



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ISABELLA COIMBRA VILA NOVA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO INIBIDOR DE TRIPSINA
DE FLORES DE *Moringa oleifera* SOBRE CÉLULAS INFECTADAS COM
*Trypanosoma cruzi***

Recife
2020

ISABELLA COIMBRA VILA NOVA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE
FLORES DE *Moringa oleifera* SOBRE CÉLULAS INFECTADAS COM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia
da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica e
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Vila Nova, Isabella Coimbra

Investigação do efeito imunomodulador do inibidor de tripsina de flores de Moringa oleifera sobre células infectadas com Trypanosoma cruzi / Isabella Coimbra Vila Nova. – 2020.

54 f. : il., col.

Orientador: Emmanuel Viana Pontual.

Coorientadora: Virginia Maria Barros de Lorena

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Moringa oleifera 2. Doença de Chagas 3. Inibidores da tripsina 4. Citocinas 5. Óxido nítrico I. Pontual, Emmanuel Viana (orient.) II. Lorena, Virginia Maria Barros de (coorient.) III. Título.

583.78

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 385

ISABELLA COIMBRA VILA NOVA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE
FLORES DE *Moringa oleifera* SOBRE CÉLULAS INFECTADAS COM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia
da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica e
Fisiologia.

Aprovado em: 21 / 02 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Pollyanna Michelle da Silva – UFPE (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação a minha família,
em especial ao meu grande amor, meu pai
Ubiraci de Castro Vila Nova (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou meus caminhos para que eu conseguisse seguir meus sonhos, em especial minha carreira acadêmica, por me colocar pessoas tão especiais em minha vida.

Aos meus pais Silvania Coimbra e Uiraci de Castro (*In memoriam*) pelos momentos de apoio, amor e dedicação no decorrer da minha carreira acadêmica, durante esses anos que me possibilitaram apreciar momentos de aprendizados na minha vida pessoal e acadêmica.

Agradeço especialmente ao meu noivo Efraim por estar ao meu lado em todos os momentos e sempre compreender minha dedicação pela pesquisa, à minha querida e única irmã Jhéssica e ao querido dog Peanut.

A todos meus companheiros do laboratório BIOPROT, em especial, Leyde, Robson, Carlos, Caio, Jainaldo, Poliana, Amanda, Livia e David .

Aos Professores Thiago Napoleão e Patrícia Paiva, que contribuíram com os experimentos e disponibilizaram o laboratório BIOPROT com toda dedicação e suporte para a realização deste trabalho.

A Dra. Virginia Lorena que abriu as portas do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ para que eu pudesse desenvolver meu projeto, sempre com total disponibilidade, dedicação em todos os momentos e me acolheu em seu laboratório.

Aos meus companheiros de laboratório da FIOCRUZ que ajudaram e me ensinaram com toda dedicação para que meus experimentos fossem concluídos, em especial, Leyllane, Kamila, Diego, Victor, Ana, Janderson, Michelle, Mineo, Cintia, Junior, Amanda, Gabriella.

A todos do laboratório LABTEC, que sempre me recebem de portas abertas me apoiando em todos os momentos, em especial a Welton, Eva, Ardiles, Hanna e Profa. Jeine.

Todo meu carinho e admiração ao meu amado orientador Prof. Emmanuel Pontual por sempre acreditar no meu desempenho, pelos momentos de aprendizado e por sempre estar presente em todas as dificuldades, e nossa amizade e admiração durante esses anos a cada dia mais aumenta.

À banca examinadora, agradeço antecipadamente por ter aceitado meu convite e pelas contribuições e observações feitas para enriquecimento da minha dissertação.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia e a todos os professores pelos conhecimentos adquiridos. Aos órgãos de fomento, em especial à Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que foi essencial para minha manutenção durante o mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indiretamente para realização deste trabalho, que é um grande sonho em minha vida.

A felicidade murcha como as flores; entretanto, assim como o bom jardineiro sempre tem a seu alcance outras para substituí-las, quem possui conhecimentos pode, também, substituir constantemente os motivos que dão permanência à felicidade na vida. O conhecimento a fixa, a torna estável; permite sentir seu palpitar de eternidade.

(PECOTCHE, 1988, p. 44)

RESUMO

A doença de Chagas, conhecida como tripanossomíase americana, é uma enfermidade endêmica e letal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. *Moringa oleifera* é uma planta Pantropical cujas fores expressam um inibidor de tripsina proteico (MoFTI, do inglês *M. oleifera flower trypsin inhibitor*) que foi previamente relatado como agente tripanocida. Este trabalho avaliou o efeito de MoFTI sobre a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humanas (PBMCs), bem como seu efeito sobre a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e óxido nítrico (NO) por PBMCs infectados com *T. cruzi*. Flores frescas foram homogeneizadas com água destilada para obtenção do extrato e MoFTI foi isolado por cromatografia de afinidade em coluna contendo Tripsina-Agarose. Em seguida, o inibidor foi avaliado quanto ao efeito na atividade de tripsina utilizando o substrato comercial BApNA e na sobrevivência de tripomastigotas de *T. cruzi* livres. MoFTI foi avaliado quanto ao efeito na viabilidade de PBMCs e foram determinadas concentrações seguras para avaliação do efeito imunomodulador. Índices de seletividade foram calculados como a razão entre os valores de CC₅₀ e CL₅₀ (concentração 50% citotóxica, e concentração que mata 50% dos tripomastigotas de *T. cruzi*, respectivamente). Após isso, o efeito de MoFTI sobre a produção de citocinas e óxido nítrico (NO) por PBMCs infectados com *T. cruzi* foi investigado. MoFTI (62 U/mg de atividade inibidora contra tripsina) foi hábil em matar tripomastigotas livres (LC₅₀ de 43,55 μ g/mL) corroborando com os resultados que já foram descritos e não apresentou toxicidade para PBMCs até 500 μ g/mL. O inibidor foi fortemente seletivo para tripomastigotas em relação aos PBMCs (índice de seletividade maior que 11,48). Quando os PBMCs foram infectados com *T. cruzi* e tratados com MoFTI (43,55 ou 87,1 μ g/mL) a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) e anti-inflamatória (IL-10), bem como de NO foi significativamente ($p < 0.05$) aumentada. Em conclusão, os dados relatados neste trabalho apontam MoFTI como um promissor agente imunomodulador sobre PBMCs humanos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* com um bom grau de especificidade para as células do parasita em relação às células sanguíneas hospedeiras.

Palavras chave: inibidor de protease; *Moringa oleifera*; atividade tripanocida; citocinas; óxido nítrico.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is an endemic and lethal disease common in Latin America that is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Moringa oleifera* is a pantropical tree whose flowers express a proteinaceous trypsin inhibitor (MoFTI, *M. oleifera* flower trypsin inhibitor) that was previously reported as a trypanocidal agent. This work evaluated the effect of MoFTI on the viability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as well as its effects on the production of cytokines and nitric oxide (NO) by PBMCs infected with *T. cruzi*. Fresh flowers were homogenized with distilled water to obtain the extract and MoFTI was isolated by affinity chromatography on Trypsin-Agarose column. Then, the inhibitor was evaluated for the effect on trypsin activity using the commercial substrate BApNA and on the survival of free *T. cruzi* trypomastigotes. MoFTI was evaluated for the effect on the viability of PBMCs and safe concentrations were determined to assess the immunomodulatory effect. Selectivity indices were calculated as the ratio between the CC₅₀ and LC₅₀ values (50% cytotoxic concentration, and concentration that kills 50% of *T. cruzi* trypomastigotes, respectively). Next, the effect of MoFTI on the production of cytokines and nitric oxide (NO) by PBMCs infected with *T. cruzi* was investigated. MoFTI (62 U/mg of inhibitory activity against trypsin) was able to kill free tripomastigotes (LC₅₀ of 43.55 µg/mL) and was not toxic to PBMCs up to 500 µg/mL. The inhibitor was highly selective for trypomastigotes regarding to PBMCs (selectivity index greater than 11.48). When PBMCs were infected with *T. cruzi* and treated with MoFTI (43.55 or 87.1 µg/mL) the release of pro-inflammatory (TNF- α and INF- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, as well as NO was significantly ($p < 0.05$) increased. In conclusion, the data reported in this work points MoFTI as a promising immunomodulatory agent on human infected PBMCs with *T. cruzi* tripomastigotes with a good degree of specificity for parasite cells regarding the host blood cells.

Keywords: protease inhibitor; *Moringa oleifera*; trypanocidal activity; cytokines; nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fundamentação teórica

Figura 1 - Distribuição geográfica dos casos da doença de Chagas em todo o mundo, 2006-2015.	18
Figura 2 - Espécies de insetos triatomíneos distribuídos na região nordeste.	18
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 4 - Evolução clínica da doença de Chagas.	22
Figura 5 - Representação esquemática da relação de <i>T. cruzi</i> com a resposta imune em humanos.....	26
Figura 6 - Imunorregulação das citocinas na doença de Chagas.....	27
Figura 7 - <i>Moringa oleifera</i> (A) com suas flores em detalhe (B).....	31

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

DC- Doença de Chagas

DTNs- Doenças Tropicais Negligenciadas

IFN- γ - Interferon gama

IGg- Imunoglobulina G

IL- Interleucina

NO- Óxido nítrico

PBMC- Células mononucleares de sangue periférico

PBS- Phosphate-buffered saline

RPMI- Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

SBF- Soro Bovino Fetal

Th1-Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo 1

Th2-Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo 2

TNF- Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	Doenças tropicais negligenciadas	16
3.2	Doença de Chagas	16
3.2.1	Aspectos gerais da doença.....	16
3.2.2	Agente etiológico	19
3.2.3	Manifestações clínicas.....	22
3.2.5	Tratamento	27
3.3	Inibidores de proteases	29
3.6	<i>Moringa oleifera</i>	30
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	APÊNDICE A– A TRYPSIN INHIBITOR FROM <i>Moringa oleifera</i> FLOWERS MODULATES THE IMMUNE RESPONSE IN VITRO OF <i>Trypanosoma cruzi</i> INFECTED HUMAN CELLS.....	43

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) constituem um grupo de enfermidades cuja ocorrência reflete o quadro de desigualdade social nos países e inclui a dengue, a esquistossomose, a hanseníase, a malária, a tuberculose, entre outras enfermidades dentre as quais destacamos a doença de Chagas e as leishmanioses (BRASIL, 2010). De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), cerca de 1,5 bilhões de pessoas por ano em todo o mundo são acometidas por alguma dessas doenças. As populações mais afetadas são geralmente aquelas vulneráveis economicamente e com limitações de acesso aos serviços de saúde. A redução da ocorrência dessas doenças é importante para que um país alcance o desenvolvimento econômico, uma vez que, anualmente, os gastos com prevenção e tratamento das DTNs custam bilhões de dólares aos países em desenvolvimento (DNDi, 2018).

