



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**



AMANDA SCOFIELD DE AZEVEDO

TESTES *IN VITRO* ANTI-*Trypanosoma cruzi*: UMA REVISÃO NARRATIVA

Ouro Preto - MG

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**



AMANDA SCOFIELD DE AZEVEDO

TESTES *IN VITRO* ANTI-*Trypanosoma cruzi*: UMA REVISÃO NARRATIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Prof^a Dra Paula Melo de Abreu Vieira

Co-orientadora: Ms. Viviane Flores Xavier

Ouro Preto - MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A994t Azevedo, Amanda Scofield de.
Testes in vitro anti-Trypanosoma cruzi [manuscrito]: uma revisão
narrativa. / Amanda Scofield de Azevedo. - 2022.
56 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Vieira.
Coorientadora: Ma. Viviane Xavier.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Trypanosoma cruzi. 2. Chagas, Doença de. 3. Agentes
antineoplásicos. I. Vieira, Paula. II. Xavier, Viviane. III. Universidade
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda Scofield de Azevedo

“Testes in vitro anti-*Trypanosoma cruzi*: uma revisão narrativa”.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Aprovada em 03 de novembro de 2022

Membros da banca

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira - Orientador(a) - DECBI-Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Viviane Flores Xavier - Co-orientadora- Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Flávia de Souza Marques - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Thays Helena Chaves Duarte - Universidade Federal de Ouro Preto

Paula Melo de Abreu Vieira, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/11/2022



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/11/2022, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0427913** e o código CRC **40E9E61F**.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, pelo suporte, amor e incentivo ao longo da minha graduação, trajetória repleta de superações.

Ao Marcinho, por acreditar em mim desde o princípio.

Às minhas irmãs, pelos conselhos, amor, apoio e amizade de sempre.

À Sabrina, por me ajudar a encontrar forças nesta reta final, você me trouxe leveza e alegria nos momentos difíceis.

À Prof^a Dra Paula Melo de Abreu Vieira, por aceitar me orientar neste trabalho e fazê-lo com muita sabedoria, atenção, compreensão e paciência.

À Ms. Viviane Flores Xavier, minha imensa gratidão por todo o suporte de prontidão e atenção ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e acolhimento nos dias difíceis, por tantos ensinamentos e por me ajudar a finalizar esse ciclo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e disporem de seu tempo e conhecimento para a análise deste trabalho.

A todos do Laboratório de Morfopatologia, pelos dias e aprendizados compartilhados ao longo dos anos de iniciação científica.

Às amigas construídas em Ouro Preto, obrigada por partilharem comigo essa trajetória incrível e tornarem-na repleta de amor e bons momentos.

Aos amigos do curso de farmácia, por todos os dias compartilhados repletos de apoio, parceria e empatia.

À Escola de Farmácia (EFAR) e à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pela formação profissional e pessoal que me possibilitaram chegar até onde cheguei.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

RESUMO

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida à humanos e à animais por meio do hospedeiro invertebrado triatomíneo, também conhecido popularmente como barbeiro, podendo também ser transmitida por meio da ingestão de alimentos contaminados com o protozoário, dentre outras formas. A doença é considerada um problema de saúde pública, pois afeta aproximadamente seis milhões de pessoas em todo o mundo. A quimioterapia específica da doença de Chagas está limitada aos fármacos Benznidazol e Nifurtimox, medicamentos associados a diversos efeitos colaterais tóxicos, à baixa eficácia no tratamento de pacientes na fase crônica da doença, dentre outras limitações que tornam estes fármacos não ideais para o tratamento da doença de Chagas. O desenvolvimento de drogas mais efetivas e menos tóxicas se faz necessário, visando à melhoria da qualidade de vida de milhões de pessoas acometidas por esta doença, porém, os resultados não se fazem promissores. Nesse contexto, a triagem *in vitro* tornou-se a principal estratégia na descoberta de fármacos para a doença de Chagas, porém, não há um consenso de protocolo a ser adotado durante as pesquisas, o que ocasiona um grande desafio ao se tentar comparar diferentes estudos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros utilizados nas pesquisas *in vitro* realizadas na busca por novos fármacos e evidenciar a divergência de variáveis empregadas. Uma revisão bibliográfica de caráter narrativo foi realizada considerando-se artigos publicados entre 2017 e 2022, e os seguintes parâmetros foram selecionados para análise: linhagem celular utilizada, cepa e DTU utilizados, tempo de incubação com o medicamento Benznidazol, valor de CI_{50} com o Benznidazol e índice de seletividade. Os dados obtidos demonstraram que há uma heterogeneidade de protocolos relacionados à quimioterapia experimental *in vitro* para doença de Chagas na literatura. Nesse sentido, a harmonização das estratégias experimentais *in vitro* é essencial para definir protocolos de *screening* seguros e confiáveis, reduzindo assim os fatores que possam interferir na seleção de candidatos a fármacos no âmbito dos ensaios pré-clínicos e, conseqüentemente, aumentar o número de compostos a serem testados em fase clínica.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; *In vitro*; Protocolo de triagem, Benznidazol.

ABSTRACT

Chagas disease, or American Trypanosomiasis, is an infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and transmitted to humans and animals through the triatomine invertebrate host, also popularly known as barbeiro, and can also be transmitted through the ingestion of food contaminated with the protozoan, among other ways. The disease is considered a public health problem, as it affects approximately six to eight million people worldwide. Specific chemotherapy for Chagas disease is limited to the drugs Benznidazole and Nifurtimox, drugs associated with several toxic side effects, low efficacy in the treatment of patients in the chronic phase of the disease, among other limitations that make these drugs not ideal for the treatment of the disease. The development of more effective and less toxic drugs is necessary, aiming to improve the quality of life of millions of people affected by this disease, however, the results are not promising. In this context, in vitro screening has become the main strategy in the discovery of drugs for Chagas disease, however, there is no protocol consensus to be adopted during research, which causes a challenge to compare different studies. In this sense, the present study aimed to evaluate the parameters used in vitro research carried out in the search for new drugs and to highlight the divergence of variables used. A narrative literature review was carried out considering articles published between 2017 and 2022, and the following parameters were selected for analysis: cell line used, strain and DTU used, time of incubation with the drug Benznidazole, IC₅₀ value with the Benznidazole and selectivity index. The data obtained showed that there is a heterogeneity of protocols related to experimental in vitro chemotherapy for Chagas disease in the literature. In this sense, the harmonization of in vitro experimental strategies is essential to define safe and reliable screening protocols, thus reducing the factors that may interfere in the selection of drug candidates within the scope of pre-clinical trials and, consequently, increase the number of compounds to be tested in the clinical phase.

KEYWORDS: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; In vitro; Screening Protocols; Benznidazole.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BNZ	Benznidazol
CI ₅₀	Concentração inibitória
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DTU	<i>Discrete typing units</i>
ECG	Eletrocardiograma
IFN- γ	Interferon-gama
IS	Índice de seletividade
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LAFEPE	Laboratório farmacêutico do estado de Pernambuco
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NFX	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
POS	Posaconazol
PUBMED	Publisher Medline
RAV	Ravuconazol
TGI	Trato gastrointestinal
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carlos Chagas em seu laboratório no Instituto Federal de Soroterapia em Manguinhos, Rio de Janeiro.....	9
Figura 2: (A) Berenice: primeira paciente diagnosticada com doença de Chagas (B) Jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e de Berenice.	10
Figura 3: Transmissão da doença de Chagas pelo vetor triatomíneo	13
Figura 4: : Dados de mapeamento mostrando mudanças epidemiológicas relativas à doença de Chagas entre 2002 e 2011	14
Figura 5: Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	15
Figura 6: A) Formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i> ; B) Músculo cardíaco de camundongo infectado com formas amastigotas do protozoário; C) Formas epimastigota; D) Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i>	16
Figura 7: Características das principais linhagens genéticas do <i>T. cruzi</i>	17
Figura 8: Distribuição geográfica aproximada dos DTUs do <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre.....	18
Figura 9: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> em triatomíneos e humanos.....	20
Figura 10: Manifestações clínicas da fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i>	23
Figura 11: Corte sagital de coração chagásico com insuficiência cardíaca	24
Figura 12: Estrutura química do Benznidazol e Nifurtimox.....	25
Figura 13: Estrutura química do Posaconazol e do Ravuconazol	28
Figura 14: Estratégia de busca.....	30
Figura 15: Critérios de seleção.....	31

LISTA DE TABELA E GRÁFICO

Tabela 1: Dados extraídos dos artigos que atenderam aos critérios de seleção.....	33
Gráfico 1: Linhagens celulares.....	41
Gráfico 2: Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	2.1 A descoberta do <i>Trypanosoma cruzi</i> e da doença de Chagas	15
	2.2 Epidemiologia	18
	2.3 Agente etiológico	21
	2.4 Vias de transmissão	25
	2.5 Manifestações clínicas.....	29
	2.6 Tratamento	32
3.	OBJETIVOS	36
	3.1 Objetivo geral.....	36
	3.2 Objetivos específicos.....	36
4.	METODOLOGIA.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÃO	53
7.	REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma antroponose originária do continente americano e foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Estima-se que, atualmente em todo o globo, aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário causador da doença, e 65 milhões de pessoas se encontrem em áreas de exposição e corram o risco de serem infectadas (OPAS, 2022). Após mais de um século desde a descoberta do *T. cruzi*, a DC ainda representa uma ameaça considerável à saúde pública, tendo em vista as dificuldades em obter-se um diagnóstico coerente, bem como um tratamento adequado (DEL-REI et al., 2019).

Nifurtimox (NFX) e Benznidazol (BNZ), desenvolvidos na década de 1970, ainda são as únicas opções disponíveis para o tratamento da DC, sendo apenas o Benznidazol disponível no mercado brasileiro (COURA; DE CASTRO, 2002). Ambos se apresentam eficazes nos estágios iniciais da infecção, porém, para o tratamento de pacientes crônicos, esses medicamentos possuem eficácia reduzida (COURA, 2009). Outro ponto crítico a ser considerado é a alta incidência de efeitos adversos ocasionados pelo uso desses medicamentos, que comprometem a continuidade do tratamento, levando cerca de 20 a 30% de abandono terapêutico (PERES et al., 2021). Desta forma, atuais pesquisadores investem em pesquisas *in vitro* e *in vivo* em busca de novas alternativas farmacológicas, seja pela otimização de medicamentos existentes ou pela formulação de novos compostos, a fim de se obter um tratamento com menores efeitos adversos e maior eficácia na fase crônica da doença.

Nos últimos anos, embora avanços tenham sido alcançados em testes pré-clínicos, poucos compostos foram testados em fase clínica, e, até o momento, o mercado não apresenta inovação no que tange a medicamentos desenvolvidos para o tratamento da DC (PERES et al., 2021). A dificuldade em elucidar novas moléculas para avanço em testes clínicos pode estar relacionada à falta de procedimentos e protocolos de triagens bem estabelecidos durante a avaliação *in vitro* da atividade tripanocida de um

determinado composto. Existem poucos dados disponíveis na literatura a respeito de qual modelo experimental *in vitro* apresenta maior valor preditivo nas avaliações de novas moléculas no âmbito da quimioterapia da DC. Ainda não há metodologia padronizada *in vitro* e *in vivo*, assim como protocolos de avaliação a fim de diminuir a variabilidade e melhorar a previsibilidade de fármacos candidatos (CHATELAIN, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho visa à revisão da literatura sobre estudos *in vitro* em busca de novos compostos promissores para o tratamento da DC, bem como à evidência de que os ensaios empregados nesses estudos não apresentam parâmetros padronizados. Essa ausência de padronização pode estar relacionada à atual dificuldade em obter resultados seguros e satisfatórios durante os testes *in vitro* e, conseqüentemente, à escassez de compostos que progrediram para os ensaios pré-clínicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A descoberta do *Trypanosoma cruzi* e da doença de Chagas

As linhagens ancestrais do protozoário *T. cruzi* foram provavelmente introduzidas na América do Sul por meio de morcegos há aproximadamente 7 a 10 milhões de anos (HAMILTON et al., 2012). A evidência mais antiga da infecção por *T. cruzi* foi detectada a partir do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito presente em uma múmia de 9.000 anos de idade na zona costeira do Deserto do Atacama (AUFDERHEIDE et al., 2004). A partir disso, considera-se a hipótese de que as pessoas as quais costumavam ter um estilo de vida nômade e participavam do ciclo silvestre do *T. cruzi*, passaram a formar povoados e, gradualmente, o parasito iniciou seu ciclo doméstico (AUFDERHEIDE et al., 2004), o qual foi facilitado pela capacidade dos vetores de se adaptarem facilmente à vegetação mais aberta (WALSH et al., 1993). Além disso, descobertas históricas sugerem que muitos pré-hispânicos possuíam contato com vetores de insetos triatomíneos em suas habitações antes da chegada dos europeus na América do Sul, América Central e México (AUFDERHEIDE et al., 2004). Há evidências de que no início do século XVI a doença já afetava os povos indígenas, bem como os viajantes europeus na América Latina (MILES, 2004).

