

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA LETÍCIA CAPRONI BONILHA

**IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE
Trypanosoma cruzi NO PROCESSO DE *SCREENING* DE NOVOS FÁRMACOS**

ALFENAS/MG

2021

ANA LETÍCIA CAPRONI BONILHA

**IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE
Trypanosoma cruzi NO PROCESSO DE SCREENING DE NOVOS FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Livia de Figueiredo Diniz

Co-orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

ALFENAS/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Bonilha, Ana Leticia Caproni.
B715i Impacto da utilização de diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* no processo de screening de novos fármacos I / Ana Leticia Caproni Bonilha. – Alfenas/MG, 2021.
75f. : il. --

Orientadora: Livia de Figueiredo Diniz.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Produtos naturais. 3. Própolis. 4. Fungos Endofíticos. 4. Técnicas In Vitro. I. Diniz, Livia de Figueiredo. II. Título.
CDD-616.9363

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis Goiatá
Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

ANA LETÍCIA CAPRONI BONILHA

IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DE *Trypanosoma cruzi* NO PROCESSO DE SCREENING DE NOVOS FÁRMACOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2021.

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Ana Lia Mazzeti
Instituição: Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/RJ

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lia Mazzeti Silva, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 17:16, 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 https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0470243** e o código CRC **DDE19C14**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus Guias pela oportunidade de ter cursado a pós-graduação em uma Universidade pública.

Agradeço a minha família pelo apoio e incentivo, principalmente ao meu pai Nivaldo Bonilha pelo suporte emocional.

Agradeço também aos meus orientadores Livia Diniz e Masaharu Ikegaki pela orientação e pela paciência de sempre.

Agradeço aos colegas do departamento de Patologia e Parasitologia por não deixarem que nenhum dia de trabalho passasse em branco.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

T. cruzi é um parasito que apresenta em seu ciclo de vida diferentes estágios evolutivos e todos podem ser empregados em *screening* de moléculas tripanossomicidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da utilização das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* na determinação da atividade de produtos de origem natural e fármacos sintéticos. O estudo foi feito por meio de duas estratégias: revisão sistemática da literatura e avaliação experimental. A estratégia de busca foi feita de acordo com o PRISMA e incluiu a construção de filtros específicos para recuperação de artigos nas bases *PubMed*, *Web of Science* e *Scopus*. Foram extraídas de cada artigo informações sobre a cepa do parasito, protocolo experimental, fármaco(s) de referência e desfecho *in vivo*, quando aplicável. Foram incluídos na revisão 226 artigos completos. Os resultados mostraram um notável crescimento no número de publicações na última década, comparativamente aos outros períodos. Os resultados indicaram grande heterogeneidade relacionada à utilização de formas evolutivas, cepas do parasito e protocolos para determinação de atividade. Epimastigota foi a forma evolutiva mais frequentemente utilizada nos estudos envolvendo produtos naturais (75%), enquanto para substâncias sintéticas e semissintéticas a utilização das três formas foi similar. Foram identificadas alterações expressivas nos valores de EC-50 entre amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, no entanto, devido à heterogeneidade dos protocolos experimentais utilizados não foi possível mensurar o impacto da utilização de uma ou outra forma no valor translacional do *screening*. Para a avaliação experimental, foram utilizados dois grupos de substâncias: (i) produtos de origem natural que apresentam ou não alguma evidência de atividade anti-*T. cruzi* já relatada (própolis vermelha, a geoprópolis e 11 extratos de fungos endofíticos isolados a partir da planta *Dalbergia ecastaphyllus*); (ii) fármacos que apresentam atividade anti-*T. cruzi* (nitroimidazólicos e azólicos). Após estudo de toxicidade em células Vero, concentrações não tóxicas dos produtos naturais foram utilizadas para o *screening* da atividade tripanossomicida sobre as diferentes formas evolutivas da cepa Y. Não foi detectada atividade anti-epimastigota para nenhum produto de origem natural e azólicos, enquanto para esses mesmos grupos de moléculas níveis máximos de 50% de mortalidade sobre tripomastigotas foram observados. Perfil diferente foi observado para as amastigotas, com percentuais de inibição que variaram de 60% a 90% para as própolis e extratos de fungos endofíticos. Foram avaliadas então curvas dose-efeito sobre amastigotas para três dos extratos de fungos, além das própolis, resultando em valores de EC-50 médios similares (aproximadamente 6 µg/mL), exceto para um dos extratos, cuja EC-50 foi de 9,76±0,89 µg/mL. Em relação às moléculas de referência do grupo dos nitroimidazólicos, o nível de atividade sobre as diferentes formas evolutivas foi similar. Os dados obtidos demonstraram que a forma evolutiva do parasito, pode influenciar no perfil de resposta do parasito ao tratamento. Devido à heterogeneidade de protocolos referidos na literatura, não foi possível inferir sobre o valor translacional dos modelos utilizados na quimioterapia experimental *in vitro*. Nesse sentido, a harmonização das estratégias experimentais é essencial para definir estratégias de *screening* viáveis, reprodutíveis e selecionar de maneira mais assertiva moléculas tripanossomicidas promissoras.

Palavras-chave: doença de Chagas. Produtos naturais. Própolis. Fungos endofíticos. *in vitro*.

ABSTRACT

T. cruzi is a parasite that presents different evolutionary stages in its life cycle and all can be used in screening for trypanosomal molecules. The objective of this work was to evaluate the impact of the use of different evolutionary forms of *T. cruzi* in determining the activity of products of natural origin and synthetic drugs. The study was carried out using two strategies: systematic review of the literature and experimental evaluation. The search strategy was carried out in accordance with PRISMA and included the construction of specific filters for retrieving articles in the *PubMed*, *Web of Science* and *Scopus* databases. Information on the parasite strain, experimental protocol, reference drug(s) and in vivo outcome, when applicable, was extracted from each article. 226 full articles were included in the review. The results showed a notable growth in the number of publications in the last decade, compared to other periods. The results indicated great heterogeneity related to the use of evolutionary forms, strains of the parasite and protocols for determining activity. Epimastigote was the evolutionary form most frequently used in studies involving natural products (75%), while for synthetic and semi-synthetic substances the use of the three forms was similar. Significant changes in the EC-50 values were identified among amastigotes, epimastigotes and trypomastigotes, however, due to the heterogeneity of the experimental protocols used, it was not possible to measure the impact of using one or the other way on the translational value of the screening. For the experimental evaluation, two groups of substances were used: (i) products of natural origin that present or not some evidence of anti-*T. cruzi* activity already reported (red propolis, geopropolis and 11 extracts of endophytic fungi isolated from the *Dalbergia ecastaphyllus* plant); (ii) drugs that have anti-*T. cruzi* activity (nitroimidazoles and azoles). After studying toxicity in Vero cells, non-toxic concentrations of natural products were used to screen for trypanosomicidal activity on the different evolutionary forms of strain Y. No anti-epimastigote activity was detected for any products of natural origin and azoles, while for these same groups of molecules maximum levels of 50% mortality on trypomastigotes were observed. A different profile was observed for amastigotes, with percentages of inhibition ranging from 60% to 90% for propolis and extracts of endophytic fungi. Dose-effect curves were then evaluated on amastigotes for three of the fungi extracts, in addition to the propolis, resulting in similar mean EC-50 values (approximately 6 $\mu\text{g} / \text{mL}$), except for one of the extracts, whose EC-50 was $9,76 \pm 0.89 \mu\text{g} / \text{mL}$. Regarding the reference molecules of the nitroimidazole group, the level of activity on the different evolutionary forms was similar. The data obtained demonstrated that the evolutionary form of the parasite can influence the response profile of the parasite to treatment. Due to the heterogeneity of protocols referred to in the literature, it was not possible to infer about the translational value of the models used in experimental in vitro chemotherapy. In this sense, the harmonization of experimental strategies is essential to define viable, reproducible screening strategies and select promising trypanosomicidal molecules more assertively.

Keywords: Chagas disease. Natural products. Propolis. Endophytic fungi. in vitro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama de fluxo dos resultados da pesquisa de revisão sistemática da literatura. Baseado no PRISMA statement “ <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>	33
Figura 2 - Número de estudos envolvendo avaliação <i>in vitro</i> de novas moléculas tripanossomicidas no período de 1980 a 2020.....	35
Figura 3 - Frequência de utilização das diferentes formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> em avaliações de atividade tripanossomicida <i>in vitro</i>	37
Figura 4 - Cepas e clones de <i>T. cruzi</i> utilizados nos estudos contidos na revisão sistemática.....	41
Figura 5 - Substâncias que demonstraram toxicidade a células de mamíferos.....	46
Figura 6 - Resultados do ensaio com epimastigotas.....	49
Figura 7 - Porcentagem de mortalidade do parasito na forma tripomastigota.....	50
Figura 8 - Porcentagem de inibição da infecção por formas amastigotas.....	51
Figura 9 - Curvas de dose-resposta em amastigotas.....	52
Figura 10 - Comparação entre a atividade de moléculas sintéticas e produtos naturais em <i>T. cruzi</i>	54

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Fármacos e reagentes	26
Tabela 1 - Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados nas bases de dados PubMed-Medline	22
Tabela 2 - Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados na base de dados Scopus	23
Tabela 3 - Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados na base de dados Web of Science	24
Tabela 4 - Fungos endofíticos e seus códigos	27
Tabela 5 - Utilização global das diferentes formas evolutivas em experimentos de atividade tripanossomicida <i>in vitro</i>	38
Tabela 6 - Valores de EC-50 das substâncias teste e referência comparativamente identificados para as diferentes formas evolutivas	39
Tabela 7 - Resultados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de estudos selecionados	44
Tabela 8 - Resultados do experimento de EC-50 das substâncias nº4, nº5, nº9, própolis vermelha e geoprópolis	53

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	JUSTIFICATIVA	13
2.2	OBJETIVOS	14
2.2.1	Objetivo geral:	14
2.2.2	Objetivos específicos:	14
2.3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.3.1	Doença de chagas	14
2.3.2	Biologia do protozoário	15
2.3.3	Manifestações clínicas da infecção	16
2.3.4	Tratamento	16
2.3.5	Produtos naturais e o desenvolvimento farmacológico	18
2.3.5.1	Fungos endofíticos	18
2.3.5.2	Própolis Vermelha.....	19
2.3.5.3	Geoprópolis	20
2.3.6	Modelos experimentais para avaliação de novas moléculas anti- <i>t. cruzi</i>	21
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.4.1	Revisão sistemática	22
2.4.1.1	Estratégia de busca	22
2.4.1.2	Avaliação dos registros elegíveis.....	24
2.4.1.3	Extração dos dados e síntese.....	25
2.4.1.4	Análise	25
2.4.2	Avaliação experimental	25
2.4.2.1	Parasito e células hospedeiras.....	25
2.4.2.2	Fármacos, reagentes e produtos de origem natural utilizados	26
2.4.3	Produtos naturais utilizados	26
2.4.4	Obtenção do parasito	27
2.4.4.1	Epimastigotas.....	27
2.4.4.2	Tripomastigotas	28
2.4.5	Ensaio de citotoxicidade	28
2.4.6	Ensaio de atividade anti- <i>t. cruzi</i>	29
2.4.6.1	Ensaio com epimastigotas	29

2.4.6.2	Ensaio com tripomastigotas	29
2.4.6.3	Ensaio com amastigotas	30
2.4.6.4	Ensaio de curva de dose-resposta e EC-50	31
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.5.1	Revisão sistemática da literatura	32
2.5.2	Estudo experimental	46
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A	64

1 INTRODUÇÃO

T. cruzi é um parasito intracelular obrigatório que infecta diversos tipos celulares de mamíferos e apresenta alta heterogeneidade genética e biológica. Ainda, o parasito apresenta em seu ciclo de vida diferentes formas evolutivas (amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas), as quais são utilizadas na avaliação de novas terapias, resultando em múltiplas possibilidades de modelos para avaliação experimental (revisto por FONSECA-BERZAL *et al.*, 2018). Considerando a relevância da forma amastigota intracelular no desenvolvimento das lesões teciduais do hospedeiro, é esperado que um candidato a fármaco tenha ação efetiva contra esta forma evolutiva (ROMANHA *et al.*, 2010); no entanto, não está claro quão diferente é a resposta comparativamente às formas extracelulares. Definições claras sobre o impacto da forma evolutiva do parasito nos resultados obtidos no *screening* de moléculas são necessárias, visto que os resultados dessas análises direcionam os estudos de produtos naturais, bem como a síntese de *hits* e protótipos de fármacos (KATSUNO *et al.*, 2015).

O benznidazol, medicamento de referência para o tratamento da doença de Chagas, não é efetivo em induzir cura na fase crônica da infecção. Ainda, induz muitas reações adversas que, por vezes, motivam a descontinuação do tratamento (KRATZ *et al.*, 2018). Nos últimos anos, muitos estudos com o objetivo de buscar alternativas terapêuticas para a parasitose foram desenvolvidos. Novas moléculas, incluindo produtos de origem natural e obtidos por síntese, bem como estratégias de tratamento promissoras, como reposicionamento e combinação de fármacos, foram avaliadas em estudos pré-clínicos (Villalta *et al.*, 2019). Notável progresso foi também realizado no âmbito das metodologias utilizadas para *screening* de novas moléculas tripanossomicidas (CHATELAIN, 2017). No entanto, não tem sido observada boa correlação entre os resultados *in vitro/in vivo* e experimentais/clínicos, demonstrando a necessidade de rever os modelos experimentais utilizados e sistematizar os achados na tentativa de orientar estratégias de maior valor preditivo (SYKES E AVERY, 2018; CHATELAIN, E., 2015; 2017).

Os produtos de origem natural (CRAIG E NEWMAN, 2020) apresentam grande participação no desenvolvimento farmacológico, incluindo doenças parasitárias (DIAS *et al.*, 2009). A importância desses produtos é devida a sua alta diversidade química e semelhança com os alvos estruturais de muitas espécies de patógenos (HARVEY *et al.*, 2007). Dentre os produtos naturais utilizados no âmbito farmacêutico, estão as própolis, substâncias produzidas

por abelhas e apresentam atividades antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, dentre outras (FRANCHIN *et al.*, 2016). Outro interessante grupo de bioprodutos são os micro-organismos endofíticos, um campo ainda emergente. Estes endófitos, neste caso os fungos, colonizam plantas em uma relação simbiótica resultando na sua proteção contra patógenos, além de haver produção de enzimas, alcaloides e antibióticos (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002). Muitos avanços vêm sendo feitos nos estudos sobre estes organismos, visto que muitos produzem compostos de interesse farmacêutico, como antibióticos e imunossupressores (STROBEL *et al.*, 2018). Enquanto bioprodutos obtidos de fungos endofíticos apresentam estudos ainda muito incipientes no campo da doença de Chagas (LENZI *et al.*, 2018), as própolis apresentam potencial já demonstrado na literatura (FROZZA *et al.*, 2013; DANTAS SILVA *et al.*, 2017), evidenciando a importância de avaliar a atividade tripanossomicida desses produtos naturais.

Portanto, no presente estudo foram utilizadas duas estratégias para explorar o impacto da utilização das diferentes formas evolutiva do parasito no desfecho da avaliação de atividade tripanossomicida de moléculas *in vitro*. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura e posteriormente exploradas, em estudo experimental, as atividades tripanossomicidas de bioprodutos - extratos advindos de micro-organismos endófitos, própolis vermelha e geoprópolis, comparativamente à atividade de fármacos sintéticos com conhecida atividade anti- *T. cruzi*, sobre as diferentes formas evolutivas do parasito.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 JUSTIFICATIVA

No fluxo racional de *screening*, a eficácia anti- *T. cruzi* de novas moléculas pode ser inicialmente determinada em ensaios *in vitro*, os quais constituem uma etapa chave na determinação da susceptibilidade do parasito às substâncias ou bioprodutos, antes de prosseguirem para avaliações *in vivo*. A ausência de modelos e protocolos *in vitro* bem validados tem, portanto, impacto direto no processo de desenvolvimento farmacológico e esse pode ser um dos fatores que contribuem para a falta de correlação entre dados *in vitro/in vivo* na quimioterapia da doença de Chagas (CHATELAIN, 2017). Particularmente desafiador é o *screening* anti- *T. cruzi* de produtos naturais, visto que nesse caso somam-se à variabilidade dos protocolos de triagem a variabilidade das moléculas inerente a métodos de extração e sazonalidade. Neste contexto, os modelos experimentais de avaliação anti- *T. cruzi in vitro* e *in vivo* têm sido revisitados (FRANCO *et al.*, 2019; SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018; MACLEAN *et al.*, 2018; CHATELAIN, 2015, 2017; CAL *et al.*, 2016;). No entanto, a influência da forma evolutiva do parasito no processo de *screening* de bioativos e fármacos tem sido escassamente discutida. Acreditamos que o primeiro passo para uma melhor compreensão e melhoria dos modelos de avaliação *in vitro* em quimioterapia experimental da doença de Chagas é a geração de dados sistematizados obtidos a partir da literatura relacionada ao *screening in vitro* de novas moléculas tripanossomicidas e os seus desfechos *in vivo*. A análise desses dados, paralelamente àqueles de moléculas que já apresentam dados de eficácia anti- *T. cruzi* pré-clínicos e clínicos, pode fornecer subsídios para o estabelecimento de estratégias de avaliação mais assertivas no processo de identificação de potenciais fármacos. Levando em conta esses antecedentes, no presente estudo foi construída uma revisão sistemática da literatura sobre *screening in vitro* de moléculas tripanossomicidas e determinada experimentalmente *in vitro* a influência da forma evolutiva do parasito na atividade de produtos naturais promissores paralelamente a fármacos-referência.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral:

Estudar a influência da utilização de diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* na determinação da atividade antiparasitária de moléculas sintéticas e produtos de origem natural *in vitro*.