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e ocorre principalmente em áreas endêmicas da América Latina com registros relevantes de mortalidade. A doença de Chagas é transmitida pelo contato com as fezes de insetos triatomíneos infectados, conhecidos popularmente como “barbeiro” ou “chupão”. Atualmente é estimado que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com *T. cruzi* (OMS, 2018).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, alternando entre inseto vetor e hospedeiro vertebrado, com formas evolutivas que diferem bioquímica e morfológicamente: epimastigotas (forma replicativa encontrada no intestino do inseto), tripomastigotas metacíclicos (forma presente na porção final do tubo digestivo e nas fezes do inseto), tripomastigotas sanguíneos (encontrados no sangue do hospedeiro) e amastigotas (forma intracelular presente nos tecidos do hospedeiro vertebrado). Tripomastigotas e amastigotas são as formas clinicamente relevantes, constituindo alvos para drogas contra doença de Chagas (DE SOUZA, 2002).

Atualmente, apenas duas drogas de efeito tripanocida estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol (LAFEPE) e o nifurtimox (Bayer). Apesar de recomendada pela Organização Mundial de Saúde, a quimioterapia para a doença de Chagas tem sérias limitações, uma vez que o benzonidazol e o nifurtimox são eficientes para o controle da parasitemia na fase aguda da doença, mas têm eficácia limitada na fase crônica e apresentam alta toxicidade para o hospedeiro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). Na década de 1980 o Nifurtimox teve sua produção descontinuada no Brasil, mas pode ser

disponibilizado pelo Ministério da Saúde em casos de resistência ou forte reação ao benzonidazol (FERREIRA et al., 2019). O benzonidazol e o nirfutimox apresentam sérios efeitos colaterais, como anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatites, geralmente esses efeitos adversos podem levar o paciente a desistir do tratamento (FARIA et al., 2007).

Moringa oleífera Lamarck (Moringaceae) é uma planta pantropical que tem despertado interesse devido às suas propriedades medicinais e utilização como planta forrageira, bem como por ser uma fonte promissora de óleos e biogás (MAKKAR e BECKER, 1996; FOIDL et al., 2001; KARADI et al., 2006). Suas flores contêm cálcio, potássio e antioxidantes (α - e γ tocoferol) (SÁNCHEZ MACHADO et al., 2006). Pontual et al. (2012) caracterizaram um extrato de flores de *M. oleífera* em água destilada, revelando a presença de β -amirina, β -sitosterol, flavonoides (campferol e quercetina) e de uma proteína com atividade inibidora de tripsina (MoFTI, do inglês *M. oleífera flower trypsin inhibitor*); os autores demonstraram a toxicidade do extrato para larvas de *Aedes aegypti* nos estágios L2, L3 e L4, sendo este último o de maior susceptibilidade ao tratamento. Em trabalho mais recente, foi reportado que, após purificado, MoFTI (com peso molecular de 18 kDa) causou mortalidade ($CL_{50} = 0,3$ mg/mL) e atrasou o desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* (PONTUAL et al., 2014). Os relatos sobre as atividades biológicas de MoFTI também incluem ação tripanocida por causar lise de tripomastigotas de *T. cruzi* com $CL_{50/24\text{ h}} = 41,20 \pm 4,28$ $\mu\text{g/mL}$ (PONTUAL et al., 2017) com seletividade de 7,9 a >12 células do parasita em relação a macrófagos peritoneais murinos e células Vero, respectivamente (PONTUAL et al., 2017).

A escassez de terapia efetiva para doença de Chagas durante a fase crônica, e com baixa toxicidade para células do hospedeiro tem impulsionado a busca por novos agentes tripanocidas. Considera-se também que um dos importantes efeitos esperados para as drogas de ação tripanocida é que sejam capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, o que, juntamente com a ação direta sobre o parasita, facilita sua eliminação (SATLHER-AVELLAR et al., 2012). Nesse sentido, os relatos da ação direta de MoFTI sobre tripomastigotas de *T. cruzi* estimularam a avaliação do efeito do inibidor na resposta imune de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o inibidor de tripsina de flores de *Moringa oleifera* (MoFTI) quanto ao efeito sobre a produção de citocinas por PBMCs infectadas com *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar MoFTI a partir de protocolo previamente estabelecido.
- Investigar MoFTI quanto à atividade tripanocida contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliar MoFTI quanto à citotoxicidade para PBMCs.
- Determinar o efeito de MoFTI sobre a produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF) por PBMCs infectados ou não com *T. cruzi*.
- Analisar o efeito de MoFTI sobre a produção de óxido nítrico por PBMCs infectados ou não com *T. cruzi*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diverso de enfermidades crônicas debilitantes causadas por protozoários, bactérias, fungos ou vírus. Sua maior prevalência ocorre em países com climas tropicais e subtropicais, estando distribuídas em 149 países em desenvolvimento onde acometem mais de 1,5 bilhões de pessoas, geralmente em comunidades de maior vulnerabilidade econômica onde o saneamento e o acesso aos serviços de saúde pública são precários (HOUWELING et al., 2016; ARRÚA, 2019; OMS, 2019). Assim, as DTNs refletem o quadro de desigualdade social nos países e a maneira mais eficiente para reduzir a sua disseminação é melhorar a qualidade de vida da população (DNDi, 2018).

Por atingirem principalmente a população de baixa renda, as DNTs não possibilitam retornos lucrativos para a indústria farmacêutica, possuem pouca visibilidade política e os problemas associados à sua ocorrência são eventualmente ignorados. Contudo, o que precisa ser compreendido é que com a diminuição da incidência dessas doenças, os países poderiam alcançar o desenvolvimento econômico mais facilmente, pois os gastos com prevenção e tratamento das DNTs custam anualmente bilhões de dólares aos seus cofres (SANTOS et al., 2017).

O tratamento de doenças desse grupo geralmente é restrito, devido ao alto custo e, além disso, algumas drogas são altamente tóxicas. Mesmo assim, a busca por novos fármacos que sejam mais eficazes e tolerados pelo organismo humano é desestimulada devido ao baixo incentivo para erradicação das DTNs, à falta de interesse das indústrias de medicamentos e ao fraco apoio às pesquisas acadêmicas (ARRÚA, 2019). Dentre as DTNs podemos destacar a doença de Chagas.

3.2 Doença de Chagas

3.2.1 Aspectos gerais da doença

Em 1909, o médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) fez o descobrimento da doença de Chagas (DC) no Sudeste do Brasil, no estado de Minas Gerais

(CHAGAS, 1909). Essa descoberta trouxe aspectos relevantes da doença, sendo descritas informações sobre as formas clínicas, o agente etiológico, identificado no sangue humano, bem como os mecanismos de infecção e as formas de transmissão da doença (MARIN-NETO, 2017).

A DC, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença infecciosa, potencialmente letal. Anualmente são registradas 50.000 casos de mortes distribuídas em todo o mundo (GONÇALVES-SANTOS et al., 2019) e, como característica do grupo das DNTs, é uma doença restrita a países pobres ou em desenvolvimento, em áreas sem saneamento básico (DIAS et al., 2015; MARIN-NETO, 2017). Dados epidemiológicos apontam que, nos anos de 1990 eram 30 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo com DC e houve uma redução para 7 milhões de pessoas no ano de 2010, porém dados do mesmo período não mostram uma diminuição significativa no risco de exposição ao parasita, considerando que o risco de contrair essa doença foi reduzido em 30% (RASSI, 2010).

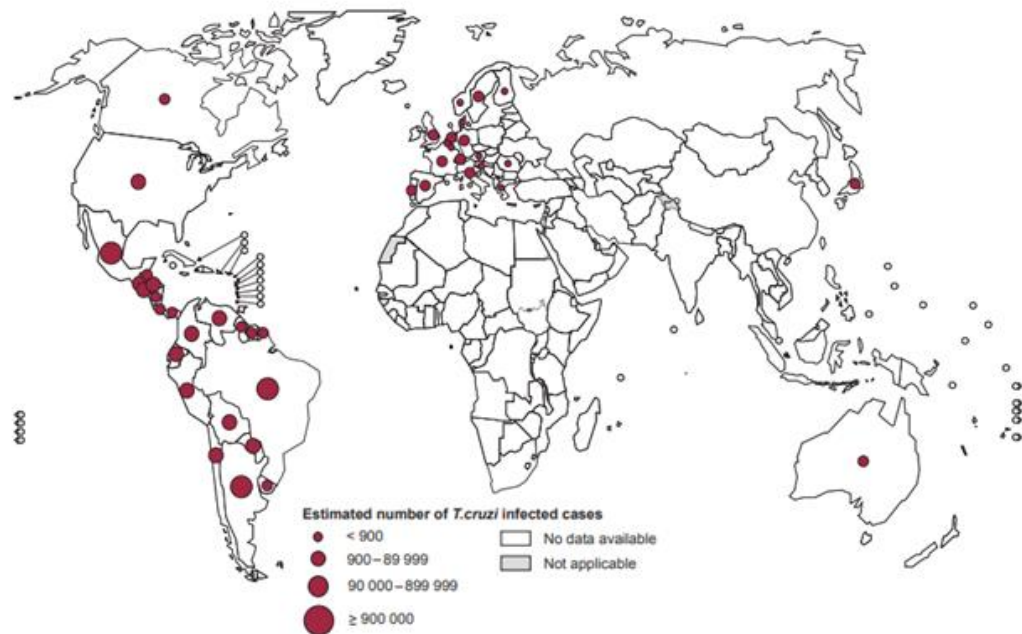
Mais atualmente, a distribuição da DC ocorre principalmente em áreas endêmicas da América Latina onde acomete em torno de 21 países endêmicos e 19 países não endêmicos, devido ao processo de imigração que acarretou na expansão da doença (BIVONA et al., 2020). A DC pode ser encontrada nos países da América do norte, Europa, Ásia e Oceania (COURA et al., 2014). Na América Central e do Sul, pelo menos 120 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença de Chagas e, anualmente, em torno de 12.000 mortes são causadas pelos agravos da cardiomiopatia crônica dessa doença (CUNHA-NETO, 2014).

