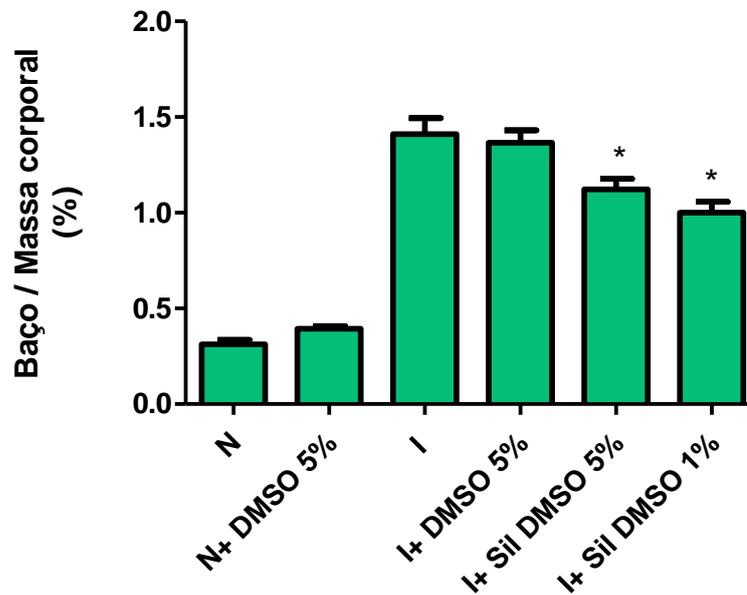
**Figura 11.** Contagem de ovos de *S. mansoni* distribuídos no tecido hepático (1º lote experimental). A contagem foi realizada em octuplicatas, segundo a técnica de Cheever (1968), nos seguintes grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%).

### Avaliação da hepatoesplenomegalia

Ao relacionar o peso dos órgãos e corporal em questão, estabeleceu-se o cálculo dos índices de fígado e baço. Através deste índice, observou-se que houve aumento esperado nestes parâmetros nos grupos infectados comparados aos normais. Além disso, foi possível evidenciar uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) em ambos os órgãos, em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme observado nas figuras 12 e 13.



**Figura 12.** Índice de fígado. Percentual do peso do tecido hepático em relação ao peso corporal (1º lote experimental) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

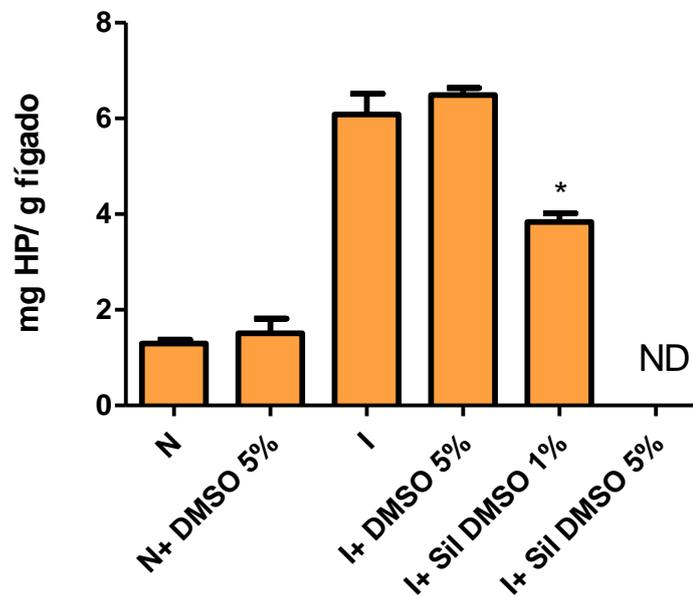


**Figura 13.** Índice de baço. Percentual do peso do tecido esplênico em relação ao peso corporal (1º lote experimental) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

## Conteúdo de hidroxiprolina

Ao analisar a deposição, verificou-se que partindo do grupo Infectado controle (I), há menor deposição de hidroxiprolina no grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ), conforme observado na figura 14. A dosagem referente ao grupo Infectado tratado com silimarina DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) não foi realizada.

O aminoácido hidroxiprolina sendo abundante na composição do colágeno I e III da matriz extracelular, pode-se relacionar diretamente a dosagem deste com o desenvolvimento do processo fibrótico.



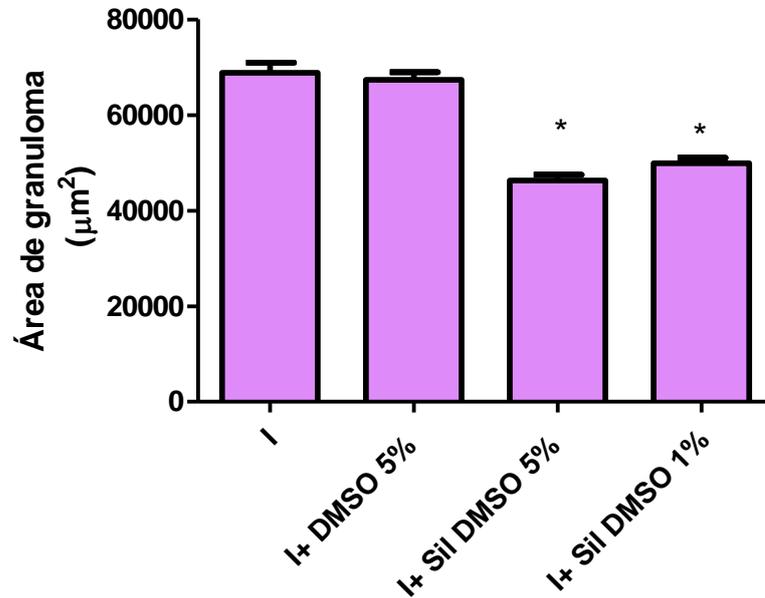
**Figura 14.** Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (1º lote experimental). Segundo método de Stegemann e Stalder (1967), a dosagem foi realizada nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 5% (N+ DMSO 5%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%). Para o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) não houve dosagem deste aminoácido (ND). Sendo  $*p < 0,05$ .

## Área de granulomas

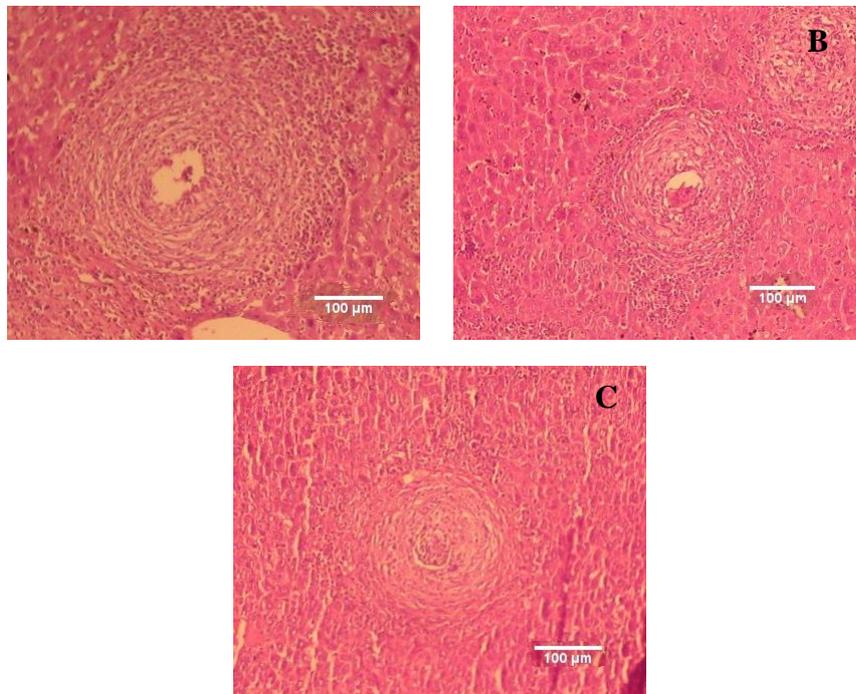
Com a finalidade de observar o processo inflamatório periovular foi calculada a área do granuloma para avaliar a possível atividade anti-inflamatória da silimarina.

Verificou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) da área dos granulomas nos grupos: Infectado tratados com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%) e Infectado tratado com

silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 15 e 16.



**Figura 15.** Área dos granulomas hepáticos periportais (1º lote experimental). A área foi mensurada através da captura de imagens de cortes histológicos nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 5% (I+ DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

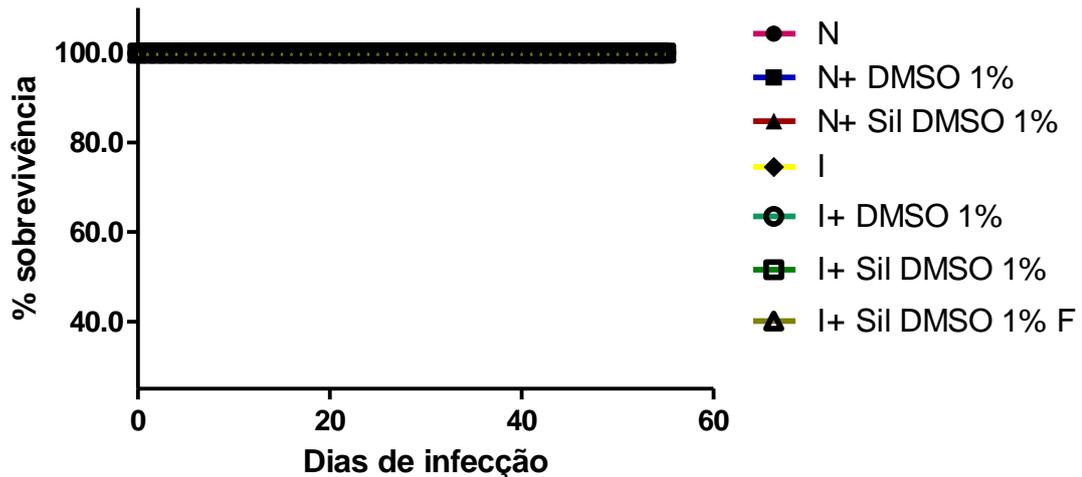


**Figura 16.** Cortes histológicos de granuloma hepático (1º lote experimental). **A** representa corte histológico corado com H&E do grupo Infectado (I), **B**, do grupo Infectado tratado com silimarina DMSO 5% (I+ Sil DMSO 5%), e **C**, grupo Infectado tratado com silimarina DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%).

## Segundo / Terceiro lote experimental

### Curva de sobrevivência

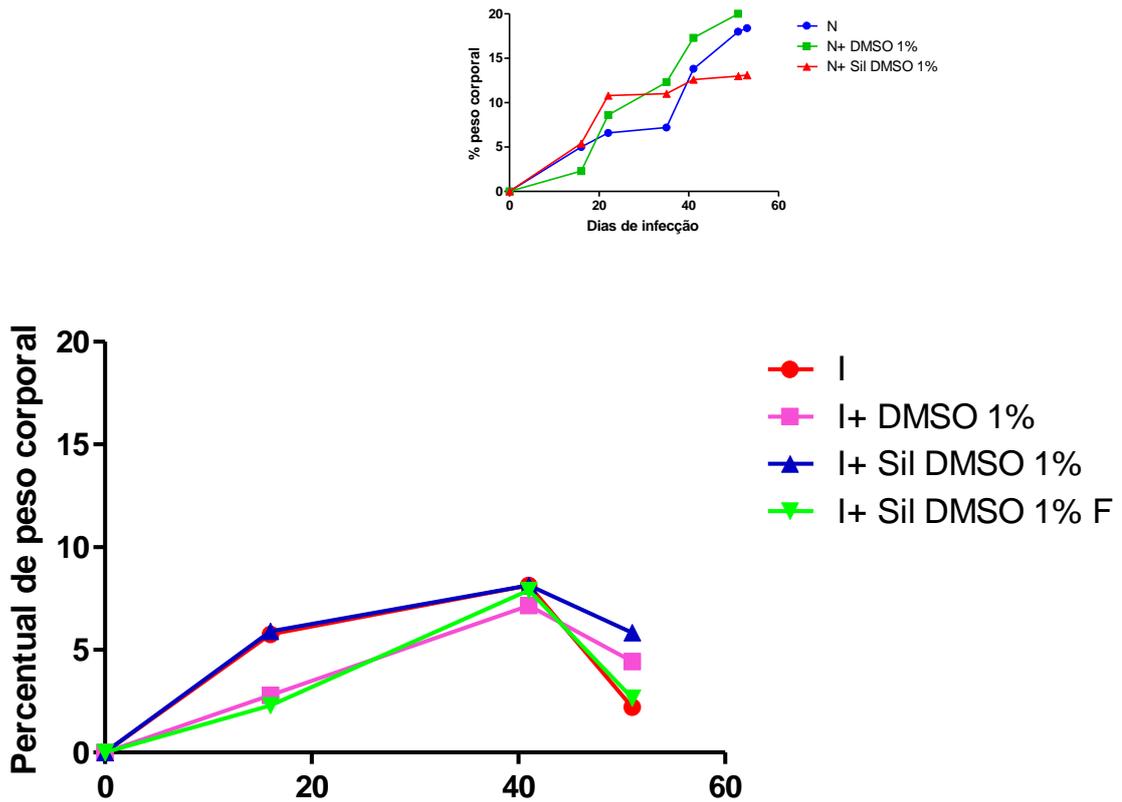
Durante o período experimental não houve morte dos camundongos em qualquer grupo, ou qualquer outro tipo de alteração comportamental que pudesse estar relacionada aos tratamentos, conforme demonstrado na figura 17.



**Figura 17.** Curva de sobrevivência (2° e 3° lotes experimentais). Relação percentual de sobrevivência durante o período de avaliação (0-55° dias de infecção) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F).

### Curva Ponderal

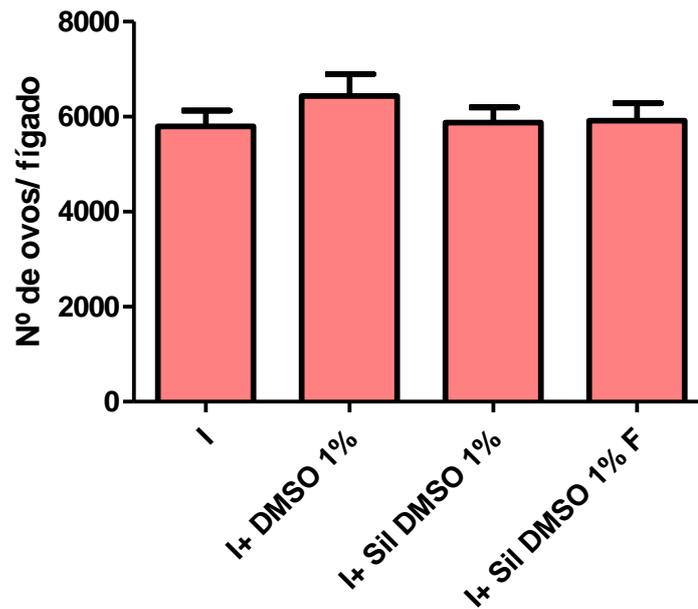
Neste experimento observou-se ascensão na curva ponderal dos animais pertencentes aos grupos normais: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%) e Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%). No entanto, todos os grupos infectados apresentaram perda de peso progressiva após o 40° dia de infecção, tratando-se de período crítico característico da infecção em relação a este parâmetro, demonstrado na figura 18.



**Figura 18.** Percentual de peso corporal (2° e 3° lotes experimentais). Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). *Inset:* Percentual de peso corporal de camundongos BALB/c normais. Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%).