2.2.2 Objetivos específicos:

- Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre avaliação *in vitro* da atividade tripanossomicida de produtos de origem natural e substâncias sintéticas;
- Identificar, nos estudos incluídos na revisão, as estratégias de *screening* (forma evolutiva, cepa do parasito, protocolo experimental) mais frequentemente utilizados e sua relação com o desfecho dos estudos *in vivo*;
- Determinar a toxicidade dos produtos de origem natural geoprópolis, própolis vermelha e extratos de fungos endofíticos para células de mamíferos;
- Avaliar o potencial tripanossomicida dos produtos de origem natural comparativamente sobre as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota da cepa Y de *T. cruzi*;
- Identificar a influência da forma evolutiva do parasito na atividade dos produtos naturais e de fármacos com atividade anti-*T. cruzi* já estabelecida e que apresentam diferentes mecanismos de ação.

2.3 REFERENCIAL TEÓRICO

2.3.1 Doença de chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *T. cruzi*, é um importante problema médico e social que afeta a cerca de 8 milhões de pessoas (WHO, 2015; 2017). No Brasil, apesar dos avanços no controle da transmissão, a doença de Chagas foi responsável por 76.7% de todas

as mortes causadas por doenças tropicais negligenciadas no período de 2000 a 2011 (COSTA DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

A parasitose encontra-se na lista das 20 Doenças Tropicais Negligenciadas, sendo endêmica em vários países da América Latina; nesses locais, onde a principal forma de transmissão se dá por via vetorial, estimam-se 7000 mortes a cada ano resultantes da infecção pelo parasito (WHO 2015; 2017). Devido à migração populacional, a doença atinge ainda países considerados não endêmicos, como EUA e Japão, e onde a transmissão do parasito ocorre pelas vias congênita, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos (GASCÓN *et al.* 2010).

2.3.2 **Biologia do protozoário**

O agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário que apresenta três formas evolutivas principais, sendo elas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas (LENZI *et al.*, 1996). A forma epimastigota é encontrada dentro do vetor, e passa pelo processo de metaciclogênese, afim de se transformar na forma tripomastigota, que é a forma infecciosa para o hospedeiro vertebrado. O protozoário *T. cruzi* é normalmente transmitido, na forma tripomastigota metacíclica, através de excretas de triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, quando estes insetos vetores estão exercendo sua alimentação hematófaga em hospedeiros vertebrados (JANSEN *et al.*, 2015).

O protozoário possui a capacidade de parasitar diferentes células nucleadas em vários hospedeiros mamíferos (LENZI *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.*, 2009). A replicação ocorre em meio intracelular; após a infecção pela forma tripomastigota, no interior das células, há a diferenciação em forma amastigota, sendo esta a forma de replicação (LEY *et al.*, 1990). As formas amastigotas se replicam através de fissão binária, e posteriormente se diferenciam novamente em formas flageladas, denominadas tripomastigotas sanguíneas, que rompem a membrana da célula parasitada para disseminar-se (FERNANDES *et al.*, 1999). A capacidade de infectar qualquer célula de mamífero nucleada, unida às diferentes formas de transmissão, revelam um alto poder de sobrevivência do *T. cruzi* na natureza, além de sua plasticidade biológica (KEESING *et al.*, 2012).

Além da via vetorial, o parasito pode ser transmitido por transfusão sanguínea. Esse tipo de transmissão ocorre por causa da condição assintomática da maioria dos pacientes infectados (ANGHEBEN *et al.*, 2015). Outra forma de transmissão de relevância

epidemiológica é a transmissão congênita. O risco deste tipo de transmissão é regido por diversos fatores, como o nível de parasitemia da gestante e sua resposta imunológica diante do parasito (TORRICO *et al.*, 2015). Nos últimos anos, foram descritos surtos de doença de Chagas devido à ingestão de formas tripomastigotas presentes em bebidas como caldo de cana-de-açúcar e açaí. A contaminação destes alimentos se dá através do esmagamento dos insetos vetores durante a preparação, onde suas fezes contendo a forma infectante são misturadas ao alimento, e então, ingeridas (FILIGHEDDU *et al.*, 2017). O açaí é uma palmeira amazônica que pode ser infestadas por vetores de *T.cruzi*. De 2007 a 2016 a extração de açaí no Brasil aumentou em 99,57%. O aumento na produção do açaí deve ocorrer sob medidas de higiene, branqueamento, pasteurização, para que haja o processo de descontaminação do produto (FUJITA *et al.*, 2019).

2.3.3 Manifestações clínicas da infecção

As fases de manifestação da doença dividem-se em fase aguda e fase crônica. A primeira pode dar sinais após sete dias da infecção, na maioria dos casos sendo assintomática, mas podendo ser assintomática ou oligossintomática (RASSI JR *et al.*, 2010). Podem ser observados o chagoma de inoculação e também o sinal de Romana, sinais de porta de entrada do parasito, caso a infecção tenha ocorrido através de forma vetorial (STEVERDING, 2014). Na ausência de tratamento, a infecção evolui para a fase crônica, com ausência de manifestações clínicas na maioria dos casos. Estima-se que 30 a 40% dos pacientes infectados evoluem para a doença crônica sintomática, que corresponde à forma cardíaca, digestiva, como megacólon ou megaesôfago ou cardiodigestiva (TARLETON *et al.*, 2003).

2.3.4 Tratamento

Há apenas dois medicamentos utilizados para o tratamento da doença, o benznidazol e o nifurtimox. Grandes empresas farmacêuticas não obterão lucro com medicamentos para doenças negligenciadas, portanto essa é uma das razões que explicam porque décadas se passaram e ainda são usados os mesmos medicamentos, cuja eficácia ainda é discutida (CHAO *et al.*, 2020). Ambos apresentam ótimos resultados durante a fase aguda, porém essa

eficácia vai decaindo com o avanço da doença (COURA E BORGES-PEREIRA, 2012), chegando a níveis máximos de cura de 20% na fase crônica tardia (KRATZ *et al.*, 2018).

O nifurtimox foi o primeiro tratamento para a doença de Chagas, tendo os testes clínicos iniciados no ano de 1965. Na fase aguda este fármaco atinge de 88 a 100% de eficácia, enquanto o tratamento experimental na fase crônica pode atingir apenas 8% de eficácia (PACKCHANIAN, 1952; BRENER, 1961; RASSI *et al.*, 2010; COURA E DE CASTRO, 2002; STREIGER *et al.*, 2004). Os efeitos adversos mais comuns são perda de peso, parestesia, anorexia, reações psíquicas, náuseas, vômito e outros sintomas intestinais. É comprovado que o tratamento com nifurtimox induz maior número de efeitos adversos comparado ao tratamento com benznidazol, mesmo que o tratamento seja realizado em baixas doses. Devido à esses efeitos, principalmente aos intestinais, a descontinuação do tratamento atinge altos números (COURA *et al.*, 1997).

O benznidazol é o fármaco de primeira escolha não só no Brasil, como também em outros países. Ele apresenta atividade tripanocida através da produção de metabólitos reativos, sendo ativado através de enzimas presentes em protozoários, as nitroreduases (DO CAMPO E MORENO, 1984; WILKINSON E KELLY, 2009; PATTERSON E WYLLIE, 2014; KEENAN E CHAPLIN, 2015). Com relação aos efeitos em avaliações experimentais, o benznidazol apresenta bom efeito tripanossomicida *in vitro*, porém a capacidade de *T. cruzi* de resistir aos fármacos tripanocidas pode ter relação com a capacidade de dormência do parasito quando este está na forma amastigota; esse tipo de reação coloca em xeque os métodos atuais de tratamento e sugere terapias alternativas (SÁNCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2018). Em modelos *in vivo*, os resultados apontaram que o fármaco pode ser benéfico nos dois estágios da doença, porém sua eficácia depende do perfil de susceptibilidade da cepa do parasito (POLAK E RICHLE, 1978; FILARDI E BRENER, 1987; NEAL E VAN BUEREN, 1988; CANAVACI *et al.*, 2010; TESTON *et al.*, 2013; FDA, 2017). Já os estudos clínicos mostram que o fármaco, apesar de eficaz na fase aguda da doença, resulta em falha terapêutica em até 80% dos pacientes na fase crônica (MOLINA E MOLINA, 2018; KRATZ *et al.*, 2018).

Diversos achados sobre o perfil toxicológico do benznidazol demonstraram preocupações, como teratogenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade (DE TORANZO *et al.*, 1984; FERREIRA E FERREIRA *et al.*, 1986; TEIXEIRA *et al.*, 1994; FDA, 2017; KRATZ *et al.*, 2018). A descontinuação do tratamento com o benznidazol ocorre por conta das reações adversas que podem surgir, principalmente náuseas, vômito e alergias cutâneas,

sendo a ultimo o mais comum (VILLAR *et al.*, 2014; SPERANDIO DA SILVA *et al.*, 2017; KRATZ *et al.*, 2018).

2.3.5 Produtos naturais e o desenvolvimento farmacológico

Como forma alternativa no tratamento de diversas enfermidades, a fitoterapia tem ganhado cenário. Esta consiste na utilização de plantas, as quais produzem metabólitos secundários, os chamados fitoquímicos, que consistem em princípios ativos com finalidades terapêuticas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial recorre ou já recorreu ao uso de fitoterápicos e a medicina herbal é reconhecida oficialmente pela OMS (SHAKYA, 2016).

Produtos naturais de origem vegetal são utilizados como terapia há milênios. Há registros das primeiras utilizações na Mesopotâmia (2600 a.C), no Egito (2900 a.C) e principalmente na Medicina Tradicional Chinesa (PATWARDHAN, 2005) e algumas plantas medicinais apresentam atividade antiparasitária conhecida (WINK, 2012).

Além das plantas, os produtos naturais incluem compostos advindos de outras fontes naturais, como animais e micro-organismos, sendo estes providos de atividades biológicas. Os fungos vêm sendo outro grupo de organismos também bastante utilizados para obtenção de metabólitos secundários que potencialmente podem ser utilizados no tratamento antiparasitário, incluindo *T. cruzi*, de acordo com os estudos de Lenzi *et al.* (2018).

Outro produto natural de que é formado de uma complexa mistura de constituintes bioativos é a própolis. Nas últimas décadas, um crescente número de estudos tem avaliado a composição química e uso terapêutico desse produto natural obtido através de abelhas, incluindo estudos de atividade antiparasitária e tripanossomicida (DE CASTRO *et al.*, 2001; FROZZA *et al.*, 2013; DANTAS SILVA *et al.*, 2017).

2.3.5.1 Fungos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos consistem em fungos e bactérias que estão localizados no interior das plantas, não causando danos a estas. A entrada destes micro-organismos nas plantas se dá através dos estômatos, sementes ou lesões causadas por insetos.

Uma vez dentro da planta hospedeira, os endófitos se disseminam através dos tecidos e estabelecem a colonização (AZEVEDO, 1998).

Os metabólitos secundários advindos de fungos possuem várias formas estruturais, sendo uma promissora fonte de produtos naturais que possivelmente podem ser aplicados em medicamentos. Os fungos endofíticos localizam-se no interior dos tecidos das plantas, que crescem em diversos ambientes, e para adaptarem-se a esses ambientes, esses fungos produzem os metabólitos (LIU, J. E LIU, G., 2018). Estes metabólicos secundários produzidos pelos endófitos apresentam funções fisiológicas de acordo com a ecologia dos organismos hospedeiros e dependem das condições do ambiente, como temperatura, pH e oxigenação (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; PINTO, 2019).

Os metabólitos secundários dos fungos são um potencial para tratar infecções parasitárias, porém ainda não são bem conhecidos como antiparasitários (MADEIRA DE CARVALHO, 2007). Existem alguns estudos mostrando ação antiparasitária de metabólitos secundários extraídos de microrganismos, como por exemplo a droga ivermectina, produzida pela bactéria *Streptomyces avermitilis*, utilizada contra algumas infecções parasitárias (WINK, 2012; PATRA, 2010), mas são escassas as referências de metabólitos secundários de fungos na infecção por *T. cruzi* (LENZI *et al.*, 2018).

2.3.5.2 Própolis Vermelha

A própolis, produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* é resultado da mistura de cera, saliva e resinas advindas de cascas de árvores. No Brasil, há diferentes tipos de própolis, apresentando cores e substâncias químicas distintas (BANKOVA *et al.*, 2000). Há uma grande diversidade de espécies vegetais utilizada pelas abelhas para a produção da própolis, o que resulta em diversas variações de seus princípios ativos e cores, indo da cor verde, vermelha a até marrom, dependendo do local onde ocorre a extração (PARK *et al.* 2002; BALTAZAR E ALMEIDA- AGUIAR, 2015)

O consumo de própolis é cada vez maior, não só no Brasil, mas no mundo todo; as pesquisas vêm crescendo à cerca das propriedades terapêuticas e composição da própolis, que na medicina alternativa, já apresenta sinais de alto potencial terapêutico, como as atividades

anti-inflamatórias, antivirais, antimicrobianas e antioxidantes (SFORCIN E BANKOVA, 2011).

A própolis vermelha pode ser encontrada no litoral nordestino do Brasil, apresentando alto teor de flavonóides, e estudos comprovam que esta exerce ação antioxidante (FROZZA *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2015) e anti-inflamatória (BUENO- SILVA *et al.*, 2016; FRANCHIN *et al.*, 2017; LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015). Esta variedade de própolis é a segunda mais produzida e utilizada no Brasil, principalmente nos estados da região nordeste. A produção da própolis vermelha acontece com a utilização da planta *Dalbergia ecastaphyllus* (SILVA *et al.*, 2008), pertencente à família fabácea, da qual as abelhas coletam uma resina vermelha, produzida pela planta, para a produção da própolis (SALATINO E SALATINO, 2018).

Higashi e Castro (1994) sugerem que a própolis é um composto altamente ativo contra o parasito *T. cruzi*, inibindo sua proliferação em células hospedeiras ou em meio axênico. Outros estudos também relatam o potencial da própolis vermelha sobre a infecção pelo parasito (DANTAS SILVA *et al.*, 2017).

2.3.5.3 Geoprópolis

A geoprópolis é uma variedade diferente de própolis, consistindo em uma mistura de cera, resina e solo (barro), sendo produzida pelas abelhas da subfamília Meliponini, que não possuem ferrão, como a *Melipona rufiventris*, e são encontradas em regiões subtropicais e tropicais (NATES-PARRA, 2001; BARTH, 2006).

Este diferente tipo de própolis é uma potencial fonte de biocompostos ativos, pois na maioria das amostras estudadas, a composição química desse produto apresenta ácidos fenólicos e terpenos (BANKOVA, 2007; SFORCIN 2017). No Brasil, a geoprópolis é aplicada em tratamentos de doenças respiratórias e dermatológicas, além de apresentar atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, entre outras (FREITAS *et al.*, 2008; SANCHES *et al.* 2017).

Santini (2019) sugere que os compostos fenólicos contidos na geoprópolis são responsáveis pelas atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias do composto. Não há na literatura estudos sobre o efeito da geoprópolis em parasitos. No

entanto, considerando o espectro de atividades já apresentado, é importante estudar o potencial tripanossomicida da geoprópolis.