O processo de globalização causou modificações epidemiológicas na DC disseminando-a e originando diferentes formas clínicas da doença. O aumento nas migrações humanas, desmatamento ambiental, modificações climáticas, popularização nas áreas urbanas e condições sociais vulneráveis (ausência de saneamento básico, educação, saúde pública de qualidade, baixa renda nas famílias) contribuem para os índices elevados de casos da DC em todo o mundo (Figura 1) (DIAS et al., 2015).

A DC pode ser transmitida por várias espécies de vetores da família Reduviidae, subfamília Triatominae, que variam de acordo com a região que são encontrados (Figura 2) (OMS, 2018; CHUIT, et al 2019). Esses insetos hematófagos ficam geralmente em locais escondidos nas paredes, rachaduras atrás de quadros e móveis, ou em telhados. Os triatomíneos são frequentemente encontrados em casas suburbanas, rurais ou em áreas próximas de matas e seu hábito de vida é noturno. Para alimentar-se pica os indivíduos e imediatamente defeca próximo à picada. Se o inseto estiver infectado pelo agente etiológico, este será eliminado através das fezes e o indivíduo coça a região da picada fazendo o parasita penetrar na sua

corrente sanguínea. Tal comportamento fez com que esses insetos fossem popularmente conhecidos como “barbeiro” ou “chupão” e esse tipo de contágio é classificado como uma transmissão vetorial (WHO, 2017).

Figura 1 - Distribuição geográfica dos casos da doença de Chagas em todo o mundo, 2006-2015.



Fonte: WHO, 2017.

Figura 2 - Espécies de insetos triatomíneos distribuídos na região nordeste.



Fonte: Adaptado JURBERG et al., 2014.

Além da transmissão vetorial, a DC pode ser transmitida de forma congênita ou seja, de mãe para filho (é estimado que cerca de 3% e 10% das crianças contraem a doença por essa via) ou pela via oral, mais frequente entre hospedeiros vertebrados como os pequenos primatas, que se alimentam de insetos triatomíneos infectados (FREILIJ, 2019). A contaminação oral

também é comum através de alimentos e bebidas, como o açaí, sucos de frutas e o caldo-de-cana (NOYA, 2015) que tenham sido processados juntamente com os insetos infectados. Essa forma de transmissão pode apresentar maiores riscos à saúde do hospedeiro com manifestações clínicas mais severas do que na transmissão vetorial. Os sintomas mais descritos são: o edema que é observado na face, gengivas e língua, miocardite, febre prolongada, esplenomegalia e hepatomegalia (FREILIJ, 2019).

Existem ainda outras formas de transmissão que ocorrem com uma menor frequência, como por exemplo através da transfusão de sangue, órgãos ou em casos de acidentes laboratoriais. Estudos mais recentes mostraram que a transmissão sexual da DC pode ocorrer, pois foram encontrados vestígios do DNA do agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*) em espermatozoides dos indivíduos que estavam infectados com o parasita (ARAUJO et al., 2017).

O diagnóstico na fase aguda da DC é baseado na detecção de parasitas no sangue do hospedeiro. O exame microscópico para identificação do parasita pode ser realizado por métodos diretos no sangue ou líquido cefalorraquidiano do paciente. Os testes sorológicos não são utilizados para a fase aguda, no entanto a detecção de imunoglobulina M anti- *T. cruzi* (IgM) pode ser empregado. Esses ensaios sorológicos de IgM não estão disponíveis e nem padronizados. No caso de bebês no primeiro mês de vida, pode ser detectada a presença do parasita através do sangue do cordão umbilical ou sangue periférico do neonato (RASSI et al., 2012).

3.2.2 Agente etiológico

O agente causador da DC pertence à espécie *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae), um protozoário flagelado que, como característica da ordem à qual pertence, apresenta uma estrutura chamada de cinetoplasto. Além disso, contém cerca de 20% de seu DNA total distribuído em forma de grandes e pequenos círculos e possui um flagelo que desenvolve-se melhor nos estágios extracelulares. Essa estrutura se desenvolve próximo ao cinetoplasto e surge através de uma bolsa flagelar cuja localização em relação ao núcleo pode ser diferente de acordo com o estágio parasitário (SOTO et al., 2019).

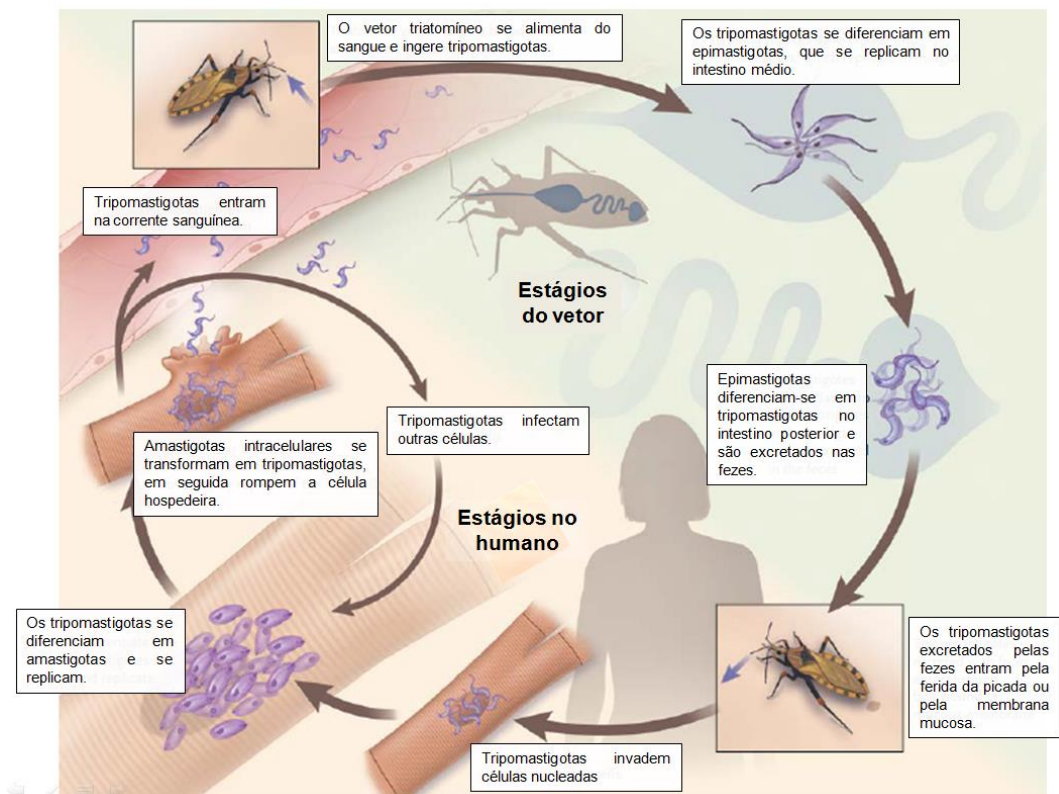
T. cruzi infecta cerca de 8 milhões de pessoas na América Central e do Sul (DE FUENTES-VICENTE, 2019). Seu ciclo de vida alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Nos vertebrados, é encontrado no sangue e nos tecidos, enquanto nos invertebrados é encontrado no interior do intestino. O ciclo se inicia quando o vetor triatomíneo faz ingestão de tripomastigotas sanguíneos através do repasto sanguíneo de um mamífero

infectado. Após a ingestão, os tripomastigotas são diferenciados em epimastigotas (forma replicativa encontrada no intestino do vetor, dividida por fissão binária) no intestino anterior dos insetos. Em seguida, os epimastigotas passam para o intestino posterior na porção do reto, e são diferenciados em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes do vetor. A invasão dos tripomastigotas metacíclicos ocorre através de uma ferida causada pela picada ou através da membrana mucosa do mamífero hospedeiro. No citoplasma das células, ocorre a diferenciação da forma intracelular amastigota. A replicação irá ocorrer em um tempo de 12 horas no período de 4 a 5 dias ao fim dos quais acontece novamente a diferenciação em tripomastigotas até a lise celular para a liberação dos tripomastigotas na corrente sanguínea. Dessa forma o ciclo poderá ser iniciado novamente (Figura 4) (SOTO, 2019; LONGO, 2015). Tripomastigotas e amastigotas são as formas clinicamente relevantes, constituindo alvos para drogas contra DC por serem as formas de vida encontradas nos mamíferos (DE SOUZA, 2002).

Apesar da reprodução do *T. cruzi* ser assexuada, ou seja clonal, esse protozoário apresenta uma grande diversidade genética e bioquímica diante das suas cepas. De acordo com o quadro clínico do paciente essa diversidade tem grande importância para a fase de tratamento. Estudos mostram que existe uma grande diversidade genômica de *T. cruzi* e de acordo com essa variabilidade, são classificados em seis unidades de tipagem discreta (DTUs) baseadas na origem genética (BRISSE et al., 2000; ZINGALES et al., 2009; ZINGALES, 2012) que são atualmente chamados de *T. cruzi* I-VI (TcI-TcVI).