## Contagem de ovos nos órgãos

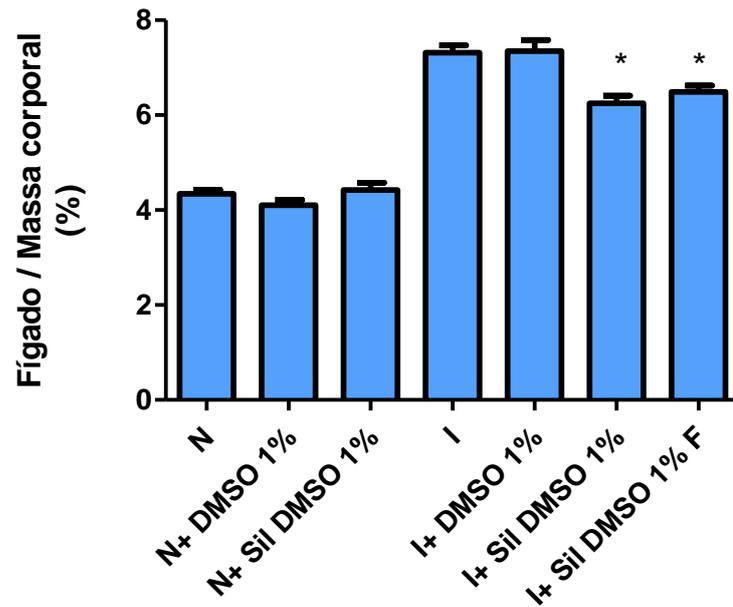
Foi possível verificar uma distribuição homogênea dos ovos no tecido hepático em todos os grupos de animais infectados, conforme figura 19. Os dados de contagem de ovos no intestino e baço não apresentaram diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados). Sendo assim, trata-se de grupos infectados comparáveis quanto aos demais parâmetros analisados, pois apresentaram mesma carga parasitária. Desta forma, o tratamento com silimarina não foi capaz de interferir na oviposição das fêmeas e na maturação dos vermes.



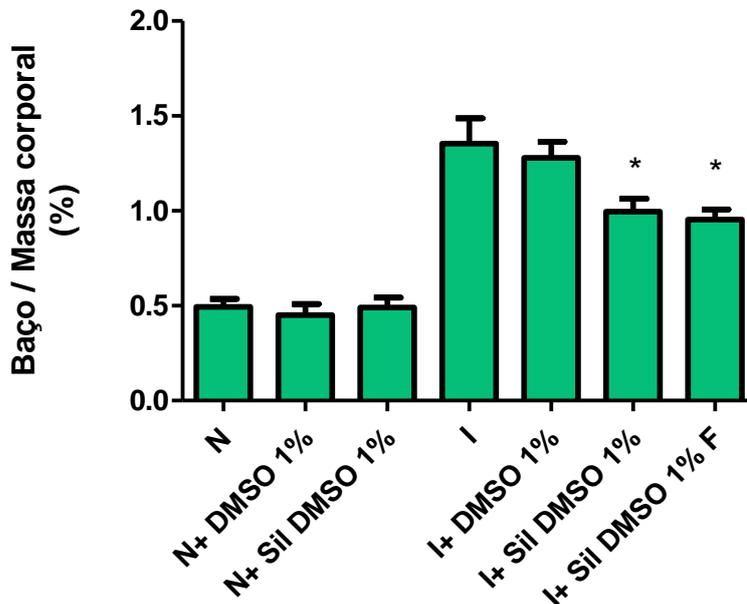
**Figura 19.** Contagem de ovos de *S. mansoni* distribuídos no tecido hepático (2º e 3º lotes experimentais). A contagem foi realizada em octuplicatas, segundo a técnica de Cheever (1968), nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F).

### Avaliação da hepatoesplenomegalia

Os índices de fígado e baço se prestam como ferramentas para avaliação da hepatoesplenomegalia. Desta forma, pode-se evidenciar redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) no tocante à hepatoesplenomegalia quando comparado ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado nas figuras 20 e 21.



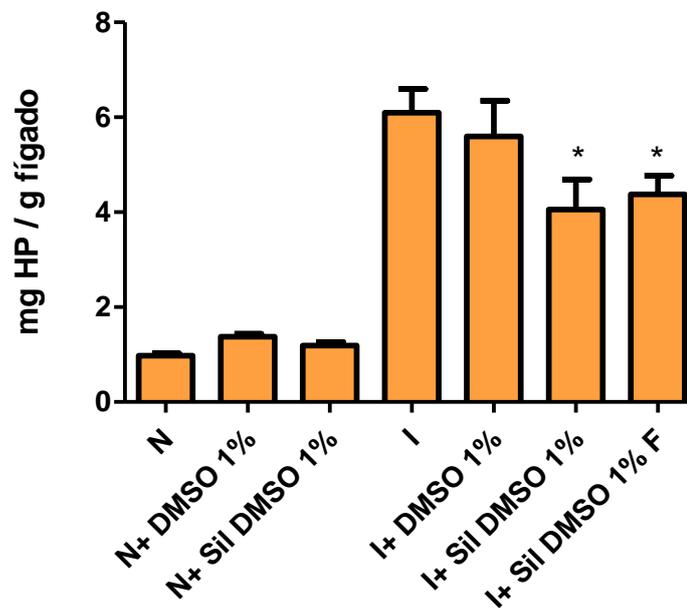
**Figura 20.** Índice de fígado (2º e 3º lotes experimentais). Percentual do peso do tecido hepático em relação ao peso corporal de camundongos BALB/c nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). Sendo \* $p < 0,05$ .



**Figura 21.** Índice de baço (2º e 3º lotes experimentais). Percentual do peso do tecido esplênico em relação ao peso corporal de camundongos BALB/c nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). Sendo \* $p < 0,05$ .

## Conteúdo de hidroxiprolina

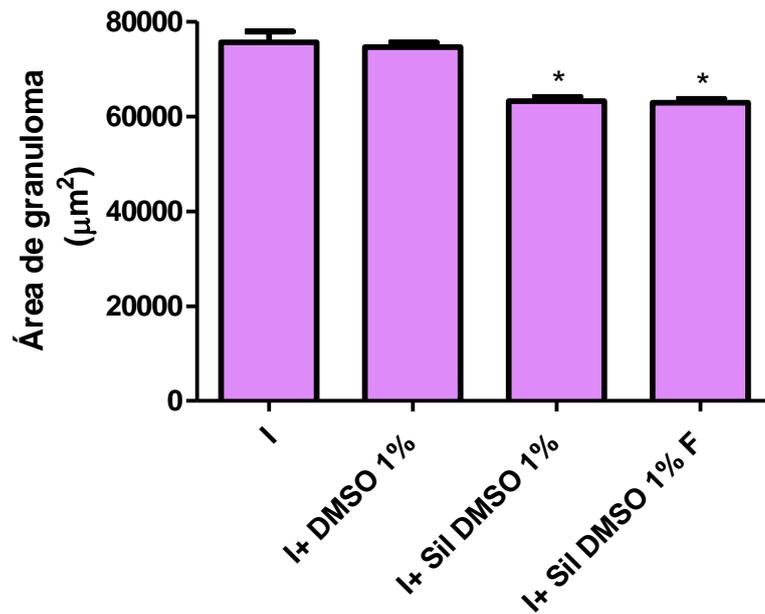
Ao se realizar a dosagem do conteúdo de hidroxiprolina, verificou-se redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) ao se comparar com o grupo Infectado controle (I), conforme observado na figura 22.



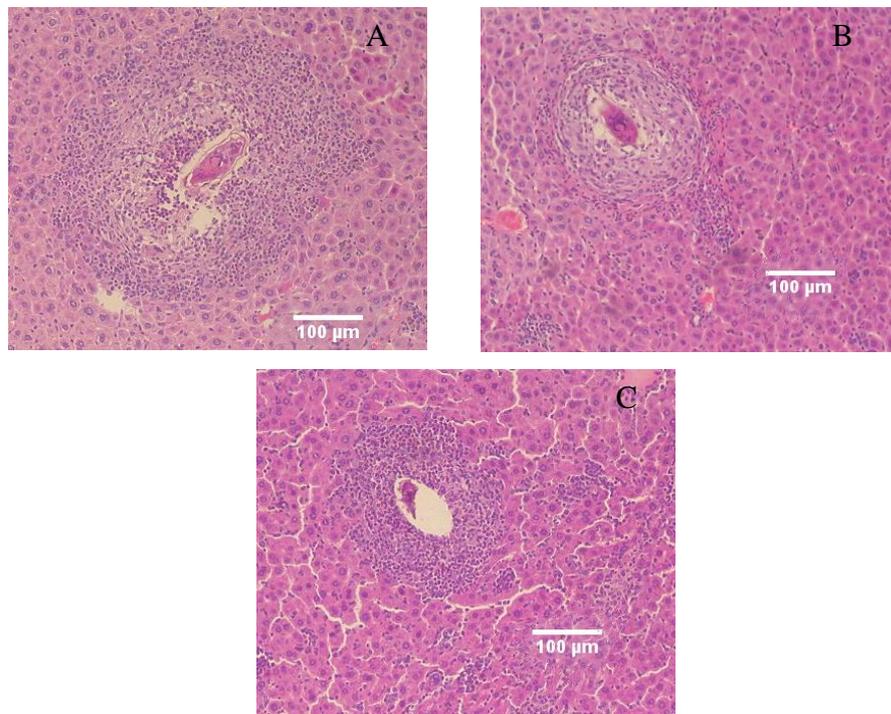
**Figura 22.** Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (2º e 3º lotes experimentais). Submeteram-se as amostras, ao método de Stegemann e Stalder (1967), os grupos: Normal controle (N), Normal tratado com DMSO 1% (N+ DMSO 1%), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). Sendo \* $p < 0,05$ .

## Área de granulomas

Houve redução significativa da área dos granulomas periovulares de ambos os grupos tratados: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) e Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme a figura 23 e 24.



**Figura 23.** Área de granulomas hepático periportais (2º e 3º lotes experimentais). A área foi mensurada através da captura de imagens de cortes histológicos dos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F). Sendo \* $p < 0,05$ .



**Figura 24.** Cortes histológicos de granulomas hepáticos corados com H&E histológicos (2 e 3º lotes experimentais). **A** representa o corte referente ao grupo Infectado (I); **B**, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); **C**, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1% F).

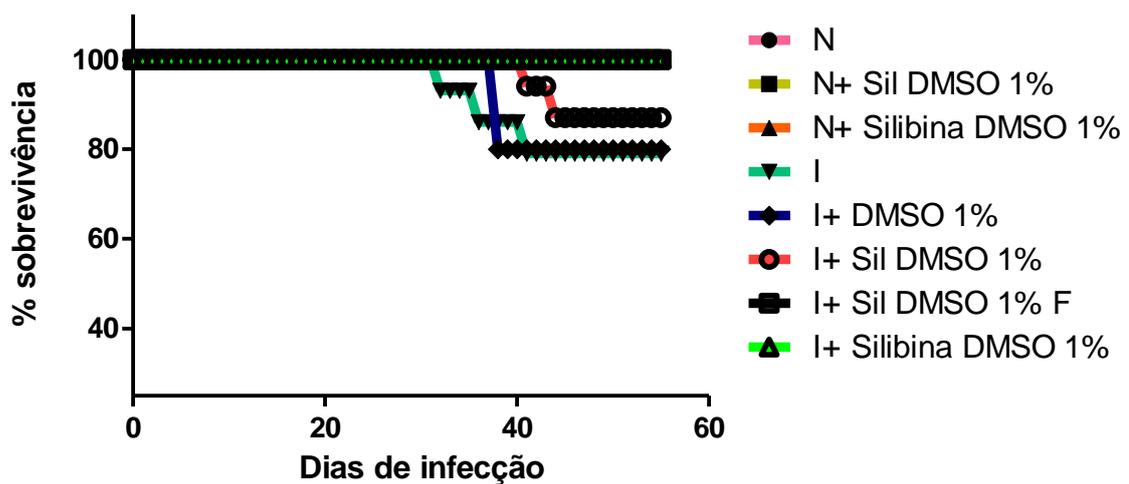
## Quarto / Quinto lote experimental

### Curva de sobrevivência

Nesta curva é possível observar mortalidade no grupo Infectado controle (I) a partir do 30º dia de infecção e se acentuando a partir do 41º dia, chegando a 21%. O grupo Infectado tratado com DMSO 1% apresentou 20%, já no grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), este início se deu no 41º dia, além de apresentar menor percentual de mortes (13%).

No restante dos grupos, Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) não se observaram mortes durante o período experimental, como visto na figura 25.

Em relação aos grupos normais não houve mortes durante o período experimental.



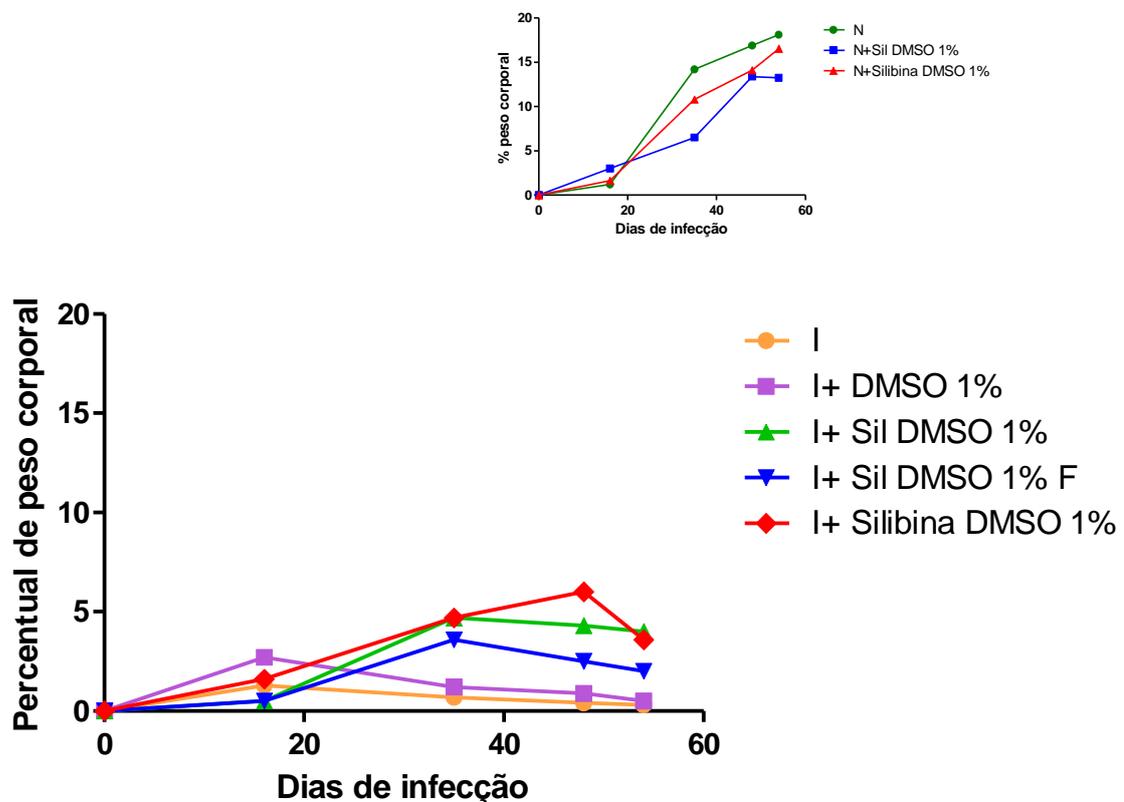
I	I+ DMSO 1%	I+ Sil DMSO 1%	I+ Sil DMSO 1% F	I+ Silibina DMSO 1%
79%	80%	87%	100%	100%

**Figura 25.** Curva de sobrevivência (4º e 5º lotes experimentais). Relação percentual de sobrevivência durante o período de avaliação (0-55º dia de infecção) nos seguintes grupos experimentais: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

### Curva Ponderal

Quanto à variação do peso corporal dos animais, foi possível observar uma ligeira redução do peso de todos os animais infectados em torno do 35º dia de infecção. Os grupos

Infectado controle (I) e Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%) apresentaram uma redução anterior a este período, sugerindo que o tratamento pode retardar a caquexia dos animais infectados, conforme figura 26. Os animais do grupo Normal controle (N) obtiveram resultados crescentes, enquanto os animais Normais tratados com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%) e Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%) apresentaram ganho de peso tendendo a ser menos intenso em relação ao grupo Normal controle (N), possivelmente devido ao *stress* promovido pelas sucessivas tratamento intraperitoneais.