2.3.6 Modelos experimentais para avaliação de novas moléculas anti- *t. cruzi*

No processo de desenvolvimento farmacológico é necessária a implementação de processos mais eficientes e de menor custo, a fim de que os medicamentos desenvolvidos possam ser oferecidos de forma segura, com eficácia garantida e valores acessíveis. Os incentivos de mercado no ramo de investimentos em novas pesquisas acerca de medicamentos para doenças parasitárias são bastante limitados, portanto há necessidade de focar recursos de forma efetiva (KATSUNO *et al.*, 2015)

Os experimentos *in vitro* são a primeira etapa nos testes de novas moléculas, tornando-se cruciais para o *screening* de moléculas (FONSECA-BERZAL *et al.*, 2018). Com relação à doença de Chagas, estudos *in vitro* são largamente utilizados. No entanto, não há ainda modelos padronizados para *screening* da atividade anti- *T. cruzi* (CHATELAIN, E., 2015), pois faltam procedimentos devidamente bem estabelecidos e também marcadores para a progressão da infecção (ROMANHA *et al.*, 2010). Considerando a relevância das formas amastigotas intracelulares no desenvolvimento das lesões teciduais do hospedeiro, usualmente é preconizado que um candidato a fármaco tenha ação contra esta forma evolutiva (ROMANHA *et al.*, 2010). No entanto, devido a aspectos técnicos, uma enormidade de estudos utiliza as formas extracelulares, tripomastigotas e epimastigotas, como uma primeira forma de triagem antes de prosseguir para as avaliações em amastigotas em ensaios de *screening* de novas moléculas. E não há na literatura publicações que abordem, de forma comparativa, o impacto da utilização das diferentes formas evolutivas na atividade de moléculas obtidas de diferentes origens e com diferentes mecanismos de ação. Neste contexto, o presente estudo busca estudar a influência da forma evolutiva do parasito no processo de *screening* da atividade anti-*T. cruzi* de novas moléculas.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Revisão sistemática

2.4.1.1 Estratégia de busca

A estratégia de busca foi realizada de acordo com o PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) (MOHER *et al.*, 2009). Foi feita a busca direta em três bases de dados eletrônicas: PubMed/MEDLINE, Web of Science e Scopus. Foram incluídos ainda outros artigos considerados relevantes.

Os filtros de busca estruturados foram desenvolvidos para cada base de dados (**Tabela 1**). Todos os estudos relevantes publicados até 22/07/2020 foram recuperados e incluídos na revisão sistemática. Os filtros foram construídos em colaboração com o Prof. Rômulo Dias Novaes e são mostrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados nas bases de dados PubMed-Medline.

<i>PubMed-MEDLINE – Filtros de busca</i>	<i>Resultados</i>
#1 Parasite: (“Chagas disease”[MeSH Terms] OR “ <i>Trypanosoma cruzi</i> ”[MeSH Terms] OR “Chagas disease”[TIAB] OR “American trypanosomiasis”[TIAB] OR “ <i>Trypanosoma cruzi</i> ”[TIAB])	
#2 Evolutionary form: (“trypomastigote*”[TIAB] OR “amastigote*”[TIAB] OR “epimastigote*”[TIAB])	
#3 Treatment: (“Benznidazol*”[TIAB] OR “Benzonidazol*”[TIAB] OR “Nifurtimox”[TIAB])	
#4 Experimental model: (“In Vitro Techniques”[MeSH Terms] OR “ <i>in vitro</i> ”[TIAB])	
#5 Combined search 2: (#1 AND #2 AND #3 AND #4)	233

Pesquisa na base de dados concluída em 22/07/2020 às 14:05.

Fonte: NOVAES, R. D. N., 2020

Tabela 2 - Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados na base de dados Scopus.

SCOPUS – <i>Filtros de busca</i>	<i>Resultados</i>
<p>#1 Disease: (TITLE-ABS-KEY(“Chagas disease”) OR TITLE-ABS-KEY(“American trypanosomiasis”) OR TITLE-ABS-KEY(“Trypanosoma cruzi”))</p>	
<p>#2 Intervention: (TITLE-ABS-KEY(“trypomastigote”) OR TITLE-ABS-KEY(“trypomastigotes”) OR TITLE-ABS-KEY(“amastigote”) OR TITLE-ABS-KEY(“amastigote”) OR TITLE-ABS-KEY(“epimastigote”) OR TITLE-ABS-KEY(“epimastigotes”))</p>	
<p>#3 Treatment: (TITLE-ABS-KEY(“Benznidazol”) OR TITLE-ABS-KEY(“Benznidazole”) OR TITLE-ABS-KEY(“Benzonidazol”) OR TITLE-ABS-KEY(“Benznidazole”) OR TITLE-ABS-KEY(“Nifurtimox”))</p>	
<p>#4 Experimental model: (TITLE-ABS-KEY(“<i>In Vitro</i> Techniques”) OR TITLE-ABS-KEY(“<i>In Vitro</i>”))</p>	
<p>#5 Search limit: AND NOT INDEX (medline)</p>	74
<p>#6 Combined search: #1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5</p>	

Pesquisa na base de dados concluída em 22/07/2020 às 14:08.

Fonte: NOVAES, R. D. N., 2020

Tabela 3 - Estratégia de busca completa com os filtros de busca e número de estudos recuperados na base de dados Web of Science.

WEB OF SCIENCE – Filtros de busca	Resultados
#1 Disease: TS=Chagas disease OR TS= <i>Trypanosoma cruzi</i> OR TS=American trypanosomiasis	
#2 Evolutionary form: TS=trypomastigote OR TS=trypomastigotes OR TS=amastigote OR TS= amastigotes OR TS=epimastigote OR TS=epimastigotes	
#3 Treatment: TS=Benznidazol OR TS=Benznidazole OR TS=Benzonidazol OR TS=Benzonidazole OR TS=Nifurtimox	
#4 Experimental model: TS= <i>In Vitro</i> Techniques OR TS= <i>In Vitro</i>	
#5 Combined search 2: #1 AND #2 AND #3 AND #4	354

Pesquisa na base de dados concluída em 22/07/2020 às 14:10.

Fonte: NOVAES, R. D. N., 2020

2.4.1.2 Avaliação dos registros elegíveis

Todos os registros de pesquisa recuperados na busca das bases de dados foram analisados, e as duplicatas retiradas, considerando os autores, título, periódico e ano de publicação. Após a triagem do título e do resumo, todos os estudos potencialmente relevantes foram avaliados em texto completo para elegibilidade de acordo com critérios específicos de inclusão e exclusão. Apenas estudos investigando a atividade anti- *T. cruzi in vitro* foram incluídos na revisão. Os critérios de exclusão foram (i) nenhum texto completo disponível, (ii) estudos secundários (ou seja, editoriais, comentários e cartas ao editor) e revisões, (iii) relatórios observacionais e epidemiológicos, (iv) estudos que investigaram exclusivamente sistemas *in silico*, *in vivo* e humanos, (v) estudos cujo parâmetro quantitativo de análise não foi identificado, (vi) estudos em outra língua além de português, inglês e espanhol.

2.4.1.3 Extração dos dados e síntese

Os estudos relevantes foram caracterizados nos seguintes níveis: (i) características da publicação: autores e ano de publicação; (ii) características do protocolo experimental: nome da substância teste, classificação em natural ou sintética, cepa do parasito, formas evolutivas avaliadas, tipos celulares hospedeiros, concentração da substância, tempo de infecção (no caso de experimentos com amastigotas intracelulares) previamente à incubação, multiplicidade da infecção (quantos parasitos foram utilizados para infectar cada célula), tempo incubação com a substância, utilização de fármaco de referência; método de detecção (iii) parâmetros quantitativos IC-50, IC-90, CC-50 das substâncias teste e controles. Foi também incluída a informação de realização ou não de experimento *in vivo* com as mesmas substâncias na tentativa de avaliar posteriormente o valor translacional do protocolo.

2.4.1.4 Análise

Considerando a inexistência na literatura de instrumentos para análise de viés para estudos *in vitro*, os dados foram apresentados de forma descritiva e em termos de comparação de percentuais.

2.4.2 Avaliação experimental

2.4.2.1 Parasito e células hospedeiras

Foram utilizadas formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, caracterizada em 1953 por Silva & Nussenzweig. Essa cepa pertence à DTU II (ZINGALES, 2009) e é classificada como parcialmente susceptível ao benznidazol e nifurtimox em modelo murino (FILARDI E BRENER, 1987). Como células hospedeiras foi utilizada a linhagem Vero (ATCC: CCL-81), proveniente de rim de macaco *Rhesus*. As células foram cultivadas utilizando frascos de cultura de 75cm² em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado a 5% com soro fetal bovino e penicilina, mantidas a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂ conforme descrito por Petersen & Burleigh (2003). Foram realizados repiques semanais por meio de tripsinização.

2.4.2.2 Fármacos, reagentes e produtos de origem natural utilizados

Quadro 1: Fármacos e reagentes

Benznidazol (Bz)	2-nitro-imidazole-(N-benzil-2-nitro- imidazoleacetamide), Lafepe, utilizado como fármaco de referência
Ravuconazol (Rav)	([R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4- difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H- 1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4- thiazolyl]benzotrile), utilizado como referência
Posaconazol (Posa)	4-(4-(4-(4-(((3R,5R)-5-(2,4- difluorophenyl)-5-(1,2,4-triazol-1- ylmethyl)oxolan-3- yl)methoxy)phenyl)piperazin-1-yl)phenyl)-2- ((2S,3S)-2-hydroxypentan-3-yl)-1,2,4-triazol-3- one, utilizado como referência
Fexinidazol-Sulfona (SFN)	1-Methyl-2-((4- (methylthio)phenoxy)methyl)-5-nitro-1H- imidazole, utilizado como referência
Resazurina	Sal dissódico (Sigma), utilizada como indicador da proliferação celular.

Fonte: Da autora

2.4.3 Produtos naturais utilizados

Os produtos naturais utilizados foram a própolis vermelha, a geoprópolis e 11 extratos de fungos endofíticos isolados a partir da planta *Dalbergia ecastaphyllus*. Todos os bioativos foram cedidos pelo professor Masaharu Ikegaki e beneficiados no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas, conforme Alencar *et al.* (2007).

Tabela 4 - Fungos endofíticos e seus códigos

Número do extrato	Código
1	P2A1
2	P5B
3	P13B
4	P17D
5	P19E
6	P34B
7	P34C
8	P34D
9	P48D2
10	P48E
11	P51D

Fonte: Da autora

As soluções-estoque dos extratos de fungos, da geoprópolis de *Melipona rufiventris* produzida na cidade de Cabo Verde-MG (Santini, 2019) e própolis vermelha (Bueno-Silva et al., 2017), produzida em Marechal Deodoro-AL, provenientes do Laboratório de Bioprocessos, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em DMSO (Dimetilsulfóxido - Merk), aliquotadas e mantidas a -20°C. Os fármacos de referência também foram preparados em DMSO, aliquotados e armazenados a -20°C nas concentrações de 100mM (benznidazol e fexinidazol-sulfona) e 10mM (posaconazol e ravuconazol).

2.4.4 Obtenção do parasito

2.4.4.1 Epimastigotas

As formas epimastigotas foram obtidas através de hemoculturas, utilizando meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) a partir de sangue de camundongos infectados pela cepa Y e que haviam atingido o pico de parasitemia no oitavo dia de infecção. Após a diferenciação, formas epimastigotas foram mantidas no mesmo meio, por meio de repiques semanais por no máximo 8 passagens sucessivas. As culturas eram observadas em dias alternados para verificação da proliferação dos parasitos e a necessidade de adição de meio LIT.

2.4.4.2 Tripomastigotas

Foram utilizadas formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular, utilizando células Vero como hospedeiras. Monocamadas semiconfluentes foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos retirados de camundongos previamente infectados pela cepa Y e que haviam atingido o pico de parasitemia. Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C, o sobrenadante rico em sangue foi removido e foram feitas lavagens com meio de cultura. Após este processo, as células foram incubadas por mais 48 horas. Após este tempo, os parasitos foram colhidos do sobrenadante, purificados por meio de centrifugação e ressuspensos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) fresco. A concentração de parasitos na suspensão foi determinada por câmara de Neubauer.

2.4.5 Ensaio de citotoxicidade

Para esse ensaio, células Vero não infectadas foram incubadas com os bioativos em diferentes concentrações. Em uma placa de acrílico de 96 poços foram colocadas duas mil células em cada poço, sendo as células quantificadas microscopicamente em câmara de Neubauer. Em cada poço foram colocados 100 µl de meio de cultura contendo as células, incubando por 24 horas na estufa a 37°C, para permitir a adesão das células. Após 24 horas, foram preparadas, em outra placa de acrílico, as diluições das substâncias (extratos de fungos endofíticos, própolis vermelha e geoprópolis) em meio de cultura DMEM fresco. Foram utilizadas 5 diluições seriadas 1:2 a partir da concentração de 200 µg/mL e foram deixados poços para serem utilizados como controle. A placa foi incubada na estufa a 37°C por 72 horas. Após esse período, foi preparada a solução de resazurina, na concentração de 1 mM em PBS. O meio de cultura foi retirado da placa e em cada poço foram colocados duzentos microlitros de solução de resazurina diretamente sobre a cultura. Após seis horas de incubação a 37°C, foi feita a leitura da placa em espectrofotômetro (leitor de microplacas) nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm. A partir desses valores foi calculado o percentual de redução da resazurina, de acordo com a fórmula [% Redução = (redução tratada*100)]. O percentual de inibição da viabilidade celular foi calculado considerando as células na ausência de tratamento, usando a fórmula: [% inibição = 100-(% redução tratado/% redução

controle)*100]. O experimento foi realizado em triplicata e repetido por no mínimo duas vezes.

2.4.6 Ensaios de atividade anti- *t. cruzi*

2.4.6.1 Ensaio com epimastigotas

Para o ensaio de epimastigotas, foram usados os parasitos previamente cultivados em meio LIT. Os fármacos, os extratos de fungos endofíticos, a geoprópolis e a própolis vermelha foram diluídos em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) até chegarem a concentração de 100µg/mL, pois foi determinada esta concentração como não tóxica para as células de mamíferos. Utilizando uma placa de acrílico de 96 poços, as substâncias foram distribuídas em triplicatas, deixando triplicatas contendo somente meio LIT para servirem como controle do experimento. Cada poço continha cem microlitros de substância. Após a distribuição das substâncias, foram colocados 1×10^6 parasitos em cada poço, contidos em cem microlitros de meio LIT. A placa foi deixada na estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 28°C por 72 horas. Após esse período, foi adicionada a resazurina na concentração de 1mM diretamente nos poços, na proporção de 10% do volume de líquido do poço, ou seja, vinte microlitros. Após três horas foi feita a leitura da placa em espectrofotômetro (leitor de placas), nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm. A partir desses valores foi calculado o percentual de redução da resazurina de acordo com a fórmula [% Redução=(redução tratada*100)]. O percentual de inibição do parasito foi calculado considerando os poços na ausência de tratamento, usando a fórmula: [% inibição = 100-(% redução tratada/% redução controle)*100]. O experimento foi repetido por no mínimo duas vezes.

2.4.6.2 Ensaio com tripomastigotas

Para o ensaio utilizando tripomastigotas, foram usados os parasitos obtidos de acordo com o item 5.4.3. Os fármacos, os extratos de fungos endofíticos, a geoprópolis e a própolis vermelha foram diluídas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 5%, na concentração de 100µg/mL (maior concentração não tóxica para células de mamíferos). Utilizando uma placa de acrílico de 96

poços, as substâncias foram distribuídas em duplicatas, deixando poços para controle do experimento. As substâncias foram distribuídas na placa, e logo após, foram adicionados 1×10^6 parasitos em cada poço, suspensos em meio DMEM. Após 24 horas em estufa a 37°C , foi feita a contagem microscópica dos parasitos vivos em cada poço utilizando novamente a câmara de Neubauer. O percentual de inibição do parasito foi calculado considerando os poços na ausência de tratamento, usando a fórmula: [% inibição = $100 - (\% \text{ redução tratada} / \% \text{ redução controle}) \times 100$]. O experimento foi repetido no mínimo duas vezes e não foram observadas alterações na morfologia dos parasitos.