Pesquisas mostram que as infecções da DC na região da América Latina são ocasionadas por DTUs, TcI, TcII, TcV e TcVI, a TcIé, restrita apenas para o ciclo silvestre (ESPINOSA, 2010). Essas DTUs são geralmente identificadas nos ciclos de transmissão doméstico. A classificação das DTUs do *T. cruzi* e das amostras biológicas exerce grande importância para a compreensão da epidemiologia da DC. Sendo necessário para verificar relações entre as cepas, características clínicas ou a transmissão desse parasita auxiliando no controle dessa doença (HERRERA, 2019).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



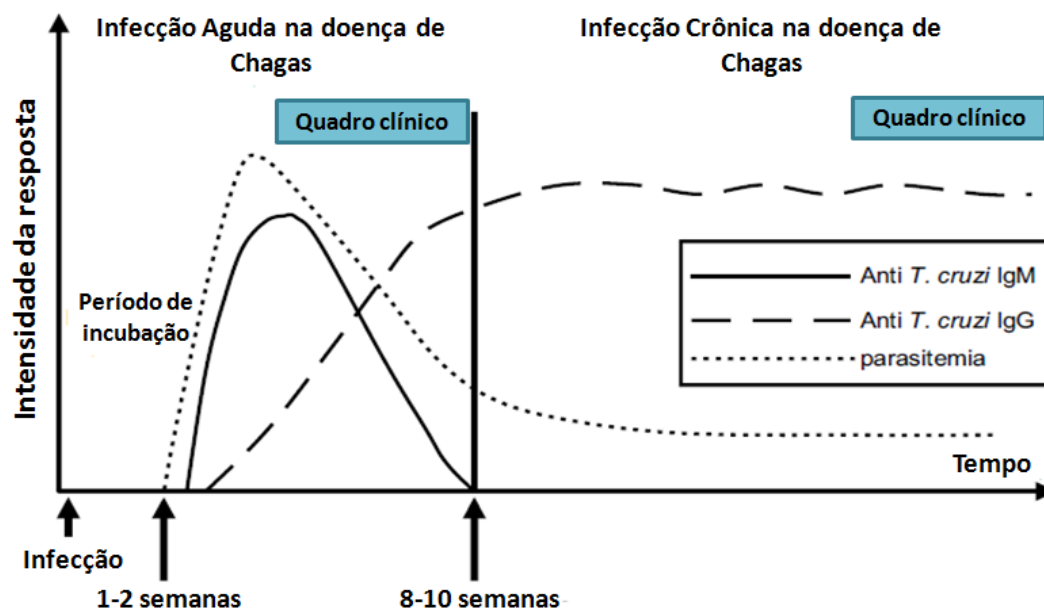
Fonte: Adaptado BERN, 2015.

T. cruzi apresenta em seu metabolismo o envolvimento de várias proteínas, dentre elas as proteinases de cisteína (CP) que são amplamente encontradas na família Trypanosomatidae. Especificamente em *T. cruzi*, foi possível caracterizar a CP cruzipaína (CAZZULO, CAZZULO FRANKE, MARTINEZ, 1990). A cruzipaína é uma proreinase classificada como um antígeno imunodominante, encontrado na maioria dos soros de pacientes com DC. É considerada como a principal proteinase lisossômica de *T. cruzi*. São atribuídas funções importantes a essa proteína como o envolvimento na nutrição do parasita, dentro do intestino dos insetos, além da sua função na entrada dos tripomastigotas dentro das células do hospedeiro vertebrado para em seguida evoluir para a forma amastigota (SOUTO-PADRÓN et al., 1990; CAZZULO, 2002). Essa proteína foi descrita em todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, porém em níveis diferentes, sendo mais ativa na forma epimastigotas (CAMPETELLA et al., 1990; FRANKE DE CAZULLO et al., 1994; CAZZULO, 2002).

3.2.3 Manifestações clínicas

A DC apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Após a infecção será iniciada a fase aguda que pode durar em torno de 2 meses com alta parasitemia (Figura 4) devido à circulação livre do *T. cruzi* na corrente sanguínea ou pelo sistema linfático. A fase aguda pode ser assintomática ou apresentar sintomas inespecíficos. Contudo, alguns sinais podem ser identificados nessa fase do processo infeccioso, como a presença de lesões cutâneas e o sinal de Romaña (o inchaço das pálpebras) que irá auxiliar no diagnóstico precoce da doença (WHO, 2017).

Figura 4 - Evolução clínica da doença de Chagas.



Fonte: Traduzido de RASSI et al., 2012.

Após a fase aguda, se o paciente não for tratado, o quadro clínico evolui para uma fase crônica, que ocorre após a disseminação dos parasitas na corrente sanguínea e no sistema linfático. Essa fase não será reversível, permanecendo por toda a vida do paciente. Na fase crônica cerca de 60% a 70% dos pacientes não desenvolvem sintomas clínicos, sendo, neste caso, essa forma crônica classificada como indeterminada. Cerca de 30% a 40% dos indivíduos desenvolvem as formas crônicas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva da doença (RASSI et

al., 2010). Na maioria dos casos é verificado que a infecção na forma cardíaca é a que oferece mais riscos ao paciente podendo levá-lo à morte por causa da arritmia ou insuficiência cardíaca.

Na infecção crônica da forma cardíaca ocorrem vários danos ao coração, como diminuição das paredes ventriculares, disfunção biventricular, aneurismas cardíaco, trombos murais, destruição das células do miocárdio, dentre outros danos que podem ser causados no músculo do coração. Os danos observados na DC crônica do trato gastrointestinal podem ser compreender o megacólon e megaesôfago; nos exames laboratoriais, podem ser encontradas lesões inflamatórias focais com infiltração linfocítica e o número de neurônios do plexo mioentérico pode ser consideravelmente reduzido (RASSI, et al., 2012). Esses danos característicos da fase crônica da DC se devem ao fato dos parasitas ainda estarem se multiplicando e persistirem no organismo do hospedeiro de forma que as lesões se tornem cada vez mais graves, podendo levar o hospedeiro à morte. A eliminação desses parasitas do organismo hospedeiro pode ser realizada através de métodos que estimulem a resposta imune e ou com o tratamento com medicamento indicado.

Na fase crônica da DC, devido à baixa parasitemia, o diagnóstico é realizado através da detecção sorológica dos anticorpos específicos para imunoglobulina G (IgG) que fazem ligação ao antígeno *T. cruzi* (Figura 4). Para um paciente ser considerado infectado com a DC seu teste sorológico necessita ser positivo para duas técnicas distintas. Entre vários métodos que podem ser utilizados para esse diagnóstico na fase crônica, podemos citar o ELISA (teste imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos) que é um método amplamente utilizado para confirmação de pacientes com a fase crônica da DC (FREILIJ, 2019).

3.2.4 Resposta imune

A resposta imune exerce papel fundamental para manter o equilíbrio no organismo do hospedeiro vertebrado. Estudos comprovam que a destruição das células do hospedeiro por *T. cruzi* e algumas lesões, chamadas de imunomediadas secundárias são consideradas como os processos mais graves da DC. Com o objetivo de minimizar essas complicações, a eliminação do parasita e a regulação da resposta imune desempenham papéis fundamentais em estratégias para tratamento da DC (GONÇALVES-SANTOS et al., 2019).

A resposta imune é extremamente importante durante as fases clínicas da doença, tanto aguda, quanto crônica. Após a infecção do hospedeiro por *T. cruzi* há uma série de reações em cascata desencadeadas para ampliar a resposta imune inata e, em seguida, a adaptativa. Mesmo assim, a resposta do sistema imunológico não é eficaz para eliminar o parasita do organismo

hospedeiro, uma vez que *T. cruzi* possui diversos mecanismos para evadi-lo (ACEVEDO, GIRARD, GOMEZ, 2018).

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunológica em casos de DC foi descrito por estudos utilizando modelos animais, incluindo camundongos. Várias células do nosso organismo estão envolvidas nessa resposta, incluindo os linfócitos NK (*Natural Killer*) e células T (CD4⁺ e CD8⁺); a produção dos anticorpos pelas células B também está envolvida (BRENER, GAZZINELLI, 1997; DOS REIS, 1997; ESPINOSA, 2010). A resistência de *T. cruzi* à infecção tem sido relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IFN- γ , as quais participam na ativação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos o qual exerce toxicidade direta sobre *T. cruzi*. Por outro lado, as citocinas de resposta Th2 como IL-10, IL-4 e TGF- β são relacionadas à vulnerabilidade ao *T. cruzi* (RODRIGUES et al., 2000; HIYAMA, 2001; ESPINOSA, 2010).

A resposta imune inata envolve o sistema complemento composto por mais de 40 proteínas que circulam livremente pelo plasma sanguíneo e atuam através de uma cascata de eventos proteolíticos que aumentam a sinalização ativada na presença de um patógeno, como o *T. cruzi*. O papel do sistema complemento culmina com a fixação de opsoninas nos epítomos do antígeno, possibilitando a fagocitose dos patógenos (opsonização). Esse evento ativa várias respostas que iniciam a inflamação, auxiliando no combate à infecção. A ativação do sistema complemento pode ser realizada através de três vias: a clássica, a alternativa e a da lectina (MBL, do inglês *Mannose-binding lectin*), que formam o complexo C3 convertase e é hidrolisado em C3a e C3b. Os mecanismos utilizados pelo sistema complemento compreendem a fagocitose mediada pelo receptor C3b que tem expressão em neutrófilos e macrófagos, e C3a que desempenha um papel pró-inflamatório (ACEVEDO, GIRARD, GOMEZ, 2018).

T. cruzi desenvolveu vários mecanismos para sua sobrevivência dentro do hospedeiro, possibilitando a inativação do sistema complemento. A proteína do retículo endoplasmático (RE) a calreticulina (TcCRT) encontra-se na superfície do parasita depois da infecção e é capaz de fazer ligação a vários sensores de padrão molecular, por exemplo C1q, MBL (FERREIRA, et al. 2004) e 1- ficolina (SOSONIUK, et al. 2014) prejudicando a ativação do complemento. O T-DAF (fator de aceleração de decaimento tripomastigota) é outra proteína de *T. cruzi* que modula a conversão do complexo C3 pelas vias alternativa e clássica, impedindo também a formação dos complexos do sistema complemento (CARDOSO, REIS-CUNHA, BARTHOLOMEU, 2016; GEIGER, et al. 2016; LIDANI, et al. 2017; ACEVEDO, et al. 2019).