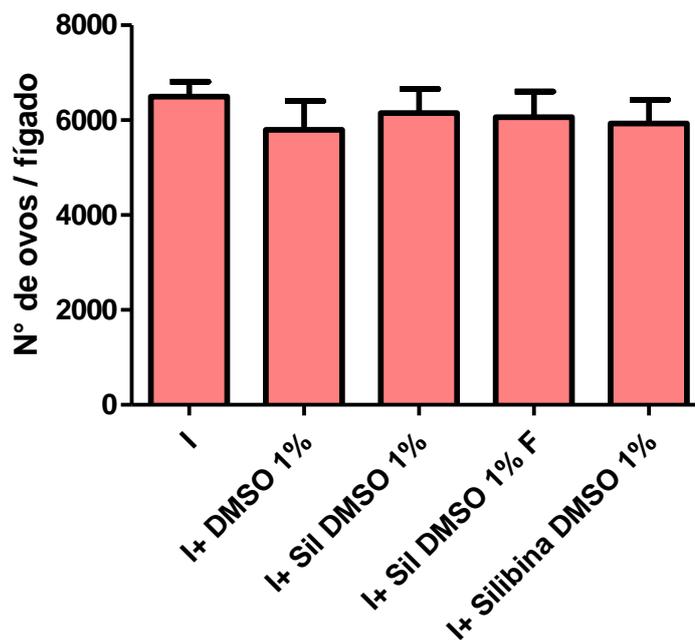
**Figura 26.** Percentual de peso corporal (4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> lotes experimentais). Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental, em relação ao dia 0 de infecção, nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). *Inset:* Percentual de peso corporal de camundongos BALB/c normais. Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%).

### Contagem de ovos nos órgãos

Foi possível verificar uma distribuição homogênea dos ovos no tecido hepático em todos os grupos de animais infectados, não havendo diferença estatística entre eles, conforme

figura 27. Os dados de contagem de ovos em outros órgãos, intestino e baço, não apresentaram diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados). Sendo assim, trata-se de grupos infectados com mesma carga parasitária; portanto, são comparáveis quanto aos demais parâmetros analisados.

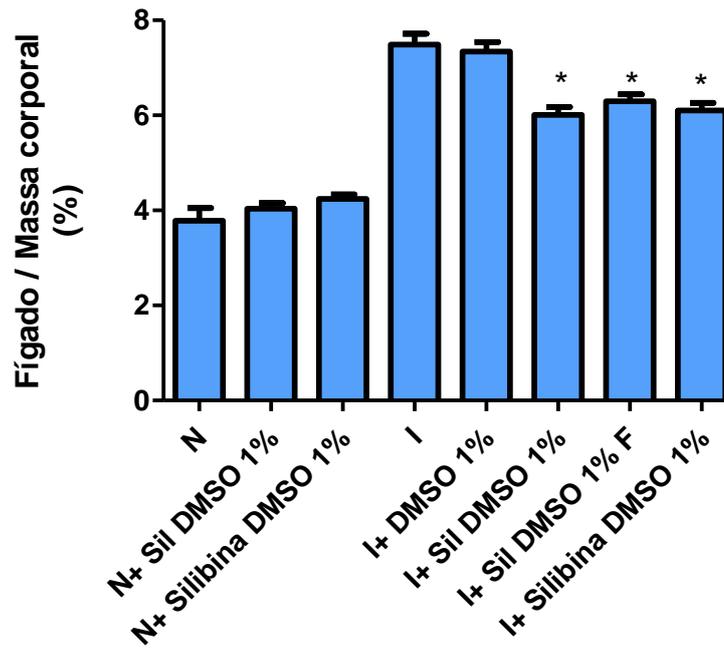
Desta forma, o tratamento dos grupos infectados com silimarina (I+ Sil DMSO 1%), silimarina filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) ou silibina (I+ Silibina DMSO 1%), não foi capaz de agir interferindo no desenvolvimento ou na oviposição dos parasitos.



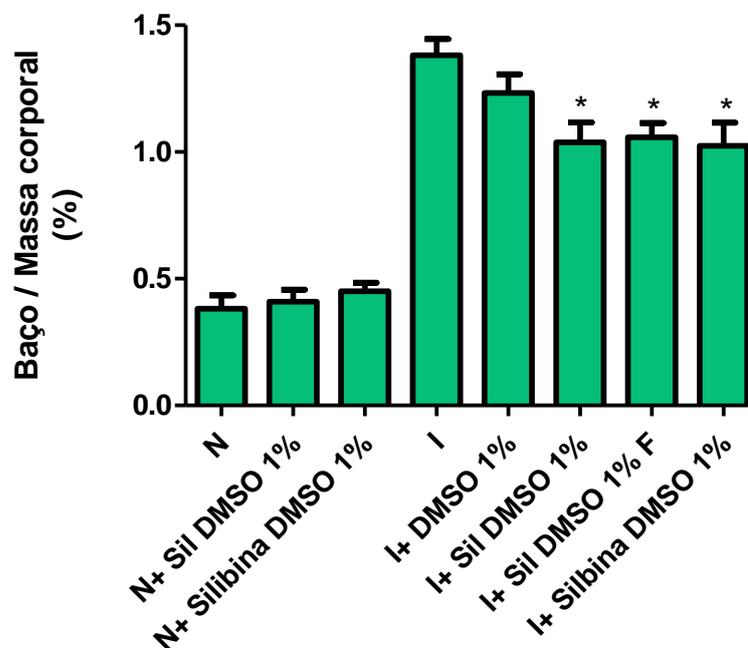
**Figura 27.** Contagem de ovos de *S. mansoni* distribuídos no tecido hepático (4° e 5° lotes experimentais). A contagem foi realizada em octuplicatas, segundo a técnica de Cheever (1968), nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

### Avaliação da hepatoesplenomegalia

Empregando-se o índice de fígado e baço como ferramenta para a avaliação da hepatoesplenomegalia, observa-se que houve redução significativa destes parâmetros nos seguintes grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao Infectado controle (I), conforme as figuras 28 e 29.



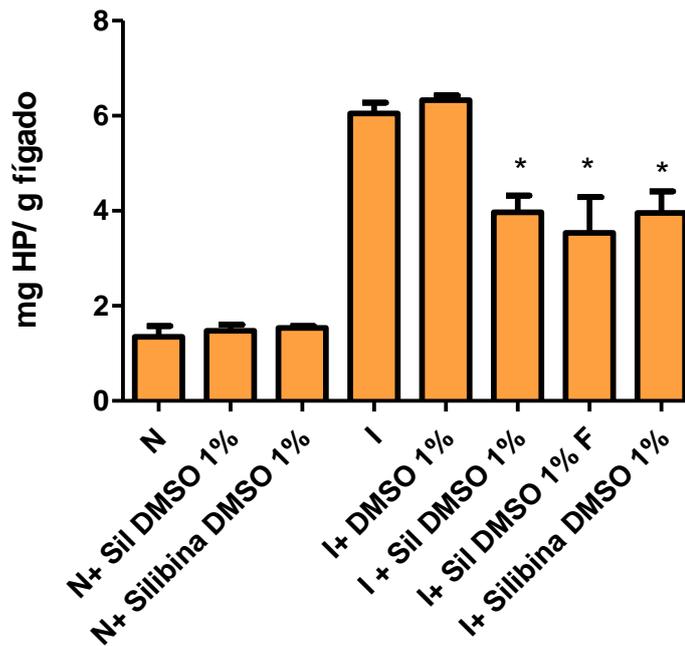
**Figura 28.** Índice de fígado (4º e 5º lotes experimentais). Percentual do peso do tecido hepático em relação ao peso corporal nos seguintes grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .



**Figura 29.** Índice de baço (4º e 5º lotes experimentais). Percentual do peso do tecido esplênico em relação ao peso corporal nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

## Conteúdo de hidroxiprolina

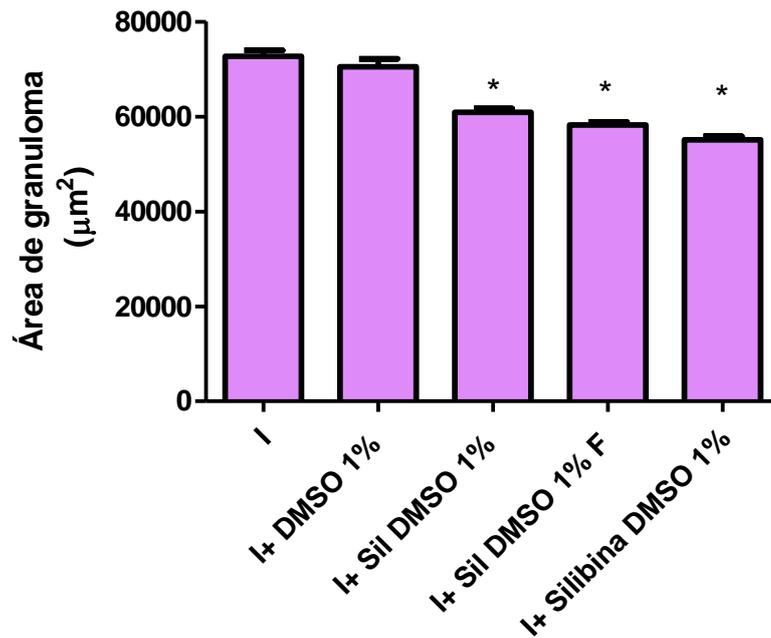
Ao se realizar a dosagem do conteúdo de hidroxiprolina foi possível verificar redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) ao se comparar com o grupo Infectado controle (I), conforme observado na figura 30.



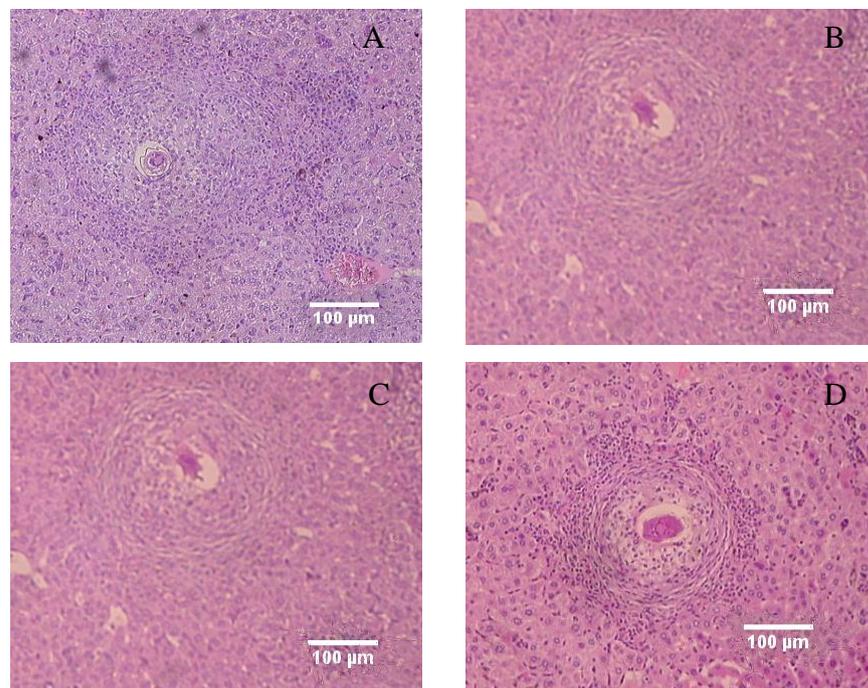
**Figura 30.** Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (4º e 5º lotes experimentais), segundo método de Stegemann e Stalder (1967), nos seguintes grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

## Área de granulomas

Em relação à área dos granulomas periovulares, houve redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 31 e 32.



**Figura 31.** Área de granulomas hepáticos periovulares (4° e 5° lotes experimentais). A área foi mensurada através da captação de imagens de cortes histológicos nos seguintes grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

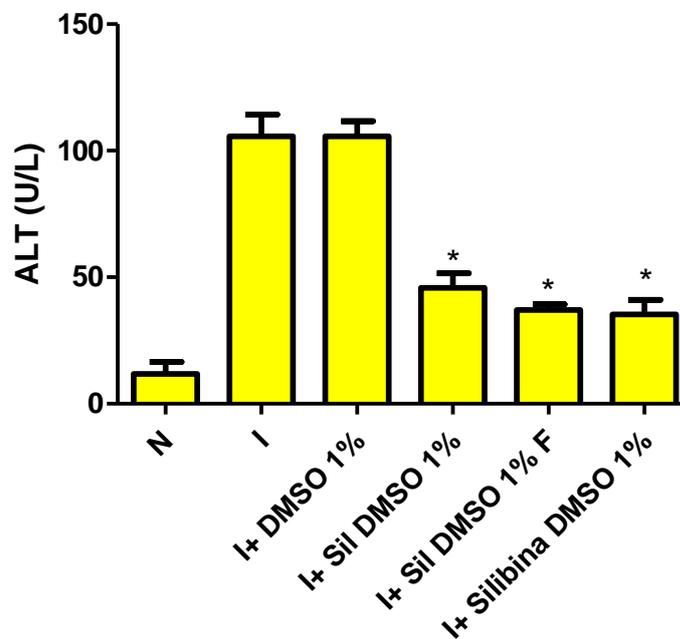


**Figura 32.** Cortes histológicos de granulomas hepáticos corados com H&E ( 4 e 5° lotes experimentais). A representa o corte referente ao grupo Infectado (I); B, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); C, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrado (I+ Sil DMSO 1% F) e D, o grupo Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

## Transaminases hepáticas

### Alanina aminotransferase

Ao se realizar a dosagem dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) foi possível verificar redução significativa desta transaminase nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 33.

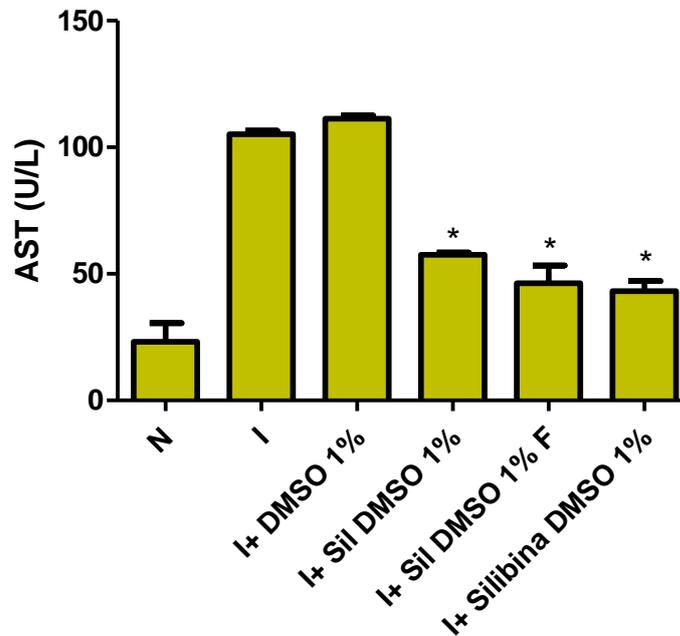


**Figura 33.** Determinação de alanina aminotransferase sérica (ALT) (4º e 5º lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

### Aspartato aminotransferase

Em relação à dosagem dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), houve redução significativa deste parâmetro nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+

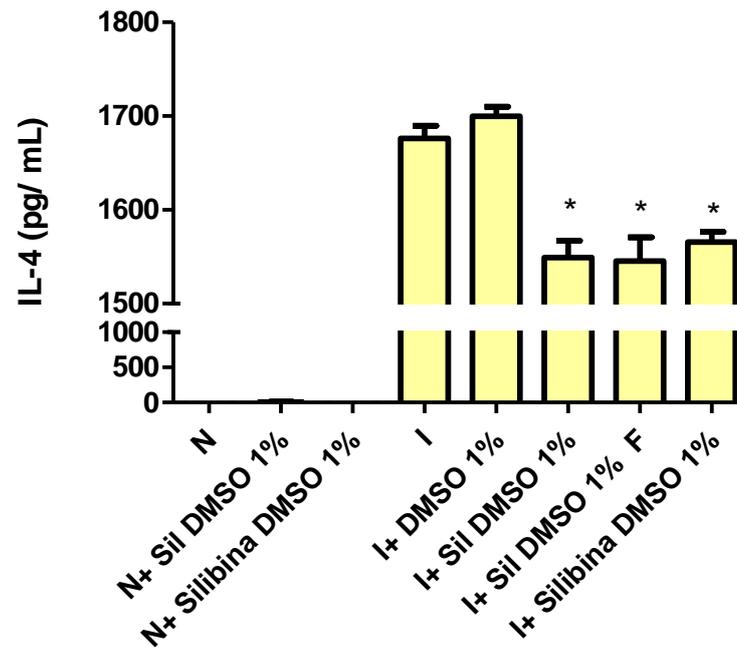
Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 34.