2.4.6.3 Ensaio com amastigotas

Para o ensaio com amastigotas, foram usadas placas com 24 poços. Em cada poço foi colocada uma lamínula de vidro de 13mm de diâmetro, e a seguir, 500 μl de células Vero na concentração de $1,5 \times 10^4/\text{mL}$ em meio DMEM suplementado a 5% com SBF foram adicionados. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 horas, para que houvesse aderência das células às lamínulas. Após 24 horas, cada poço foi infectado com 20 formas tripomastigota para cada célula, também previamente quantificadas em câmara de Neubauer e contidas em 500 μl de meio DMEM suplementado a 5% com SFB; após a infecção, as placas foram novamente colocadas na estufa a 37°C por mais 24 horas. Após este tempo, os extratos de fungos endofíticos, a geoprópolis e a própolis vermelha foram diluídos em meio DMEM suplementado a 1% com SBF para preparar a solução de uso, na concentração de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os fármacos sulfona e benznidazol foram diluídos, também em meio DMEM 1%, à concentração de $10 \mu\text{M}$, enquanto o ravuconazol e o posaconazol foram diluídos à concentração de 10nM . Os poços foram tratados, em duplicata, com as substâncias, na quantidade de 1mL para cada poço, e as placas foram colocadas novamente em estufa a 37°C por 48 horas. Passado este tempo, o sobrenadante dos poços foi retirado, e cada poço foi lavado duas vezes com meio DMEM sem suplementação. Após a lavagem, foi colocado metanol nos poços até cobrir as lamínulas e aguardou-se 5 minutos. Após esses minutos, o metanol foi retirado e descartado no descarte de metanol. O próximo passo foi colocar nos poços uma solução feita com 18 mL de água destilada e 2 mL de corante Giemsa para cada placa. Aguardou-se 10 minutos e retirou-se o sobrenadante, sendo descartado no descarte de Giemsa, e lavando cada poço com água (50% comum + 50% destilada). Após a lavagem, com o auxílio de uma agulha, foram retiradas as lamínulas dos poços, e estas foram fixadas em

lâminas utilizando Entellon. Depois de 24 horas de secagem, as lâminas foram contabilizadas em microscópio, contando-se quantas células haviam infectadas com formas amastigotas a cada 500 células. O percentual de inibição do parasito foi calculado considerando os poços na ausência de tratamento, usando a fórmula: [% inibição = 100-(% redução tratado/% redução controle)*100], sendo o controle os poços deixados sem nenhum tratamento. O experimento foi realizado em duplicata e repetido por no mínimo duas vezes.

2.4.6.4 Ensaio de curva de dose-resposta e EC-50

Para o experimento de curva de dose-resposta, a fim de se obter os valores de EC-50, foi utilizado o mesmo método utilizado no experimento com amastigotas. Foram escolhidas 5 substâncias a serem testadas, sendo elas a geoprópolis, a própolis vermelha e os extratos de fungos endofíticos de número 4, 5 e 9. Foram feitas 5 diluições das substâncias nas seguintes concentrações: 10 μ m, 5 μ m, 2,5 μ m, 1,25 μ m e 0,625 μ m, utilizando meio DMEM suplementado a 1% com SFB. As diluições foram colocadas nos poços determinados das placas, que foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Passado este tempo, o sobrenadante dos poços foi retirado, e cada poço foi lavado duas vezes com meio DMEM sem suplementação. Após a lavagem, foi colocado metanol nos poços até cobrir as lamínulas e aguardou-se 5 minutos. Após esses minutos, o metanol foi retirado e descartado no descarte de metanol. O próximo passo foi colocar nos poços uma solução feita com 18 mL de água destilada e 2 mL de corante Giemsa para cada placa. Aguardou-se 10 minutos e retirou-se o sobrenadante, sendo descartado no descarte de Giemsa, e lavando cada poço com água (50% comum + 50% destilada). Após a lavagem, com o auxílio de uma agulha, foram retiradas as lamínulas dos poços, e estas foram fixadas em lâminas utilizando Entellon. Depois de 24 horas de secagem, as lâminas foram contabilizadas em microscópio, contando-se quantas células haviam infectadas com formas amastigotas a cada 500 células. O percentual de inibição do parasito foi calculado considerando os poços na ausência de tratamento, usando a fórmula: [% inibição = 100-(% redução tratado/% redução controle)*100]. O experimento foi realizado em duplicata e repetido no mínimo duas vezes. Os valores de EC-50 foram calculado através do software *CompuSyn*®.

2.4.6.4.1 Análise estatística

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, atividade anti-epimastigota e anti-tripomastigota foram expressos como a média±desvio padrão para cada conjunto de dados. A normalidade dos dados foi investigada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os conjuntos de dados foram usados os testes de ANOVA ou teste t de Student. Para citotoxicidade, dados paramétricos foram analisados por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.

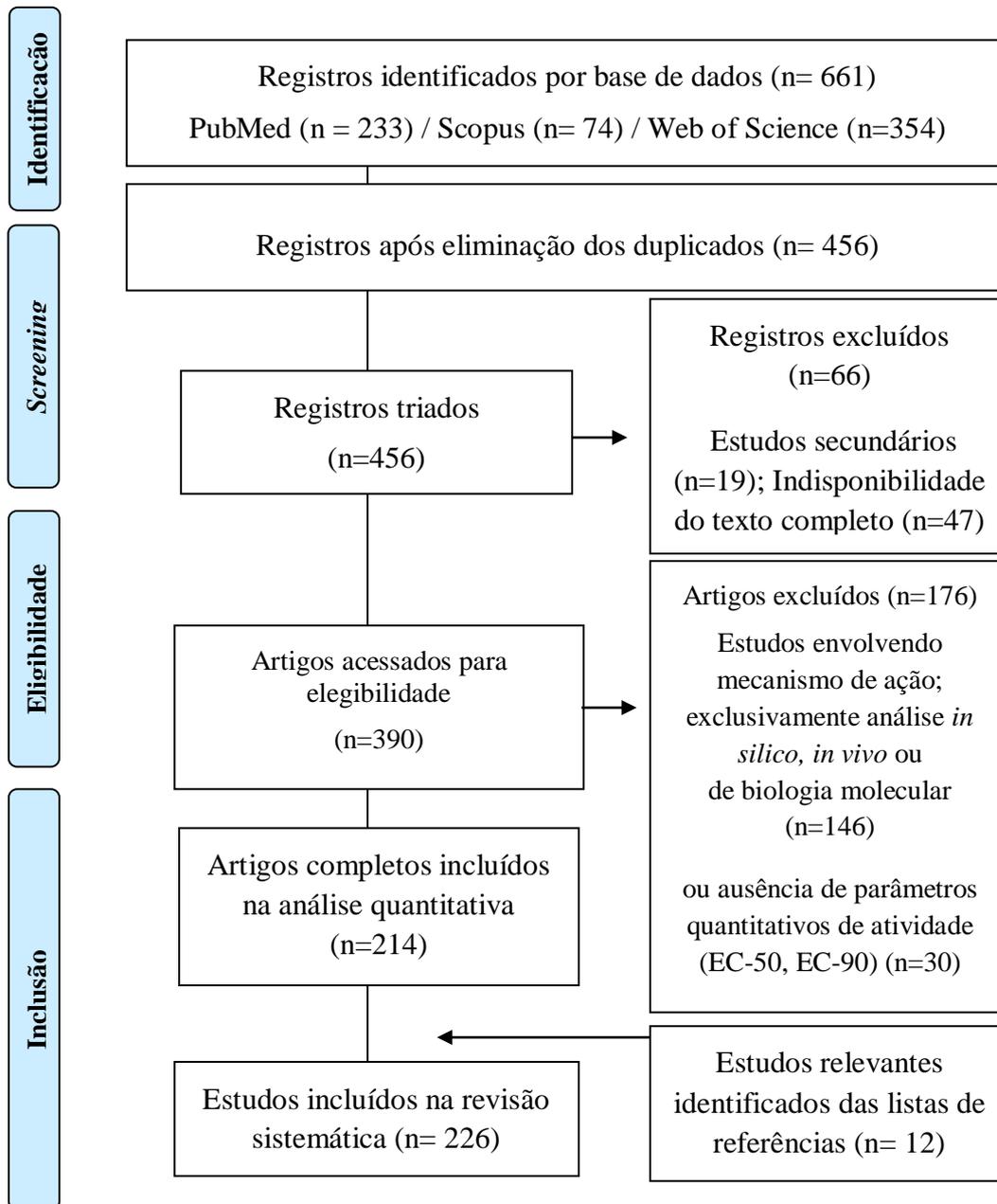
As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas no software *GraphPad Prism 7.0*. Os dados de atividade anti-amastigota foram analisados no software CompuSyn® e as curvas de dose-efeito, no *GraphPad Prism 7.0*.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Revisão sistemática da literatura

Considerando os filtros definidos (Tabelas 1 a 3), foram recuperados das bases de dados 661 trabalhos (233 PUBMED, 74 Scopus e 354 Web of Science). O fluxograma 1 mostra a estratégia utilizada para o *screening*, análise de elegibilidade e inclusão dos registros, os quais somaram 226 artigos científicos.

Figura. 1. Diagrama de fluxo dos resultados da pesquisa de revisão sistemática da literatura. Baseado no PRISMA statement “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses”.



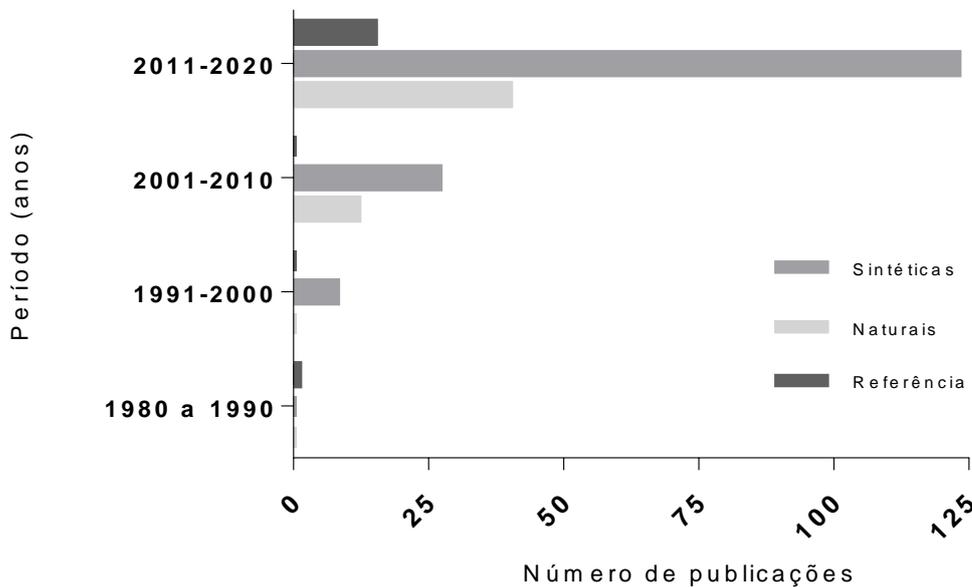
Fonte: MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZALAFF, J., GROUP PRISMA. “Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement,” *PLoS One*, vol. 6, n. 7, 2017.

Foram estudados os registros obtidos no PubMed, Scopus e Web of Science. Foram recuperados de todas as bases 661 registros, dos quais 205 eram duplicados. Os outros 456 registros passaram pela etapa de *screening* (leitura de título e abstract). Desses, foram excluídos 66 registros, dos quais 19 eram revisões de literatura e 47 não tinham texto completo disponível, mesmo após contato com o setor de busca da Biblioteca Central,

resultando em 391 registros para análise de elegibilidade. A partir desta análise foram identificados 176 estudos que preenchiam os critérios de exclusão previamente definidos; tratavam de estudos envolvendo exclusivamente avaliação de mecanismo de ação das moléculas tripanossomicidas, análises *in silico*, *in vivo* ou estudos de biologia molecular (n=146) ou não relatavam claramente os parâmetros quantitativos de atividade das moléculas e /ou bioprodutos avaliados, como EC-50 ou EC-90 (n=30). Foram incluídos então 214 estudos a partir da busca primária. Além dos estudos que avaliaram novas substâncias, naturais ou sintéticas, também foram incluídos trabalhos sobre avaliação dos medicamentos benznidazol e nifurtimox, que são fármacos de referência, ou seja, não investigaram novos fármacos, no entanto, estes fizeram avaliações em diferentes condições experimentais relacionadas a esses fármacos. Foram incluídos, ainda, 12 outros estudos considerados relevantes na área, porém não foram obtidos a partir dos filtros de busca com os termos utilizados.

Inicialmente foi analisada a cronologia dos registros incluídos; muito embora não tenha sido aplicadas restrições quanto a datas, o registro mais antigo recuperado foi do ano de 1988 e, portanto, as análises foram apresentadas com intervalos de 10 anos (1981-1990;1991-2000; 2001-2010; 2011-2020). A Figura 2 mostra o número de trabalhos publicados nos períodos avaliados e a origem das moléculas avaliadas. Do total de trabalhos incluídos, 52 (22,91%) estudaram produtos naturais, 160 (70,8%) estudaram moléculas sintéticas. Foram incluídos ainda 12 trabalhos (5,3%) que analisaram a atividade tripanossomicida dos fármacos de referência (benznidazol e nifurtimox) sob diferentes condições. É importante ressaltar que essa inclusão foi feita considerando a importância de novas estratégias de tratamento utilizando o benznidazol e o nifurtimox, as quais têm sido muito exploradas nos últimos anos (Arrúa *et al.*,2019), além de permitir expandir os dados para análise comparativa dos medicamentos de referência entre os estudos.

Figura. 2. Número de estudos envolvendo avaliação *in vitro* de moléculas tripanossomicidas no período de 1980 a 2020.



Fonte: Da autora

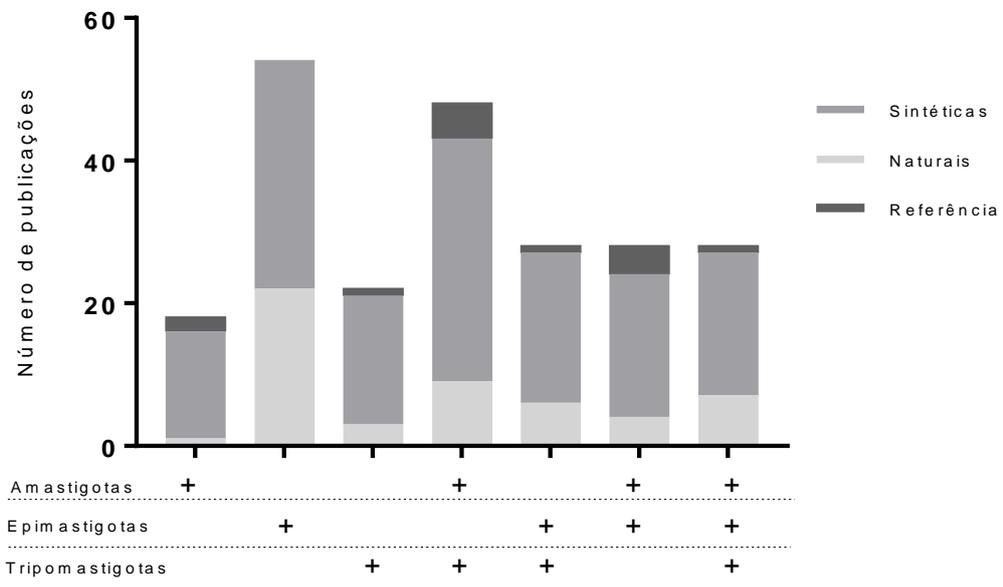
Houve um pequeno número de artigos identificados no período de 1980 a 2000, com aumento significativo a partir de 2001; ainda, o número de registros recuperados de 2011-2020 é mais que três vezes maior do que aquele referente ao período de 1980 a 2010. Com relação à origem das substâncias, isto é, se naturais, sintéticas ou semissintéticas, o gráfico mostra é que o número de substâncias sintéticas é cerca de três vezes maior do que aquele de produtos naturais testados nos períodos de 2001-2010 e 2011-2020, sendo a produção científica relacionada à ação tripanossomicida de produtos naturais incipiente nas décadas de 1980 e 1990. Fatos históricos, relacionados às diferentes fases da quimioterapia experimental da doença de Chagas podem estar relacionados ao número de estudos publicados nos períodos avaliados. A baixa eficácia do benznidazol e nifurtimox no tratamento da fase crônica da doença e a demonstração dos fenômenos de autoimunidade como responsáveis pela patogênese da cardiopatia chagásica desestimularam enormemente os estudos sobre novos tratamentos etiológicos (BAHIA *et al.*, 2014; URBINA *et al.*, 2009, TARLETON, 2003). Já a partir da década de 80, com o advento da biologia molecular e introdução da imuno-histoquímica, a permanência do parasito no hospedeiro foi associada ao processo patogênico, e, portanto, houve novo estímulo aos estudos de quimioterapia da doença de Chagas. No entanto, os custos requeridos no desenvolvimento de novos fármacos, aliados à perspectiva de retornos financeiros insuficientes, resultou em escassos recursos em

P&D na área de doenças parasitárias por parte das principais companhias farmacêuticas e biotecnológicas do mundo (DIAS *et al.*, 2009), atrasando o avanço nos estudos de novos tratamentos para a doença de Chagas, considerada uma doença tropical negligenciada. Foi a partir dos anos 2000 que houve novo estímulo na busca de fármacos anti- *T. cruzi*, principalmente impulsionado pela criação de parcerias sem fins lucrativos para o desenvolvimento de produtos, como a DNDi (BAHIA *et al.*, 2014).