Alguns séculos depois, em 1908, durante uma campanha anti-malária nos serviços de construção de uma ferrovia na cidade de Lassance, Minas Gerais, o médico sanitarista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas foi informado sobre a existência de um inseto hematófago, popularmente denominado barbeiro, que habitava os domicílios da população local e atacava as pessoas a noite. A partir disso, os hematófagos foram enviados para o Instituto de Manguinhos, Rio de Janeiro, e juntamente com o Dr. Oswaldo Cruz deu-se início a diversos estudos sobre o novo protozoário flagelado encontrado no intestino do inseto em questão (CHAGAS, 1909). A princípio foi utilizado como cobaia um macaco da espécie *Callithrix penicillata*, que após 20 dias de estudo, apresentou em seu sangue periférico tripanosomas de morfologia distinta das outras espécies conhecidas do gênero *Trypanosoma* (CHAGAS, 1909). Em continuidade aos estudos, diversos animais foram infectados com o protozoário recém-descoberto e depois de verificada a verdadeira natureza

taxonômica do tripanossomídeo descoberto, esse passou a ser denominado *Trypanosoma cruzi*. A partir disso, os conhecimentos sobre o parasito, bem como sobre sua biologia nos hospedeiros vertebrado e invertebrado e seus reservatórios foram se consolidando.

Figura 1: Carlos Chagas em seu laboratório no Instituto Federal de Soroterapia em Manguinhos, Rio de Janeiro.



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Carlos_chagas_2.jpg.

Acesso em: 16 de abril. 2022.

Em 1909, Chagas foi convidado a examinar uma menina de dois anos, Berenice, que se encontrava febril, com o baço e o fígado aumentados e linfonodos inchados (CHAGAS, 1909). A partir disso, as manifestações clínicas ocasionadas a partir da infecção pelo *T. cruzi* foram descritas por Chagas e foi tornada pública a descoberta da doença infecciosa humana denominada Tripanossomíase Americana ou DC (CHAGAS, 1909). Ainda em 1909, Chagas publicou um artigo no primeiro volume da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz relatando a morfologia e o ciclo de vida da espécie do tripanosoma recém-descoberta. Após este fato, a descoberta da doença foi descrita e revisada em diversas publicações por vários autores (MOREL, 1999).

Figura 2: (A) Berenice: primeira paciente diagnosticada com doença de Chagas. **(B)** Jornal brasileiro relatando a história da doença de Chagas e de Berenice.



Fonte: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00166/full>. Acesso em: 30 de abril. 2022.

A notícia da descoberta atingiu rapidamente a América Latina e gerou grande repercussão entre os pesquisadores, dentre os quais cita-se o microbiologista alemão Rudolf Kraus, que, durante um congresso Pan-Americano em Buenos Aires, declarou sua negação às descobertas de Carlos Chagas com base no argumento de que não havia identificado casos da doença na Argentina (KRAUS; ROSENBUSCH, 1919). Além de Kraus, Chagas também sofreu forte oposição da Academia Nacional de Medicina do Brasil, fato que ocasionou um efeito devastador sobre a descoberta e essa foi esquecida por quase 20 anos (WENDEL et al., 1992). Após a realização do trabalho de Salvador Mazza na Argentina, o qual descrevia mais de mil casos de pacientes com a Tripanossomíase Americana em regiões que Kraus havia estudado 20 anos antes, e com a colaboração de vários outros pesquisadores, a DC se tornou alvo de muitos estudos (KROPF et al., 2009). Esses visavam elucidar as características biológicas do vetor, do parasito e de seus portadores; o quadro clínico e patogênese da infecção; as características epidemiológicas; e os mecanismos de transmissão e técnicas de diagnóstico (KROPF et al., 2009).

Segundo Lannes-Vieira et al., a história da DC pode ser dividida em três fases importantes. A primeira, de 1909 a 1934, a qual se inicia com o brilhante trabalho de Carlos Chagas e segue com a polêmica social no que tange a definição e a legitimação da doença recém-descoberta. A segunda fase, de 1935 a 1960, ocorre após a morte de Chagas, quando Mazza e Romãña

confirmaram a forma aguda da doença na Argentina e quando Evandro Chagas (filho de Carlos Chagas) e Emmanuel Dias identificaram o caráter endêmico e crônico. Por fim, a terceira fase, a partir de 1961 até os dias atuais, destaca-se com o desafio tanto para o controle quanto para a compreensão da DC (LANNES-VIEIRA et al., 2010).

2.2 Epidemiologia

Após sua descoberta, a DC permaneceu por muitas décadas sendo considerada como uma enfermidade exclusivamente rural associada à pobreza em áreas da América Latina (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Atualmente sabe-se que a DC está associada a múltiplos fatores sociais e ambientais, e apresenta distribuição em todo continente americano (OPAS, 2022). Dentre os principais fatores de risco estão morar em moradias mal construídas - principalmente em áreas rurais e suburbanas, residir em áreas de pobreza social ou em regiões com altas taxas de migração e, por fim, pertencer a grupos ligados ao trabalho agrícola sazonal e à colheita (OPAS, 2022).

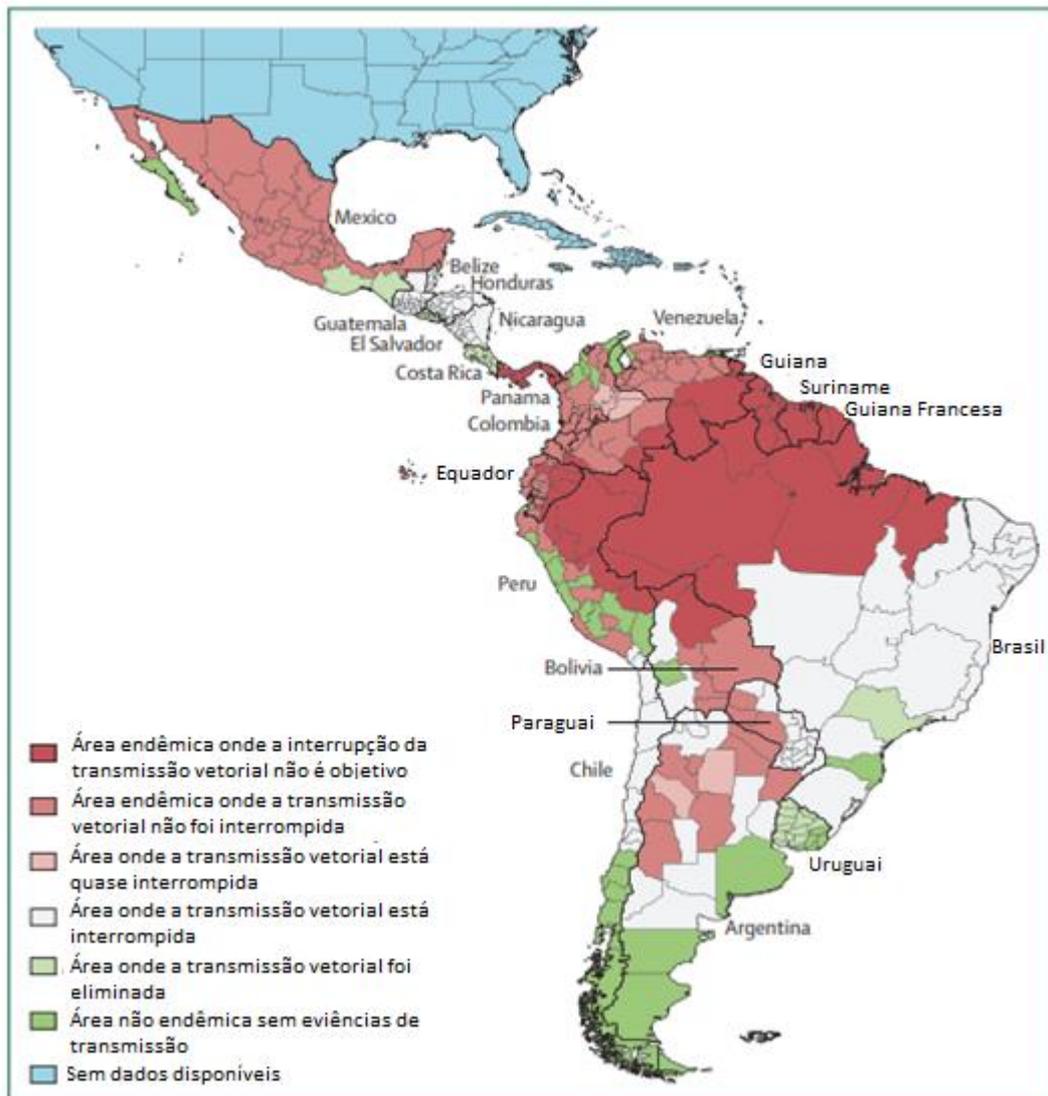
Mesmo após completar mais de cem anos de descoberta, a DC ainda é abordada como um importante problema de saúde pública que atinge milhões de pessoas (MALAFAIA; DE LIMA RODRIGUES, 2010). Originária da América Latina e frequente em outros continentes, a DC pode ser considerada endêmica em 21 países latinos, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e do Chile, e apresenta as maiores prevalências na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%) (RASSI; MARIN-NETO, 2009).

No início da década de 1990, os países afetados pela DC se organizaram para combatê-la e adotaram iniciativas a fim de controlar essa ameaça à saúde pública na América Latina (COURA et al., 2002). Juntamente com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), os representantes de alguns países organizaram um plano de cooperação denominado: Iniciativas Sub-regionais para Prevenção e Controle da DC, o qual abordava a tentativa de interrupção da transmissão vetorial em todo ou parte do território dos países afetados, a eliminação de espécies exóticas de vetores, a introdução da triagem universal de doadores de sangue, a detecção de casos de doenças congênitas, a redução da prevalência em crianças, a redução da morbidade, a

ampliação do acesso ao diagnóstico e ao tratamento, a melhoria da qualidade do diagnóstico, do atendimento clínico e do tratamento de pessoas infectadas e de doentes (OPAS, 2022).

Como consequência das medidas adotadas, o número estimado de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no mundo reduziu de 30 milhões em 1990 para 6 a 7 milhões em 2010. Ao longo desses 20 anos, a incidência anual diminuiu de 700.000 para 28.000 novos casos de infecção (OPAS, 2022). Além disso, a transmissão vetorial clássica foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999, e na maior parte do Brasil em 2000 (COURA et al., 2002). No entanto, a frequência de transmissão aumentou em regiões como na bacia amazônica devido à transmissão oral (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Figura 3: Transmissão da doença de Chagas pelo vetor triatomíneo (setembro, 2014).

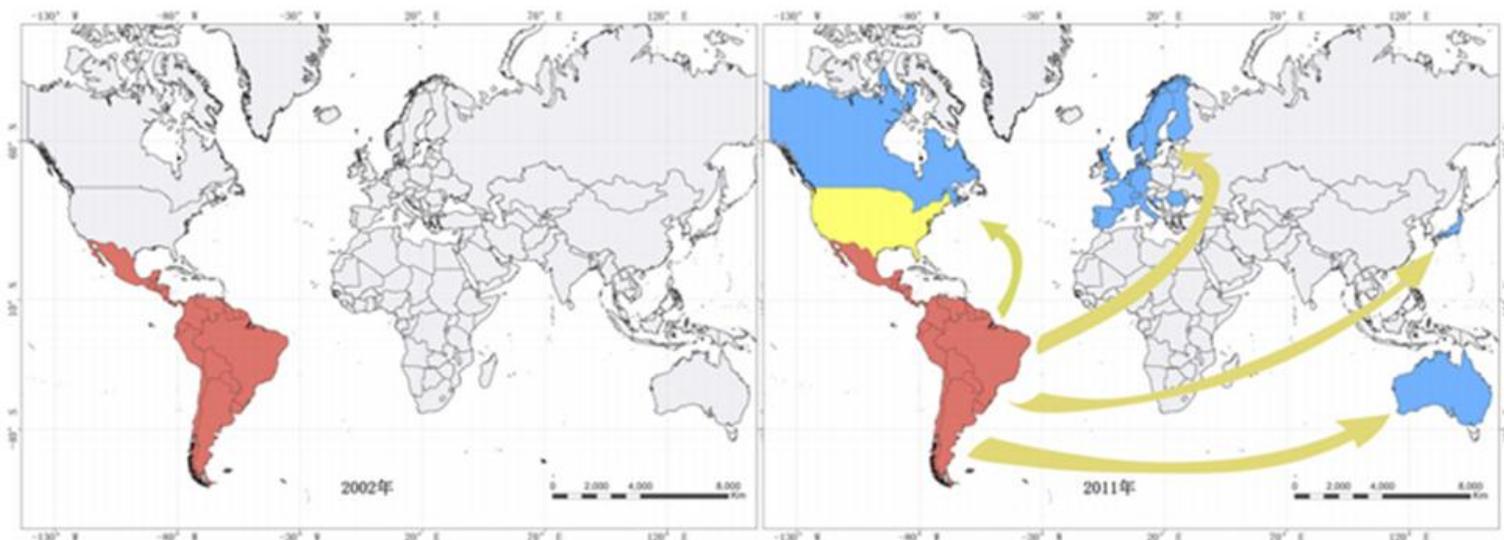


Fonte: Adaptado do programa de controle da doença de Chagas da Organização Mundial da Saúde Pan-Americana. Acesso em: 16 de maio. 2022.