As células de primeira linha de defesa são os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) que atuam contra vários patógenos. São responsáveis pelo reconhecimento

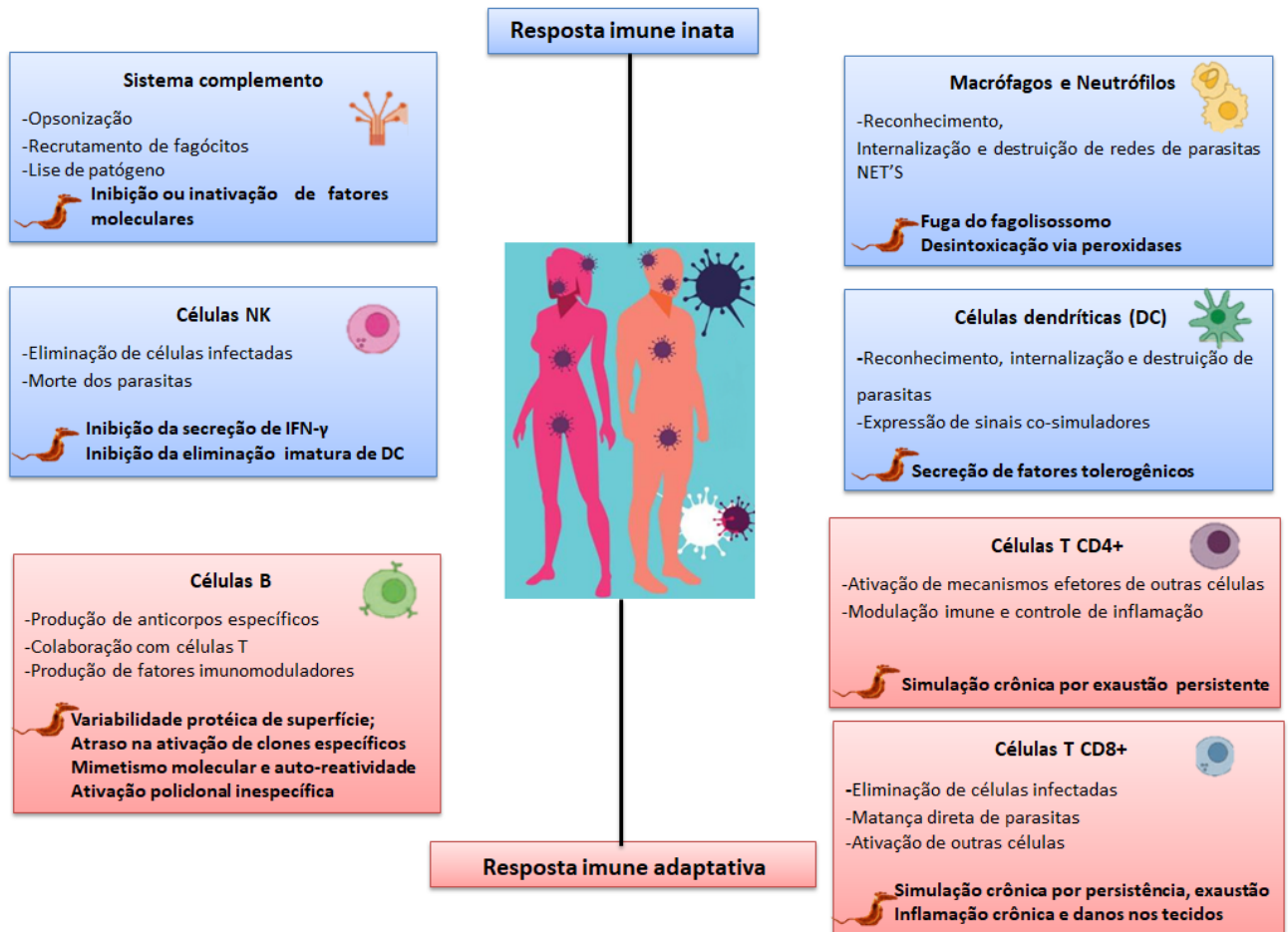
dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que irão estimular a imunidade inata diante dos receptores de membrana, por exemplo o receptor Tolllike (TLR). Estes possibilitam a atuação do sistema imune para detectar e fagocitar os microrganismos. O próximo passo é a liberação de citocinas que tem a capacidade de modular a resposta local onde está ocorrendo a infecção (ABBAS, 2012; FERREIRA, et al. 2004; ACEVEDO, et al. 2019).

Nas infecções causadas por patógenos intracelulares, as células NK (Figura 5) participam na diferenciação das células T com relação a um perfil de inflamação e fazem a ativação de macrófagos pela secreção de IFN- γ após o processo de infecção que pode ser fundamental para identificação e controle dos parasitas na fase aguda da DC (CARDILLO, REED, SILVA, 1996; ACEVEDO, et al. 2019). As células B estão relacionadas à imunidade adaptativa e possuem a capacidade de produzir anticorpos, na infecção pelo *T. cruzi* são observadas mudanças na maturação e diferenciação dessas células B, dessa forma induzindo uma resposta do anticorpo que não possibilita a eliminação do parasita (ACOSTA et al., 2007; ACEVEDO et al., 2019). Foi relatado que na DC crônica, os pacientes tem um aumento da ativação dos linfócitos T para secretar citocinas pró e anti-inflamatórias; essa resposta das células T mantém a parasitemia baixa na fase crônica da DC (DUTRA, GOLLOB, 2008; SARTORI et al., 2002; ACEVEDO et al., 2019).

As respostas dos Linfócitos T citotóxicos (LTC) são consideradas alvos principais para o conhecimento da resposta imune na DC. Foi mencionado que células T CD8⁺ são fundamentais para controlar a infecção pelo *T. cruzi*. Os pacientes crônicos cardíacos graves tinham uma menor frequência de CD8⁺ comparado com os pacientes cardíacos leves e assintomáticos, mostrando no entanto que a resposta do LTC pode auxiliar a progressão dos sintomas da DC (JUNQUEIRA et al., 2010; TARLETON, 1990; TARLETON et al., 1992; ALBAREDA et al., 2006; ACEVEDO et al., 2019). As células T CD4⁺ expressam moléculas de superfície e secretam citocinas que irão modular outras células, em modelos experimentais murinos com infecção crônica da DC essas células desempenham papel importante nas lesões cardíacas, dessa forma sendo importante na resposta diante o *T. cruzi* (ABBAS, 2012; YOUNÈS-CHENNOUFI, et al. 1998; ACEVEDO, et al. 2019).

Relatos prévios em modelos experimentais da infecção por *T. cruzi* mostraram que o aumento da resposta imune de células T tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ e o aumento na produção de citocinas como, IFN- γ , TNF- α e a IL- 12 são importantes para controlar a parasitemia do *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN, ISSES A.; COFFMAN, 1996; MARTINS, et al. 1999).

Figura 5 - Representação esquemática da relação de *T. cruzi* com a resposta imune em humanos.



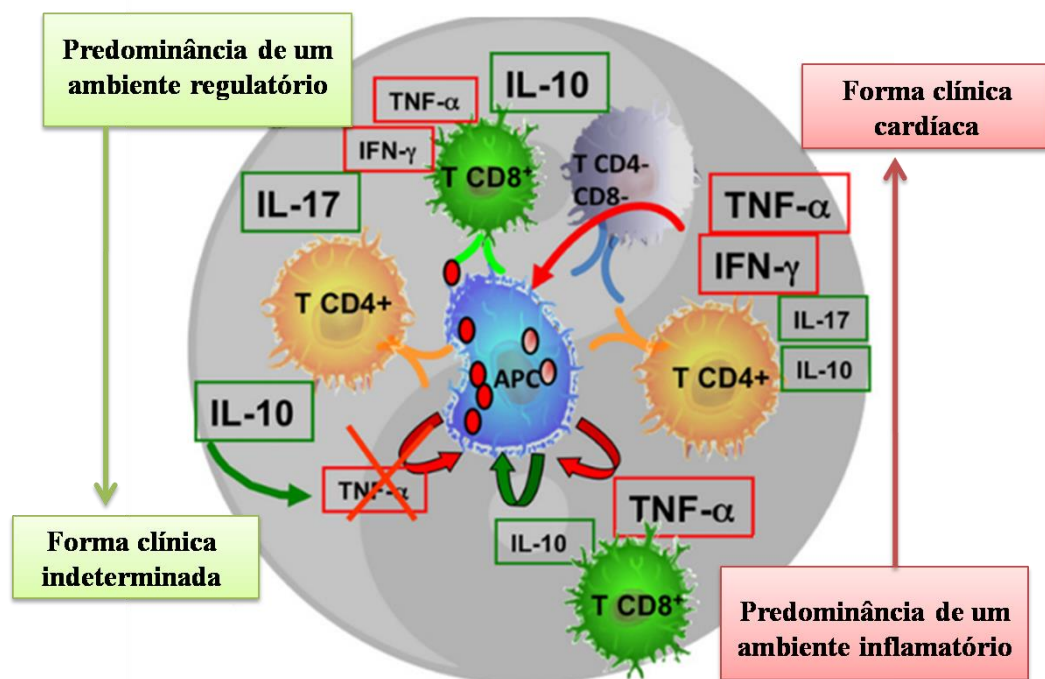
Fonte: Adaptado de ACEVEDO et al., 2019.

Na fase aguda da DC é importante a produção de anticorpos, e ativação imunológica se mostram eficazes para controlar a infecção pelo *T. cruzi*. Estudos realizados com modelos experimentais mostram que há uma grande resposta inflamatória na fase aguda, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que fazem a ativação das células para a eliminação do parasita (TEIXEIRA, GAZZINELLI, 2002). Quando o paciente que está na fase aguda passa para a fase crônica da doença, é verificado uma diminuição da parasitemia e um controle da resposta imunológica pró-inflamatória que ocorre na fase aguda. Dessa forma, sugerindo a presença de mecanismos imunorregulatórios para controlar a resposta inflamatória, as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 fazem uma regulação na produção das citocinas pró-inflamatórias.