Muito embora tenha havido um grande salto no número de estudos de quimioterapia experimental, (MARTINEZ-PEINADO *et al.*, 2020), um número muito limitado de candidatos promissores foi identificado em ensaios *in vivo* (BAHIA *et al.*, 2014; VILLATLA *et al.*, 2019). Paralelamente, dentre os candidatos que foram avaliados em estudos clínicos, para os quais excelentes resultados foram obtidos em modelos experimentais, altos níveis de falha terapêutica foram observados (MOLINA *et al.*, 2017; TORRICO *et al.*, 2018). A partir desses fatos, muitos questionamentos acerca do valor translacional dos modelos pré-clínicos de quimioterapia da doença de Chagas têm sido feitos (CHATELAIN, E., 2015; KATSUNO *et al.*, 2015; ROMANHA *et al.*, 2010), ressaltando a necessidade de analisar mais profundamente o tema na tentativa de determinar o nível de evidência para os procedimentos até então adotados e contribuir para a identificação de estratégias de seleção de candidatos mais assertivas.

A avaliação da atividade tripanossomicida *in vitro* é o primeiro passo na identificação de novos candidatos a fármacos (FIOCRUZ, 2017). *T. cruzi* é um parasito que apresenta diferentes formas evolutivas cultiváveis experimentalmente; ainda, as formas intracelulares parasitam diferentes tipos celulares. Somado a isso, há enorme variabilidade genética e biológica de diferentes cepas do parasito. Todas essas características oferecem múltiplas possibilidades de análise, as quais, somadas ainda à variabilidade de protocolos disponíveis, leva a alta heterogeneidade no processo de *screening* e avaliação do potencial terapêutico de novos candidatos. Para compreender como a diversidade de formas evolutivas, cepas do parasito e protocolos experimentais vêm sendo explorados nos experimentos de quimioterapia anti- *T. cruzi* e se há relação com o nível de atividade tripanossomicida, os dados relativos a esses parâmetros foram quantificados na presente revisão. A Figura 3 mostra as proporções de estudos que utilizaram as diferentes formas evolutivas nos experimentos, separadamente.

Figura 3- Frequência de utilização das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* em avaliações de atividade tripanossomicida *in vitro*. Dados obtidos a partir de revisão sistemática da literatura.



Fonte: Da autora

Considerado o conjunto total de estudos, 41,4% (n=94) utilizaram somente uma das formas evolutivas do parasito para os estudos de atividade tripanossomicida, sendo as epimastigotas as mais frequentes (23,89% dos estudos). Outros 58,15% (n= 132) estudos avaliaram a atividade tripanossomicida das moléculas sobre mais de uma forma do parasito, sendo, nesses casos, a combinação amastigota + tripomastigota mais utilizada (21,14%, 48 estudos). Quando analisamos a utilização das mesmas formas levando em consideração a origem das substâncias, 59,62% (n=94) dos testes com substâncias sintéticas foram feitos em mais de uma forma evolutiva; esse percentual foi de 50% para avaliações de produtos naturais e 78,57% no caso das estratégias utilizando fármacos de referência (benznidazol e nifurtimox). Destaca-se ainda um perfil interessante; do total de estudos envolvendo produtos naturais, 42,3% (n=22) utilizaram somente epimastigotas nas avaliações, enquanto esse percentual foi de 19,87% (n=32) para os trabalhos que avaliaram substâncias sintéticas e 0 para os estudos com os medicamentos de referência (Figura 3).

Os dados revelam grande heterogeneidade na utilização das várias formas clínicas do parasito. Apesar de não haver um consenso explicitado na literatura, relacionado aos protocolos de triagem de novas moléculas ou estratégias de tratamento *in vitro*, classicamente se admite que as formas tripomastigotas e amastigotas apresentam maior relevância, visto que são as formas presentes nos hospedeiros vertebrados. Especialmente as formas amastigotas,

que enquanto mantenedoras do parasitismo e, conseqüentemente do processo patogênico, necessitam ser susceptíveis aos mecanismos de ação dos fármacos tripanossomicidas. Na descrição do *TPP (Target Product Profile)* para a doença de Chagas não constam informações sobre o nível de atividade ideal ou aceitável sobre as diferentes formas evolutivas do parasito, (CHATELAIN, 2015), diferente do que é praticado na literatura relacionada a outras parasitoses, como para malária, em que a atividade de candidatos a fármacos sobre diferentes formas evolutivas de *Plasmodium* é um requisito para progressão (BURROWS *et al.*, 2013).

Após uma reunião de experts, durante a comemoração do centenário do descobrimento a doença de Chagas, Romanha *et al.* (2010) publicaram um fluxograma com recomendações para *screening in vitro* e *in vivo* de potenciais fármacos anti- *T. cruzi*, na tentativa de padronizar os protocolos adotados pela comunidade científica. Foi recomendada a análise direta de compostos em linhagens celulares infectadas por *T. cruzi* em uma única concentração, o que permite monitorar os efeitos em amastigotas e tripomastigotas em um único sistema. Foram recomendadas ainda determinadas linhagens de células de mamífero e cepas do parasito (ROMANHA *et al.*, 2010). No entanto, o que os dados da presente revisão mostram é que as formas extra e intracelulares do parasito são utilizadas indiscriminadamente, sendo o uso isolado das formas epimastigotas muito mais frequente (24% das publicações) comparado ao uso isolado de amastigotas e tripomastigotas (7,82% e 9,25%, respectivamente).

A Tabela 5 mostra a utilização das formas evolutivas nas diferentes categorias de moléculas, considerando o uso isolado ou combinado com outras formas. E ainda, o número de trabalhos em cada categoria que utilizou minimamente a combinação tripomastigotas e amastigotas.

Tabela 5 – Utilização global das diferentes formas evolutivas em experimentos de atividade tripanossomicida *in vitro*.

	Epimastigotas	Tripomastigotas	Amastigotas	Tripomastigotas + Amastigotas
Natural	39/52 (75%)	25/52 (48,1%)	21/52 (40,3%)	16/52 (30,8%)
Sintética	93/161 (57,8%)	94/161 (58,4%)	89/161 (55,3%)	54/161 (33,5 %)

Legenda: Tripomastigota+Amastigota – trabalhos que avaliariam a atividade tripanossomicida de candidatos, no mínimo, sobre formas amastigotas e tripomastigotas.

Fonte: Da autora

Enquanto as formas amastigotas foram utilizadas em 40,3% e 55,3% dos estudos com bioprodutos e sintéticos, respectivamente, cerca de um terço deles (30,8% e 33,5%) incluiu a avaliação sobre ambas as formas evolutivas encontradas no hospedeiro vertebrado. Limitações técnicas e a falta de dados claros sobre o valor translacional das diferentes abordagens *in vitro* são sugeridos como justificativas; formas epimastigotas são de fácil cultivo, menor custo, mais adaptável a procedimentos de automação e envolve menos riscos de manipulação (CHATELAIN *et al.*, 2017). Já a obtenção de tripomastigotas a partir de culturas de células e tripomastigotas sanguíneos, assim como ensaios com formas intracelulares demandam infraestrutura mais robusta, maiores custos operacionais, além de maior risco biológico ao manipulador. Na tentativa de identificar se a forma evolutiva influencia na atividade das moléculas testadas e em que intensidade isso se dá, foram listados os valores de EC-50 das substâncias teste e fármaco de referência de todos os trabalhos que analisaram as três formas evolutivas comparativamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de EC-50 das substâncias teste e referência comparativamente identificados para as diferentes formas evolutivas. (CONTINUA)

Valor do EC50 do teste			Valor do EC50 do BZ			REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
AMA	EPI	TRIPO	AMA	EPI	TRIPO	
0,683 ± 0,269 µg/mL	***	***	0,0015 ± 0,0006 µg/mL	***	***	Gonzalez-Martin <i>et al.</i> 1998
42±3 µg/mL	***	***	40.3±3.1 µg/mL	***	***	Muelas <i>et al.</i> 2002
1,1±0,3 µM [#]	1,3±0,2µM [#]	***	***	***	***	Herrera <i>et al.</i> 2009
2,7 ± 1,1 µg/mL	17,9 ± 3,3 µg/mL	0,7 ± 0,1 µg/mL	***	***	***	Miguel <i>et al.</i> 2010
***	9,87 µM	***	9,87 µM	13,22 µM	13,6 µM	Boutaleb-Charki <i>et al.</i> 2011
10,69 µM	2,42 mM	9,46 µM	4,10 ± 0,55 µM	5,86 ± 0,93 µM	30,26 ± 2,85 µM	Cicarelli <i>et al.</i> 2012
***	18,1 ± 0,8 µM	5,7 ± 0,7 µM	***	8,1 ± 0,3 µM	3,4 ± 0,9 µM	Cogo <i>et al.</i> 2012
6,81 ± 0,1mM	6,10 ± 0,2mM	6,03 ± 0,3mM	18,92 ± 1,1mM	15,89 ± 1,1mM	18,92 mM	Ramírez-Macías <i>et al.</i> 2012
40,9 ± 3,6 µM	71,7 ± 4,4 µM	20,4 ± 1,2 µM	48,4 ± 1,3 µM	182,1 ± 10,7 µM	77,3 ± 5,1µM	Campos <i>et al.</i> 2013
3,93 ± 1,11 mM	10,63 ± 0,18 mM	***	0,50 ± 0.03 mM	26,55 ± 4,53 mM	***	Fonseca-Berzal <i>et al.</i> 2013
***	***	10,4 µg/mL	74,5 µg/mL	***	***	Polanco-Hernandez <i>et al.</i> 2013
2,81 ± 0,43 µM	0,26 ± 0,05 µM	0,79 ± 0,02 µM	***	***	26,0 ± 4,0 Mm	Salomão <i>et al.</i> 2013
Valor do			Valor do			REFERÊNCIA

EC50 do teste				EC50 do BZ		BIBLIOGRÁFICA
21 µM	12 µM	180 µM	0,27 mM	1,6 mM	20 mM	Sülsen <i>et al.</i> 2013
2,6 ± 1,2 µM	1,1 ± 0,04 µM	7,1 ± 1,3 µM	***	7,4 mM	15,4 mM	Rodrigues <i>et al.</i> 2014
***	2,9 ± 0,1 µg/mL	1,7 ± 0,5 µg/mL	***	2,8 ± 0,7 µg/mL	2,8 ± 0,7 µg/mL	Meira <i>et al.</i> 2015
8,76 ± 1,1 µM	10,35 ± 4,9 µM	11,0 ± 1,4 µM	23,3 ± 4,6 µM	15,8 ± 1,1 µM	22,4 ± 1,9 µM	Olmo <i>et al.</i> 2015
1,2 ± 0,4 µM	4,6 ± 1 µM	50 ± 8 nM	1,6 µM	1,9 µM	1,7 µM	Veiga-Santos <i>et al.</i> 2015
17,6 ± 6,1 µM	17,6 ± 6,1 µM	11,7 µM	5,6 µM	5,6 µM	1,2 µM	Lechuga <i>et al.</i> 2016
29 ± 4,5 µg/mL	17,39 ± 0,62 µg/mL	12,5 ± 1,74 µg/mL	1,36 ± 0,4 µg/mL	***	0,8 ± 0,18 µg/mL	Oliveira de Souza <i>et al.</i> 2017
1,20 ± 0,16 µM	1,99 ± 0,17 mM	15,57 ± 0,34 µM	***	> 450 µM	6,4 µM	Peron <i>et al.</i> 2017
2,7 µM	0,6 a 0,1 µM	≤ 8 µM	2,7 µM	<3 µM	≤ 0,25 µM	Nefertiti <i>et al.</i> 2018
3,73 µM	30,84 µM	9,34 µM	0,87 µM	0,58 µM	3,73 µM	Strauss <i>et al.</i> 2018
7,1 ± 0,2 µM	25,5 ± 8,6 µM	16,1 ± 0,8 µM	3,0 ± 0,4 µM	25,5 ± 8,6 µM	6,2 ± 1,7 µM	Paucar <i>et al.</i> 2019
5,9 µM	25,7 µM	4,6 µM	11,4 µM	22,01 µM	12,71 µM	Reigada <i>et al.</i> 2019
***	***	***	4,00 ± 1,90 µM	4,02 ± 2,82 µm	5,73 ± 3,07 µm	Revollo <i>et al.</i> 2019
***	9,3 µmol/L	0,94 µmol/L	***	282 ± 20 µmol/L	218 ± 15 µmol/L	Freire <i>et al.</i> 2020
9,2 ± 0,6 µM	3,3 ± 0,8 µM	24,0 ± 4,3 µM	9,2 ± 0,57 µM	3,3 ± 0,8 µM	24,0 ± 4,3 µM	de Paula <i>et al.</i> 2020

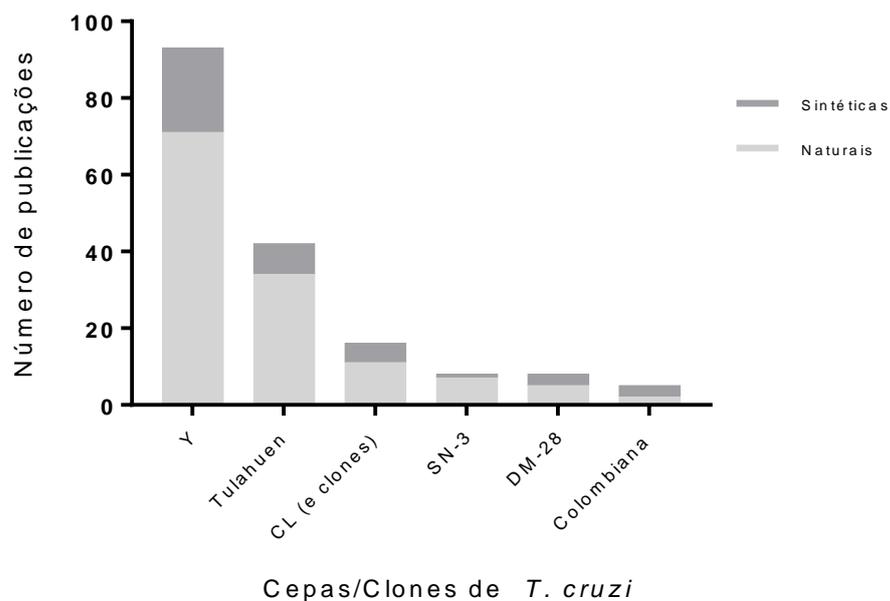
Nota: ***Parâmetros não demonstrados no artigo; #Cepa CL, substância N1; AMA= amastigotas, EPI= epimastigotas, TRIPO= tripomastigotas

Fonte: Da autora

Novamente foi observada grande heterogeneidade, não sendo possível estabelecer um perfil com relação às faixas de valores de EC-50 observadas entre as diferentes formas; enquanto em alguns trabalhos os valores sobre epimastigotas foram significativamente maiores (MIGUEL *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2013), em outros o foram aqueles encontrados em amastigotas ou tripomastigotas (MUELAS *et al.*, 2002; SÜLSEN *et al.*, 2012). Essas diferenças podem ter relação com os mecanismos de ação das moléculas testadas, visto que as diferentes formas apresentam características relacionadas ao metabolismo que podem ser peculiares, a depender da via envolvida (SYKES E AVERY, 2018). No entanto, perfil similar foi observado também para o fármaco de referência, o benznidazol, cujos valores variaram de 1,3 ± 0,5 µM a 182,1 ± 10,7 µM para epimastigotas, 1,3 ± 0,5 µM a 74,5 µg/mL para amastigotas e 1,3 ± 0,5 µM a 22,4 ± 1,9 µM para

tripomastigotas. Nesse sentido, mesmo para o fármaco de referência, apesar de se admitir classicamente que a EC-50 é em torno de $3,8\mu\text{M}$ ou (ROMANHA *et al.*, 2010) e esses valores serem estimados como faixa terapêutica do fármaco em estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos (Perin *et al.*, 2017), não há consenso. A partir da leitura desses trabalhos ficou evidente que muitos fatores provavelmente estão envolvidos nesta alta variabilidade, sobretudo a cepa do parasito, protocolo experimental (tempo de incubação, concentrações de fármaco, veículos, métodos de análise) e tipo celular hospedeiro (nos experimentos com amastigotas). Neste contexto, foi possível constatar a utilização de 43 cepas ou clones do parasito utilizados nos diferentes estudos sobre a atividade de novas moléculas (naturais e sintéticas). A Figura 4 mostra aquelas mais frequentemente utilizadas.