**Figura 34.** Determinação de aspartato aminotransferase sérica (AST) (4° e 5° lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

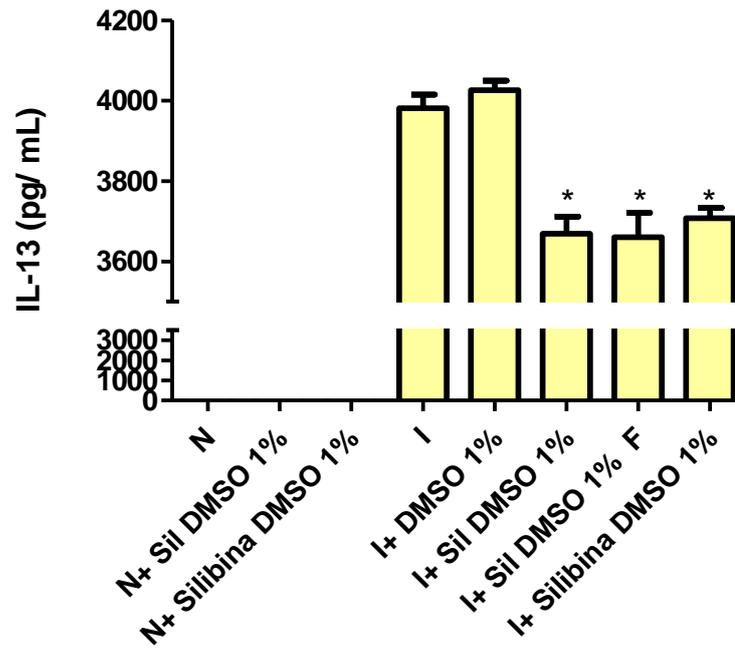
## Dosagem de citocinas

Através da dosagem dos níveis séricos de IL-4, os seguintes grupos experimentais apresentaram redução significativa: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F); Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme demonstrado na figura 35. Os tratamentos com silimarina, silimarina filtrada ou silibina levaram a uma redução de 7,6%, 7,8% e 6,6%, respectivamente, da produção desta importante citocina que pertence ao perfil TH2.



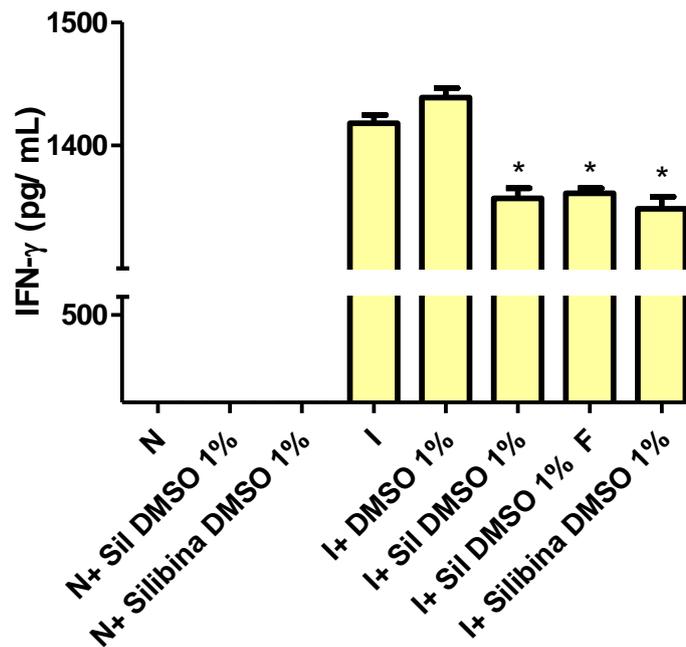
**Figura 35.** Dosagem dos níveis séricos de IL-4 (4° e 5° lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

Já quanto aos níveis séricos de IL-13, verificou-se redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F); Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme demonstrado na figura 36; sendo a redução dos níveis séricos desta citocina de 7,9%, 8,1% e 6,9%, respectivamente.



**Figura 36.** Dosagem dos níveis séricos de IL-13 sérico (4º e 5º lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

Verificou-se redução significativa dos níveis séricos de IFN- $\gamma$  nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme demonstrado na figura 37; sendo a redução dos níveis séricos desta citocina de 4,2%, 4,0% e 4,9%, respectivamente.



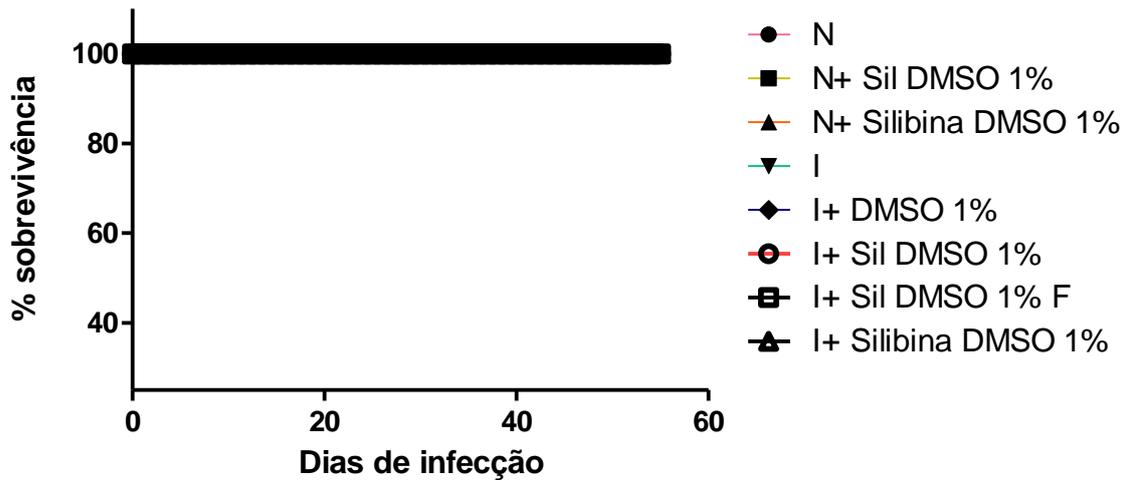
**Figura 37.** Dosagem de níveis séricos de IFN- $\gamma$  (4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

### Sexto / Sétimo lote experimental

Nestes lotes experimentais foi utilizada outra linhagem de camundongos isogênica: C57BL/6.

### Curva de sobrevivência

Durante o período experimental não houve morte em qualquer grupo, ou algum tipo de alteração comportamental que pudesse estar relacionada ao tratamento realizado, conforme demonstrado na figura 38.

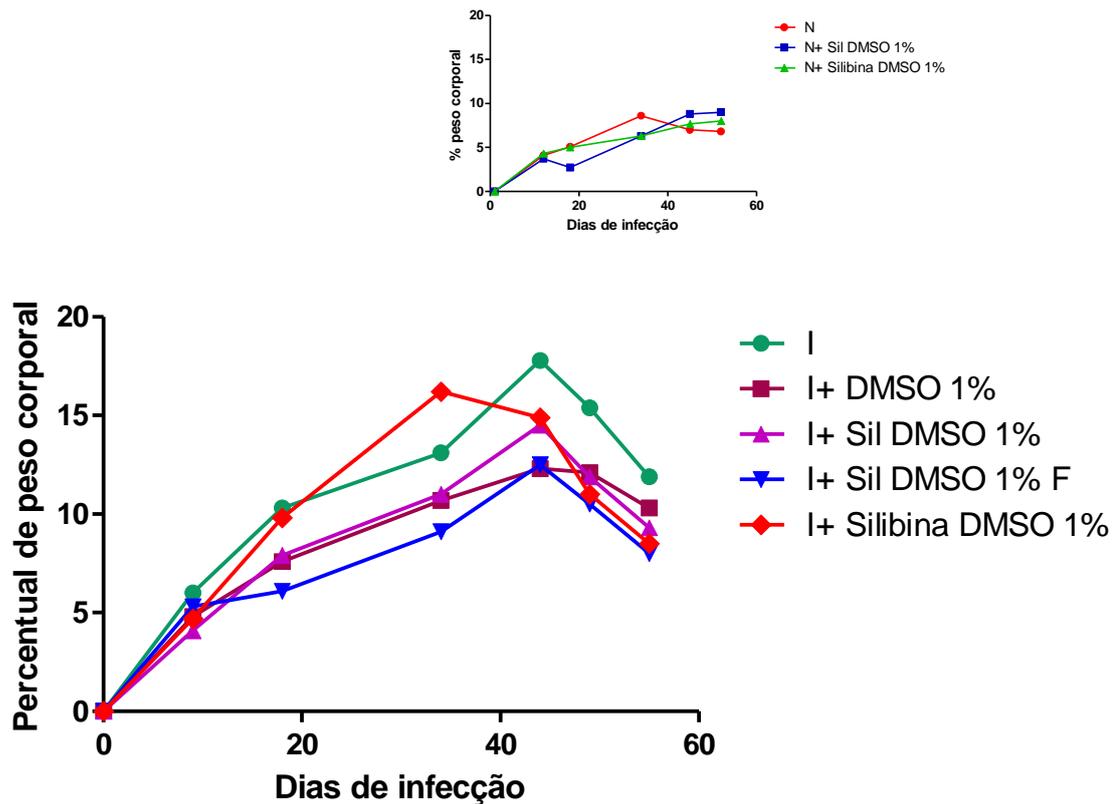


**Figura 38.** Curva de sobrevivência (6° e 7° lotes experimentais). Relação percentual de sobrevivência durante o período de avaliação (0-55° dias de infecção) nos grupos experimentais: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

## Curva Ponderal

Neste experimento observou-se tendência a ascensão na curva ponderal dos animais pertencentes aos grupos normais: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%) e Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%).

Em todos os grupos infectados houve perda de peso progressiva após o 40° dia de infecção, sendo este um período crítico característico da infecção em relação a este parâmetro, como demonstrado na figura 39.

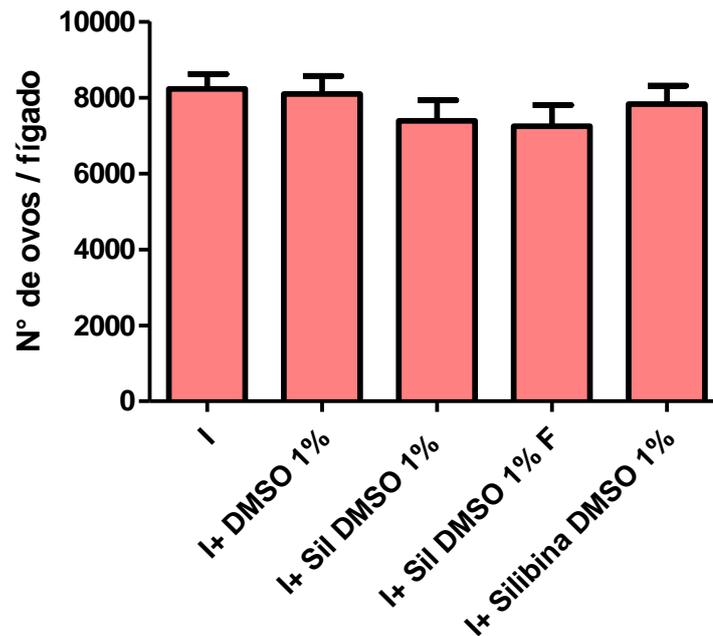


**Figura 39.** Percentual de peso corporal (6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> lotes experimentais). Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). *Inset:* Percentual de peso corporal de camundongos C57BL/6 normais. Avaliação do peso corporal no decorrer do período experimental em relação ao dia 0 de infecção nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%).

## Contagem de ovos nos órgãos

Houve uma distribuição homogênea dos ovos no tecido hepático em todos os grupos infectados, não havendo diferença estatística entre eles, conforme figura 40. Em relação aos dados de contagem de ovos no intestino e baço não houve diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados).

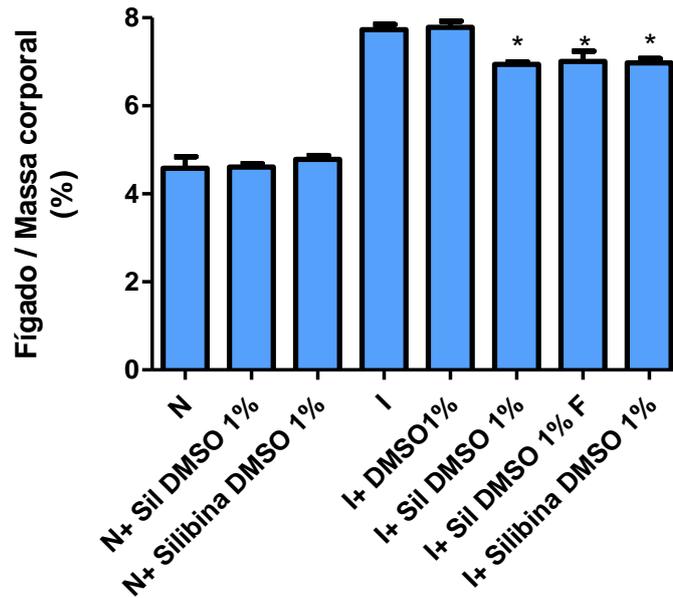
Sendo assim, trata-se de grupos infectados com mesma carga parasitária; portanto, são comparáveis quanto aos demais parâmetros analisados. Desta forma, o tratamento com silimarina, silimarina filtrada ou silibina, como esperado, não foi capaz de agir interferindo no desenvolvimento ou na oviposição dos parasitos nesta linhagem de animais.



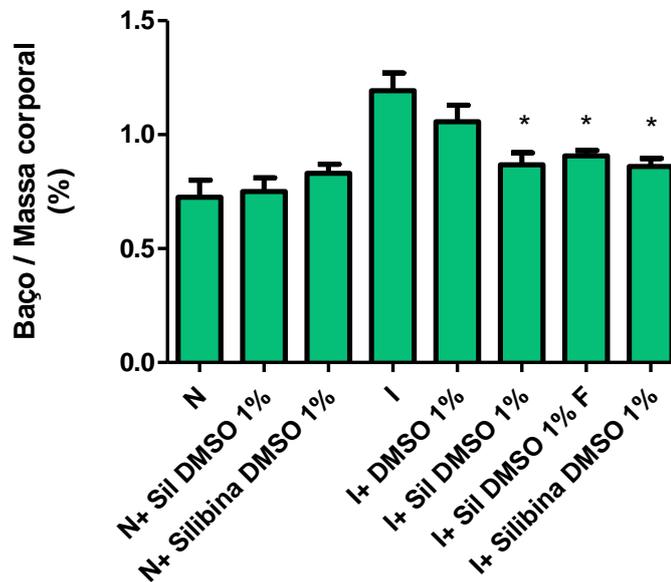
**Figura 40.** Contagem de ovos de *S. mansoni* distribuídos no tecido hepático (6º e 7º lotes experimentais), em octuplicatas, segundo a técnica de Cheever (1968), nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

### Avaliação da hepatoesplenomegalia

Ao utilizar os índices de fígado como ferramenta para a avaliação da hepatomegalia, pode-se verificar redução significativa nos seguintes grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao Infectado controle (I), como demonstrado na figura 41. Em relação a esplenomegalia, evidenciou-se redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%), conforme figura 42.