Devido ao sucesso do plano de cooperação adotado em 1990 para controle vetorial e prevenção da transmissão do *T. cruzi* em áreas endêmicas, em 1991 foi criada a “Iniciativa Cone Sul”, um programa instaurado nos Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) que visava à eliminação do vetor *Triatoma infestans*. Nos anos seguintes, programas semelhantes foram criados em áreas endêmicas com o mesmo objetivo, a exemplificar a “Iniciativa dos Países Andinos” (1997), “Iniciativa da América Central e México” (1998) e “Iniciativa dos Países Amazônicos” (2004) (COURA, 2013). Como consequência destes programas, foi observada uma redução significativa no número de casos consequentes de transmissão vetorial clássica, fato que contribuiu indiretamente para a redução das infecções por transfusão sanguínea e via materno-fetal (COURA et al., 2014).

Embora a prevalência da DC na América Latina tenha reduzido nas últimas décadas, um aumento no número de casos de pacientes em países não endêmicos foi observado, tornando-a um problema de saúde pública mundial (MONCAYO; SILVEIRA, 2017). As migrações de pessoas infectadas têm sido apontadas como o fator crítico principal para o surgimento da doença em áreas nas quais anteriormente esta não era descrita (CONNERS et al., 2016). Neste contexto, a DC já foi detectada em áreas não endêmicas, como em países da América do Norte (Canadá e EUA), na Europa (principalmente na Espanha) e em regiões do Pacífico Ocidental (Austrália, Nova Zelândia e Japão) (GASCON et al., 2010; JACKSON et al., 2014).

Figura 4: Dados de mapeamento mostrando mudanças epidemiológicas relativas à doença de Chagas entre 2002 e 2011.



Fonte: (LIU; ZHOU, 2015). Acesso em: 16 de maio. 2022.

2.3 Agente etiológico

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae (CHAGAS, 1909). É um organismo que compreende populações altamente heterogêneas que diferem em características morfológicas, biológicas, patológicas, clínicas, imunológicas e bioquímicas (TEIXEIRA et al., 2006), além de apresentarem diversas peculiaridades de interesses filogenético e evolutivo (MARCILI, 2008). Uma das principais características do *T. cruzi* é a existência de uma única mitocôndria que contém uma região rica em ácido desoxirribonucleico denominada cinetoplasto (kDNA), constituída por moléculas dupla-fita circulares,

minicírculos e maxicírculos (FIDALGO; GILLE, 2011). Durante o ciclo biológico, o protozoário pode assumir três principais formas evolutivas, as quais são identificadas morfológicamente através da posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (TEIXEIRA et al., 2012) e possuem variações quanto à infectividade e patogenicidade.

Figura 5: Formas evolutivas do *T. cruzi*

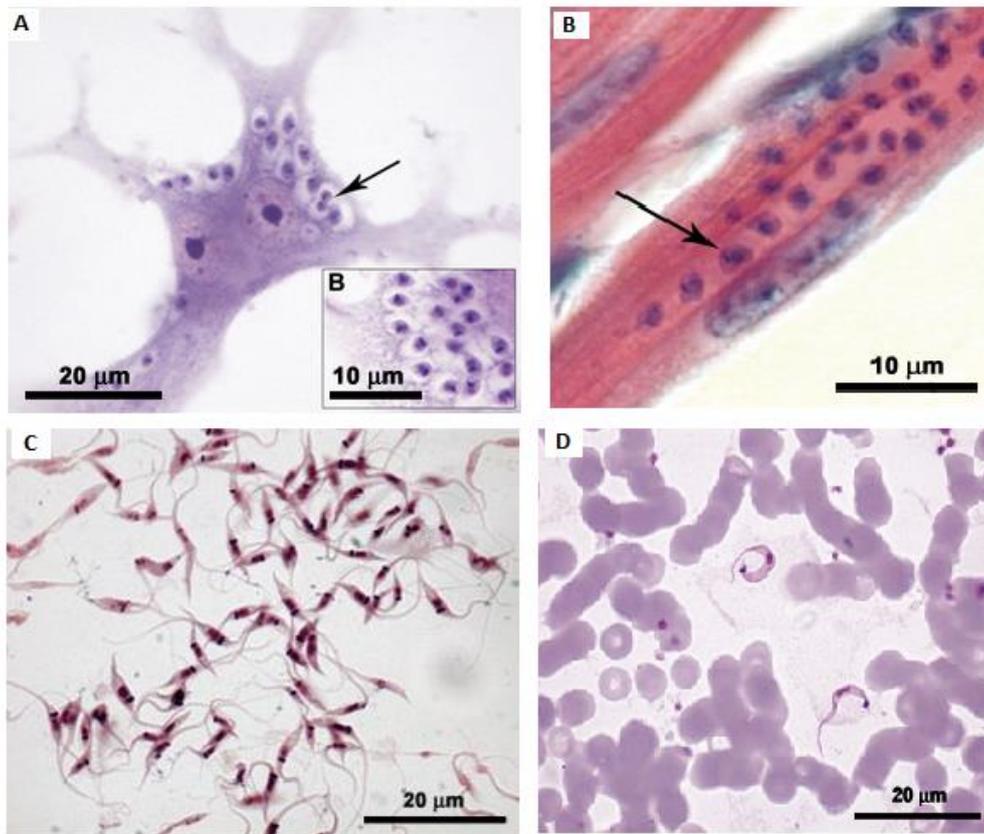


Fonte: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/16732/1/ExpressaoGenicaProteinas.pdf>.

Acesso em: 20 de Junho. 2022.

As amastigotas são as formas proliferativas e são encontradas no interior das células dos hospedeiros vertebrados. São células ovoides com aproximadamente 2 μ m de diâmetro, com núcleo centralizado e arredondado, e apresentam um reduzido flagelo (figura 6A e 6B) (BRENER, 1973). Essa forma pode ser encontrada no interior de células de hospedeiros infectados, bem como em cultivo axênico (ELIAS et al., 2001). Epimastigotas são formas proliferativas encontradas no intestino do hospedeiro invertebrado e apresentam forma fusiforme e alongada, apresentando o cinetoplasto próximo à saída do flagelo e posterior ao núcleo (figura 6C) (BRENER, 1973). Por fim, as formas tripomastigotas são altamente infectantes e são encontradas na porção final do intestino do inseto vetor (tripomastigota metacíclica), no sangue e no espaço intercelular do hospedeiro vertebrado. É uma forma alongada e levemente achatada, apresentando um flagelo que percorre toda a extensão lateral do parasito, formando uma membrana ondulante (figura 6D) (BRENER, 1973).

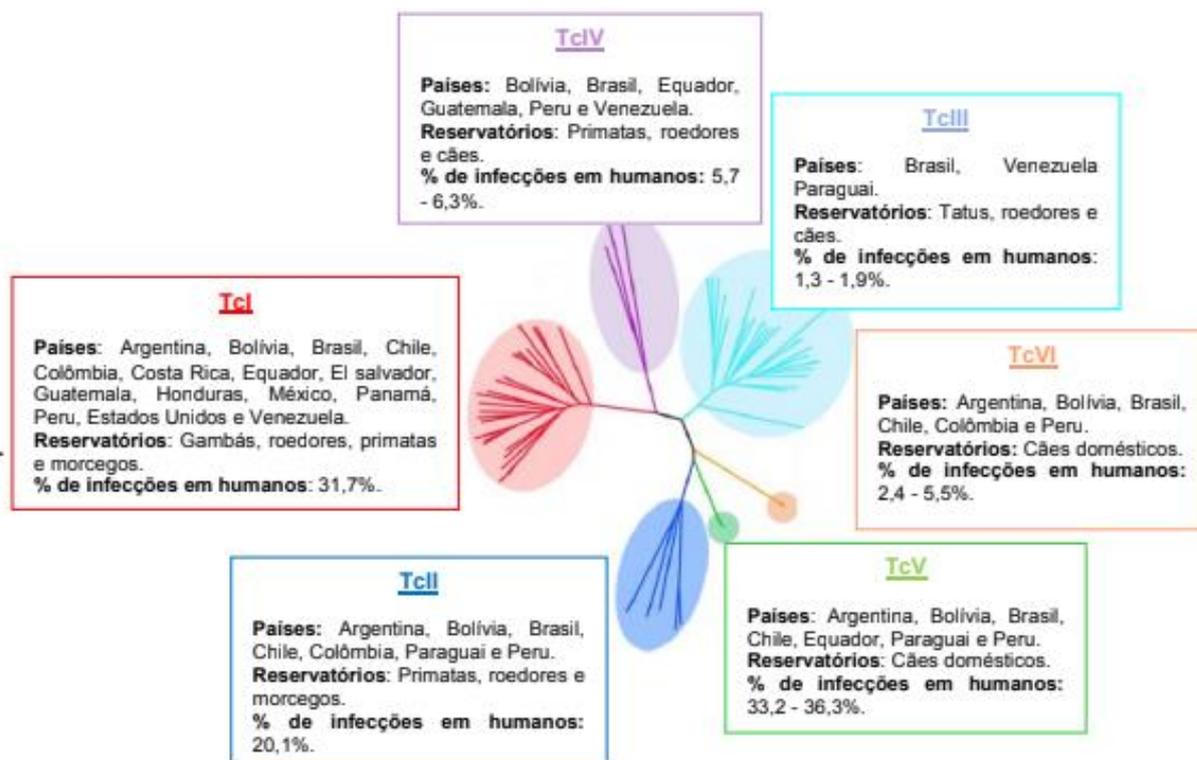
Figura 6: A) Formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*; **B)** Músculo estriado cardíaco de camundongo infectado com formas amastigotas do protozoário; **C)** Formas epimastigota; **D)** Formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*.



Fonte: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>. Acesso em: 25 de junho. 2022.

Desde o final da década de 1970, a evolução e a estrutura populacional do *T. cruzi* tornaram-se as mais estudadas dentre os modelos de epidemiologistas moleculares e geneticistas de populações (ZINGALES et al., 2012). A espécie é subdivida em seis unidades discretas de tipagem (*Discrete Typing Units* - DTUs) ou genótipos, designadas TcI a TcVI (ZINGALES et al., 2012), embora um sétimo genótipo, Tcbat, tenha sido proposto recentemente (FRANCISCO et al., 2017). Todos os seis DTUs são capazes de infectar humanos, e essa diversidade genética tem sido relacionada à distribuição, à patogênese, às características clínicas e à resposta à terapia (ZINGALES et al., 2012).

Figura 7: Características dos principais DTUs do *T. cruzi*



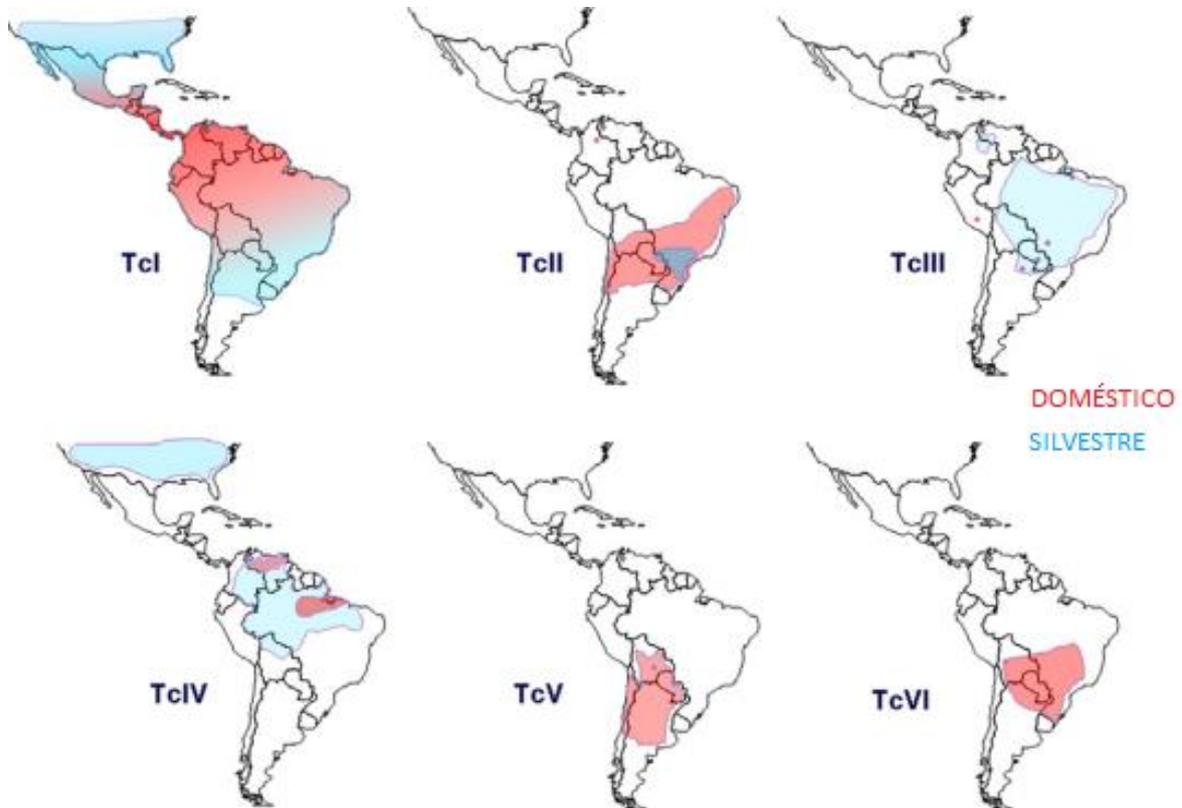
Fonte: Adaptado de FRANCISCO et al., 2017. Acesso em: 04 de setembro. 2022.