Figura 4 - Cepas e clones de *T. cruzi* utilizados nos estudos contidos na revisão sistemática.



Fonte: Da autora

T. cruzi apresenta alta heterogeneidade genética e biológica, e é desejável que novas moléculas tripanossomicidas tenham minimamente ação sobre as DTUs TcI, TcII, TcV, e TcVI (CHATELAIN, 2015). As cepas Colombiana, Dm28 e SN3 pertencem à DTU I, enquanto Y à DTU II, Tulahuen e CL, DTU VI, de forma que no contexto geral têm sido utilizadas cepas ou clones pertencentes às DTUs de maior relevância epidemiológica. No entanto, no contexto individual, a grande maioria dos trabalhos (sintéticos ou naturais) utiliza apenas uma cepa ou clone do parasito. Já 57,14% os artigos que estudaram os fármacos de referência utilizaram mais de uma DTUs em suas avaliações.

Em relação aos outros parâmetros sugeridos como fatores de variabilidade para os valores de EC-50 do benznidazol, não foi realizada a quantificação de cada um deles. De forma geral, quanto aos tipos celulares, células Vero foram as mais utilizadas, seguidas de LLC-MK2 (provenientes de rim de *Macaca mulata*), da linhagem macrofágica J774, macrófagos peritoneais e linhagem de fibroblastos L929. Cardiomiócitos da linhagem H9c2 e de cultivo primário foram ocasionalmente utilizados (8 e 4 trabalhos, respectivamente). Esses dados corroboram com os achados de Duran-Rehbein *et al.* (2014), que ao mostrarem a ampla diversidade de células hospedeiras utilizadas em experimentação com *T. cruzi* e identificaram a linhagem Vero como a mais utilizada e sugerem que tipos celulares alvos do parasito deveriam ser utilizados (DURAN-REHBEIN *et al.*, 2014). Muito embora não haja recomendações específicas quanto aos tipos celulares que devem ser utilizados, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que o tipo celular hospedeiro influencia no desfecho da terapia (Fernandes *et al.*, em publicação). Da mesma forma, Franco *et al.* (2019) demonstraram que apesar de não haver uma linhagem celular mais recomendada para triagens envolvendo *T. cruzi*, a cepa do parasito utilizada e a célula hospedeira podem interferir na atividade tripanossomicida ou tripanostática dos fármacos.

Quanto às variações de protocolos experimentais, essas não foram analisadas quantitativamente, no entanto cabem algumas observações. De forma geral, referiram-se ao tempo de infecção, proporção parasitos por célula e percentual de infecção no momento da incubação com as substâncias teste (no caso de amastigotas); tempo de incubação parasito-fármaco; diluentes e concentrações dos fármacos utilizadas, além de diferentes métodos de detecção. Com relação ao percentual de infecção nos poços controle, a maior parte dos artigos não mencionou esse parâmetro, apesar de serem aplicadas proporções de 1 a 20 parasitos por célula por 2 a 24 horas. Já os tempos de incubação variaram de 24 a 96 horas, o que pode gerar grandes diferenças em termos de atividade, principalmente em moléculas que têm efeito tempo-dependentes. No entanto, frequentemente esse não é um parâmetro bem evidenciado nos estudos. Quanto aos métodos de detecção (microscopia eletrônica, imunofluorescência, etc.), foi possível perceber que embora tenha havido um grande avanço no desenvolvimento de metodologias usando triagem/análise de alto conteúdo, essas técnicas ainda não são acessíveis à maioria dos laboratórios de *screening* anti- *T. cruzi*, em acordo com o observado por Fonseca-Berzal *et al.* (2018).

Apesar dos vários fatores de variabilidade, com o intuito de analisar minimamente o valor preditivo dos protocolos utilizados, foram estudados os trabalhos que realizaram, além

de estudos *in vitro*, experimentação animal para avaliação da atividade das mesmas moléculas. Dentre as substâncias sintéticas, 61 (38,12%) foram avaliadas *in vivo*, enquanto dos produtos naturais, 14 (36,8%) evoluíram para essa fase. Desse total, em 21 foram utilizados esquemas terapêuticos para avaliação de eficácia, ou seja, por período maior ou igual a 14 dias. Desses estudos, foram selecionados aqueles que apresentaram dados completos sobre a atividade das substâncias teste *in vitro*; eles são mostrados na Tabela 7. Alguns dos estudos avaliaram substâncias isoladamente e em combinação, no entanto, somente os dados referentes aos tratamentos isolados foram considerados.

Dentre os estudos nos quais foi detectada cura parasitológica (n=4), um utilizou apenas uma forma evolutiva (amastigota) e nenhum deles avaliou o efeito sobre tripomastigotas. Dentre aqueles que apresentaram efeito intermediário (redução da parasitemia e/ou mortalidade, n=11), em 6 foi utilizada uma forma evolutiva *in vitro* e 8 estudaram mais de uma; desses últimos, 6 estudos empregaram as 3 formas evolutivas.

Tabela 7 – Comparação entre desfechos *in vitro* e *in vivo* em estudos que avaliaram eficácia terapêutica em modelo murino

Forma evolutiva	Desfecho <i>in vitro</i> (EC-50)	Período de tratamento	Desfecho <i>in vivo</i>	Referência Bibliográfica
Epi e ama	1,6 a 9,7 μ M; 0,09 a 2,58 μ M *	21 dias	Cura 45% a 90% FA*	Neal e Burer, 1988
Epi, ama	30nM; 0,3nM [#]	28 dias	Cura 100% FA Cura 60-75% FC	Urbina <i>et al.</i> , 1998
Epi e ama	300nM; 0,1 nM	60 dias	Cura de 0 a 100% ^{&}	Urbina <i>et al.</i> , 2003
Ama	5,8 μ M	20 dias	Cura 100% FA	Bahia <i>et al.</i> , 2014
Epi, tripo e ama	30,84 μ M, 9,34 μ M, 3,73 μ M	35 dias	Redução da parasitemia	Strauss <i>et al.</i> , 2018
Tripo	5,86 μ M	14 dias	Redução da parasitemia	Puente <i>et al.</i> , 2018
Epi, tripo e ama	0,67 μ M, 3,89 μ M, 31,35 μ M	20 dias	Redução da parasitemia	Saraiva <i>et al.</i> , 2006
Epi e tripo	0,77 μ g/mL, 1,53 μ g/mL	17 dias	Redução da parasitemia e da mortalidade	Valdez <i>et al.</i> , 2011
Ama	7,15 nM	20 dias	Redução da mortalidade	Gulin <i>et al.</i> , 2020
Tripo e ama	1,3 μ M; 1,3 μ M	20 dias	Redução da parasitemia	Martins <i>et al.</i> , 2016
Epi, tripo e ama	33,92 μ M; 0,40 μ M	15 dias	Redução da parasitemia	Fonseca-Berzal <i>et al.</i> , 2015
Epi	8,52 \pm 0,2 μ M	17 dias	Redução da parasitemia	García-Huertas <i>et al.</i> , 2018
Epi	5,0 μ M	25 dias	Redução da parasitemia	Aguilera <i>et al.</i> , 2018
Epi, tripo e ama	8,5 μ g/mL	15 dias	Redução do número de ninhos de amastigota	Polanco-Hernández <i>et al.</i> , 2013
Epi	1,15 μ M	20 dias	Redução da parasitemia	Gonçalves-Santos <i>et al.</i> , 2019
Ama	915,96 μ M	20 dias	Não suprimiu parasitemia	Mazzeti <i>et al.</i> , 2019
Epi, tripo e ama	17,9 μ g/mL, 0,7 μ g/mL, 2,7 μ g/mL	20 dias	Não alterou a curva de parasitemia	Miguel <i>et al.</i> , 2010
Epi e ama	6,1 a 50 μ M, 0,12 a 15 μ M [#]	21 dias	Ineficiente contra infecção aguda	Oliveira <i>et al.</i> , 2015

Nota: #não foi determinada a EC-50; valores referem-se à concentração inibitória mínima. Pela análise do gráfico a EC-50~1nM. * efeito variável com a cepa. & Índices dependentes da cepa e tempo de tratamento. Referências grifadas referem-se a produtos naturais, as demais, são sintéticas. AMA= amastigotas, EPI= epimastigotas, TRIPO= tripomastigotas

Fonte: Da autora

Não foi possível estabelecer nenhuma relação entre os valores de EC-50 sobre as diferentes formas evolutivas e a eficácia *in vivo*, dada à alta heterogeneidade de cepas e outras

variações nos protocolos experimentais, as quais não permitem uma comparação direta. Para exemplificar, Bahia *et al.*, (2014) identificaram 100% de cura com a administração de um composto cuja EC-50 sobre amastigotas foi 5,8 μM , enquanto Gulin *et al.*, e Martins *et al.*, identificaram apenas redução da parasitemia com substâncias de EC-50 menores. Já Oliveira *et al.* não viram nenhuma atividade *in vivo* para uma molécula que apresentou atividade anti-amastigota variável de 0,12 a 15 μM . Por outro lado, Gonçalves *et al.* tiveram sucesso ao identificar atividade *in vivo* a partir de dados obtidos com epimastigotas *in vitro*. Somada à variabilidade das estratégias de *screening in vitro*, a alta variabilidade de protocolos relacionados à avaliação dos desfechos *in vivo* torna arriscada qualquer comparação direta ou tentativa de averiguar o valor preditivo dos modelos utilizados nos estudos.

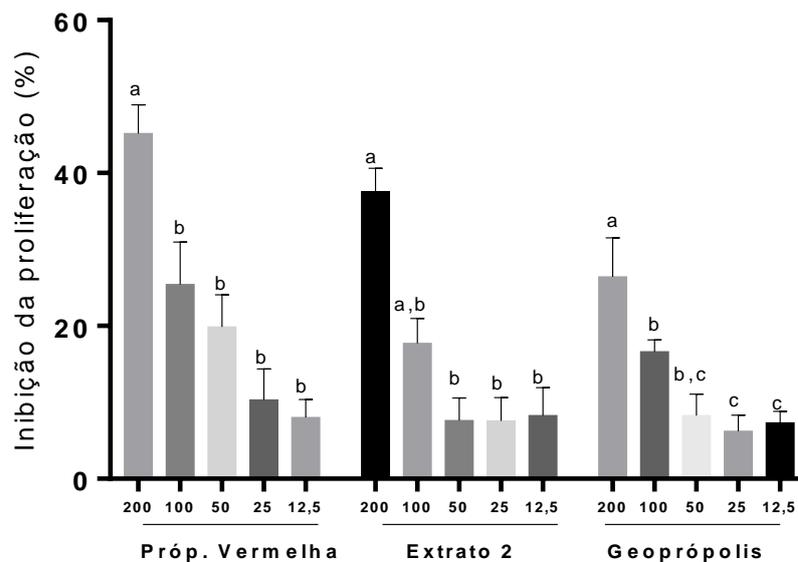
Se consideradas apenas as moléculas que induziram cura, elas incluem, além do benznidazol, o ravuconazol, e o posaconazol, que são os candidatos que evoluíram a estudos clínicos. Muito embora não haja dados sobre a atividade da fexinidazol-sulfona sobre epimastigotas em Bahia *et al.* (2014), para as demais moléculas foram observados valores de EC-50 superiores aos observados para epimastigotas. Urbina *et al.*, 1998 e 2003 discutem que esse fato é relacionado ao mecanismo de ação dos azólicos. Como inibidores da biossíntese de ergosterol, necessitam de períodos prolongados para haver a depleção desse esteroide em epimastigotas. Dessa forma, variações relacionadas ao mecanismo de ação dos fármacos e metabolismo das formas evolutivas provavelmente influenciarão nos valores de EC-50. Apesar de não terem sido encontrados relatos da atividade anti-epimastigotas na literatura para fexinidazol-sulfona, como um 5-nitroimidazol que atua via estresse redutivo, seria esperado que apresentasse efeito similar ao benznidazol contra essa forma evolutiva. Considerando Neal e Burer (1988), os valores de EC-50 para o benznidazol foram variáveis a depender da cepa do parasito, variando de 1,6 a 9,7 μM em epimastigotas e 0,09 a 2,58 μM em amastigotas. Outro ponto importante, porém, é que o fexinidazol, molécula que apresenta alta eficácia tripanossomicida *in vitro*, não tem atividade *in vivo*, pois é um pró-fármaco que necessita metabolização hepática para exercer o efeito tripanocida via metabólitos sulfona e sulfóxido (BAHIA *et al.*, 2014).

Tendo em vista os dados apresentados, é possível afirmar que a forma evolutiva do parasito influencia nos resultados da quimioterapia *in vitro*, no entanto, o impacto dessa influência no valor translacional dos modelos de *screening* utilizados não pode ser mensurada sem uma detalhada análise dos outros fatores envolvidos.

2.5.2 Estudo experimental

Considerando dados apresentados na revisão sistemática, na segunda etapa deste trabalho foi avaliada a influência da forma evolutiva do parasito no processo de *screening* de bioprodutos comparativamente aos fármacos de referência. Em relação à avaliação experimental, inicialmente foram realizados ensaios de citotoxicidade para identificar a tolerância das células de mamíferos (células hospedeiras de *T. cruzi*) aos produtos de origem natural. A figura 5 mostra o percentual de inibição da proliferação das células Vero quando incubadas com os extratos 2, geoprópolis e própolis vermelha. As demais substâncias não interferiram na viabilidade celular, e, desta forma, não foram representadas no gráfico.

Figura 5- Substâncias que demonstraram toxicidade a células de mamíferos



Legenda: Células Vero foram incubadas com o extrato de fungo endófito 2, geoprópolis e própolis vermelha na concentração de 200 µg/mL por 72 horas em estufa a 37°C. Após esse período, a viabilidade celular foi aferida utilizando resazurina. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$); comparações foram feitas entre concentrações de cada bioproduto.

Fonte: Da autora

Foi considerada citotóxica a redução superior a 30% na viabilidade, de acordo com a *International Organization for Standardization* (2009). O potencial citotóxico foi baixo e concentração-dependente, sendo a própolis vermelha e o extrato 2, tóxicas na concentração de 200 µg/mL, mas não nas demais. Já a geoprópolis induziu redução menor que 30% na proliferação celular, mostrando-se menos tóxica comparativamente à própolis vermelha. Estudos com a própolis vermelha para tratamento de vários tipos de câncer demonstraram

toxicidade para células cancerígenas, além da indução da apoptose celular (RUFATTO *et al.*, 2017). A própolis vermelha já foi testada também em células de músculo cardíaco e sua toxicidade se mostrou dose-dependente de acordo com os estudos de Higashi e Castro (1994). Dantas *et al.* (2017) também endossam o maior potencial citotóxico da própolis vermelha comparativamente às demais, corroborando o resultado encontrado. Já Santini (2019) assume que a geoprópolis pode ser tóxica para as células cancerígenas *in vitro*. Pinto (2019), demonstrou que os extratos de fungos endofíticos não reduzem significativamente a viabilidade celular, também em células cancerígenas.