Os pacientes da fase crônica da DC produzem níveis mais elevados de citocinas anti-inflamatórias, em relação aos pacientes na fase aguda (SOUZA et al., 2004), a IL-10 é

encontrada desde os estágios iniciais da fase crônica (SATHLER-AVELAR et al., 2003; VITELLI-AVELAR et al., 2008) , o controle da resposta pró-inflamatória na fase aguda pode estar relacionado a produção da citocina IL-10. Todavia, na forma indeterminada na fase crônica da DC há uma prevalência de citocinas anti-inflamatórias, mas na fase crônica cardíaca existem uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 6). O mecanismo de evolução do paciente da forma indeterminada para a forma cardíaca ainda não foi totalmente elucidado, mas relatos mostram que a perda da capacidade de controle da resposta imune inflamatória pode causar danos no tecido do paciente (DUTRA et al., 2014).

Figura 6 - Imunorregulação das citocinas na doença de Chagas.



Fonte: Traduzido de Dutra et al. (2014)

3.2.5 Tratamento

Estudos mostram que existem vários fármacos, incluindo produtos de origem natural que são promissores para o tratamento da DC, mas esses potenciais medicamentos ainda não possuem licença para iniciar os ensaios clínicos. O tratamento utilizado na DC deve pelo menos curar o processo infeccioso da fase aguda, e minimizar os danos causados na infecção crônica, dessa forma diminuindo ou prevenindo os índices de morbidade e mortalidade relacionados às formas clínicas mais graves da doença (RASSI, et al. 2012). Portanto, o tratamento que é utilizado na clínica médica atual baseia-se nos medicamentos Benzonidazol (Lafepe ©) e

Nirfutimox (Lampit®, Bayer) (GARCIA-BOURNISSEN, 2019), que são drogas nitroheterocíclicas. O medicamento nifurtimox (derivado do nitrofuranonifurtimox) iniciou sua utilização na clínica médica em 1965 e teve sua produção descontinuada no Brasil na década de 80, todavia o benzonidazol (derivado do nitroimidazol) é o único medicamento recomendado em vários países incluindo o Brasil para o tratamento da DC (ARAÚJO-JORGE, CASTRO, 2012).

Os medicamentos disponíveis para tratamento da DC tanto o nirfutimox quanto o benzonidazol, possuem sua eficiência comprovada na fase aguda da doença, porém na fase crônica a chance de cura da doença com esses medicamentos são menos descritas. Essas drogas possuem vários efeitos colaterais para o paciente em tratamento (por exemplo, no sistema nervoso central, e alterações no hemograma com leucopenia) que podem deixar o paciente desestimulado para continuar o tratamento da DC, em média de 10% à 30% dos pacientes desistem do tratamento (BIVONA et al., 2020). Até o momento não existem vacinas para a DC (BEAUMIER et al., 2016).

O benzonidazol possui efeito antiparasitário para todas as formas evolutivas, epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de proteínas e RNA. Recomenda-se a utilização de 5 a 8 mg/kg/dia, duas doses por dia durante o período de 60 dias. Porém não é recomendado para mulheres grávidas (MOSCATELLI, MORONI, 2019; FERREIRA et al., 2019). O tratamento específico com benzonidazol também possui efeitos colaterais comprovados, sendo mais frequente a presença de dermatites alérgicas, em torno de 20% a 30% dos pacientes, polineuropatia (distúrbio simultâneo de diversos nervos periféricos do corpo humano) ocorrendo em torno de 10%, e, de forma menos frequente, a depleção de células da série branca no sangue (ECHEVERRIA, MORILLO, 2019).

Na fase aguda da DC, o tratamento é recomendado a todos os casos de infecção confirmada independente da forma de transmissão (RASSI et al., 2000; RASSI et al., 2012). No entanto, na fase crônica da DC o uso do benzonidazol tem sido eficaz para crianças de até 12 anos de idade, mas o tratamento para adultos na fase crônica deve ser prescrito de maneira individual, visando as características clínicas apresentadas. Porém na forma cardíaca grave da fase crônica esse tratamento não é utilizado devido a relatos que não existe melhora no quadro clínico desses pacientes (FERREIRA et al., 2019).

Em um estudo randomizado BENEFIT não foi verificada diferença significativamente os grupos tratados com benzonidazol e placebo que apresentavam cardiopatia chagásica

crônica, porém, houve uma redução da carga parasitária verificada através de PCR no sangue dos pacientes tratados com benzonidazol (DIAS, et al. 2016; FERREIRA, et al. 2019)

Nesse contexto, cresce a busca por novos fármacos que sejam mais tolerados pelo organismo do hospedeiro, mais eficazes na fase crônica da doença e que possam ser utilizados como alternativa caso a cepa de *T. cruzi* não seja suscetível ao tratamento com o benzonidazol.

3.3 Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases formam complexos, reversíveis ou não, com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da sua atividade por competição com o substrato pelo sítio catalítico (TREMACOLDI, PASCHOLATI, 2004). Esses inibidores fazem a de regulação das da atividade das proteases endógenas (RYAN, 1990; BODE, HUBER, 1992), prevenindo a proteólise tanto em condições fisiológicas normais quanto em situações patológicas (LASKOWSKI, KATO, 1980; LASKOWSKI, JAFFE, KOMORNICKI, 1986; COTABARREN et al., 2020).

Os inibidores de proteases tem despertado o interesse das indústrias farmacêuticas para atuar como potenciais fármacos, devido às proteases participarem de processos biológicos importantes como a imunidade, coagulação sanguínea, regulação do ciclo celular e morfogênese tecidual (HEUTINCK et al., 2010; UDVARDY, 1996; COTABARREN et al., 2020). Nas plantas os inibidores de proteases participam do mecanismo de defesa contra microrganismos ou insetos. Os inibidores de proteases são classificados de acordo com o grupo de proteases que inibem como inibidores de serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases ou metaloproteases (LASKOWSKI, KATO, 1980; TREMACOLDI, PASCHOLATI, 2004).

Os inibidores possuem muitas aplicações na biomedicina, biotecnologia, indústria de alimentos e diagnóstico e são geralmente pequenas proteínas formadas por 15 a 60 aminoácidos contendo vários resíduos de cisteína na forma de ponte dissulfeto, o que confere resistência a temperatura, condições extremas de pH ou força iônicas e à proteólise. Nesse sentido, os inibidores de proteases de plantas são promissores para compor fármacos que podem ser utilizados no tratamento de câncer, esclerose múltipla, processos inflamatórios e outras doenças (COTABARREN, et al. 2020).

Os inibidores de tripsina, uma serino-protease, são mais investigados quanto as suas propriedades. O inibidor de tripsina de *Tecoma stans* (ancião amarelo), TesTI, foi capaz de

inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Candida krusei* com concentração mínima inibitória (CMI) de 100 mg/mL e concentração mínima fungicida (CMF) = 200 mg/mL, bem como não apresentou toxicidade para PBMCs (PATRIOTA et al., 2016). Relatos mostraram que o extrato do tronco de *Pilosocereus gounellei* possui um inibidor de tripsina (PgTI) de aproximadamente 37,1 kDa que inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com CMI de 7,5 a 150 µg/mL, e foi bactericida para *Escherichia coli* com concentração mínima bactericida (CMB) de 75,0 µg/mL. PgTI também inibiu o crescimento de *Candida krusei* (CMI de 60 µg/mL) (DA ROCHA FILHO et al., 2019).

3.6 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lamarck (Moringaceae) é uma planta pantropical, nativa do leste da África e sul da Índia (SANTOS et al., 2015; CORIANO et al. 2019). Atualmente existem 13 espécies pertencentes a essa família. É encontrada em vários países dos trópicos, estando adaptada a climas úmidos ou quentes e podendo sobreviver em solos pouco férteis e secos. Seu crescimento é rápido, sendo considerada um arbusto ou árvore de pequeno porte, devido à sua altura que pode variar de 5 a 10 metros (Figura 7A) (MATOS, 1998; KARADI et al., 2006; ANWAR et al., 2007; VERGARA-JIMENEZ, ALMATRAFI, FERNANDEZ, 2017).

M. oleifera possui folhas de coloração verde claro, com plumas e cerca de 30 a 60 cm com muitos folhetos pequenos. As flores são bissexuais e possuem aroma, contêm cinco pétalas de tamanho variável, com coloração branca ou creme que florescem nos primeiros 6 meses após o plantio. A floração pode ocorrer na época de abril a junho nos pedicelos peludos e finos; após esse período as flores crescem em hino e seu comprimento pode variar de 12 a 30 cm (PAUL, C. W.; DIDIA, 2012; SANTIAGO, NETO, 2017; LIU et al., 2018). Em áreas geográficas com climas mais frios a floração ocorre uma vez por ano, em regiões mais temperadas podem florescer duas vezes ou até o ano todo. Seus frutos possuem várias quantidades de sementes, podendo chegar a mil após três anos do seu plantio (SANTIAGO, NETO, 2017; LIU et al., 2018).

Tem despertado interesse devido às suas propriedades medicinais e utilização como planta forrageira, bem como por ser uma fonte promissora de óleos e biogás (MAKKAR e BECKER, 1996; FOIDL et al., 2001; KARADI et al., 2006). É conhecida popularmente como uma “árvore milagrosa” e “árvore da vida” por causa de suas propriedades que trazem benefícios a população. Sua utilização na medicina é muito investigada em todo o mundo. Suas preparações possuem várias atividades farmacológicas como atividade atividades

antimicrobiana, hipotensora, hipoglicêmica, imunomoduladora e anti-inflamatória ou em caso de bronquite, algumas infecções e febre (PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, 2019). As partes da *M. oleifera* que são amplamente investigadas incluem, folhas, flores, vagens, sementes, raízes e casca (MADI et al., 2016; TILOKE et al., 2018).

Figura 7 - *Moringa oleifera* (A) com suas flores em detalhe (B).



Fonte: A autora

Nas sementes de *M. oleifera* foram encontrados compostos que podem auxiliar o efeito terapêutico em várias doenças, podendo produzir a expressão do fator nuclear kappa B (NFκB), citocinas como, IL-1β pró-inflamatória, IL-6 e TNF-α e óxidos nítricos (JAJA-CHIMEDZA et al., 2017). Suas sementes contêm lectinas com atividade inseticida (COELHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011) e as suas flores podem apresentar antioxidantes (α - e γ - tocoferol), lectinas, inibidor de tripsina e alcalóides antimicrobianos (LIZZY et al., 1968; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2006; SANTOS et al., 2009; BIJINA et al., 2011; MOURA et al., 2011).