O DTU TcI é o mais abundante e amplamente disperso de todos os DTUs e está associado à espécies tanto do ciclo silvestre quanto do ciclo doméstico. A prevalência da infecção humana por TcI é maior no norte das Américas do Sul e Central, e está intimamente ligada à ocorrência de cardiomiopatia chagásica em seus portadores. Cerca de 52 gêneros de mamíferos são naturalmente infectados com esse DTU, assim como todos os principais gêneros de triatomíneos (ZINGALES et al., 2012). Já o DTU TcII é o segundo mais prevalente no Brasil e é encontrado predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul. Foi isolado principalmente de ciclos domésticos de transmissão e está associado à manifestações cardíacas, megaesôfago e megacólon (LISBOA et al., 2008).

O DTU TcIII está principalmente associado ao ciclo silvestre no Brasil e em países vizinhos, com raras infecções humanas documentadas. Já o DTU TcIV apresenta um padrão de distribuição similar ao TcIII na América, porém, ao contrário do TcIII, o TcIV ocorre com bastante frequência em humanos e é a principal causa da tripanossomíase americana na Venezuela (ZINGALES et al., 2012). Por fim, os DTUs TcV e TcVI são híbridos de TcII e TcIII, e essa hibridização pode ter ocorrido como um resultado das atividades humanas, à

medida que co-infecções surgiram em humanos. Ambos os DTUs estão associados à DC no sul e centro da América do Sul e são isolados principalmente de ciclos domésticos de transmissão (ZINGALES et al., 2012).

Figura 8: Distribuição geográfica aproximada dos DTUs do *T. cruzi* nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre.



Fonte: ZINGALES et al., 2012. Acesso em: 04 de setembro. 2022.

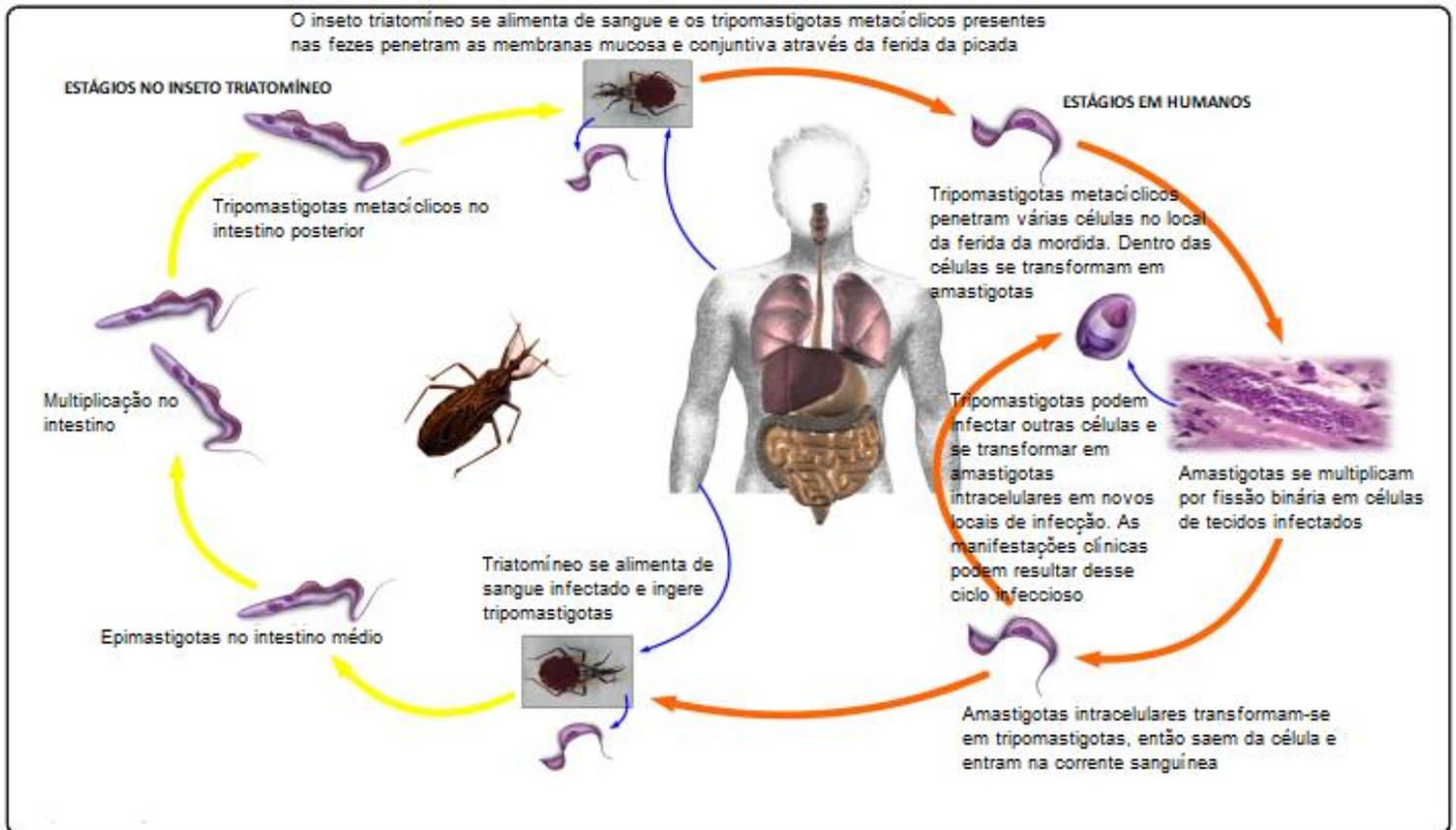
2.4 Vias de transmissão

As vias de transmissão da DC são geralmente divididas em dois fluxos, com base na frequência de transmissão e na importância epidemiológica (LIU; ZHOU, 2015). As vias mais comuns de transmissão do *T. cruzi* incluem transmissão vetorial, transmissão oral, transfusão de sangue contaminado com o parasito e transmissão congênita (PEREIRA; NAVARRO, 2013). Já as vias incomuns incluem transmissão durante transplante de órgãos, ingestão de leite materno contaminado com o protozoário, acidentes de laboratório, picadas de artrópodes contaminados e transmissão sexual (DIAS; NETO; DE ALBUQUERQUE LUNA, 2011).

Em áreas endêmicas, a forma mais comum de infecção por *T. cruzi* é por meio da transmissão vetorial por insetos triatomíneos (MUÑOZ-CALDERÓN et al., 2013). Essa via é considerada o mecanismo de transmissão de maior relevância epidemiológica e é responsável pela manutenção da doença, apresentando maior impacto nos países da América Latina (DIAS; NETO; DE ALBUQUERQUE LUNA, 2011). Os tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do barbeiro penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema macrocítico fagocitário da pele ou das mucosas do humano (DIAS; COURA, 1997). Na célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas e realizam o processo de divisão binária intracelular. Em seguida, ocorre a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas, as quais lisam a célula hospedeira e alcançam a corrente sanguínea, podendo atingir outras células de outros tecidos ou órgãos e realizar um novo ciclo celular (DIAS; COURA, 1997).

Já no hospedeiro invertebrado, os triatomíneos se infectam ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Ao longo do tubo digestivo do inseto, o *T. cruzi* sofre uma sequência irreversível de transformações no estômago do inseto, transformando-se em epimastigotas e, posteriormente, ao atingir o intestino, se diferencia em tripomastigotas metacíclicos, os quais são eliminados nas fezes ou na urina do inseto (DIAS; COURA, 1997).

Figura 9: Ciclo de vida do *T. cruzi* em triatomíneos e humanos



Fonte: Adaptado de LIU; ZHOU, 2015. Acesso em: 28 de Junho. 2022.

Outra via de infecção destacada na última década foi a transmissão por via oral. Até 2004, a infecção por *T. cruzi* a partir de alimentos e bebidas contaminados por triatomíneos ou por suas fezes não era frequente, no entanto, a partir de 2005, surtos de transmissão do protozoário via oral foram relatados, iniciando-se no estado de Santa Catarina e, posteriormente, na região norte (NÓBREGA et al., 2009). Acredita-se que a contaminação ocorra pela presença de triatomíneos infectados inadvertidamente esmagados, ou a partir da presença de fezes do inseto durante o processamento do alimento (NÓBREGA et al., 2009). Como consequência dos inúmeros casos registrados, as autoridades brasileiras implementaram diretrizes de boas práticas de fabricação e pasteurização obrigatória de bebidas e alimentos relacionados à transmissão oral da DC (NÓBREGA et al., 2009).

Atualmente, a maioria dos casos de transmissão oral tem sido relatada no Brasil, porém também ocorrem em outros países. Surtos da transmissão oral do *T. cruzi* relacionados ao consumo de sucos de goiaba e frutas silvestres contaminados com fezes de triatomíneos já foram registrados na Guiana

Francesa, Venezuela e Bolívia (DE NOYA et al., 2010). Um caso de transmissão oral foi confirmado na Argentina devido à ingestão de carne de caça (STORINO; JORG, 1994). Também foram descritos casos suspeitos de transmissão alimentar da DC a partir da ingestão de carnes de animais silvestres no Equador e na Colômbia (Amunárriz et al., 1991; Rodriguez et al., 1992).

A transmissão da doença por transfusão de sangue foi apontada pela primeira vez em 1936 na Argentina, por Mazza e colaboradores, e confirmada em 1952 no Brasil (WENDEL, 2010). O risco de transmissão por transfusão de sangue depende de vários fatores como: a presença do parasito no sangue ou no hemocomponente transfundido; o tipo e o número de hemoderivados infectados transfundidos; o estado imunológico do receptor; a qualidade da triagem clínico-epidemiológica; o nível de cobertura da triagem sorológica de doadores; e da sensibilidade dos testes sorológicos utilizados para rastrear a doação de sangue (WENDEL, 2010). Até o final da década de 1970 no Brasil, as transfusões de sangue eram realizadas em sua grande maioria nas grandes cidades, a tecnologia era rudimentar, não havia controle do material transfundido e a cobertura de testes sorológicos para DC em doadores de sangue era menor que 20% e se apresentava como uma técnica de difícil execução e com sérios problemas de padronização. (DIAS, 2006). O conjunto desses fatores ocasionava grande número de pessoas infectadas pelo protozoário por meio de transfusão sanguínea a cada ano, sendo entre 100 mil casos novos, 20 mil correspondentes à transmissão transfusional (DIAS, 2006).

Na década de 80, com a VIII Conferência Nacional de Saúde, surgiram importantes avanços na luta contra a DC no Brasil e esses ocasionaram um enorme impacto na transmissão da parasitose. Houve a proibição de doador remunerado, normatizou-se a prática da hemoterapia, criou-se um sistema nacional de sangue e hemoderivados e foi instituída a obrigatoriedade da seleção sorológica dos candidatos à doação (WENDEL, 2010). A partir das medidas preconizadas, o risco de transmissão transfusional da DC foi amplamente reduzido na América Latina como um todo (DIAS et al., 2016a). No Brasil da década de 1950, a prevalência média estimada de sorologia positiva para *T. cruzi* entre potenciais doadores de sangue foi de 8,3%, e no final dos anos 1980 e início dos anos 90 esse número reduziu para 3,2% (DIAS

et al., 2016a). Além do avanço na segurança da transfusão de sangue, o processo de hemovigilância também sofreu melhorias, com o estabelecimento de um sistema nacional que integre bancos de sangue e vigilância epidemiológica e sanitária (DIAS et al., 2016a).