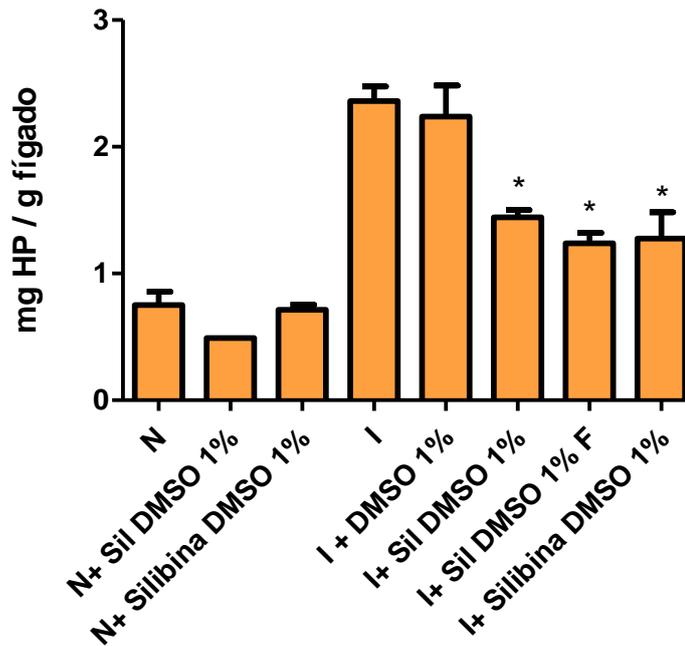
**Figura 41.** Índice de fígado. Percentual do peso do tecido hepático em relação ao peso corporal (6° e 7° lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .



**Figura 42.** Índice de baço. Percentual do peso do tecido esplênico em relação ao peso corporal (6° e 7° lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

## Conteúdo de hidroxiprolina

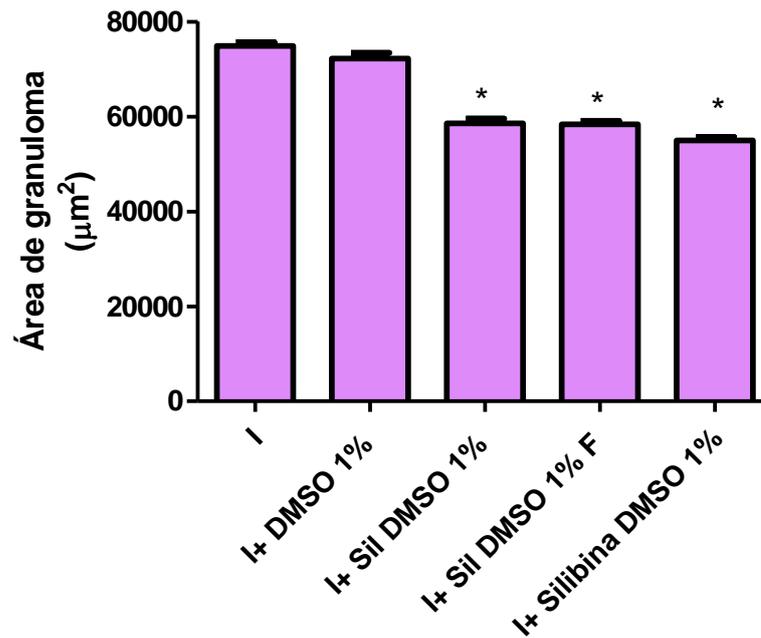
Ao se realizar a dosagem do conteúdo de hidroxiprolina foi possível verificar redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em comparação com o grupo Infectado controle (I), conforme observado na figura 43.



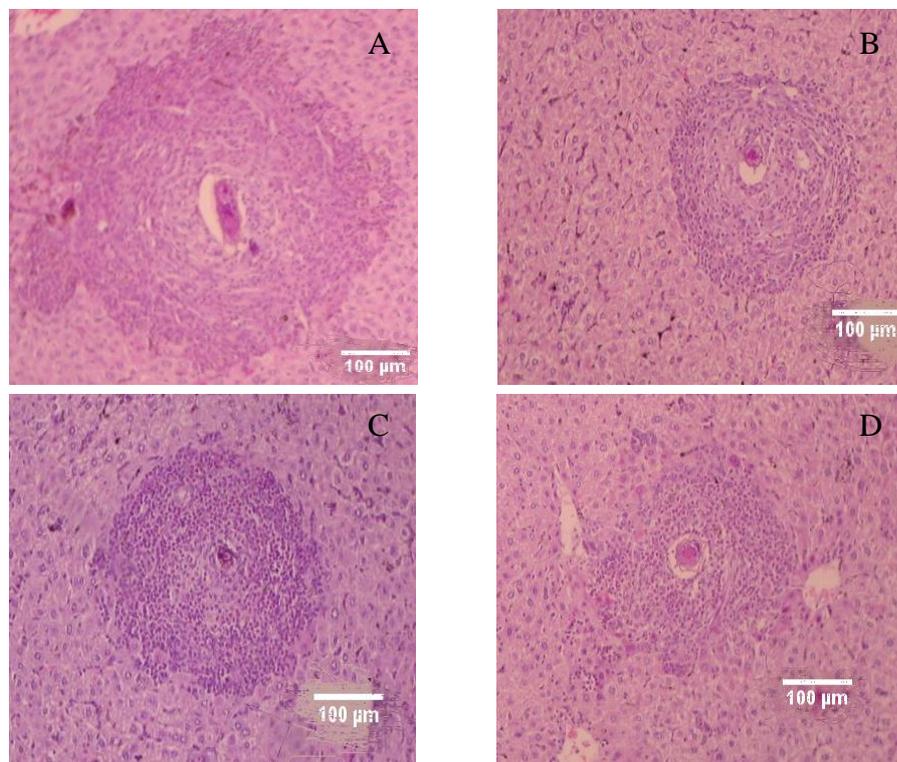
**Figura 43.** Determinação de hidroxiprolina no tecido hepático (6º e 7º lotes experimentais), segundo método de Stegemann e Stalder (1967), nos grupos: Normal controle (N), Normal tratado com silimarina em DMSO 1% (N+ Sil DMSO 1%), Normal tratado com silibina em DMSO 1% (N+ Silibina DMSO 1%), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

## Área de granulomas

Houve redução significativa da área dos granulomas periovulares nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 44 e 45.



**Figura 44.** Área de granulomas hepáticos periportais (6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> lotes experimentais). A área foi mensurada através da captura de imagens de cortes histológicos nos grupos: Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

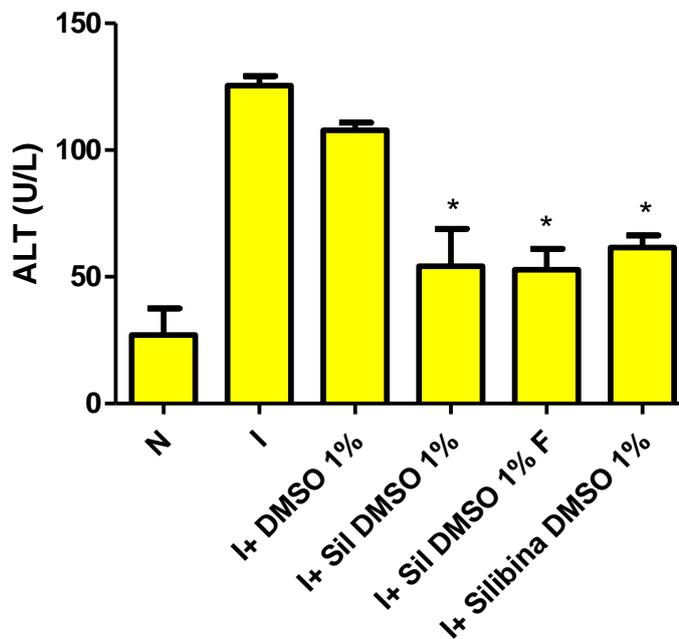


**Figura 45.** Cortes histológicos corados com H&E (6 e 7<sup>o</sup> lotes experimentais). **A** representa o corte referente ao grupo Infectado (I); **B**, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); **C**, o grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrado (I+ Sil DMSO 1% F) e **D**, o grupo Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%).

## Transaminases hepáticas

### Alanina aminotransferase

Na dosagem dos níveis séricos do marcador hepático alanina aminotransferase (ALT), houve redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 46.

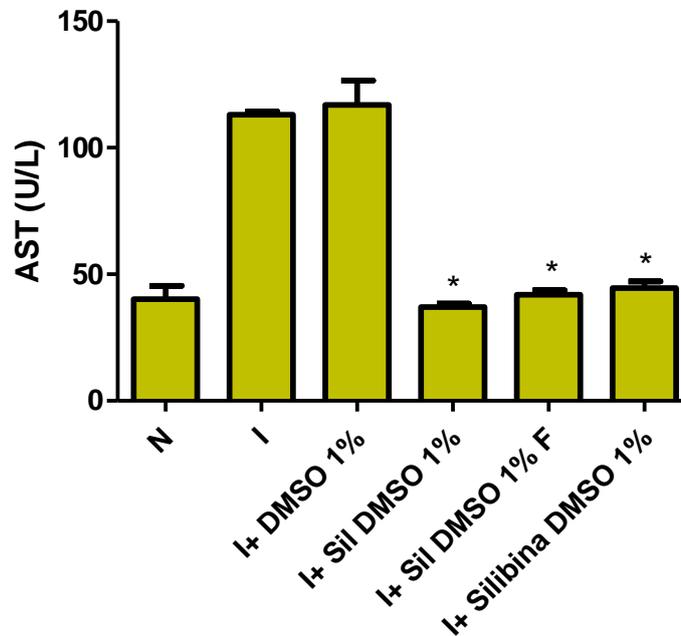


**Figura 46.** Determinação dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) (6° e 7° lotes experimentais) nos grupos: Normal (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo\* $p < 0,05$ .

### Aspartato aminotransferase

Na dosagem sérica da transaminase aspartato aminotransferase (AST), houve redução significativa dos níveis deste marcador nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+

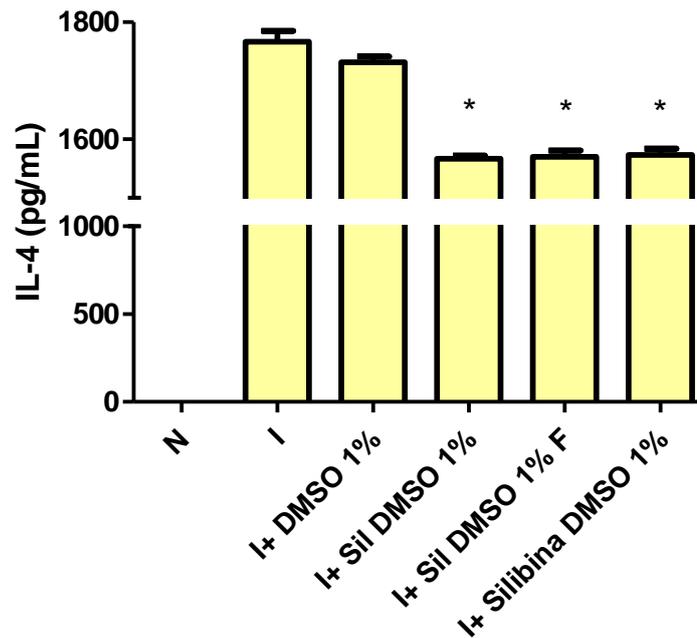
Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), como demonstrado na figura 47.



**Figura 47.** Determinação dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) (6° e 7° lotes experimentais) nos grupos: Normal (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F), Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

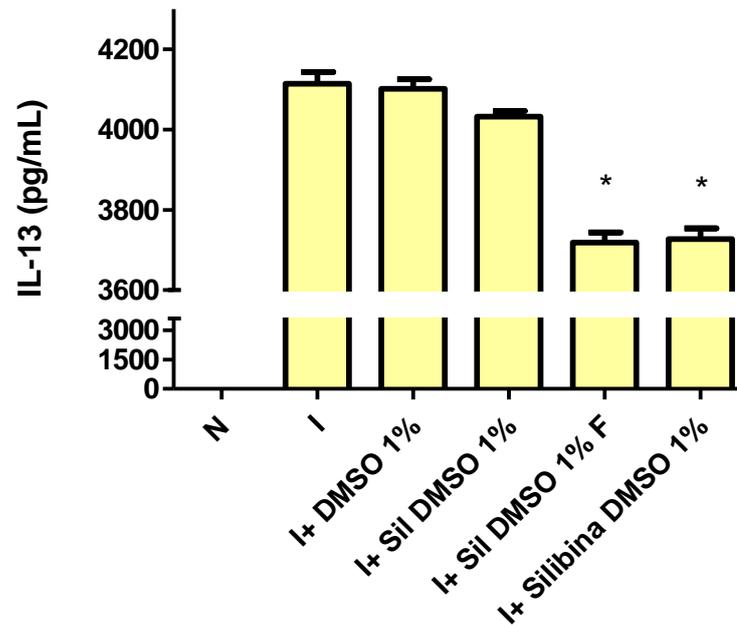
## Dosagem de citocinas

Ao se realizar a dosagem dos níveis séricos de IL-4, verificou-se uma redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%); Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I) de 3,7%, 11,2% e 10,9%, respectivamente, conforme demonstrado na figura 48.



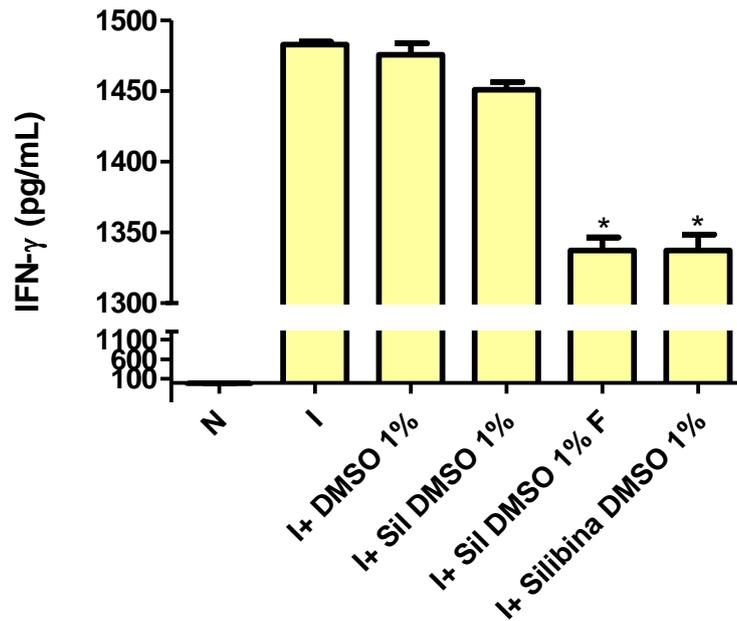
**Figura 48.** Dosagem dos níveis séricos de IL-4 sérico (6º e 7º lotes experimentais), nos grupos: Normal controle (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

Já quanto aos níveis séricos de IL-13 séricos, verificaram-se redução significativa nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), de 9,6% e 9,4%, respectivamente, conforme demonstrado na figura 49. No entanto, a redução desta citocina no grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) foi de apenas 2%, não representando um resultado significativo.



**Figura 49.** Dosagem dos níveis séricos de IL-13 (6° e 7° lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

Verificou-se redução significativa dos níveis séricos de IFN- $\gamma$  nos grupos: Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%) em relação ao grupo Infectado controle (I), conforme demonstrado na figura 50. Sendo a redução nestes tratamentos de 9,8% e 9,8%, respectivamente. No entanto, a redução no grupo Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%) foi de apenas 2,1%, não representando resultado significativo.



**Figura 50.** Dosagem dos níveis séricos IFN- $\gamma$  sérico (6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> lotes experimentais) nos grupos: Normal controle (N), Infectado controle (I), Infectado tratado com DMSO 1% (I+ DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% (I+ Sil DMSO 1%), Infectado tratado com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+ Sil DMSO 1% F) e Infectado tratado com silibina em DMSO 1% (I+ Silibina DMSO 1%). Sendo \* $p < 0,05$ .