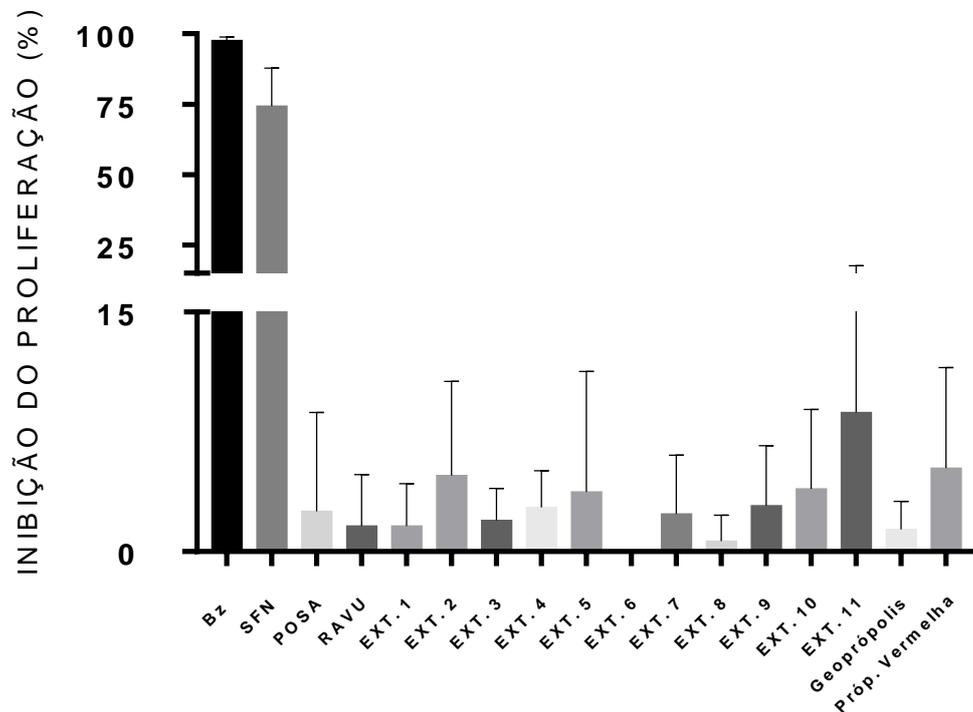
A partir dos resultados do ensaio de citotoxicidade, foi estabelecida a concentração inicial de 100 µg/mL para avaliação da atividade tripanossomicida sobre formas extracelulares e 10 µg/mL para avaliação em amastigotas intracelulares. Esta última foi adotada considerando a literatura científica disponível; Romanha *et al.* (2010) recomendam que para um produto natural ou substância sintética progredir na cadeia de avaliação como candidato anti-*T. cruzi*, deve apresentar atividade anti- amastigota na concentração de 10 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Já a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) define que um *hit* deve apresentar eficácia considerável sobre amastigotas intracelulares ($EC_{50} < 10 \mu M$) e adequada seletividade (>10-vezes maior em células de mamíferos) para progredir na cadeia de avaliação (Katsuno *et al.*, 2015). Para as demais formas não há recomendações e, considerando a experiência do grupo (Machado *et al.*, 2020) e a literatura sobre atividade tripanossomicida de produtos naturais (Dantas *et al.*, 2006; Salomão *et al.*, 2008;) optou-se por utilizar para o *screening* a maior concentração não tóxica das substâncias. Não foi realizado ensaio de citotoxicidade para os fármacos utilizados pelo fato de estes resultados já estarem bem estabelecidos na literatura (MACHADO *et al.*, 2020; BAHIA *et al.*, 2014; SOEIRO *et al.*, 2013; URBINA *et al.*, 1998).

Após a determinação da concentração inicial de uso para cada substância já definida, foram realizados os ensaios de atividade anti-*T. cruzi* utilizando as diferentes formas evolutivas do parasito. Para essa avaliação foram incluídas moléculas que apresentam comprovada atividade tripanossomicida *in vitro* e *in vivo* e pertencem a diferentes classes farmacológicas: os nitroheterocíclicos benznidazol e fexinidazol-sulfona, e os derivados azólicos ravuconazol e posaconazol. O benznidazol é o fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas, portanto tem sua atividade bem caracterizada. O fexinidazol-sulfona apresentou excelentes resultados em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Bahia *et al.*, 2014) e o seu precursor, fexinidazol, está atualmente em ensaio clínico para a doença de

Chagas (<https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole-chagas/>). Já os derivados azólicos, recentemente avaliados em estudos clínicos após se mostrarem muito promissores em estudos *in vitro* (URBINA *et al.*, 2003; URBINA *et al.*, 1998) e *in vivo* (URBINA *et al.*, 2003; DINIZ *et al.*, 2010; DINIZ *et al.*, 2013), resultaram em falha terapêutica em até 90% dos casos (MOLINA *et al.*, 2014; TORRICO *et al.*, 2018).

A Figura 6 mostra os resultados obtidos com a utilização da concentração de 100 µg/mL sobre tripomastigotas. Pode-se notar que os fármacos benznidazol e sulfona, como esperado, foram efetivos em inibir a proliferação do parasito, induzindo de 70% a 90% de inibição. Já as substâncias de origem natural não se mostraram efetivas, apresentando porcentagens muito baixas de inibição da proliferação do parasito. Os resultados são diferentes daqueles observados por Dantas *et al.* (2017) que relataram que o extrato de própolis vermelha mostra alta atividade anti-epimastigota, levando a 98% de inibição do crescimento em 24 horas de incubação. No entanto, os autores utilizaram a concentração de 300 µg/mL do bioproduto, o que, de acordo com os nossos resultados de citotoxicidade poderia levar à eliminação de epimastigotas de forma não seletiva, já que foi observado que a concentração de 200 µg/mL é citotóxica. Muito embora tenha sido avaliada a mesma cepa do parasito, outras variações no protocolo experimental, como o método de extração da própolis e a região da qual foi coletada (DANTAS *et al.*, 2017) poderiam contribuir para a diferença nos resultados.

Figura 6 – Atividades dos bioprodutos e fármacos de referência sobre epimastigotas.



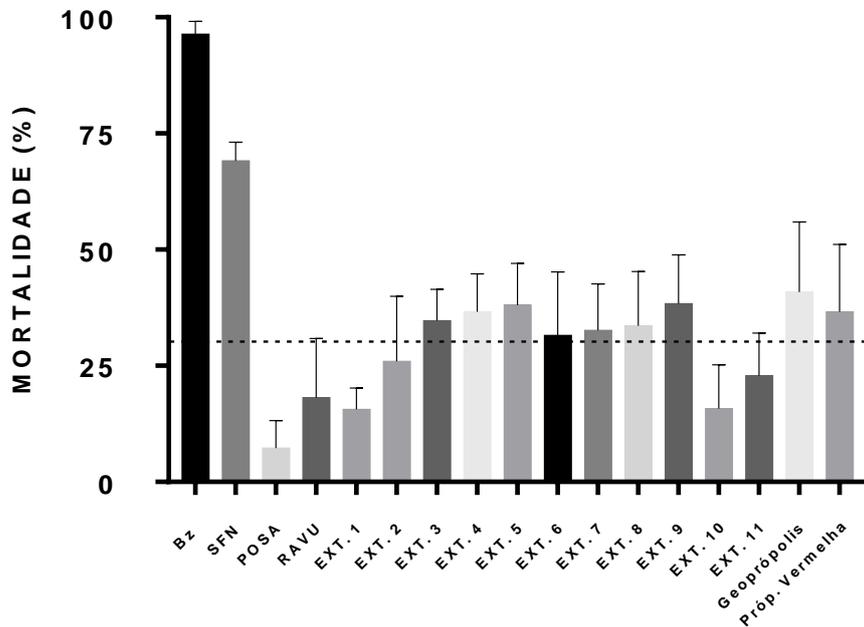
Legenda: Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram incubadas com os fármacos (Bz- benznidazol; SFN – fexinidazol-sulfona; POSA- posaconazol; RAVU – ravuconazol), com os extratos de fungos endofíticos, com a geoprópolis e a própolis vermelha na concentração de 100 µg/mL por 72 horas em estufa a 28°C. Após esse tempo, a porcentagem de inibição do parasito foi aferida utilizando resazurina.

Fonte: Da autora

Os derivados azólicos ravuconazol e posaconazol também não apresentaram boa atividade contra o parasito, fato que pode estar relacionado ao mecanismo de ação da molécula; ambos são inibidores da biossíntese de ergosterol (enzima TcCYP51), e Urbina *et al.*, 2003, demonstraram que são necessários períodos mais prolongados (96 horas) para identificação da inibição dos esteróis em epimastigotas. Sykes e Avery (2018) observaram resultados similares.

Diferente do ensaio com epimastigotas, no ensaio utilizando tripomastigotas, a atividade antiparasitária das moléculas de origem natural foi ligeiramente maior. Conforme o que pode ser visto na Figura 7, os fármacos benznidazol e sulfona foram efetivos em induzir mortalidade do parasito. Já as substâncias de origem natural, algumas induziram porcentagem de mortalidade média maior do que 30%, sendo elas: extratos 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, geoprópolis e própolis vermelha. No ensaio com tripomastigotas, os derivados azólicos ravuconazol e posaconazol também demonstraram baixa atividade anti *T. cruzi*.

Figura 7 - Atividades dos bioprodutos e fármacos de referência sobre tripomastigotas.



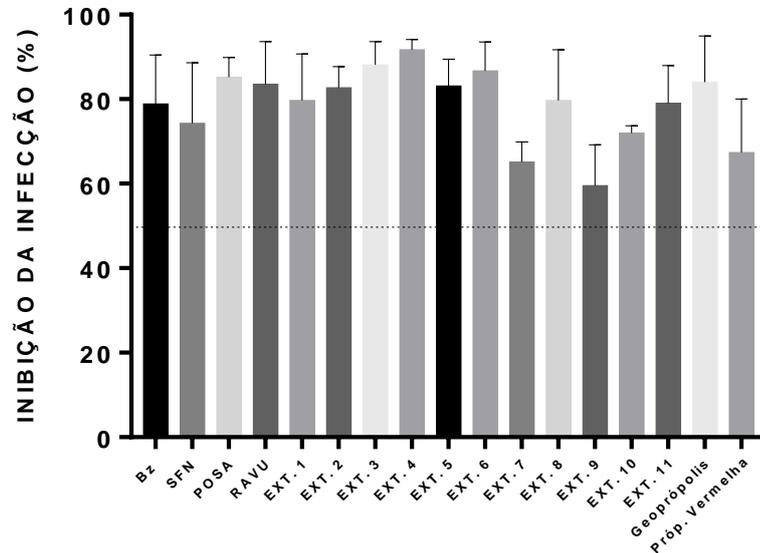
Legenda: Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas por 24 horas com fármacos (Bz- benznidazol; SFN – fexinidazol-sulfona; POSA- posaconazol; RAVU – ravuconazol), extratos de fungos endofíticos, geoprópolis e própolis vermelha, na concentração de 100 µg/mL, em estufa a 37°C. Após esse tempo, a porcentagem de mortalidade do parasito foi aferida utilizando a câmara de Neubauer. A linha pontilhada indica o nível de 30% de atividade.

Fonte: Da autora

No ensaio com tripomastigotas, os derivados azólicos ravuconazol e posaconazol também demonstraram baixa atividade anti-*T. cruzi*, corroborando os dados de Machado *et al.*, (2020), que demonstraram que o ravuconazol não exerce atividade anti-tripomastigota nesta dosagem, enquanto o mesmo foi mostrado para o posaconazol por Sykes e Avery (2018).

De forma interessante, no ensaio com amastigotas, mesmo com a utilização de concentrações menores dos bioprodutos, houve níveis de atividade maiores que 50% para os diferentes extratos (Figura 8). Da mesma forma, e de acordo com o esperado, a atividade anti-amastigota de todos os fármacos de referência foi acima de 70%.

Figura 8 - Porcentagem de inibição da infecção por formas amastigotas.

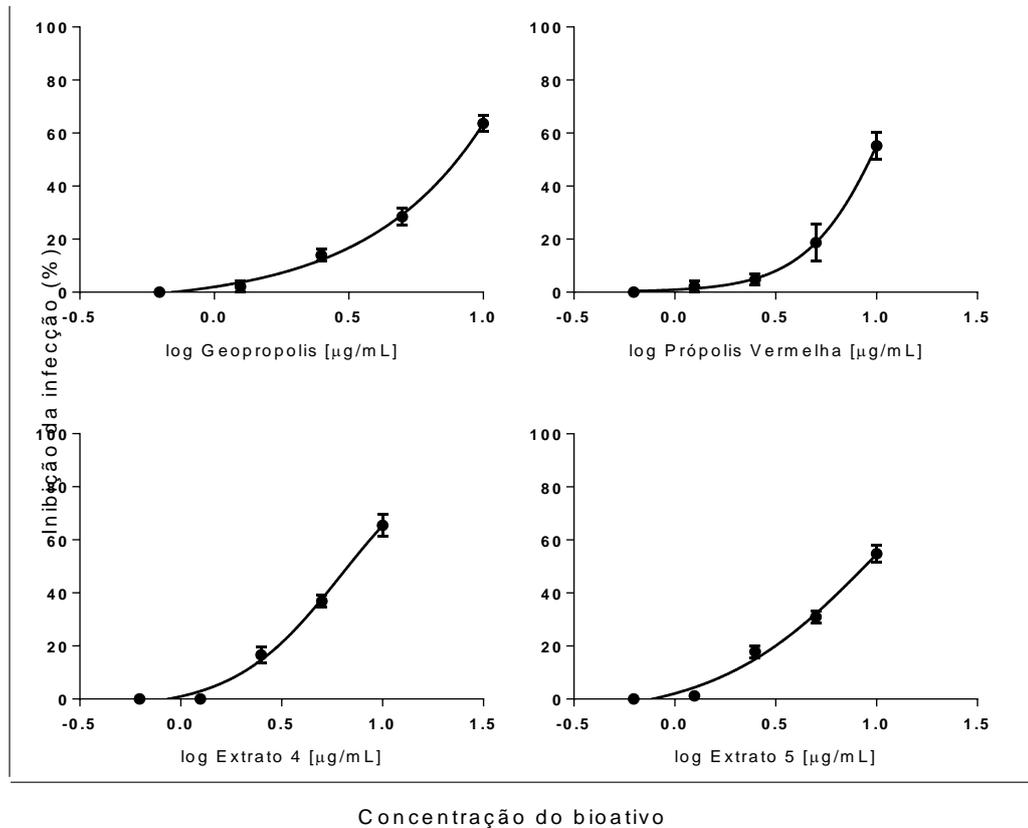


Legenda: Células Vero infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* foram incubadas por 48 horas com os fármacos (Bz- benznidazol; SFN – fexinidazol-sulfona; POSA- posaconazol; RAVU – ravuconazol), os extratos de fungos endofíticos, a geoprópolis e a própolis vermelha, na concentração de 10 µg/mL em estufa a 37°C. Após esse tempo, a coloração das lamínulas foi feita utilizando corante Giemsa e a contagem das células infectadas por microscopia óptica.

Fonte: Da autora

Considerando esses resultados, a própolis, geoprópolis e endofíticos 4, 5 e 9 foram selecionados para avaliação da atividade tripanossomicida em diferentes concentrações e determinação dos parâmetros EC-50. A figura 9 mostra as curvas de dose reposta para cada um deles; o efeito relativo ao extrato 9 não é mostrado na figura porque só houve inibição nas duas primeiras concentrações.

Figura 9 – Curvas de dose-resposta e EC-50 feitas com amastigotas.



Fonte: Da autora

Como mostrado na tabela 5, tanto os extratos de fungos endofíticos quanto as própolis apresentaram efeito concentração-dependente e a potência na inibição do parasitismo foi concordante com o ensaio de concentração única. O cálculo de EC-50 mostrou valores similares, exceto para o extrato 9. Segundo Higashi e Castro (1994), a própolis apresentou EC-50 de 7,8 µg/mL sobre amastigotas, valor que se aproxima muito ao encontrado no presente estudo.

Tabela 8- Resultados do experimento de EC-50 das substâncias nº4, nº5, nº9, própolis vermelha e geoprópolis.