As flores de *M. oleifera* (Figura 7. B) possuem polifenóis, alcalóides, taninos, flavonóides, vitaminas, minerais e carotenóides (KALAISELVI, V. et al. 2018) além de cálcio e potássio (SÁNCHEZ MACHADO et al., 2006). Pontual et al. (2012) caracterizaram um extrato aquoso de flores de *M. oleifera*, revelando a presença de β -amirina, β -sitosterol, cammpferol, quercetina, e de um inibidor de protease protéico (MoFTI).

Relatos mostraram que as flores de *Moringa oleifera* possuem um inibidor de tripsina que é uma protéico (MoFTI), é uma proteína de 18 kDa que é tóxica para larvas de *Aedes*

aegypti por atrasar seu desenvolvimento, também foi capaz de inibir o crescimento de bactérias intestinais no ínstar L₄ das larvas (CMI= 0,031 mg / mL e CMB =1,0 mg / mL) (PONTUAL et al., 2014). Relato mais recente demonstrou que MoFTI é um promissor agente tripanocida por causar lise de tripomastigotas de *T. cruzi* com CL50/24 h de $41,20 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$. Curiosamente, o inibidor mostrou-se seletivo para as células do parasita quando comparado com macrófagos peritoneais murinos e células Vero, revelando índices de seletividade que variaram entre 7,9 a >12 (PONTUAL et al., 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O inibidor de tripsina de flores de *M. oleifera* (MoFTI) não apresenta citotoxicidade para PBMCs humanos, revelendo um bom grau de especificidade para as células do parasita ;
- MoFTI é capaz de modular a resposta imune por PBMCs humanos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi*, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) e anti-inflamatória (IL-10), bem como NO.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, Ises A.; COFFMAN, Robert L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental parasitology**, v. 84, n. 2, p. 231-244, 1996.
- ACEVEDO, Gonzalo R.; GIRARD, Magalí C.; GÓMEZ, Karina A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1929, 2018.
- ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. et al. Trypanosoma cruzi Infection Beats the B-cell Compartment Favouring Parasite Establishment: Can we Strike First?. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 137-142, 2007.
- ALBAREDA, María Cecilia et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International immunology**, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.
- ÁLVAREZ, José M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.
- ARAUJO, Perla F. et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437-446, 2017.
- ARRÚA, Eva C. et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta tropica**, p. 105080, 2019.
- BEAUMIER, Coreen M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2996, 2016.
- BERN C, MARTIN DL, GILMAN RH. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology** 2011; 75: 19-47.
- BILGIN, Mehmet et al. Bauhinia bauhinioides cruzipain inhibitor reduces endothelial proliferation and induces an increase of the intracellular Ca²⁺ concentration. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 283-290, 2010.
- BIVONA, Augusto E. et al. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient Trypanosoma cruzi immune-mediated control. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, p. 165658, 2020.
- BODE, Wolfram; HUBER, Robert. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, n. 2, p. 433-451, 1992.
- BONTEMPI, Esteban et al. Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of Trypanosoma cruzi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 77, n. 3, p. 599-604, 1984.
- Franke de Cazzulo, B. M.; Martínez, M.; North, M. J.;

BRENER, Zigman; GAZZINELLI, Ricardo T. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International archives of allergy and immunology*, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

C.M. BEAUMIER, P.M. GILLESPIE, U. STRYCH, T. HAYWARD, P.J. HOTEZ, M.E. BOTTAZZI, Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease, *Vaccine*. 34 (2016) 2996 –3000. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.074

CAMPETELLA, O.; MARTINEZ, J.; CAZZULO, J.J. A Major Cysteine Proteinase is Developmentally Regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol.Lett.*1990, 67, 145 - 150.
CARDILLO, Fabiola et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 128-134, 1996.

CARDOSO MS, REIS-CUNHA JL, BARTHOLOMEU DC. Evasion of the immune response by trypanosome cruzi during acute infection. **Frontiers in Immunology**. 2016;6:1–15.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BATERL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CAZZULO, J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, 2002.

CAZZULO, J.J.; CAZZULO FRANKE, M.C.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B.M. Some Kinetic Properties of a Cysteine Proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1990, 1037, 186 - 191.

CAZZULO, J.J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 33–42, 1989.

CHAGAS C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanumcruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 1909;1(2):159–218. ISSN 0074-0276
Chagas disease.CurrOpin Infect Dis. 2008;21(3):287–92.

CHUIT, Roberto; MEISS, Roberto; SALVATELLA, Roberto. Epidemiology of Chagas Disease. In: **Chagas Disease. Springer, Cham**, 2019. p. 91-109.

CORIOLOANO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, 2019.

COTABARREN, Juliana et al. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, p. 110398, 2020.

COURA, José Rodrigues; VINAS, Pedro Albajar; JUNQUEIRA, Angela CV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and

the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 109, n. 7, p. 856-862, Nov. 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000700856&lng=en&nrm=iso>.access on 15 Jan. 2020. Epub Oct 21, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140236>.

CUNHA-NETO, Edecio; CHEVILLARD, Christophe. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

DA ROCHA FILHO, Cláudio Alberto Alves et al. PgTI, the First Bioactive Protein Isolated from the Cactus *Pilosocereusgounellei*, is a Trypsin Inhibitor with Antimicrobial Activity. **Advances in Research**, p. 1-11, 2019.

DE FUENTES-VICENTE, José A. et al. Trypanosoma cruzi: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. **Acta tropica**, 2019.

DE OLIVEIRA, Cleide et al. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from Bauhinia bauhinioides seeds. **Biological chemistry**, v. 382, n. 5, p. 847-852, 2001.

DIAS JCP, RAMOS JRN JR, GONTIJO ED, LUQUETTI A, SHIKANAI-YASUDA MA, COURA JR, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 2016;25(N. esp.):7-86. PMid:27869914.

DOS REIS, G. A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Today**, v. 13, n. 9, p. 335-342, 1997.

DUTRA, W. O. et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with Trypanosoma cruzi chronic infection. **Scandinavian journal of immunology**, v. 45, n. 1, p. 74-80, 1997.

DUTRA, W. O., MENEZES, C. A., MAGALHÃES, L. M., & GOLLOB, K. J. (2014). Immunoregulatory networks in human C hagas disease. **Parasite immunology**, 36(8), 377-387.

DUTRA, Walderez O.; GOLLOB, Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 287, 2008.

ECHEVERRIA, Luis E.; MORILLO, Carlos A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2019.

ESPINOSA, B. et al. Mexican Trypanosoma cruzi TCI strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 890672, 2010.

ESPINOSA, B. et al. Mexican *Trypanosoma cruzi* TCI strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 890672, 2010.

- FARIA, Angélica R. et al. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.
- VALLEJO, Alejandro et al. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. **Acta tropica**, v. 164, p. 117-124, 2016.
- FERREIRA, Ariela Mota et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, n. AHEAD, 2019.
- FERREIRA, Ariela Mota et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, n. AHEAD, 2019.
- FERREIRA, Viviana et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from Trypanosoma cruzi. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042-3050, 2004.
- FRANKE DE CAZZULO, B. M.; MARTÍNEZ, M.; NORTH, M. J.; COOMBS, G. H.; CAZZULO, J. J. Effect of Proteinase Inhibitors on Growth and Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**. 1994, 124, 81 - 86.
- FREILIJ, Héctor. Chagas Disease: Past, Present, and Future. In: Chagas Disease. **Springer, Cham**, 2019. p. 3-22.
- GARCIA-BOURNISSEN, Facundo. Clinical Pharmacology of Drugs for the Treatment of Chagas Disease. In: Chagas Disease. **Springer, Cham**, 2019. p. 299-312.
- GEIGER, Anne et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from trypanosomatids. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 212, 2016.
- GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.
- GONÇALVES-SANTOS, Elda et al. Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-Trypanosoma cruzi specific chemotherapy. **International immunopharmacology**, v. 77, p. 105961, 2019.
- GONÇALVES-SANTOS, Elda et al. Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-Trypanosoma cruzi specific chemotherapy. **International immunopharmacology**, v. 77, p. 105961, 2019.
- HARTH, Guenter et al. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 58, n. 1, p. 17-24, 1993.
- HERRERA, Claudia et al. Phylogenetic Analysis of Trypanosoma cruzi from Pregnant Women and Newborns from Argentina, Honduras, and Mexico Suggests an Association of Parasite Haplotypes with Congenital Transmission of the Parasite. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 6, p. 1095-1105, 2019.

HIYAMA, Kazutoshi et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 87, n. 4, p. 269-274, 2001.

HOUWELING TAJ, Karim-Kos HE, Kulik MC, Stolk WA, Haagsma JA, Lenk EJ, et al. (2016) Desigualdades socioeconômicas em doenças tropicais negligenciadas: uma revisão sistemática. **PLOS Neglected Tropical Diseases**.10 (5):e0004546. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004546>

JACOBS, Frédérique et al. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 113, n. 1, p. 59-64, 1998.

JAJA-CHIMEDZA, Asha et al. Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. **PLOS one**, v. 12, n. 8, 2017.

JANTAN, Ibrahim; AHMAD, Waqas; BUKHARI, Syed Nasir Abbas. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 655, 2015.

JUNQUEIRA C, CAETANO B, BARTHOLOMEU DC, MELO MB, ROPERT C, RODRIGUES MM, GAZZINELLI RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. 2010;12:e29.

JUNQUEIRA, Caroline et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, 2010.

JURBERG, José et al. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). 2014.

K.M. Heutinck, I.J.M. ten Berge, C.E. Hack, J. Hamann, A.T. Rowshani, Serine proteases of the human immune system in health and disease, **Molecular Immunology**. 47 (2010) 1943–1955. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.020.

K.M. HEUTINCK, I.J.M. ten Berge, C.E. Hack, J. Hamann, A.T. Rowshani, Serine proteases of the human immune system in health and disease, **Molecular Immunology**. 47 (2010) 1943–1955. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.020.