Já a transmissão congênita ou transmissão vertical da DC ainda é relativamente importante no Brasil, apesar da ausência de medidas sistemáticas preventivas contra essa forma de transmissão no país (DIAS et al., 2016a). A gestante infectada transmite o protozoário para seu bebê durante a gestação ou no momento do parto, e a transmissão pode ocorrer por via transplacentária, em qualquer fase da doença (aguda ou crônica), por transmissão pelo leite ou ainda durante o ato de amamentar, em casos de sangramento por fissura mamária (BRASIL, 2017). A estimativa geral da prevalência da infecção por *T. cruzi* em gestantes varia de 1 a 40%, e aproximadamente 1,8 milhão de mulheres em idade fértil na América estão infectadas (DIAS et al., 2016a).

2.5 Manifestações clínicas

A compreensão do ciclo de vida do *T. cruzi* e da patogênese da doença, descrita inicialmente em 1908, permitiu aos clínicos diferenciar os dois estágios da doença: a fase aguda e a fase crônica.

A fase aguda se inicia logo após a infecção, quando há um elevado número de parasitos circulante na corrente sanguínea do hospedeiro. Apresenta duração de 4 a 8 semanas, e, na maioria dos casos, ocasiona sintomas inespecíficos, sendo apenas 10% dos casos que desenvolvem sintomas mais específicos em uma síndrome clínica que tende a se desdobrar em semanas (DIAS et al., 1956). Os sintomas são geralmente leves e inespecíficos, incluindo febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (DIAS et al., 1956). Na transmissão vetorial clássica, há sinais de porta de entrada do *T. cruzi*: a entrada do parasito pela pele produz o chagoma de inoculação, uma área de eritema e inchaço, enquanto a entrada do protozoário através das membranas mucosas oculares produz o sinal de Romaña, achado clássico na DC aguda, que consiste em um edema unilateral indolor das pálpebras e tecidos perioculares (DIAS et al., 1956), como mostrado na figura 10. A doença aguda grave ocorre em menos de 5% dos pacientes e inclui manifestações

como miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (risco de mortalidade 0,2 - 0,5%) (DIAS et al., 1956). A transmissão oral do parasito parece estar associada a uma maior incidência de miocardite e a uma maior taxa de letalidade em relação à infecções transmitidas por vetores (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Figura 10: Manifestações clínicas da fase aguda da infecção por *T. cruzi*



Sinal de Romaña

Chagoma de inoculação cutâneo

Fonte: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/32942/1/2018_AgenordeCastroMoreiradosSantosJ%C3%BAnior.pdf. Acesso em: 03 de setembro. 2022.

Posteriormente à fase aguda, a resposta imunológica da pessoa infectada controla a replicação do parasito e a partir disso, os sintomas, bem como a parasitemia patente, desaparecem espontaneamente em 4 a 8 semanas (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Inicia-se então a fase crônica da DC, na qual 60% a 70% dos pacientes apresentam-se na forma crônica indeterminada, ou seja, não apresentam sintomas clínicos. Essa forma é caracterizada pela positividade para anticorpos anti-*T. cruzi* no soro, eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações normal e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais. Os demais pacientes (30% - 40%) desenvolvem a forma determinada, podendo ser a forma cardíaca, digestiva (principalmente megaesôfago e megacólon), ou cardiodigestivo – geralmente 10 a 30 anos após a infecção inicial (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca é a manifestação mais grave e frequente da doença crônica (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000). Essa forma se desenvolve em 20% a 30% dos indivíduos e normalmente ocasionam sintomas e sinais físicos que estão relacionados a quatro síndromes, insuficiência cardíaca, tromboembolismo, arritmias e manifestações anginosas, as quais podem existir concomitantemente no mesmo indivíduo portador da doença (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000). A insuficiência cardíaca é frequentemente uma manifestação

tardia da cardiopatia chagásica e está associada a uma maior mortalidade por insuficiência cardíaca quando comparada a outras causas (FREITAS et al., 2005).

Figura 11: Corte sagital de coração chagásico com insuficiência cardíaca congestiva



Fonte: (SIMÕES et al., 2018). Acesso em: 03 de setembro. 2022.

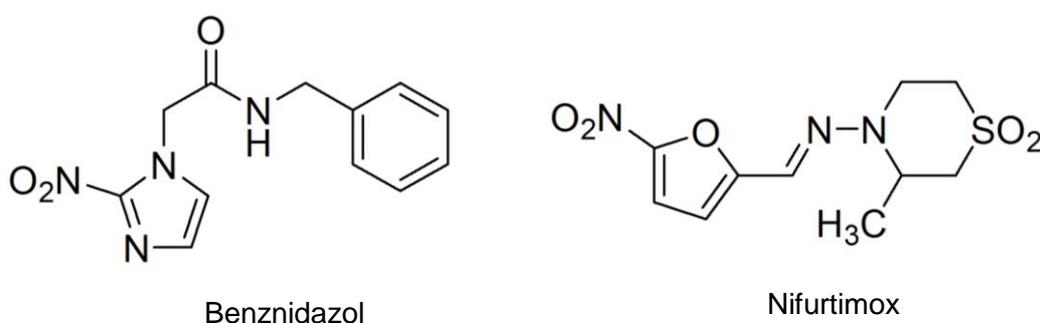
A forma digestiva da DC é caracterizada por alterações no sistema motor, nas funções secretoras e absorptivas do esôfago e do trato gastrointestinal (TGI). Embora possa se manifestar em todos os órgãos do TGI, a forma digestiva da tripanossomíase acomete principalmente o esôfago e o intestino grosso, acarretando o aparecimento de megaesôfago e megacólon, respectivamente (DIAS et al., 2016b). No megaesôfago, os sintomas incluem disfagia, sensação de plenitude, dor torácica, regurgitação e hipertrofia das glândulas salivares devido à hipersalivação. O acometimento esofágico ocorre em diferentes graus, podendo variar morfológicamente e apresentar anormalidades no comportamento motor do órgão, desde pequenas alterações do trânsito esofágico até formas avançadas de dolicomegaesôfago, com grande prolongamento do tempo de trânsito dos alimentos (DIAS et al., 2016b).

Já no megacólon, os principais sinais e sintomas são diarreia paradoxal, disquesia, distensão abdominal, fecaloma, constipação e a ruptura da víscera. O bolo fecal acumulado e/ou esforço devido à dificuldade de evacuar estimulam a dilatação do cólon, causando dor e desconforto (DIAS et al., 2016b). Outras doenças podem existir concomitantemente com a patologia, como o câncer colônico (raramente) e a doença diverticular colônica. A dilatação colônica pode ser diagnosticada em até 80% dos casos e pode ocorrer apenas no reto, apenas no sigmóide ou em todo o cólon (DIAS et al., 2016b).

2.6 Tratamento

Desde a descoberta da DC, muitas substâncias foram testadas contra *T. cruzi*. Os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento da doença foram o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio, porém ao serem testados, esses se apresentaram ineficazes contra o protozoário (CROFT, 1999). A partir disso, foram descobertos novos compostos, dentre os quais destacam-se os derivados quinoleínicos, os arsenobenzóis sulfurados, os derivados fenantridínicos, os compostos nitrofurânicos e os antagonistas purínicos (RASSI; FERREIRA, 1971). Apesar de evidenciarem nítida atividade tripanocida e redução do índice de mortalidade dos animais inoculados, esses compostos não foram capazes de combater a persistência da infecção (RASSI; FERREIRA, 1971). No final da década de 60 e início dos anos 70, houve o surgimento dos fármacos NFX (5-nitrofurano) e o BNZ (2 - nitroimidazol), os quais foram introduzidos na terapêutica em 1967 e em 1972, respectivamente (BOAINAIN; RASSI, 1979).

Figura 12: Estrutura química do Benznidazol e Nifurtimox



O BNZ, um derivado do nitroimidazol, é considerado o tratamento de primeira linha, foi sintetizado em 1972 por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006). Em abril de 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do BNZ foram cedidos ao Brasil pela Roche e hoje esse é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), sendo, atualmente, o único medicamento disponível no Brasil para o tratamento específico da DC (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006). Por sua vez, o NFX é um derivado nitrofurano comercializado pela indústria farmacêutica Bayer e foi lançado em 1967 com o nome comercial Lampit[®], sendo o primeiro

fármaco utilizado no tratamento da fase aguda da DC (BOAINAIN, 1979). A partir da década de 1980, o NFX teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile, Argentina), por motivo de segurança, já que seus efeitos adversos eram mais evidentes quando comparados ao BNZ (COURA; DE CASTRO, 2002).

O mecanismo de ação destes compostos ainda não é totalmente elucidado (SALES et al., 2017). Acredita-se que o BNZ atue por via de estresse redutor envolvendo modificação covalente de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios (DOCAMPO, 1990). Além disso, o BNZ e seus metabólitos podem afetar o metabolismo da tripanotona do *T. cruzi* (SALES et al., 2017), melhorar a fagocitose, aumentar a morte de tripanossomas por meio da indução de IFN- γ , e inibir a NADH fumarato redutase do protozoário (TURRENS et al., 1996). O NFX, por sua vez, sofre uma redução a um radical de ânion nitro, seguido pela autooxidação deste radical, o que produz metabólitos de oxigênio altamente tóxicos (DOCAMPO, 1990). O *T. cruzi*, por não apresentar mecanismos de desintoxicação metabólica de oxigênio, se apresenta altamente suscetível à produtos de redução de oxigênio, principalmente à peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1990).

Atualmente, os fármacos BNZ e NFX são os únicos medicamentos disponíveis no mercado com a eficácia comprovada contra a DC (BERN et al., 2007). De acordo com as recomendações, o tratamento com esses compostos é indicado para todos os casos de infecção aguda, congênita e reativada, bem como para todas as crianças com a infecção e para pacientes com até 18 anos de idade que estejam na fase crônica da doença (BERN et al., 2007). O tratamento medicamentoso geralmente é recomendado à adultos entre 19 a 50 anos sem cardiopatia chagásica avançada, e é opcional para àqueles maiores de 50 anos, já que o benefício não foi comprovado nesta população (BERN et al., 2007). Por outro lado, o tratamento é contraindicado durante a gravidez, para pacientes com insuficiência renal ou hepática grave, e para aqueles com cardiopatia chagásica avançada ou com megaesôfago em que haja comprometimento da deglutição (BERN et al., 2007).

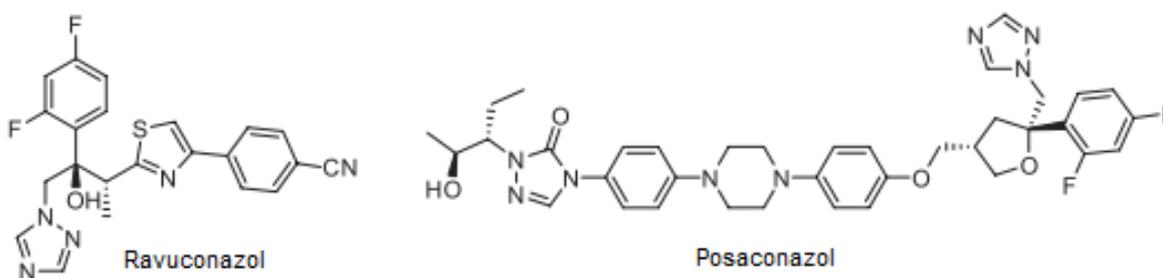
Apesar de o BNZ e o NFX serem utilizados para o tratamento da DC, esses compostos não são considerados fármacos ideais de acordo com os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual

determina que para um fármaco ser ideal, esse deve atender as seguintes exigências: cura parasitológica de casos agudos e crônicos; ação eficaz com uma única dose ou poucas doses; acessibilidade aos pacientes a partir de um custo reduzido; baixos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos; nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento e nenhuma indução da resistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Ambos os compostos apresentam eficácia limitada especialmente em pacientes com a forma crônica da doença, em pacientes com imunossupressão medicamentosa ou ainda em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LAMAS et al., 2006). Além disso, tanto o NFX quanto o BNZ ocasionam diversos efeitos adversos, dentre os quais destacam-se os mais comuns: vômitos, polineuropatia, dermatite e depressão da medula óssea, e, esses efeitos aliados à necessidade de administrar doses elevadas, conduzem o paciente à interrupção do tratamento medicamentoso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A partir disso, atualmente, vários novos compostos estão em desenvolvimento pré-clínico, e diferentes abordagens têm sido utilizadas para a identificação de novos fármacos (MCKERROW et al., 2009). Embora muitas tentativas tenham sido realizadas a fim de alcançar um tratamento ideal para a doença, desde a introdução dos fármacos BNZ e o NFX no mercado, apenas o alopurinol e alguns antifúngicos avançaram para ensaios clínicos (APT et al., 2005). Em 2009, a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) e seus parceiros lançaram a Plataforma de Pesquisa Clínica da doença de Chagas (<https://dndi.org/diseases/chagas/>), que visa promover discussões técnicas, desenvolver uma massa crítica de conhecimentos, fortalecer as capacidades institucionais de pesquisa e vincular pesquisadores por meio de uma rede colaborativa. Como resultado, três ensaios clínicos de fase II iniciaram-se em 2011 com o objetivo de investigar a potencial ação do posaconazol (POS) (um análogo estrutural do itraconazol) e de um pró-fármaco do ravuconazol (RAV) no tratamento da DC (DA SILVA et al., 2014).