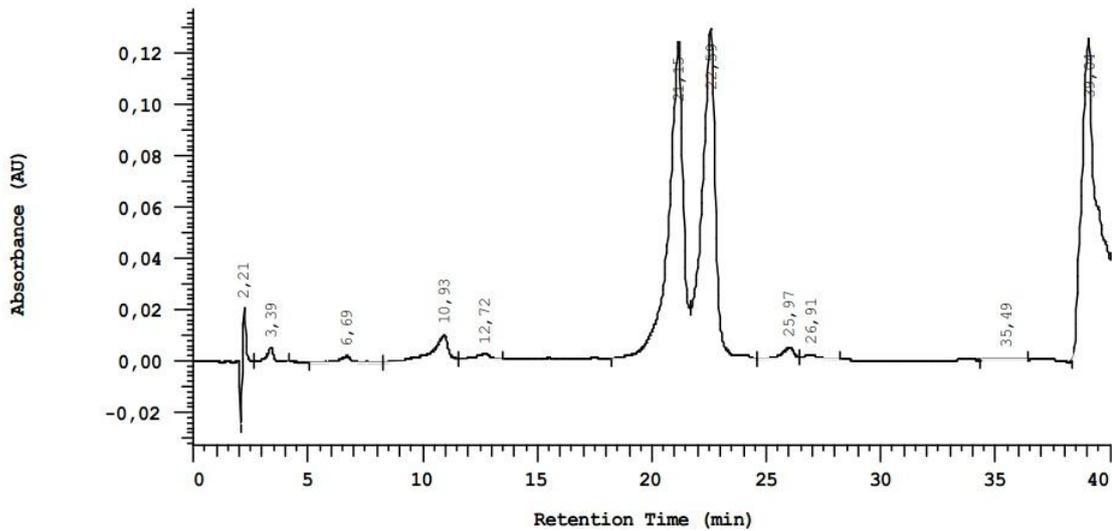
## Cromatografia líquida de alta eficiência

Ao se submeter as preparações: silibina (1mg/mL), silimarina (2mg/mL) e silimarina filtrada (2mg/mL, antes da filtração) à cromatografia líquida de alta eficiência foram obtidos os cromatogramas representados nas figuras 51, 52 e 53.

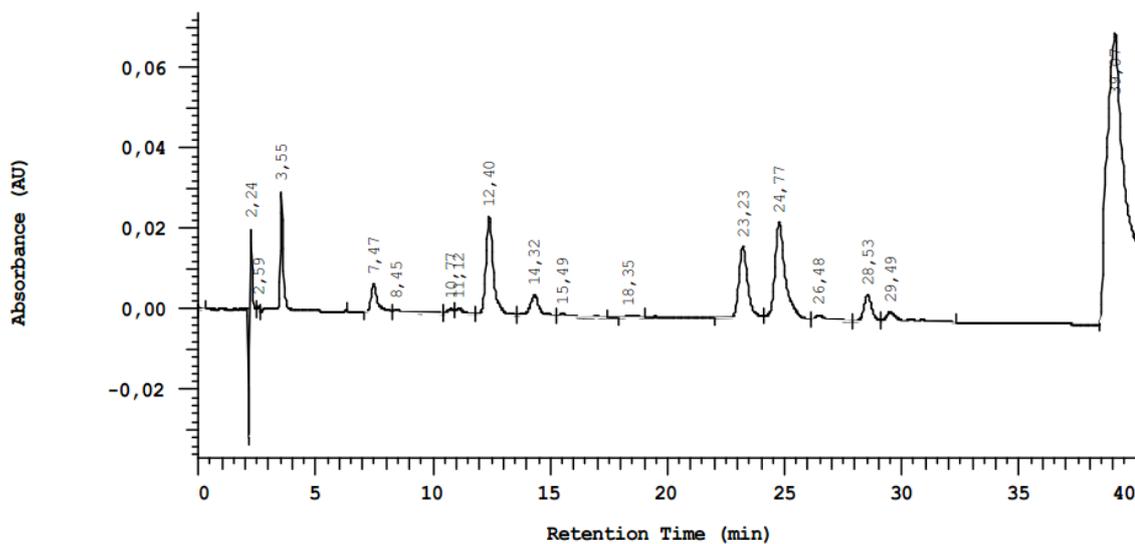
Na figura 51, observa-se que os picos com tempo de retenção de 21,16 e 22,29, referem-se à silibina A e silibina B, representando um total de 92,9% das substâncias presentes no extrato; enquanto os demais picos tem pouca representatividade por se tratar de uma substância pura.

Por analogia e se tratando de análises cromatográficas realizadas sob as mesmas condições, os picos com tempo de retenção de 23,23 e 24,77 (figura 52) e de 22,48 e 24,08 (figura 53) devem corresponder à silibina A e silibina B.

Não se pode afirmar a que substâncias correspondem os demais picos observados nas figuras 52 e 53, visto que não se dispõe de outros padrões puros para se efetuar a correlação. Além disso, não se dispõe de dados na literatura de análises de amostras de silimarina realizadas em condições semelhantes que permitam inferir a que substâncias correspondem os demais picos observados nos cromatogramas das figuras 52 e 53.

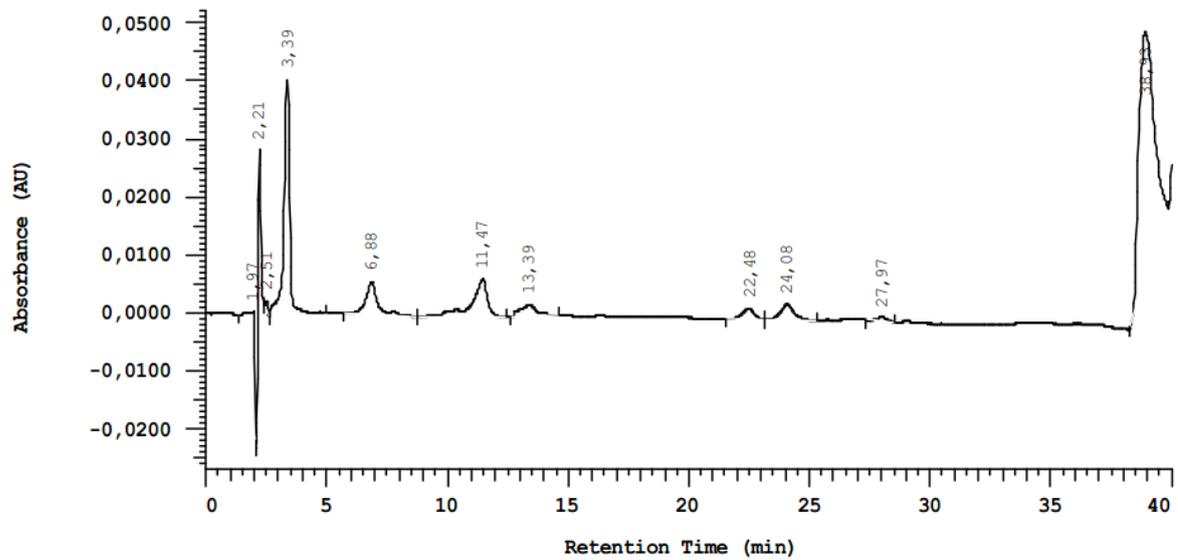


**Figura 51.** Cromatograma da preparação de silibina (1mg/mL). Eluição em coluna Lichrosorb RP 18 Merck com fase móvel nas seguintes proporções nos respectivos intervalos de tempo: 40% metanol / 60% água (0- 35 min); 60% metanol / 40% água (35-35,2 min) e 100% metanol (35,2-40 min) e fluxo de 1mL/min desta fase.



**Figura 52.** Cromatograma da preparação de silimarina (2mg/mL). Eluição em coluna Lichrosorb RP 18 Merck com fase móvel nas seguintes proporções e nos respectivos intervalos de tempo: 40% metanol / 60% água (0- 35 min); 60% metanol / 40% água (35-35,2 min) e 100% metanol (35,2-40 min) e fluxo de 1mL/min desta fase.

Em relação às figuras 52 e 53, observa-se a redução quantitativa dos isômeros da silibina. Na preparação silimarina (figura 52), os picos com tempos de retenção de 23,23 e 24,77 representam, possivelmente, silibina A e B, compõem 56,21% do total no cromatograma. Na preparação silimarina filtrada (figura 53), as essas substâncias estão representadas nos picos com tempos de retenção de 22,48 e 24,08, compondo apenas 21,59% do cromatograma total.



**Figura 53.** Cromatograma da preparação de silimarina (2mg/mL) filtrada em filtro de membrana de 22  $\mu$ m de diâmetro, empregando coluna Lichrosorb RP 18 Merck com a fase móvel nas seguintes proporções e nos respectivos intervalos de tempo: 40% metanol / 60% água (0- 35 min); 60% metanol / 40% água (35-35,2 min) e 100% metanol (35,2-40 min) e fluxo de 1mL/min desta fase.

## DISCUSSÃO

A esquistossomíase é uma doença que ainda acomete muitos indivíduos de regiões em desenvolvimento; por ser uma doença de grande morbidade e debilitante, torna-se um fator que contribui negativamente para o desenvolvimento destas regiões. Grande parte da morbidade está ligada à fibrose e, conseqüentemente à instalação da hipertensão portal e, posteriormente, formação de varizes esofagianas, culminando com o óbito do indivíduo por conta do rompimento destas varizes e hemorragia. Portanto, são necessários estudos que visem não apenas à obtenção de fármacos eficazes contra o parasito, mas também ao desenvolvimento de fármacos que atuem diminuindo ou revertendo a fibrose já estabelecida.

O modelo murino foi escolhido por apresentar patologia semelhante a do homem, com espessamento fibroso dos espaços porta, acúmulo de granulomas periovulares, sendo possível evidenciar fibrose do tipo “pipestem”; lesões de parênquima e desenvolvimento de hipertensão portal (CHEEVER *et al.*, 2002). Sendo assim, este modelo pode auxiliar no estudo de terapias coadjuvantes para a esquistossomíase, bem como em outras doenças em que a fibrose esteja envolvida como patologia principal.

Neste trabalho, a silimarina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), e não em carboximetilcelulose (CMC) como nos trabalhos anteriores de nosso grupo (MATA-SANTOS *et al.*, 2010). Sendo a preparação em DMSO mais solúvel, esta foi avaliada quanto aos seus efeitos na infecção esquistossomótica. Além disso, foram comparados os efeitos da silibina com aqueles observados para a silimarina, com objetivo de tentar evidenciar se a fração biologicamente ativa da silimarina era a silibina.

Como observado nas curvas ponderais dos vários lotes experimentais utilizando BALB/c, os animais normais e normais tratados demonstram acréscimo no peso corporal de cerca de 20% ao final do tempo experimental. Entretanto, os animais infectados e infectados tratados apresentaram curva ponderal com ganho de peso mais discreto em relação aos normais, cerca de 10%, e por volta do 40º dia houve decréscimo de peso corporal destes animais, fossem tratados ou não. Esta redução possivelmente está associada ao início da oviposição e, principalmente, a chegada destes aos tecidos. Segundo OTHMAN *et al.*, 2010, o grupo de antígenos chamado SEA (antígenos solúveis do ovo) ao ser liberado nos tecidos, tem relação direta com redução do peso dos animais infectados. Isto pode ser explicado, pois nesta fase há o comprometimento da função hepática atingindo, principalmente, a metabolização de nutrientes (ATTA *et al.*, 1981), podendo, desta forma, justificar a redução ponderal após o início da oviposição pelos vermes adultos (MONE e BOISSIER, 2004). Soma-se a isto o fato de que a passagem do ovo para a luz intestinal promove o processo inflamatório da mucosa,

que irá alterar a absorção de glicose (SADEK, BORGES e MISZPUTEN, 1986), contribuindo também para a redução de peso corporal. Em relação aos animais C57BL/6, observou-se uma redução ponderal mais amena, possivelmente pela menor susceptibilidade desta linhagem à infecção em relação aos animais BALB/c (FANNING *et al.*, 1981).

Em relação à toxicidade da silimarina, pode-se verificar completa ausência de toxicidade na dose utilizada, como já demonstrado por nosso grupo anteriormente (MATA-SANTOS *et al.*, 2010). Além disso, trata-se de fitoterápico seguro com LD<sub>50</sub> elevada, sem descrição de efeitos colaterais importantes em estudos clínicos (FLORA *et al.*, 1998). Da mesma forma, os grupos que receberam silibina como tratamento apresentaram a mesma ausência de toxicidade, o que era esperado pelo fato de o composto ser o majoritário na silimarina (GAZAK, WALTEROVA e KREN, 2007). Nas duas linhagens, com os tratamentos foi observada ausência de qualquer tipo de alteração como: mudanças comportamentais, redução de peso ou aumento da mortalidade. Além disso, o tratamento com silimarina ou silibina não foi capaz de alterar a capacidade de oviposição ou ainda a maturação dos vermes adultos (EL-LAKKANY *et al.*, 2012).

Ao submeter os tecidos do fígado, intestino e baço à técnica de Cheever (CHEEVER, 1968), e efetuar a contagem dos ovos distribuídos nestes tecidos, não foi observada diferença estatística entre os grupos infectados sem tratamento e os infectados tratados com silimarina ou silibina, tanto na linhagem BALB/c como na C57BL/6. Uma vez que os grupos apresentavam a mesma quantidade de ovos nos tecidos, eles puderam ser comparados em relação a outros parâmetros relativos à infecção, como: hepatoesplenomegalia, processo inflamatório periovular, fibrose, modulação da resposta imune e redução dos marcadores hepáticos.

Na esquistossomíase, a reação granulomatosa periovular parece desempenhar a função relevante de enclausurar antígenos hepatotóxicos eliminados pelos ovos. A presença do infiltrado inflamatório no tecido ocorre também no intuito de destruí-los. No entanto, este processo promove danos nas regiões adjacentes ao infiltrado com a formação de processo cicatricial fibrótico (ANDRADE e WARREN, 1964; ANDRADE, 1991). Desta forma, pode-se deduzir que o processo inflamatório está diretamente relacionado à fibrose que se estabelece nesta infecção (CHEEVER, DUVALL e HALLACK, 1983). Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, pois houve redução significativa da área de granuloma, diminuição do conteúdo de hidroxiprolina, que está diretamente ligado à fibrose nos grupos que receberam tratamento com silimarina ou silibina.

Estes resultados podem estar relacionados à atividade antiinflamatória e antioxidante da silimarina e silibina descrita na literatura (MIDDLETON, KANDASWAMI e THEOHARIDES, 2000) e, conseqüentemente, serem responsáveis pela redução do processo fibrótico hepático como já demonstrado em outro modelo experimental (BOIGK *et al.*, 1997). Em particular, este fenômeno ocorre por conhecida ação da silimarina em suprimir a expressão profibrogênica do procolágeno  $\alpha$ -1 (I) e de metaloproteinases-1, provavelmente pela diminuição de mRNA para TGF $\beta$  1 já demonstrada em ratos com fibrose biliar secundária (JIA *et al.*, 2001).

A hidroxiprolina é um aminoácido constitutivo na formação do colágeno presente no processo fibrótico. Desta forma, a determinação do conteúdo deste aminoácido pode avaliar a intensidade deste processo. Conforme a literatura, a silimarina vem sendo empregada em tratamentos com pacientes cirróticos para amenizar a fibrose estabelecida (FLORA *et al.*, 1998; DE GROOT e RAUEN, 1998). Neste trabalho, confirmaram-se os resultados obtidos na literatura com redução acentuada de hidroxiprolina nos grupos tratados com silimarina ou silibina. A redução média foi ao redor de 35% em relação ao grupo infectado. Este resultado foi semelhante entre as linhagens de camundongos estudadas.

A redução das enzimas hepáticas ALT/AST observada nos animais tratados possivelmente deve-se a outro mecanismo de ação já relacionado à silimarina e à silibina, o de hepatoproteção. Quando do aporte dos ovos no tecido hepático, ocorre a produção de quimiocinas e citocinas devido à intensa liberação de SEA (antígenos solúveis do ovo) gerando radicais livres que promovem dano à membrana celular de hepatócitos adjacentes. No entanto, com o tratamento com silimarina / silibina, o dano é minimizado, pois a silimarina / silibina interage com fosfolipídeos de membrana dos hepatócitos, impedindo que estes radicais livres possam promover a peroxidação lipídica da membrana e, por conta disso, o dano celular (HUBER *et al.*, 2008; TROUILLAS *et al.*, 2008). Outros autores acreditam que a silimarina / silibina também possam atuar inibindo a formação de radicais aniônicos de superóxido e de óxido nítrico; ou ainda pela diminuição da ação oxidativa através da redução da formação de malondialdeído, ou pelo decréscimo menos acentuado da superóxido dismutase, da catalase e da glutathione redutase que são fatores que promovem proteção celular (DEHMLow, ERHARD e DE GROOT, 1996; BOSISIO, BENELLI e PIROLA, 1992; FU *et al.*, 2008; TAGER *et al.*, 2001).