Produto	Média± SD
Geoprópolis	6,04±0,61
P. Vermelha	6,62±0,95
Extrato nº 4	6,32±0,021
Extrato nº 5	6,26±0,82
Extrato nº 9	9,76±0,89

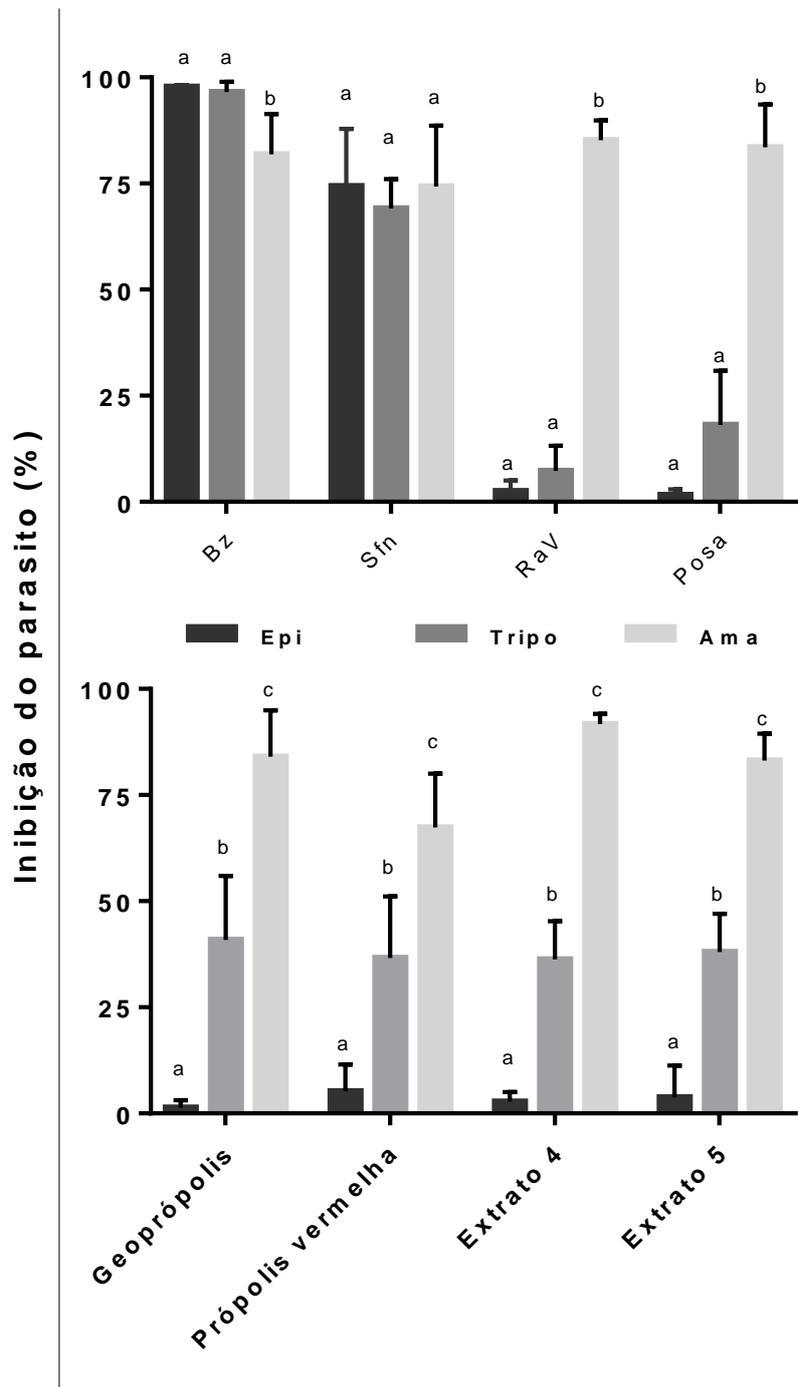
Fonte: Da autora

Dantas *et al.* (2017) relata que a inibição da proliferação de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* pode ter relação com o conteúdo de flavonóides e ácidos aromáticos presente nos extratos de própolis, principalmente na própolis vermelha, que possui maior teor destes componentes. Os dados de Higashi e Castro (1994) corroboram com os de Dantas, afirmando que esses constituintes da própolis poderiam intensificar o mecanismo de ativação da célula, levando ao aumento da destruição celular de amastigotas.

Os terpenos também são componentes bem distribuídos nos reinos Plantae e Fungi, e são conhecidos por sua atividade biológica e têm se mostrado bastante ativos contra vários parasitos. Os fungos apresentam variedade de terpenóides com atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antiplasmódica, antimalárica e antiviral (LENZI *et al.*, 2017)

Por fim, a figura 10 mostra a atividade de 4 extratos e das moléculas sintéticas de referência sobre as diferentes formas evolutivas, comparativamente.

Figura 10 – Comparação entre a atividade de moléculas sintéticas e produtos naturais em *T. cruzi* sobre as diferentes formas evolutivas do parasito.



Legenda: Bz- benznidazol, Sfn- fexinidazol-sulfona, Rav- ravuconazol, Posa – posaconazol. Os percentuais de inibição foram extraídos das figuras 6, 7 e 8.

Fonte: Da autora

Os resultados obtidos demonstram que a forma evolutiva do parasito apresentou impacto no estudo das atividades anti-*T. cruzi* e esse impacto parece relacionado ao

mecanismo de ação da substância. Enquanto os derivados azólicos não foram capazes de eliminar formas extracelulares do parasito, apresentam alta potência (escala nanomolar) em controlar a infecção por amastigotas intracelulares. Os resultados de Machado *et al.* (2020) e Sykes and Avery (2018) corroboram esses achados. Já Urbina *et al.* (1998, 2003) demonstram atividade anti-epimastigota do posaconazol e ravuconazol; no entanto, esse efeito é dependente da incubação da cultura por mais de 96 horas e há apenas uma redução na proliferação do parasito, mas não eliminação. Esses resultados refletem as diferenças no metabolismo de esteróis entre as diferentes formas evolutivas (MORAES *et al.*, 2014; SYKES E AVERY, 2018). De forma interessante, o mesmo perfil foi observado para a atividade de grande parte dos produtos de origem natural experimentalmente avaliados, no entanto, não é possível inferir no mecanismo de ação.

Os extratos de fungos endofíticos apresentam bons resultados relacionados ao potencial antimicrobiano e antioxidantes, já relatados na literatura, assim como a as própolis, além da atividade anti-inflamatória (BUENO- SILVA *et al.*, 2016; FRANCHIN *et al.*, 2017), na qual também é incluída a própolis vermelha (PINTO, 2019; SANTINI, 2019; HIGASHI E CASTRO, 1994). Dessa forma, esses bioprodutos são candidatos promissores a estudos pré-clínicos *in vivo*, nos quais poderia atuar via efeito tripanossomicida, além de efeitos pleiotrópicos que podem ser promissores.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a revisão sistemática mostraram que a forma evolutiva do parasito influencia no perfil de atividade tripanossomicida detectado *in vitro*, de forma que é possível sugerir que mais de uma forma evolutiva deva ser utilizada nessas avaliações. No entanto, a alta heterogeneidade nos experimentos de *screening* de produtos naturais, sintéticos e mesmo naqueles que avaliaram os fármacos de referência, limita inferências sobre o impacto da utilização das diferentes formas evolutivas no valor preditivo dos modelos utilizados. Essas constatações evidenciam que é urgentemente necessária a harmonização de protocolos utilizados pelos grupos de pesquisa na área, de forma a utilizar estratégias experimentais de maior valor translacional, otimizando tempo e recursos na busca de alternativas terapêuticas para a doença de Chagas. Ainda, essa harmonização traria impacto positivo no sentido de aumentar a reprodutibilidade dos parâmetros observados para os fármacos de referência, de forma que possam nortear de forma mais assertiva a progressão ou não dos estudos das moléculas testadas para etapas subsequentes.

A influência da forma evolutiva do parasito no desfecho da análise foi confirmada no estudo experimental realizado, no qual foi identificada atividade anti-amastigota de extratos de fungos endofíticos, própolis e geoprópolis testadas, embora a atividade tenha sido muito limitada ou nula para as formas extracelulares do parasito. Nesse contexto e considerando ainda os possíveis efeitos peliotrópicos desses bioprodutos na infecção por *T. cruzi*, os quais seriam resultantes das atividades biológicas já demonstradas na literatura, os extratos de endofíticos (4 e 5) e as própolis se incluem como candidatos à experimentação pré-clínica em modelo *in vivo* de infecção por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfus**, v. 4, p. 540–550, 2015.
- ARRÚA, E. C. *et al.* Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta Trop**, v. 108, 2019.
- ATHERTON, P. Aloe vera revisited. **The British Journal of Phytotherapy**, v. 4, n. 4, p.176-183, 1997.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia Microbiana**, p. 117-137, 1998.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 23, p. 1225-1237, 2014.
- BANKOVA, V. S. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p.31, 2000.
- BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 342–350, 2004.
- BATISTA, C. M. *et al.* The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 180, p. 198-207, 2018
- BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeido-semicarbazona (nitrofurazona) em esquema de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 104, n. 4, 1961.
- BREYNER, N. M. *et al.* In vitro models for investigation of the host-parasite interface - possible applications in acute Chagas disease. **Acta Trop**, v. 202, 2020.
- BUENO-SILVA, B. *et al.* Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, p. 1583-1590, 2016.
- BURROWS, J. N.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; MÖHRLE, J. Designing the Next Generation of Medicines for Malaria Control and Eradication. **Malaria**, v. 12, p.187, 2013.
- CALDAS, S. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1628-1637, 2014.

CANAVACI, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; PADILLA, A. M. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. 740, 2010.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no Distrito Federal**. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, p. 63, 2006.

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Acta Mol Basis Dis**, v. 1866, 2020.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. Mortality Trends for Neglected Tropical Diseases in the State of Sergipe, Brazil, 1980–2013. **Infect Dis Poverty**, 2017.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 3, p.286-296, 2012.

COURA, J. R. *et al.* Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of CD, in a field area with interrupted transmission: I. preliminary evaluation. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.3, p.139–144, 1997.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on CD chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, 1997.

COUTINHO, D. F. *et al.* Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. **Visão Acadêmica**, v.3, n.1, p. 7-12, 2002.

DANTAS SILVA, R. P. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ON**, v. 12, 2017.

DE CASTRO, S. L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Ann Rev Biol Sc**, v. 3, p. 49, 2001.

DE CASTRO, S. L.; HIGASHI, K. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Ethnopharmacol.**, v. 46, p. 55-58, 1995

DE TORANZO, E. G.; MASANA, M.; CASTRO, J. A. Administration of benznidazole, a chemotherapeutic agent against Chagas disease, to pregnant rats. Covalent binding of reactive metabolites to fetal and maternal proteins. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.272, p. 17-23, 1984.

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

DO CAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev Infect Dis**, v. 6, p. 223-238, 1984.

- FERNANDES, O. *et al.* The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118, 1998.
- FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the Salmonella/microsome assay. **Braz J Med Biol Res = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas Biológicas**, v. 19, p.19-25, 1986.
- 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, p. 755–759, 1987.
- FILIGHEDDU, M. T.; GORGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, p. 125-131, 2017.
- FONSECA-BERZAL, C.; ARÁN, V. J.; ESCARIO, J. A. Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.**, v. 117, p. 3367–3380, 2018.
- FRANCHIN, M. *et al.* The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49-55, 2018.
- FREITAS, M. *et al.* Flavonóides e triterpenos do ninho da abelha sem ferrão *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532–535, 2008.
- FROZZA, C., O. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.
- FUJITA D. M.; NASCIMENTO M. S; DE ANDRADE JÚNIOR, H. F. The oral transmission of chagas disease in Brazil: New food supplies and travel experience. **Acta Trop.**, v. 197 2019.
- HARVEY, A. *et al.* Emerging Infectious Diseases That Threaten the Blood Supply, **Seminars in Hematology**, v. 44, p. 32-41, 2007.
- HUANG, S. *et al.* Avanços recentes na composição química da própolis. **Molecules** , v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.
- JANSEN, A. M.; XAVIER S. C.; ROQUE A. L. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Trop.**, v. 151, p. 1-15, 2015.
- KATSUNO, K.; BURROWS J. N.; DUNCAN, K. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 14, p 151-158, 2015.
- KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H. A new era for chagas disease drug discovery? **Prog Med Chem.**, v. 54, p.185–230, 2015.

- KEESING, F. *et al.* Reservoir Competence of Vertebrate Hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. **J. Emerg Infect Dis.**, v. 18, p. 2013.-2016, 2012.
- KRATZ, J. G. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Exp Rev Clin Pharmacol.**, v. 11, p. 343-957, 2018
- LENZI, H. L. *et al.* Trypanosoma cruzi: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp Parasitol.**, v. 84, p. 16-27, 1996.
- LENZI, J. *et al.* Medicinal fungi: a source of antiparasitic secondary metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2791-5810, 2018.
- LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med.**, v. 171, p. 401-413, 1990
- LIMA-CAVENDISH, R. *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127-133, 2015.
- LIU, J.; LIU, G. Analysis of Secondary Metabolites from Plant Endophytic Fungi. **Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes**, p. 25–38, 2018.
- MACHADO, Y. A. *et al.* Amlodipine Increases the Therapeutic Potential of Ravuconazole upon *Trypanosoma cruzi* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, 2020.
- MADEIRA DE CARVALHO, L. M. *et al.* Efficacy of the nematofagous fungi *Duddingtonia flagrans* in the biological control of horse strongylosis in the Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 233-247, 2007.
- MENDONÇA, L. S. *et al.* Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 35, p. 291-298, 2015.
- MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J., GROUP PRISMA. “Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement,” **PLoS One**, vol. 6, n. 7, 2017.
- MOLINA, I. *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, 2017.
- MORAES, C. B.; GIARDINI, M. A.; KIM, H. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Sci Rep.**, v. 4, 2014.
- NATES-PARRA, G. Las Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) da Colômbia. **Biota Colombiana**, v. 2, 2001.
- NEAL, R. A.; VAN BUEREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 82, p. 709-714, 1988.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.**, v.83, p. 770-803, 2020

- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.552-558, 2011.
- PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental CD with nitrofurans compounds. **J Parasitol**, 1952,
- PARK, Y. K. *et al.* Evidence-Based Complementary Altern. Med. **Agric. Food Chem**, v. 50, p. 2502, 2015.
- PATRA, K. C. Antimicrobials in clinical practice: ivermectin the antiparasitic antibiotic. **Pediatr Infect Dis.**, v. 2, p. 14-20, 2010.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends Parasitol.**, v. 30, p. 289-298, 2014.
- PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **J Ethnopharmacol.**, v. 10, p. 495-502, 2005.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.
- PEREIRA, C. A. Autoinmunidad en la enfermedad de Chagas - Autoimmunity in Chagas disease. **Medicina (B Aires)**, v. 75, p. 262-263, 2015.
- PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1 β in *Trypanosoma cruzi* - induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect Immun**, v. 71, p. 4441-4447, 2003.
- PINTO, R. A. F. O. **Bioprospeção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 99f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Alimentos e Medicamentos da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2019.
- POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 71, p. 45-54, 1978.
- RASSI, A. J. R.; MARIN, J. A. Cardiomiopatia chagásica crônica: uma revisão dos principais mecanismos patogênicos e a eficácia do tratamento etiológico após o ensaio de Avaliação de Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase (BENEFIT). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 173-189, 2017.
- ROMANHA, A. J. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, 2010.
- RUFATTO, L. C. *et al.* Red própolis: chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 591-598, 2017.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Própolis vermelho brasileiro: nome legítimo da fonte de resina da planta. **MOJ Food Process. Technol**, 2018.
- SANCHES M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, E. Ações farmacológicas de extratos de própolis de abelhas sem ferrão (Meliponini), **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 2017.

SÁNCHEZ-VALDÉZ F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **Elife**. 2018, v. 7, 2018.

SANTINI, A. T. **Caracterização química e atividades biológicas da geoprópolis produzida por *Melipona rufiventris***. Dissertação – mestrado – Departamento de Alimentos e Medicamentos - Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL – MG, 2019.

SFORCIN, J. M. **Própolis e geoprópolis: uma herança das abelhas**. São Paulo: Editora Unesp Digital, 2017. V. 11.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V.; Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **J. Ethnopharmacol**, v. 133, p. 253, 2011.

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SILVA-CARVALHO, R. *et al.* Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SOEIRO, M. N. Activities of Psilostachyin A and Cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 5307-5314, 2013.

SPERANDIO DA SILVA, G. M.; MEDIANO, M. F. F.; HASSLOCHER-MORENO, A. M. Benznidazole treatment safety: the medecins sans frontieres experience in a large cohort of Bolivian patients with Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, p. 2596-2601, 2017.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 317, 2014.

STREIGER M. L. *et al.* . Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, 2004

STROBEL, G. A.; VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi. **Natural Product Communications**, v. 4, 2009

SYKES, M. L.; AVERY, V. M. 3-pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal *in vitro* profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

TARLETON, R. L.; TYLER, K. M.; MILES, M. A *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease: cause and Effect In American Trypanosomiasis. **Eds Springer New York**, v. 7, p. 107– 116, 2003.

TEIXEIRA T. L. *et al.*. Potencial uso terapêutico de extratos fitoterápicos na tripanossomíase. **Pathog Glob Health**, v. 108, p.30-36, 2014.

TEIXEIRA, A. R.; CALIXTO, M. A.; TEIXEIRA, M. L. Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. **Mutat Res.**, v. 305, p. 189-196, 1994.

TESTON, A. P.; MONTEIRO, W. M.; REIS, D. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Trop Med Int Health**, v. 18, p. 85-95, 2013.

TORRICO, F. R; VIOTTI, C. Chagas congénito, Enfermedad de Chagas, Un enfoque práctico basado en la investigación médica. **Panamericana**, v. 1866, p. 117-128, 2015.

URBINA, J. A. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1771-1777, 1998.

VILLALTA, F.; RACHAKONDA, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.**, v. 14, 2019.

VILLAR J. C; PEREZ, J. G.; CORTES, O. L. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, 2014.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med.**, 2009.

WILLIAMS, J. T. *et al.* . Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in *Macaca fascicularis* using archived tissues. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, 2009

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases into global health and development**, 2015

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, 2009.

ANEXO A – Tabela de dados da revisão sistemática