Figura 13: Estrutura química do Posaconazol e do Ravuconazol



Fonte: Adaptado de (DA SILVA et al., 2014). Acesso em 04 de Setembro. 2022

Esses fármacos são frequentemente utilizados como antifúngicos de uso oral e têm como alvo a enzima estero 14alfa-desmetilase (também conhecida como CYP51), necessária para a biossíntese de ergosterol. Ensaio iniciais utilizando POS demonstraram uma potente e específica atividade *in vitro* e *in vivo* contra *T.cruzi*, no entanto, quando testado em ensaios clínicos de Fase II, o fármaco apresentou falha terapêutica em 92% dos casos, os quais reincidiram durante o período de acompanhamento de 10 a 12 meses (MOLINA et al., 2014). Um estudo de Fase II mais recente envolvendo pacientes assintomáticos também relatou alta taxa de reincidência da doença ao testar o POS sozinho (87%), ou associado com BNZ (13%), com descontinuação do tratamento em 32% dos pacientes devido a efeitos colaterais adversos (MORILLO et al., 2017). O mesmo pode ser citado para o RAV, o qual teve seu pró-fármaco E1224 testado contra o *T. cruzi*, e, embora tenha demonstrado eficácia na eliminação do parasito durante testes pré-clínicos, um ano após o tratamento, apenas 8-31% dos pacientes tratados com E1224 mantiveram a eliminação do parasito em comparação com 81% dos pacientes tratados com BNZ, demonstrando que esse tem baixa erradicação do parasito (SALES et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão narrativa da literatura sobre pesquisas *in vitro* utilizadas na busca por novos fármacos para o tratamento da DC.

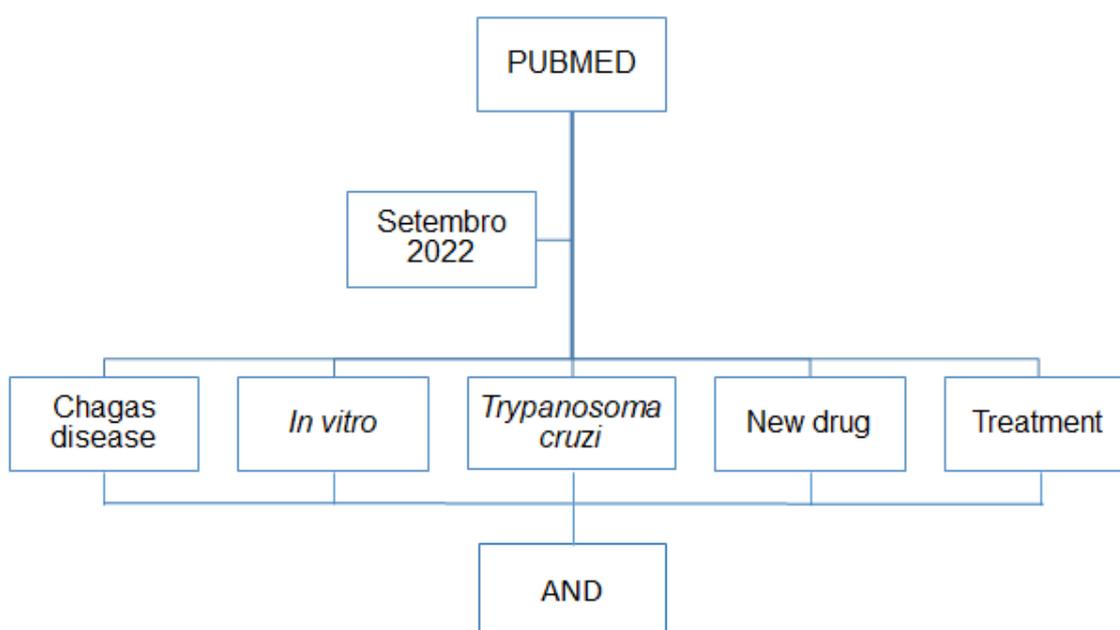
3.2 Objetivos específicos

- Traçar estratégias de busca na literatura;
- Selecionar as publicações de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos;
- Extrair de cada publicação selecionada a partir dos bancos de dados as informações sobre: linhagem celular utilizada, cepa e DTU utilizados, tempo de incubação com BNZ, valor de CI_{50} (Concentração inibitória média) com BNZ, composto testado e IS (índice de seletividade);
- Reunir e organizar as informações chaves de maneira concisa;
- Relacionar a não padronização dos ensaios com a divergência dos resultados encontrados.

4. METODOLOGIA

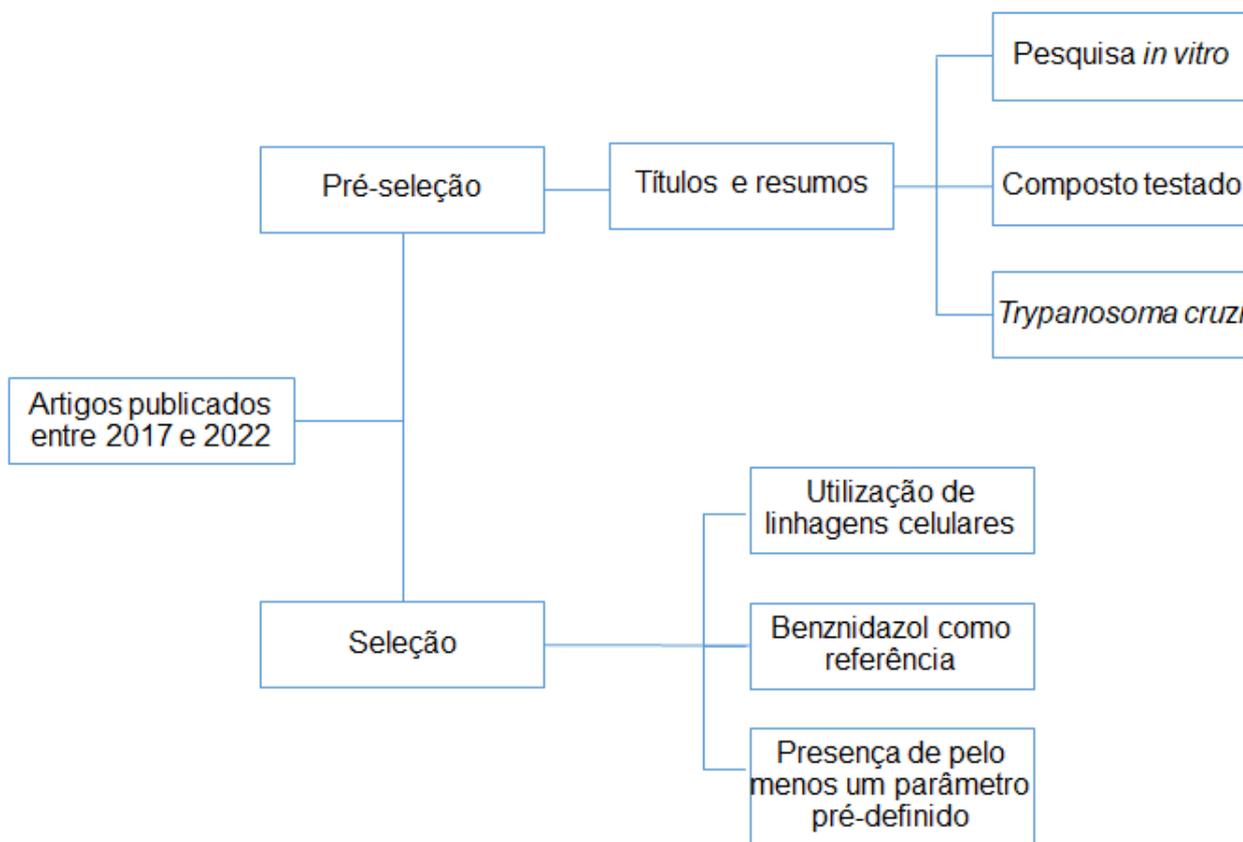
A fim de atingir o objetivo proposto, foram traçadas as estratégias de busca na literatura, conforme descrito na figura 14. A coleta de dados ocorreu em setembro de 2022 a partir de artigos científicos publicados nas bases de dados disponibilizadas no portal de periódicos PUBMED (Publisher Medline). Foi realizado o cruzamento entre as palavras chaves “Chagas disease”, “*In vitro*”, “*Trypanosoma cruzi*”, “New drug” e “Treatment” utilizando-se o operador booleano “AND” para fornecer a intercessão entre os descritores e filtrar apenas artigos que continham as palavras chaves escolhidas, assim, restringindo-se a dimensão da pesquisa.

Figura 14: Estratégia de busca



Foram filtrados os estudos publicados entre 2017 e 2022, e a partir disso, esses foram pré-selecionados pelos títulos e resumos, os quais deveriam conter como primeiro critério os termos *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*, e o nome do composto a ser testado. Posteriormente, foi realizada a leitura na íntegra dos artigos pré-selecionados, e apenas aqueles que realizavam estudo *in vitro* utilizando alguma linhagem celular e BNZ como fármaco de referência foram selecionados para esse trabalho. Foram excluídos os estudos que não apresentavam resultados de pelo menos um parâmetro do BNZ, sendo esses: tempo de incubação, CI_{50} ou IS. Também foram excluídos os artigos não acessíveis, bem como aqueles indisponíveis.

Figura 15: Critérios de seleção



Para a coleta das informações dos artigos selecionados, foi elaborada uma tabela com o intuito de reunir e organizar as informações-chave de maneira concisa. A tabela contemplava os seguintes itens: nome do autor; o composto a ser testado; a linhagem celular utilizada no teste intracelular da atividade tripanocida do composto; a cepa e o DTU do *T. cruzi*; a concentração de BNZ utilizada como referência; o tempo de incubação com BNZ; o valor do CI_{50} e do IS com BNZ. Por fim, as informações foram analisadas a fim de estabelecer uma compreensão e conclusão sobre o tema presente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao realizar uma busca na plataforma Pubmed, foram detectados 290 artigos. A partir disso, os artigos cuja publicação tenha ocorrido nos últimos cinco anos, ou seja, entre 2017 e 2022, foram filtrados e 147 resultados foram encontrados. Dentre esses, levando-se em consideração os títulos e os resumos, foram excluídos aqueles que não se enquadravam na proposta deste estudo, permanecendo na pesquisa 79 artigos para serem analisados na íntegra.

Durante a análise completa da metodologia dos artigos selecionados, observou-se que embora estes apresentassem títulos e resumos interessantes para a pesquisa, alguns não se adequavam aos critérios de seleção, e, portanto, 38 estudos foram excluídos. Além disso, também foram excluídos 11 artigos pagos os quais não foi possível realizar a leitura na íntegra. Ao final, considerou-se um total de 29 estudos, dos quais foram retiradas as informações necessárias para este trabalho, e estas se encontram descritas na tabela abaixo.