Durante a fase aguda, o parasito promove estímulos aos polimorfonucleares a produzirem citocinas do perfil T<sub>H</sub>1 (resposta celular, fagocítica), com o início da oviposição progressivamente há o estímulo para a produção de citocinas resposta do perfil T<sub>H</sub>2, que

auxiliam na formação de granulomas. No entanto, estes perfis coexistem, sendo de extrema importância a existência de balanço entre ambos (PEARCE e MACDONALD, 2002). A produção das citocinas nas duas linhagens de camundongos mostrou comportamento distinto, contudo em ambos os casos houve redução das citocinas dos perfis  $T_H1$  (IFN- $\gamma$ ) e  $T_H2$  (IL-4 e IL-13). Os animais da linhagem BALB/c demonstraram redução homogênea das citocinas em todos os grupos tratados. Entretanto, em camundongos C57BL/6, o tratamento apenas com silimarina em DMSO 1% não apresentou redução significativa observada nos grupos tratados com silimarina em DMSO 1% filtrada (I+Sil 1% F) e silibina em DMSO 1% (I+Silibina 1%).

Por apresentarem diferenças genéticas, as linhagens de camundongos desenvolvem diferentes respostas em relação a hepatoesplenomegalia, hipertensão portal e formação de granuloma. Entre as linhagens estudadas neste trabalho temos que a linhagem C57BL/6 que desenvolve estes sinais de forma mais amena do que os animais da linhagem BALB/c (FANNING *et al.*, 1981). Neste trabalho, é possível verificar melhores respostas aos tratamentos dos animais C57BL/6 em relação aos BALB/c nos parâmetros de fibrose e área de granuloma, 40% e 24%, respectivamente; em relação a 33% e 20% para os BALB/c, respectivamente. Pode-se verificar diferentes respostas imunológicas entre as linhagens de camundongos, em que os animais C57BL/6 tratados apresentam redução de ambos os perfis,  $T_H1$  (com redução de IFN- $\gamma$ ) e  $T_H2$  (com redução de IL-4 e IL-13); enquanto os animais BALB/c apresentam redução mais proeminente do perfil  $T_H2$ . No entanto, a redução não foi tão expressiva, possivelmente devido à fase aguda da doença, período em que ocorre a transição entre os perfis imunológicos (GRZYCH *et al.*, 1991; SHER *et al.*, 1991).

Sendo assim, pode-se deduzir que na linhagem C57BL/6 a silimarina atua de modo menos eficiente que a silimarina filtrada ou silibina quanto à imunorregulação, possivelmente por interferência de outras flavolignanas presente na silimarina. Já na linhagem BALB/c, todos os tratamentos são eficazes ao reduzirem a resposta  $T_H2$ , e em menor nível também a resposta  $T_H1$ . Desta forma, pode-se inferir que em ambas as linhagens, a resposta  $T_H2$ , de característica fibrótica, é modulada negativamente. Logo, como já discutido, a menor fibrose leva à redução da morbidade associada, e com isso há diminuição das chances de quadros clínicos mais graves e morte.

No cromatograma da silibina (figura 48), os picos com tempos de retenção de 21,16 e 22,90 correspondem à silibina A e silibina B, uma vez que de acordo com o certificado de análise do produto trata-se de substância pura (grau de pureza maior ou igual a 98%). Da mesma forma, pode-se inferir que os demais picos observados (com tempos de retenção de 2,21; 3,39; 10,93 e 25,97, que correspondem <4%) representam interferências inespecíficas

(ruídos). Pode-se deduzir que o gradiente empregado foi eficaz na separação dos isômeros silibina A e silibina B.

No cromatograma da silimarina (figura 49), por analogia com o cromatograma da silibina (figura 48), os picos com tempo de retenção de 23,23 e 24,77 possivelmente são referentes à silibina A e silibina B e ambos representam 56,21% dos componentes da amostra, sendo confirmado com o certificado de análise do fabricante que indica a proporção de silibina. Os picos iniciais de tempo de retenção de 2,24 e 3,55 parecem ser ruídos e representam pequeno percentual da amostra.

Já no cromatograma da silimarina filtrada (figura 50), pode-se verificar por analogia ao cromatograma da silimarina (figura 49), que há quase exclusivamente os picos referentes à silibina A e silibina B (os tempos de retenção relativos a estas são 22,48 e 24,08). Contudo, houve perda de cerca de 65% da concentração das mesmas com o processo de filtração. Mesmo com esta redução, os animais tratados com a silimarina filtrada apresentaram resultados biológicos semelhantes aos demais tratamentos, demonstrando assim, que as ações biológicas estão relacionadas à silibina solúvel.

Como os grupos tratados com silibina demonstraram resultados semelhantes aos tratados com silimarina e silimarina filtrada e, uma vez que a silibina é o composto majoritário da silimarina, ela possivelmente está envolvida nos efeitos encontrados neste trabalho que corroboram os demonstrados anteriormente por nosso grupo, como a redução de hepatomegalia, dos processos inflamatório e fibrótico ocasionados pela deposição de ovos no tecido hepático (MATA-SANTOS *et al.*, 2010). Vale ressaltar que apesar da redução da dose de silibina (5 mg/kg), esta foi capaz de gerar efeitos biológicos semelhantes aqueles encontrados pelo tratamento com silimarina (10 mg/kg).

Os possíveis mecanismos de ação da silibina no modelo de esquistossomíase murina podem estar relacionados à proteção da membrana celular e das suas ações antioxidantes já demonstradas. Contudo, novos ensaios são necessários para elucidar o(s) mecanismo(s) de ação da silibina na esquistossomíase. E novos estudos devem ser realizados a fim de buscar formulações farmacêuticas que tornem a silibina mais solúvel e mais biodisponível, propiciando a redução da dose para obtenção do efeito máximo. Como já demonstrado neste trabalho, a fração solúvel é a que proporciona o efeito biológico desejado. Além disso, o uso de substância pura como a silibina facilita a observação dos efeitos desejados, auxiliando no esclarecimento do mecanismo de ação associado.

Nas duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6 obteve-se resultados semelhantes. Desta forma, sugere-se que o tratamento com silimarina ou silibina pode ser

benéfico em linhagens de animais de diferentes *backgrounds* genéticos. Diante disso, pode-se afirmar que o tratamento é favorável para diferentes populações, onde temos maior heterogeneidade genética. Isso pode ter grande relevância, uma vez que o uso da silimarina / silibina em humanos deve ter ação garantida independente das diferenças individuais. Assim, uma vez que o modelo murino apresenta semelhanças ao da infecção humana (WARREN, 1966; ANDRADE e CHEEVER, 1993), sugere-se que a silimarina ou silibina possa ser empregada em humanos com sucesso.

## CONCLUSÕES

O tratamento com silimarina ou silibina em ambas as linhagens murinas (BALB/c e C57BL/6) foi capaz de promover:

- Redução da hepatoesplenomegalia;
- Redução da área do infiltrado inflamatório;
- Diminuição do conteúdo de hidroxiprolina hepática (menor fibrose hepática);
- Diminuição das transaminases hepáticas;
- Redução dos níveis da citocinas estudadas.

É possível sugerir o uso da silimarina, e em particular da silibina, como tratamento coadjuvante para minimização da patogênese e da morbidade inerente à infecção por *Schistosoma mansoni*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANARUMA FILHO, F., SANT'ANA, J.M., DOS SANTOS, R.F. e CASTAGNA, C.L. Environmental inducers of schistosomiasis mansoni in Campinas, Brazil. **Geospat Health**, v.5, n.1, p.79-91. 2010.
- ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of pipe-stem fibrosis of the liver (experimental observation on murine schistosomiasis). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.82, n.3, p.325-334. 1987.
- ANDRADE, Z.A. Extracellular matrix and schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86 Suppl 3, p.61-73. 1991.
- ANDRADE, Z.A. Patogenia do granuloma esquistossomótico. In: Lopes de Faria, J. *In: G.-K. S.A. Patologia Especial com Aplicações Clínicas*. Rio de Janeiro: 2ª ed., 1998. p.687.
- ANDRADE, Z.A. Regression of hepatic fibrosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.6, p.514-520. 2005.
- ANDRADE, Z.A. e CHEEVER, A.W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ('pipestem' fibrosis). **Int J Exp Pathol**, v.74, n.2, p.195-202. 1993.
- ANDRADE, Z.A. e WARREN, K.S. Mild Prolonged Schistosomiasis in Mice: Alterations in Host Response with Time and the Development of Portal Fibrosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.58, p.53-57. 1964.
- ATTA, A.M., MAGALHAES, L.A., DE ALCANTARA, F.G. e PAREJA, G. Schistosomiasis mansoni. I. Evolution of the pathologic picture: parasitologic, hematologic and histopathologic analyses. **Rev Saude Publica**, v.15, n.1, p.72-92. 1981.
- BAI, T.C., YAN, G.B., HU, J., ZHANG, H.L. e HUANG, C.G. Solubility of silybin in aqueous poly(ethylene glycol) solution. **Int J Pharm**, v.308, n.1-2, p.100-106. 2006.
- BARRETO, M.L. The dot map as an epidemiological tool: a case study of *Schistosoma mansoni* infection in an urban setting. **Int J Epidemiol**, v.22, n.4, p.731-741. 1993.
- BINDOLI, A., CAVALLINI, L. e SILIPRANDI, N. Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. **Biochem Pharmacol**, v.26, n.24, p.2405-2409. 1977.
- BOIGK, G., STROEDTER, L., HERBST, H., WALDSCHMIDT, J., RIECKEN, E.O. e SCHUPPAN, D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. **Hepatology**, v.26, n.3, p.643-649. 1997.
- BOSISIO, E., BENELLI, C. e PIROLA, O. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. **Pharmacol Res**, v.25, n.2, p.147-154. 1992.

BREITKOPF, K., HAAS, S., WIERCINSKA, E., SINGER, M.V. e DOOLEY, S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. **Alcohol Clin Exp Res**, v.29, n.11 Suppl, p.121S-131S. 2005.

BURT, A.D. C. L. Oakley Lecture (1993). Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J Pathol**, v.170, n.2, p.105-114. 1993.

CAPASSO. A quick reference to herbal medicine. **Springer Verlag**2003.

CARINI, R., COMOGLIO, A., ALBANO, E. e POLI, G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. **Biochem Pharmacol**, v.43, n.10, p.2111-2115. 1992.

CHEEVER, A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bull World Health Organ**, v.39, n.2, p.328-331. 1968.

CHEEVER, A.W., DUVALL, R.H. e HALLACK, T.A., JR. Hepatic fibrosis in *Schistosoma haematobium*-infected mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.77, n.5, p.673-679. 1983.

CHEEVER, A.W., LENZI, J.A., LENZI, H.L. e ANDRADE, Z.A. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.917-940. 2002.

CHITSULO, L., LOVERDE, P. e ENGELS, D. Schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol**, v.2, n.1, p.12-13. 2004.

CHITTEZHATH, M., DEEP, G., SINGH, R.P., AGARWAL, C. e AGARWAL, R. Silibinin inhibits cytokine-induced signaling cascades and down-regulates inducible nitric oxide synthase in human lung carcinoma A549 cells. **Mol Cancer Ther**, v.7, n.7, p.1817-1826. 2008.

COMOGLIO, A., LEONARDUZZI, G., CARINI, R., BUSOLIN, D., BASAGA, H., ALBANO, E., TOMASI, A., POLI, G., MORAZZONI, P. e MAGISTRETTI, M.J. Studies on the antioxidant and free radical scavenging properties of IdB 1016 a new flavanolignan complex. **Free Radic Res Commun**, v.11, n.1-3, p.109-115. 1990.

CROCENZI, F.A. e ROMA, 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.

DE GROOT, H. e RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam Clin Pharmacol**, v.12, n.3, p.249-255. 1998.

DE JESUS, A.R., SILVA, A., SANTANA, L.B., MAGALHAES, A., DE JESUS, A.A., DE ALMEIDA, R.P., REGO, M.A., BURATTINI, M.N., PEARCE, E.J. e CARVALHO, E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis**, v.185, n.1, p.98-105. 2002.

DEEP, G., OBERLIES, N.H., KROLL, D.J. e AGARWAL, R. Identifying the differential effects of silymarin constituents on cell growth and cell cycle regulatory molecules in human prostate cancer cells. **Int J Cancer**, v.123, n.1, p.41-50. 2008.

- DEHMLOW, C., ERHARD, J. e DE GROOT, H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. **Hepatology**, v.23, n.4, p.749-754. 1996.
- DESPLACES, A., CHOPPIN, J., VOGEL, G. e TROST, W. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. **Arzneimittelforschung**, v.25, n.1, p.89-96. 1975.
- DI SARIO, A., BENDIA, E., TAFFETANI, S., OMENETTI, A., CANDELARESI, C., MARZIONI, M., DE MINICIS, S. e BENEDETTI, A. Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine-Vitamin E complex in rats. **Dig Liver Dis**, v.37, n.11, p.869-876. 2005.
- DOENHOFF, M.J., CIOLI, D. e UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Infect Dis**, v.21, n.6, p.659-667. 2008.
- DOENHOFF, M.J. e PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.4, n.2, p.199-210. 2006.
- DORAI, T. e AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Lett**, v.215, n.2, p.129-140. 2004.
- DRUMMOND, S.C., PEREIRA, S.R., SILVA, L.C., ANTUNES, C.M. e LAMBERTUCCI, J.R. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p.519-523. 2010.
- DUNN, M.A., KAMEL, R., KAMEL, I.A., BIEMPICA, L., KHOLY, A.E., HAIT, P.K., ROJKIND, M., WARREN, K.S. e MAHMOUD, A.A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. **Gastroenterology**, v.76, n.5 Pt 1, p.978-982. 1979.
- DUNNE, D.W. e PEARCE, E.J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes Infect**, v.1, n.7, p.553-560. 1999.
- EL-LAKKANY, N., HAMAM, O., EL-MADAWY, W., BADAWY, A., AIN-SHOKA, A. e EBEID, F. Anti-inflammatory/anti-fibrotic effects of the hepatoprotective silymarin and the schistosomicide praziquantel against *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p.9. 2012.
- ENGELS, D., CHITSULO, L., MONTRESOR, A. e SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop**, v.82, n.2, p.139-146. 2002.
- ENK, M.J., AMARAL, G.L., COSTA E SILVA, M.F., SILVEIRA-LEMOS, D., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZINNELLI, G., COELHO, P.M. e MASSARA, C.L. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p.537-540. 2010.
- FANNING, M.M., PETERS, P.A., DAVIS, R.S., KAZURA, J.W. e MAHMOUD, A.A. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic

background to hepatosplenic disease and modulation. **J Infect Dis**, v.144, n.2, p.148-153. 1981.

FENWICK, A., SAVIOLI, L., ENGELS, D., ROBERT BERGQUIST, N. e TODD, M.H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol**, v.19, n.11, p.509-515. 2003.

FLORA, K., HAHN, M., ROSEN, H. e BENNER, K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **Am J Gastroenterol**, v.93, n.2, p.139-143. 1998.

FU, H., KATSUMURA, Y., LIN, M., HATA, K., MUROYA, Y. e HATANO, Y. Fast repair activities towards dGMP hydroxyl radical adducts by silybin and its analogues. **J Radiat Res**, v.49, n.6, p.609-614. 2008.

GAZAK, R., WALTEROVA, D. e KREN, V. Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. **Curr Med Chem**, v.14, n.3, p.315-338. 2007.

GEBHARDT, R. Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. **Planta Med**, v.68, n.4, p.289-296. 2002.

GHARAGOZLOO, M., VELARDI, E., BRUSCOLI, S., AGOSTINI, M., DI SANTE, M., DONATO, V., AMIRGHOFAN, Z. e RICCARDI, C. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: effects on NF-kappaB activity and IL-2 production. **Pharmacol Res**, v.61, n.5, p.405-409. 2010.

GRZYCH, J.M., PEARCE, E., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S., LEWIS, F. e SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v.146, n.4, p.1322-1327. 1991.

HAHN, G., LEHMANN, H.D., KURTEN, M., UEBEL, H. e VOGEL, G. On the pharmacology and toxicology of silymarin, an antihepatotoxic active principle from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. **Arzneimittelforschung**, v.18, n.6, p.698-704. 1968.

HESSE, M., MODOLELL, M., LA FLAMME, A.C., SCHITO, M., FUENTES, J.M., CHEEVER, A.W., PEARCE, E.J. e WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol**, v.167, n.11, p.6533-6544. 2001.

HUBER, A., THONGPHASUK, P., ERBEN, G., LEHMANN, W.D., TUMA, S., STREMMEL, W. e CHAMULITRAT, W. Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. **Biochim Biophys Acta**, v.1780, n.5, p.837-847. 2008.

INVERNIZZI, R., BERNUZZI, S., CIANI, D. e ASCARI, E. Silymarin during maintenance therapy of acute promyelocytic leukemia. **Haematologica**, v.78, n.5, p.340-341. 1993.

IREDALE, J.P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. **Semin Liver Dis**, v.21, n.3, p.427-436. 2001.

JIA, J.D., BAUER, M., CHO, J.J., RUEHL, M., MILANI, S., BOIGK, G., RIECKEN, E.O. e SCHUPPAN, D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated

by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. **J Hepatol**, v.35, n.3, p.392-398. 2001.

JOHNSON, V.J., OSUCHOWSKI, M.F., HE, Q. e SHARMA, R.P. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. alterations in thymic differentiation correlate with changes in c-myc gene expression. **Planta Med**, v.68, n.11, p.961-965. 2002.

KANG, S.N., LEE, M.H., KIM, K.M., CHO, D. e KIM, T.S. Induction of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation into monocytes by silibinin: involvement of protein kinase C. **Biochem Pharmacol**, v.61, n.12, p.1487-1495. 2001.

KIDD, P.M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. **Altern Med Rev**, v.14, n.3, p.226-246. 2009.

KING, C.H. Toward the elimination of schistosomiasis. **N Engl J Med**, v.360, n.2, p.106-109. 2009.

KOLACZINSKI, J.H., KABATEREINE, N.B., ONAPA, A.W., NDYOMUGYENYI, R., KAKEMBO, A.S. e BROOKER, S. Neglected tropical diseases in Uganda: the prospect and challenge of integrated control. **Trends Parasitol**, v.23, n.10, p.485-493. 2007.

LAMMIE, P.J., FENWICK, A. e UTZINGER, J. A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. **Trends Parasitol**, v.22, n.7, p.313-321. 2006.

LIN, Y.L., HSU, Y.C., CHIU, Y.T. e HUANG, Y.T. Antifibrotic effects of a herbal combination regimen on hepatic fibrotic rats. **Phytother Res**, v.22, n.1, p.69-76. 2008.

LU, P., MAMIYA, T., LU, L.L., MOURI, A., NIWA, M., HIRAMATSU, M., ZOU, L.B., NAGAI, T., IKEJIMA, T. e NABESHIMA, T. Silibinin attenuates amyloid beta(25-35) peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.331, n.1, p.319-326. 2009.

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.

MACHICAO, F. e SONNENBICHLER, J. Mechanism of the stimulation of RNA synthesis in rat liver nuclei by silybin. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v.358, n.2, p.141-147. 1977.

MATA-SANTOS, H.A., LINO, F.G., ROCHA, C.C., PAIVA, C.N., CASTELO BRANCO, M.T. e PYRRHO ADOS, S. Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. **Parasitol Res**, v.107, n.6, p.1429-1434. 2010.

MIDDLETON, E., JR., KANDASWAMI, C. e THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v.52, n.4, p.673-751. 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF: 7ª ed., 2009. p.19- 29.

- MOMENY, M., KHORRAMIZADEH, M.R., GHAFFARI, S.H., YOUSEFI, M., YEKANINEJAD, M.S., ESMAEILI, R., JAHANSHIRI, Z. e NOORIDALOOI, M.R. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. **Eur J Pharmacol**, v.591, n.1-3, p.13-20. 2008.
- MONE, H. e BOISSIER, J. Sexual biology of schistosomes. **Adv Parasitol**, v.57, p.89-189. 2004.
- MORAZZONI, B. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). **Fitoterapia**, v.66, p.3-42. 1995.
- MURIEL, P., GARCIAPINA, T., PEREZ-ALVAREZ, V. e MOURELLE, M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. **J Appl Toxicol**, v.12, n.6, p.439-442. 1992.
- MURIEL, P.E.M., M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl<sub>4</sub> liver damage. **J Appl Toxicol**, v.10, n.4, p.275-279. 1990.
- O.M.S. Inter- country meeting on strategy to eliminate schistosomiasis from the Eastern Mediterranean Region. **Muscat, Oman**, v.6-8 November 2007.
- O.M.S. Schistosomiasis Number of people treated, 2009. **Weekly epidemiological record**, v.86, n.9, p.73 - 80. 2011.
- OLSEN, A. Efficacy and safety of drug combinations in the treatment of schistosomiasis, soil-transmitted helminthiasis, lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.8, p.747-758. 2007.
- OTHMAN, A.A., SHOHEIB, Z.S., SAIED, E.M. e SOLIMAN, R.H. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiology**, v.215, n.2, p.101-112. 2010.
- PEARCE, E.J. e MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.7, p.499-511. 2002.
- PEREIRA, A.P., FAVRE, T.C., GALVAO, A.F., BECK, L., BARBOSA, C.S. e PIERI, O.S. The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p.563-569. 2010.
- PRADHAN, S.C. e GIRISH, C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. **Indian J Med Res**, v.124, n.5, p.491-504. 2006.
- PYRRHO, A.S., LENZI, H.L., RAMOS, J.A., MOURA-NETO, R., CACHEM, F.C., SANTOS DA SILVA, C., TAKIYA, C.M. e GATTASS, C.R. Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. **Parasitology research**, v.92, n.6, p.478-483. 2004.
- RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.90, n.2, p.277-280. 1995.

- RAMELLINI, G. e MELDOLESI, J. Liver protection by silymarin: in vitro effect on dissociated rat hepatocytes. **Arzneimittelforschung**, v.26, n.1, p.69-73. 1976.
- RASO, P., DE MELLO, R.T., BRASILEIRO FILHO, G., ROCHA, M.O. e COELHO, P.M. Hepatic lesions caused by injection of *Schistosoma mansoni* eggs into the portal vein of sensitized and unsensitized mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.25, n.5, p.236-245. 1983.
- REIS, D.C., KLOOS, H., KING, C., QUITES, H.F., MATOSO, L.F., COELHO, K.R. e GAZZINELLI, A. Accessibility to and utilisation of schistosomiasis-related health services in a rural area of state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p.587-597. 2010.
- REIS, L.F., VENTURA, T.G., SOUZA, S.O., ARANA-PINO, A., PELAJO-MACHADO, M., PEREIRA, M.J., LENZI, H.L., CONCEICAO, M.J. e TAKIYA, C.M. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifylline on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96 Suppl, p.107-112. 2001.
- REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan, 4a ed., 2008. 856 p.
- RICHARDS, F.O., JR., EIGEGER, A., MIRI, E.S., JINADU, M.Y. e HOPKINS, D.R. Integration of mass drug administration programmes in Nigeria: The challenge of schistosomiasis. **Bull World Health Organ**, v.84, n.8, p.673-676. 2006.
- ROCKEY, D.C. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. **Clin Liver Dis**, v.10, n.3, p.459-479, vii-viii. 2006.
- ROSS, S.M. Milk thistle (*Silybum marianum*): an ancient botanical medicine for modern times. **Holist Nurs Pract**, v.22, n.5, p.299-300. 2008.
- SADEK, M.G., BORGES, D.R. e MISZPUTEN, S.J. Intestinal activity of disaccharidases in schistosomiasis mansoni. Study of the course in mice with various degrees of infestation. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.28, n.2, p.67-73. 1986.
- SALLER, R., MEIER, R. e BRIGNOLI, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. **Drugs**, v.61, n.14, p.2035-2063. 2001.
- SANGEETHA, N., ARANGANATHAN, S. e NALINI, N. Silibinin ameliorates oxidative stress induced aberrant crypt foci and lipid peroxidation in 1, 2 dimethylhydrazine induced rat colon cancer. **Invest New Drugs**, v.28, n.3, p.225-233. 2010.
- SCAMBIA, G., DE VINCENZO, R., RANELLETTI, F.O., PANICI, P.B., FERRANDINA, G., D'AGOSTINO, G., FATTOROSSO, A., BOMBARDELLI, E. e MANCUSO, S. Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. **Eur J Cancer**, v.32A, n.5, p.877-882. 1996.
- SCHUMANN, J., PROCKL, J., KIEMER, A.K., VOLLMAR, A.M., BANG, R. e TIEGS, G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. **J Hepatol**, v.39, n.3, p.333-340. 2003.

SCHUPPAN, D., JIA, J.D., BRINKHAUS, B. e HAHN, E.G. Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium. **Hepatology**, v.30, n.4, p.1099-1104. 1999.

SHANMUGAM, K., HOLMQUIST, L., STEELE, M., STUCHBURY, G., BERBAUM, K., SCHULZ, O., BENAVENTE GARCIA, O., CASTILLO, J., BURNELL, J., GARCIA RIVAS, V., DOBSON, G. e MUNCH, G. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. **Mol Nutr Food Res**, v.52, n.4, p.427-438. 2008.

SHER, A., FIORENTINO, D., CASPAR, P., PEARCE, E. e MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J Immunol**, v.147, n.8, p.2713-2716. 1991.

SHIBANO, M., LIN, A.S., ITOKAWA, H. e LEE, K.H. Separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by liquid chromatography connected with hybrid ion-trap and time-of-flight mass spectrometry (LC-MS/IT-TOF). **Journal of natural products**, v.70, n.9, p.1424-1428. 2007.

SIMANEK, V., KREN, V., ULRICHOVA, J., VICAR, J. e CVAK, L. Silymarin: What is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. **Hepatology**, v.32, n.2, p.442-444. 2000.

SINGH, R.P. e AGARWAL, R. Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer. **Antioxid Redox Signal**, v.4, n.4, p.655-663. 2002.

SINGH, R.P., GU, M. e AGARWAL, R. Silibinin inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and angiogenesis. **Cancer Res**, v.68, n.6, p.2043-2050. 2008.

SONG, Y., ZHUANG, J., GUO, J., XIAO, Y. e PING, Q. Preparation and properties of a silybin-phospholipid complex. **Pharmazie**, v.63, n.1, p.35-42. 2008.

SONNENBICHLER, J. e ZETL, I. Mechanism of action of silibinin. V. Effect of silibinin on the synthesis of ribosomal RNA, mRNA and tRNA in rat liver in vivo. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v.365, n.5, p.555-566. 1984.

SONNENBICHLER, J. e ZETL, I. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. **Prog Clin Biol Res**, v.213, p.319-331. 1986.

SOTO, C., MENA, R., LUNA, J., CERBON, M., LARRIETA, E., VITAL, P., URIA, E., SANCHEZ, M., RECOBA, R., BARRON, H., FAVARI, L. e LARA, A. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. **Life Sci**, v.75, n.18, p.2167-2180. 2004.

SOTO, C., RECOBA, R., BARRON, H., ALVAREZ, C. e FAVARI, L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.136, n.3, p.205-212. 2003.

SOTO, C.P., PEREZ, B.L., FAVARI, L.P. e REYES, J.L. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v.119, n.2, p.125-129. 1998.

SOUZA, D.D., FALCÃO, A.C.M.G., GARGIONI, C., KANAMURA, H.Y., CIARAVOLO, R.M.D.C. e EDUARDO, M.B.P. Vigilância Epidemiológica e controle da Esquistossomose. *In: C.D.V.E.P.A. VRANJAC. São Paulo, 2007. p.455-479.*

STEGEMANN, H. e STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta**, v.18, n.2, p.267-273. 1967.

STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M. e UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v.6, n.7, p.411-425. 2006.

TAGER, M., DIETZMANN, J., THIEL, U., HINRICH NEUMANN, K. e ANSORGE, S. Restoration of the cellular thiol status of peritoneal macrophages from CAPD patients by the flavonoids silibinin and silymarin. **Free Radic Res**, v.34, n.2, p.137-151. 2001.

TRAPPOLIERE, M., CALIGIURI, A., SCHMID, M., BERTOLANI, C., FAILLI, P., VIZZUTTI, F., NOVO, E., DI MANZANO, C., MARRA, F., LOGUERCIO, C. e PINZANI, M. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. **J Hepatol**, v.50, n.6, p.1102-1111. 2009.

TROUILLAS, P., MARSAL, P., SVOBODOVA, A., VOSTALOVA, J., GAZAK, R., HRBAC, J., SEDMERA, P., KREN, V., LAZZARONI, R., DUROUX, J.L. e WALTEROVA, D. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. **J Phys Chem A**, v.112, n.5, p.1054-1063. 2008.

TYAGI, A., AGARWAL, C., HARRISON, G., GLODE, L.M. e AGARWAL, R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. **Carcinogenesis**, v.25, n.9, p.1711-1720. 2004.

UEBERHAM, E., LOW, R., UEBERHAM, U., SCHONIG, K., BUJARD, H. e GEBHARDT, R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. **Hepatology**, v.37, n.5, p.1067-1078. 2003.

VAN PELT, J.F., VERSLYPE, C., CRABBE, T., ZAMAN, Z. e FEVERY, J. Primary human hepatocytes are protected against prolonged and repeated exposure to ethanol by silibinin-dihemisuccinate. **Alcohol Alcohol**, v.38, n.5, p.411-414. 2003.

VERSCOYLE, R.D., GREAVES, P., PATEL, K., MARSDEN, D.A., BROWN, K., STEWARD, W.P. e GESCHER, A.J. Evaluation of the cancer chemopreventive efficacy of silibinin in genetic mouse models of prostate and intestinal carcinogenesis: relationship with silibinin levels. **Eur J Cancer**, v.44, n.6, p.898-906. 2008.

VOINOVICH, D., PERISSUTTI, B., MAGAROTTO, L., CESCHIA, D., GUIOTTO, P. e BILIA, A.R. Solid state mechanochemical simultaneous activation of the constituents of the

*Silybum marianum* phytocomplex with crosslinked polymers. **J Pharm Sci**, v.98, n.1, p.215-228. 2009.

WAGNER, H., DIESEL, P. e SEITZ, M. [The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn]. **Arzneimittelforschung**, v.24, n.4, p.466-471. 1974.

WANG, H.J., TASHIRO, S., ONODERA, S. e IKEJIMA, T. Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor signaling enhanced silibinin-induced activation of death receptor and mitochondrial apoptotic pathways in human breast cancer MCF-7 cells. **J Pharmacol Sci**, v.107, n.3, p.260-269. 2008.

WARREN, K.S. The pathogenesis of "clay-pipe stem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. **Am J Pathol**, v.49, n.3, p.477-489. 1966.

WELLINGTON, K. e JARVIS, B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. **BioDrugs**, v.15, n.7, p.465-489. 2001.

WEN, Z., DUMAS, T.E., SCHRIEBER, S.J., HAWKE, R.L., FRIED, M.W. e SMITH, P.C. Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v.36, n.1, p.65-72. 2008.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. **J Nutr Biochem**, v.7, p.2-5. 1996.

YANYU, X., YUNMEI, S., ZHIPENG, C. e QINENG, P. The preparation of silybin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats. **Int J Pharm**, v.307, n.1, p.77-82. 2006.

YOO, H.G., JUNG, S.N., HWANG, Y.S., PARK, J.S., KIM, M.H., JEONG, M., AHN, S.J., AHN, B.W., SHIN, B.A., PARK, R.K. e JUNG, Y.D. Involvement of NF-kappaB and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells. **Int J Mol Med**, v.13, n.1, p.81-86. 2004.

ZI, X. e AGARWAL, R. Modulation of mitogen-activated protein kinase activation and cell cycle regulators by the potent skin cancer preventive agent silymarin. **Biochem Biophys Res Commun**, v.263, n.2, p.528-536. 1999.

ZI, X., FEYES, D.K. e AGARWAL, R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. **Clin Cancer Res**, v.4, n.4, p.1055-1064. 1998.