Tabela 1: Dados extraídos dos artigos que atenderam aos critérios de seleção

AUTOR	COMPOSTOS	LINHAGEM CELULAR	CEPA E DTU	CONCENTRAÇÃO DE BNZ	TEMPO DE INCUBAÇÃO COM BNZ	VALOR DE CI_{50} COM BNZ	VALOR DE IS
Peres, R.B.; Fiuza, L.F.A.; da Silva, P.B.; et al. (2021)	Substâncias isoladas de: <i>Aureliana fasciculata</i> <i>Clusia studartiana</i> <i>Crescentia cujete</i> <i>Malpighia glabra</i> <i>Piper tectoniifolium</i> <i>Rheedia longifolia</i>	L929	Tulahuen (DTU VI)	0 – 50 μ M	96h	$3.8 \pm 1.8 \mu$ M	> 52
Martín-Escolano, R.; Etxebeste-Mitxelorena, M.; Martín-Escolano, J.; et al. (2021)	Compostos derivados de Selênio	Vero	Arequipa (DTU I) SN3 (DTU I) Tulahuen (DTU VI)	0,1 – 50 μ M	72h	$8.3 \pm 0.7 \mu$ M $16.6 \pm 1.4 \mu$ M $10.0 \pm 0.8 \mu$ M	10 5 8
Ferreira, D. D.; Mesquita, J. T.; da Costa Silva, T. A.; et al. (2018)	Sertralina	L929 Macrófagos ¹ Células do músculo cardíaco ¹	Tulahuen (DTU VI) Y (DTU II)	*	96h 48h 48h	$2.5 \pm 0.9 \mu$ M $5.0 \pm 1.5 \mu$ M $3.6 \pm 1.0 \mu$ M	*

Torchelsen, F. K. V.; Silva, T. M.; Milagre, M. M.; et al. (2020)	Silibinina (monoterapia e associação com BNZ)	Vero	Y (DTU II)	10 µM	24h	22.9 ± 3.0 µM	7,7
--	---	------	------------	-------	-----	---------------	-----

da Silva, C. F.; Pacheco, A.O.; Alves, R.N.; et al. (2018)	Compostos isolados de folhas de <i>Excoecaria lucida</i>	L929	Y (DTU II)	2.6 µM	Y: 24h	13.0 ± 9.0 µM	>90
			Tulahuen (DTU VI)		Tulahuen: 96h		

Simões-Silva, M. R.; De Araújo, J. S.; Peres, R. B.; et al. (2019)	Imantimib e derivados	L929	Tulahuen (DTU VI)	0 – 50 µM	96h	4.1 ± 1.3 µM	>12
			Y (DTU II)		48h		

Sales Junior, P. A.; Zani, C. L.; de Siqueira, E. P.; et al. (2019)	Substância isolada de <i>Trixis vauthieri</i>	L929	Tulahuen (DTU VI)	*	96h	3.8 µM	625
--	---	------	-------------------	---	-----	--------	-----

Leite, D. I.; Fontes, F. de V.; Bastos, M. M.; et al. (2018)	Análogos de BNZ contendo anéis 1,2,3-triazol	L929	Tulahuen (DTU VI)	*	96h	4 ± 1.5 µM	> 50
---	--	------	-------------------	---	-----	------------	------

Bulhões Portapilla, G.; Pereira, L. M.; Bronzon da Costa, C. M.; et al. (2019)	Corantes de fenotiazínio	LLCMK2	Tulahuen (DTU VI)	8 µM	72h	3.4 ± 0.38 µM	> 58.65
---	--------------------------	--------	-------------------	------	-----	---------------	---------

Rojas Vargas, J. A.; López, A. G.; Pérez, Y.; et al. (2019)	Derivados de imidazóis substituídos com grupo aril	MRC-5 _{SV2}	Tulahuen (DTU VI)	*	72h	2.8 ± 0.56 µM	*
--	--	----------------------	-------------------	---	-----	---------------	---

Núñez, M.J.; Martínez, M.L.; Arencibia, A.L.; et al. (2021)	Extratos da casca da raiz de <i>Maytenus chiapensis</i>	J774	Y (DTU II)	*	72h	6.9 µM	57.5
--	---	------	------------	---	-----	--------	------

Bustamante, C.; Díez-Mejía, A.F.; Arbeláez, N.; et al. (2022)	Composto orgânico denominado UBMC-4	huMDM	Tulahuen (DTU VI)	20 µM	72h	1.1 ± 0.03 µM	>655
Ribeiro, J.L.S.; Soares, J.C.A.V.; Portapilla, G.B.; et al. (2020)	Derivados de 1,6-difenil-1Hpirazolo[3,4-b]piridina	LLC-MK2	Tulahuen (DTU VI)	1.56 – 200 µM	72h	3.9 ± 0.28 µM	> 50.25
Martinez-Peinado, N.; Lorente-Macías, Á.; García-Salguero, A.; et al. (2021)	Quimiotipos de purina	Vero	Tulahuen (DTU VI)	*	96h	1.8 µM	115.11
Araujo, S. C.; Sousa, F. S.; Costa-Silva, T. A.; et al. (2021)	Compostos neolignanós isolados de <i>Nectandra leucantha</i>	Macrófagos ¹	Y (DTU II)	*	48h	5.5 ± 1.4 µM	34.5

**Puente, V.; Demaria, A.;
Frank, F.M.; et al. (2018)**

Vitamina C

Macrófagos¹

Tulahuen (DTU VI)

0.5 – 40 µM

10h

4.1 ± 0.55 µM

20.1

**Brancaglion, G. A.;
Toyota, A. E.; Cardoso
Machado, J. V.; et al.
(2018)**

Análogos estruturais da
cumarina

H9c2

Y (DTU II)

1.87 – 120 µM

72h

25.0 ± 10 µM

>8

**Varela, M.T.; Lima, M.L.;
Galuppo, M.K.; et al.
(2017)**

Alquenil e análogos
derivados de *Piper
malacophyllum*

Macrófagos¹

*

*

72h

5.2 ± 0.3 µM

51.9

**Rolón, M.; Lima, A. P. A.;
Coronel, C.; et al. (2019)**

Derivados de 2,5-
dihidroxibenzil

J774

CL-B5 (DTU VI)

*

72h

*

14

De Araújo, J. S.; da Silva, P. B.; Batista, M. M.; et al. (2019)

Derivados de ftalazinona

L929

Tulahuen (DTU VI)

0 – 200 μM

96h

$2.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$

51

Monteiro, M. E.; Lechuga, G.; Lara, L. S.; et al. (2019)

Pirazol-imidazolina e híbridos de pirazol-tetrahidropirimidina

Vero
Células do
músculo cardíaco¹

Dm28 (DTU I)
Y (DTU II)

0.41 – 100 μM

72h

$1.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$

>263.1

$0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$

>555

Barros Freitas, L. A.; Caroline da Silva Santos, A.; de Cássia Silva, G.; et al. (2021)

Derivados de tiazolil-isatina

L929

Tulahuen (DTU VI)

*

168h

5.6 μM

21.87

Macedo, C. M.; Saraiva, F. M. S.; Paula, J. I. O.; et al (2021)

Derivado de fenil-terc-butil-nitrona - LQB303

RAW264.7

Y (DTU II)

50 μM

48h

*

*

Guerra, A.; Gonzalez-Naranjo, P.; Campillo, N. E.; et al (2017)	2,2-dióxidos de imidazo[4,5c][1,2,6]tiadiazina	L929	CL- B5 (DTU VI)	*	168h	0.8 µM	> 9.4
Lopes, C. D.; Possato, B.; Giovanini, A. P. S. G.; et al. (2019)	Complejo Organometálico de Ouro(III)	LLC-MK2	Y (DTU II)	*	24h	0.8 ± 0.29 µM	*
Vinuesa, T.; Herráez, R.; Oliver, L.; et al. (2017)	Nanoformulados de BNZ	L929	CL-B5 (DTU VI)	14.9 – 26.8 µM	96h	0.8 ± 0.4 µM	904
Clemente, C. M.; Robledo, S.M.; Ravetti, S. (2022)	Carbonatos de mentol	U-937	Tulahuen (DTU VI)	*	72h	60.1 ± 12.2 µM	12,8

**Pauli, I.; Rezende, C.O.;
Slafer, B. W.; et al (2022)**

Derivados de
benzimidazol

HFF-1

Tulahuen (DTU VI)

*

120h

1.45 ± 0.4 µM

> 33

**Velásquez, A. M. A.;
Ribeiro, W. C.; Venn, V.;
et al. (2017)**

Composto ciclopaladado
binuclear

Macrófagos¹

Y (DTU II)

0.5 – 100 µM

24h

5.3 ± 1.4 µM

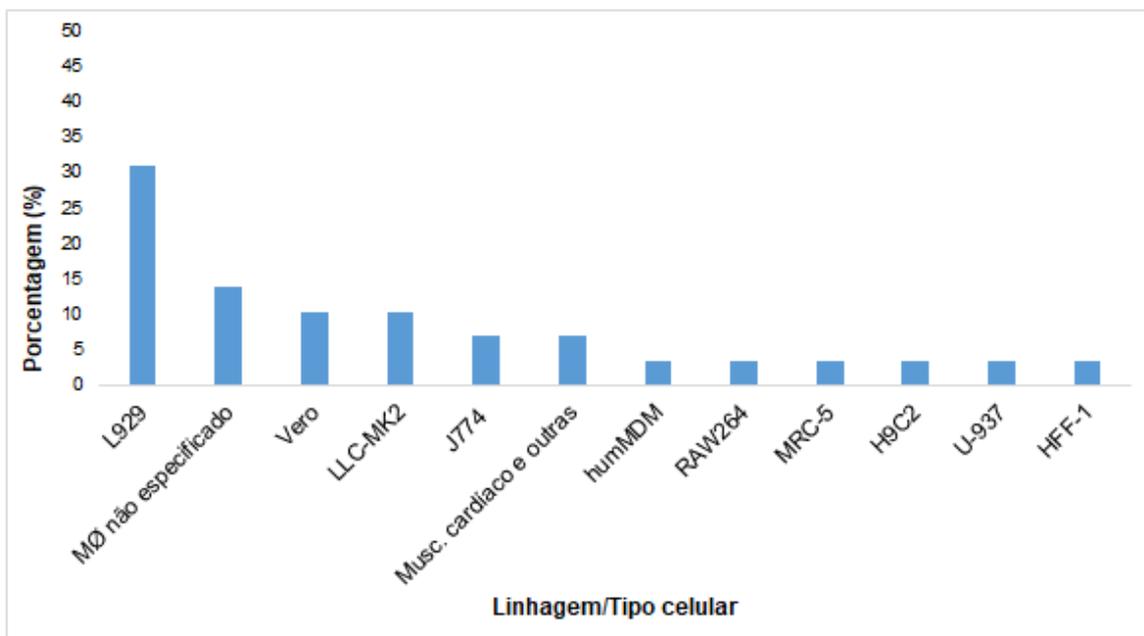
187.2

* Informação não encontrada

¹ Não especificado

Ao interpretar os resultados, observou-se a utilização de 12 linhagens celulares diferentes, as quais estão descritas no gráfico 1. Foi possível observar a linhagem L929 (fibroblastos murinos) como a mais utilizada pelos autores e presente em 31,03% dos estudos considerados. Em sequência, macrófagos também foram frequentemente utilizados nos estudos, sendo a linhagem J774 utilizada em dois artigos (6,89%), a linhagem humMDM, assim como a RAW264.7, citadas em um artigo (3,44%) e quatro estudos (13,79%) não especificaram qual a linhagem de macrófago utilizada. As células epiteliais renais de macaco verde africano (Vero) e de macaco Rhesus (LLC-MK2) estiveram presentes em 10,34% dos estudos, respectivamente. Células do músculo cardíaco sem origem especificada foram utilizadas em dois artigos, juntamente com outras linhagens celulares, sendo essas linhagens: Vero (3,44%), e células L929 e Macrófagos não especificados (3,44%). Por fim, as células de tecido pulmonar humano MRC-5_{SV2}, bem como células de músculo cardíaco de rato H9C2, a linhagem monocítica humana U-937 e as células de fibroblasto de prepúcio humano HFF-1, foram utilizadas em apenas um estudo e artigo representa 3,44% do total. Tais resultados podem ser observados no gráfico 1 abaixo:

Gráfico 1: Linhagens celulares



O *T. cruzi* é um parasito que apresenta capacidade de infecção em diversos tipos de células, portanto, a escolha da célula hospedeira em um ensaio *in vitro* normalmente está relacionada à facilidade de uso levando-se em consideração o estabelecimento, a manutenção e a detecção quantitativa da infecção pelo parasito (CHATELAIN; IOSET, 2018). Cardiomiócitos são frequentemente utilizados em experimentos *in vitro* devido à patogênese da doença, mas esse dogma tem sido alterado após a demonstração do tropismo do parasito por células nervosas e por células do sistema endotelial (ROMANHA et al., 2010; DURANREHBEIN et al., 2014). Após a realização de uma revisão da literatura, Duran-Rehbein e colaboradores (2014) concluíram que a linhagem celular mais utilizada pelos pesquisadores em ensaios *in vitro* é a Vero, as quais são células epiteliais, seguida pela HUVEC, células endoteliais da veia umbilical humana (DURANREHBEIN et al., 2014). Esses dados corroboram com o fato de que os cardiomiócitos não são mais a primeira escolha de linhagem celular entre os pesquisadores, e o tropismo do *T. cruzi* é um fator que deve ser levado em consideração durante os testes *in vitro*.

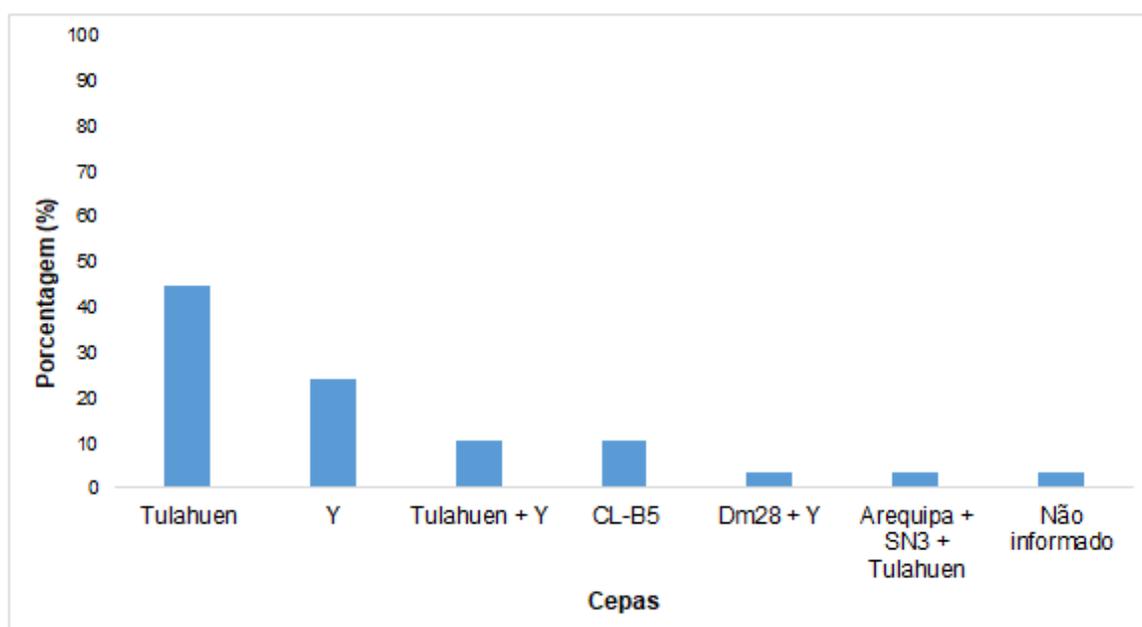
Romanha e colaboradores (2010) recomendaram protocolos *in vitro* e *in vivo* para triagem de fármacos, com o objetivo de aprimorar a harmonização desses. Foi sugerida a utilização de linhagens celulares como Vero (células epiteliais renais de macaco verde africano), HeLa (célula derivada de câncer cervical humano), L929 (fibroblastos de camundongos) e L6 (músculo esquelético de camundongo) para *screening* de novos fármacos ou compostos tripanocidas (ROMANHA et al., 2010). Os dados encontrados estão de acordo com a literatura, pois 41,37% dos estudos considerados utilizaram uma das linhagens celulares recomendadas por Romanha e colaboradores, sendo essas: Vero ou L929.

Em contrapartida, Lewis et al (2014) demonstrou que durante a fase crônica da DC, o TGI é o único local em que o *T. cruzi* permanece de forma persistente (LEWIS et al., 2014). Mais tarde, Ward e colaboradores (2020), a partir de experimentos com bioluminescência e imagens confocais, demonstrou que os locais de persistência do parasito durante a infecção crônica em camundongos englobam células musculares lisas na camada muscular circular do cólon, células musculares esqueléticas e a pele (WARD et al., 2020). Esses dados nos levam a questionar a recomendação de Romanha e colaboradores,

bem como escolha dos autores com relação às linhagens celulares utilizadas nos ensaios *in vitro*, uma vez que essas células em grande maioria não correspondem aos reservatórios do *T. cruzi* em fase crônica em humanos.

Com relação à cepa do parasito utilizada, observou-se a utilização de 6 cepas distintas, as quais estão descritas no gráfico 2. Dos artigos selecionados, 44,82% utilizaram a cepa Tulahuen, e 24,13% selecionaram a cepa Y. Três artigos utilizaram tanto a cepa Tulahuen quanto a Y durante o mesmo estudo, e outros três artigos citaram a utilização da cepa CL-B5, os quais equivalem a 10,34%, respectivamente. Um estudo utilizou a cepa Dm28 em associação com a Y (3,44%), e outro artigo citou o uso das cepas Arequipa e SN3 juntamente com a Tulahuen (3,44%). Por fim, um artigo não informou qual a cepa utilizada.

Gráfico 2: Cepas do *Trypanosoma cruzi*



De acordo com os resultados, a maioria dos protocolos de triagem utiliza cepas pertencentes ao TcII (por exemplo, Y) ou TcVI (por exemplo, Tulahuen e CL-B5) os quais estão frequentemente associados à infecções crônicas que causam cardiomiopatia e megasíndromes em pacientes (ZINGALES et al., 2012). Além disso, Cunha et al (2022) a partir de uma revisão sistemática concluiu que o TcII é o DTU mais encontrado nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, enquanto na região Norte do país, o principal DTU associado às infecções humanas foi o TcIV (DA CUNHA et al., 2022). Já o TcI foi constatado presente em apenas 25,2% das infecções (DA CUNHA et al., 2022). Por outro lado, a atual epidemiologia do *T. cruzi*, bem como as

implicações clínicas dos DTUs na DC demonstraram que TcI é o DTU mais comumente associado à fase aguda da doença, e frequentemente encontrado em pacientes crônicos com cardiomiopatia dos países do norte da América do Sul, bem como em indivíduos imunocomprometidos com reativação da doença (ZINGALES et al., 2012).

A partir de resultados do estudo de Moraes et al. (2014), o qual compara a susceptibilidade de cinco cepas de *T. cruzi* pertencentes à diferentes DTUs, concluiu-se que as cepas mais infectantes e com crescimento mais rápido foram associadas à perfis de sensibilidade mais baixos com base em medições de CI_{50} , sugerindo-se que cepas de crescimento rápido requerem maiores concentrações de compostos para inibir seu crescimento (MORAES et al., 2014). Sabe-se que as cepas Tulahuen e Y, as cepas mais utilizadas pelos pesquisadores de acordo com os resultados encontrados, são sensíveis e parcialmente resistentes ao BNZ, respectivamente (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et al., 1998). Já a CL-Brener, outra cepa também encontrada com frequência nos estudos *in vitro*, apresenta sensibilidade aos atuais compostos nitroderivados disponíveis (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et al., 1998). Os dados encontrados corroboram com a literatura, visto que os valores encontrados de CI_{50} do BNZ para a cepa Tulahuen variaram entre 1,1 e 10 μ M, destacando-se apenas um estudo no qual o valor de CI_{50} encontrado foi discrepante ($60.1 \pm 12.2 \mu$ M). Já os estudos que utilizaram a cepa Y em seu protocolo, obtiveram uma variação de valor de CI_{50} entre 5,3 e 25 μ M.

Durante a análise dos resultados, observou-se que 48,27% dos autores não informou a concentração de BNZ utilizada durante o ensaio *in vitro*. Dentre os estudos que apresentaram valores para esse parâmetro, observou-se uma considerável variação entre 0,1 μ M e 200 μ M. Além disso, observou-se que a maioria dos autores utilizou um tempo de incubação com o BNZ equivalente à 72 horas (37,93%) ou à 96 horas (20,68%). Dentre os estudos selecionados, também se observou um tempo de incubação de 48 horas (6,89%) e de 24 horas (10,34%). Dois artigos utilizaram diferentes tempos de incubação durante o estudo, sendo 96h e 48h (6,89%), enquanto um artigo realizou a incubação por 96h e 48h simultaneamente (3,44%). Três autores citaram o tempo de incubação superior à 96h, dentre os quais dois estudos utilizaram 168 horas

(6,89%) e um incubou o fármaco por 120 horas (3,44%). Apenas um estudo realizou 10 horas de incubação, representando 3,44% do total.

De acordo com Romanha e colaboradores (2010), o tempo ideal de tratamento das células infectadas com BNZ é equivalente à 96 horas (ROMANHA et al., 2010). Foi possível observar que a maioria dos autores (58,60%) realizou um estudo com tempo de incubação com o fármaco inferior em relação ao tempo recomendado, e, 10,33% dos estudos citou um tempo de incubação superior.

Para os parâmetros de CI_{50} e IS, os quais medem a dose capaz de eliminar 50% do agente etiológico e o quanto o composto é ativo contra o parasito sem causar danos às células de mamíferos, respectivamente, observou-se que os autores obtiveram uma grande variabilidade de resultados, os quais apresentaram valores entre 0,8 μ M e 60,1 μ M para CI_{50} , e entre 5 e 904 para IS. Cinco estudos (16,66%) não apresentaram pelo menos um dos dois parâmetros citados acima.

Romanha e colaboradores (2010) propuseram ponto de corte no fluxo de screening baseado no valor de CI_{50} do BNZ, o qual assumiram ser 3,8 μ M (ROMANHA et al., 2010). Em recente revisão da literatura, Bonilha et al identificaram que a faixa de valores de CI_{50} do BNZ sobre formas intracelulares em estudos *in vitro* varia de 3,73 μ M a 48,4 μ M, levando-se em consideração o tipo de célula hospedeira, a cepa do parasito, o tempo de infecção, o tempo de incubação com os fármacos e a técnica de quantificação utilizada (BONILHA, 2021). Entretanto, neste estudo foi observado que o CI_{50} variou de 0,8 μ M a 60,1 μ M, fato que evidencia a necessidade de padronização de testes *in vitro*, visto que, pode-se observar uma grande variedade de tipos celulares e cepas de *T.cruzi* utilizadas, dentre outras variáveis experimentais que interferem diretamente nos resultados encontrados pelos autores (CHATELAIN, 2015).

Por fim, sabe-se que o IS é determinado com base na razão do valor do CI_{50} da célula hospedeira pelo valor do CI_{50} do parasito, e apenas os compostos que atingem um valor de IS superior a 50 são considerados para a próxima etapa (NWAKA; HUDSON, 2006). Ao analisar os estudos, 48,27% encontraram um valor de IS para BNZ superior a 50, demonstrando que em mais da metade das triagens *in vitro*, o fármaco referência não seria viável para posteriores testes *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dessa revisão bibliográfica narrativa demonstram que há uma alta heterogeneidade nos experimentos de *screening* de produtos naturais, sintéticos e mesmo naqueles que avaliaram o fármaco de referência. Portanto, essas constatações evidenciam que é necessária a harmonização de protocolos utilizados pelos grupos de pesquisa na área, de forma a obter-se estratégias experimentais de maior valor translacional, otimizando-se tempo e recursos na busca de alternativas terapêuticas para a DC. Além disso, ensaios *in vitro* robustos possibilitaria a reprodutibilidade dos parâmetros observados para o fármaco de referência, reduziria os fatores que possam interferir na seleção de candidatos a fármacos no âmbito dos ensaios pré-clínicos e, conseqüentemente, aumentaria o número de compostos a serem testados em fase clínica.

7. REFERÊNCIAS

AMUNÁRRIZ, M.; CHICO, M. E.; GUDERIAN, R. H. Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, n. 03, p. 145-149, 1991.

APT, W. et al. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: The results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 8, p. 733–741, 2005.

BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BOAINAIN, E. Atualização Terapêutica. p. 395–399, 1979.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 141–153, 2018.

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

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

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 215–220, 1999.

DA CUNHA, M. L. M. et al. Distribuição Geográfica de DTUs do *Trypanosoma cruzi* Isolado de Infecções Humanas no Brasil: Revisão Sistemática / Geographical Distribution of DTUs from *Trypanosoma cruzi* Isolated from Human Infections in Brazil: Systematic Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 13334–13348, 2022.

DA SILVA, E. N. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: Our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1780–1798, 2014.

DE NOYA, B. A. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 2010.

DEL-REI, R. P. et al. Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–12, 2019.

- DIAS, E. et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035–1060, 1956.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: Vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 83–84, 2006.
- DIAS, J. C. P. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. November, p. 3–60, 2016a.
- DIAS, J. C. P. et al. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 25, p. 7–86, 2016b.
- DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. [s.l: s.n.].
- DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E. J. Mecanismos alternativos de Transmissão do trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375–379, 2011.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1–27, 1990.
- ELIAS, M. C. Q. B. et al. Transcription rate modulation through the Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79–90, 2001.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.
- FRANCISCO, A. F. et al. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, 2017.
- FREITAS, H. F. G. et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Role of Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 102, n. 2, p. 239–247, 2005.
- JR, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- LAMAS, M. C. et al. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 239–243, 2006.
- LANNES-VIEIRA, J. et al. The centennial of the discovery of chagas disease: Facing the current challenges. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 4–7, 2010.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, 2014.

LISBOA, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 156, n. 3–4, p. 314–318, 2008.

LIU, Q.; ZHOU, X. N. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2015.

MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 263–269, 2009.

MOLINA, I. et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–11, 2014.

MORILLO, C. A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MUÑOZ-CALDERÓN, A. et al. Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 113–122, 2013.

MURTA, S. M. F. et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 203–214, 1998.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Doença de Chagas crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre a alimentação saudável, atividade física e saúde. Disponível em <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 25 de Outubro. 2022.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: A review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, 2013.

PERES, R. B. et al. In vitro phenotypic activity and in silico analysis of natural products from Brazilian biodiversity on *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 1–13, 2021.

RASSI, A.; FERREIRA, H. DE O. Tentativa de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquema de duração prolongada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 5, n. 5, p. 235–262, 1971.

RASSI, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883–889, 2000.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

SALES, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583–588, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SIMÕES, M. V. et al. Chagas Disease Cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173–189, 2018.

TURRENS, J. F. et al. Reductase By Benznidazole and Anthelmintic Imidazole Derivatives. **Elsevier Science B.V.**, v. 82, p. 125–129, 1996.

WARD, A. I. et al. In vivo analysis of *Trypanosoma cruzi* persistence foci at single-cell resolution. **mBio**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2020.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 28–34, 2010.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.