KALAISELVI, V. et al. Microwave assisted green synthesis of hydroxyapatite nanorods using *Moringa oleifera* flower extract and its antimicrobial applications. **International journal of veterinary science and medicine**, v. 6, n. 2, p. 286-295, 2018.

LASKOWSKI JR, Michael; KATO, Ikunoshin. Protein inhibitors of proteinases. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

LASKOWSKI, Bernard C.; JAFFE, Richard L.; KOMORNICKI, Andrew. Ab initio calculations of phenylene ring motions in polyphenylene oxide. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 563-578, 1986.

LIDANI KCF, BAVIA L, AMBROSIO AR, de Messias-Reason IJ. The complement system: a prey of Trypanosoma cruzi. **Frontiers in Microbiology**. 2017;8:1–14.

LIU, Yang et al. Values, properties and utility of different parts of Moringa oleifera: An overview. **Chinese Herbal Medicines**, v. 10, n. 4, p. 371-378, 2018.

LONGO, D. L.; BERN, C. Chagas' disease. N Engl J Med, v. 373, p. 456-466, 2015.M. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' MADI, Niveen et al. Moringa oleifera's nutritious aqueous leaf extract has anticancerous effects by compromising mitochondrial viability in an ROS-dependent manner. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 35, n. 7, p. 604-613, 2016.

MARIN-NETO, J. Antonio. Doença de Chagas–mais de 100 anos depois de sua cientificamente brilhante descoberta, há poucas razões para se comemorar?. **Revista USP**, n. 115, p. 89-104, 2017.

MARR, J. Joseph; DOCAMPO, Roberto. Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. **Reviews of infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 884-903, 1986.

MARTINS, Gislaine A. et al. Gamma Interferon Modulates CD95 (Fas) and CD95 Ligand (Fas-L) Expression and Nitric Oxide-Induced Apoptosis during the Acute Phase of Trypanosomacruzi Infection: a Possible Role in Immune Response Control. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 3864-3871, 1999.

MEIRELLES, Maria Nazareth L. et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175-184, 1992. miceto Trypanosoma cruzi infection. *Nature*. 1992;356:338–40.

MOSCATELLI, Guillermo; MORONI, Samanta. Acute Vector-Borne Chagas Disease. In: Chagas Disease. **Springer, Cham**, 2019. p. 161-178.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOYA, Belkisyolé Alarcón de et al . Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 110, n. 3, p. 377-386, May 2015 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000300377&lng=en&nrm=iso>.access on 16 Jan. 2020. Epub Apr 28, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140285>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2018) Chagas disease (American trypanosomiasis), Fact sheet ([http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))) 1 September 2019

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2019). Defeating neglected tropical diseases: progress, challenges and opportunities.

(<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325755/WHO-CDS-NTD-2019.01-eng.pdf>). Accessed 19 september 2019

PADAYACHEE, B.; BAIJNATH, H. An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. **South African Journal of Botany**, 2019.

PATRIOTA, Leydianne LS et al. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 611, 2016.

PAUL, C. W.; DIDIA, B. C. The effect of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam roots on the histology of kidney and liver of guinea pigs. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 55-60, 2012.

PECOTCHE, Carlos Bernardo González. **Bases para sua Conduta**. Logosofica, p. 44, 1998.

PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; MOURA, M. C. ; COELHO, L. C. B. B. ; NAVARRO, D. M. A. F. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G . Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**, v. 113, p. 727-733, 2014.

PONTUAL, Emmanuel V. et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. **Natural product research**, v. 32, n. 24, p. 2940-2944, 2018.

PRAMANIK, Asmita et al. *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract exhibits antileishmanial effect through pro-inflammatory response: An in vitro study. **Current microbiology**, v. 74, n. 1, p. 59-67, 2017.

PRAMANIK, Asmita et al. Serine protease inhibitors rich *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract induces protective immune responses in murine visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 224-235, 2019.

RAIMONDI, Alejandra et al. Degradation of oxidised insulin A and B chains by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 49, n. 2, p. 341-344, 1991.

RASSI A, RASSI A JR, RASSI GG. Fase aguda da doença de Chagas. In: Brener Z, 2nd edition. Rio de Janeiro (Brazil): **Guanabara Koogan**; 2000. p. 231–45.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. “Chagas Disease”, in **Lancet**, v. 375, 2010, p. 1.388-402.

RASSI, A.; DE REZENDE, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

RODRIGUES, Mauricio M.; RIBEIRÃO, Marcelo; BOSCARDIN, Silvia B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunology letters**, v. 73, n. 1, p. 43-50, 2000.

ROFFÊ, Ester et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 649-660, 2012.

RYAN, Clarence A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425-449, 1990.

SANTIAGO, Margaret Thatcher Barros; NETO, EgídioBezerra. Ecophysiology of *Moringa oleifera* Lam in function of different rainfall conditions. **Revista Geama**, v. 3, n. 4, p. 236-241, 2017.

SANTOS, Charles Souza et al. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2017.

SARTORI AMC, NETO JE, NUNES EV, BRAZ LMA, CAIAFFA HH, OLIVEIRA OD, NETO VA, SHIKANAI-YASUDA MA. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. **The Journal of Infectious Diseases**. 2002;186:872–5.

SATHLER-AVELAR, R., LEMOS, E. M., REIS, D. D., MEDRANO-MERCADO, N., ARAÚJO-JORGE, T. C., ANTAS, P. R. Z., & MARTINS-FILHO, O. A. (2003). Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian journal of immunology**, 58(6), 655-663.

SOSONIUK, Eduardo et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. **Molecular immunology**, v. 60, n. 1, p. 80-85, 2014.

SOTO, Catalina D. Alba; CAPPÀ, Stella Maris González. *Trypanosoma cruzi* Journey from the Insect Vector to the Host Cell. In: Chagas Disease. **Springer, Cham**, 2019. p. 25-59.

SOUSA, Giovane Rodrigo et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014.

SOUTO-PADRON, THAIS et al. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **Journal of Cell Science**, v. 96, n. 3, p. 485-490, 1990.

SOUZA, P. E., ROCHA, M. O., ROCHA-VIEIRA, E., MENEZES, C. A., CHAVES, A. C., GOLLOB, K. J., & DUTRA, W. O. (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and immunity**, 72(9), 5283-5291.

SOUZA, Paulo EA et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

TARLETON RL. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**. 1990;144:717–24.

TEIXEIRA MM, GAZZINELLI RT, SILVA JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends in parasitology**. 2002 Jun 1;18(6):262-5.

TILOKE, Charlette et al. Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 457-466, 2018.

UDVARDY, Andor. The role of controlled proteolysis in cell-cycle regulation. In: EJB Reviews 1996. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 1996. p. 195-201.

VERGARA-JIMENEZ, Marcela; ALMATRAFI, ManalMused; FERNANDEZ, Maria Luz. Bioactive components in Moringa Oleifera leaves protect against chronic disease. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 91, 2017.

VITELLI-AVELAR, D. M., SATHLER-AVELAR, R., TEIXEIRA-CARVALHO, A., PINTO DIAS, J. C., GONTIJO, E. D., FARIA, A. M., ... & MARTINS-FILHO, O. A. (2008). Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian journal of immunology**, 68(5), 516-525.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, 2017.

YOUNÈS-CHENNOUFI, A. Ben et al. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 84-89, 1988.

ZINGALES, B et al . A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov. 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000700021&lng=en&nrm=iso>.access on 20 Jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

ZINGALES, Bianca et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

**APÊNDICE A– A TRYPSIN INHIBITOR FROM *Moringa oleifera* FLOWERS
MODULATES THE IMMUNE RESPONSE IN VITRO OF *Trypanosoma cruzi*-
INFECTED HUMAN CELLS**

Article

A Trypsin Inhibitor from *Moringa oleifera* Flowers Modulates the Immune Response In Vitro of *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Cells

Isabella Coimbra Vila Nova ¹, Leyllane Rafael Moreira ², Diego José Lira Torres ², Kamila Kássia dos Santos Oliveira ², Leydianne Leite de Siqueira Patriota ¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho ¹, Patrícia Maria Guedes Paiva ¹, Thiago Henrique Napoleão ¹, Virgínia Maria Barros de Lorena ² and Emmanuel Viana Pontual ^{3,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil; isabella.coimbra@ufpe.br (I.C.V.N.); leydianne.patriota@ufpe.br (L.L.d.S.P.); luana.coelho@ufpe.br (L.C.B.B.C.); patricia.paiva@ufpe.br (P.M.G.P.); thiago.napoleao@ufpe.br (T.H.N.)

² Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife 50670-901, Brazil; leyllanemoreira@gmail.com (L.R.M.); diegolira18ufpe@gmail.com (D.J.L.T.); kamilakassia@outlook.com (K.K.d.S.O.); lorena@cpqam.fiocruz.br (V.M.B.d.L.)

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 52171-900, Brazil

* Correspondence: emmanuel.pontual@ufrpe.br; Tel.: +55-81-3320-6395

Received: 15 July 2020; Accepted: 12 August 2020; Published: 14 August 2020



Abstract: *Trypanosoma cruzi* causes the lethal Chagas disease, which is endemic in Latin America. Flowers of *Moringa oleifera* (Moringaceae) express a trypsin inhibitor (MoFTI) whose toxicity to *T. cruzi* trypomastigotes was previously reported. Here, we studied the effects of MoFTI on the viability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as well as on the production of cytokines and nitric oxide (NO) by *T. cruzi*-infected PBMCs. Incubation with MoFTI (trypsin inhibitory activity: 62 U/mg) led to lysis of trypomastigotes (LC₅₀ of 43.5 µg/mL) but did not affect the viability of PBMCs when tested at concentrations up to 500 µg/mL. A selectivity index > 11.48 was determined. When *T. cruzi*-infected PBMCs were treated with MoFTI (43.5 or 87.0 µg/mL), the release of the pro-inflammatory cytokine TNF-α and INF-γ, as well as of NO, was stimulated. The release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 also increased. In conclusion, the toxicity to *T. cruzi* and the production of IL-10 by infected PBMCs treated with MoFTI suggest that this molecule may be able to control parasitemia while regulating the inflammation, preventing the progress of Chagas disease. The data reported here stimulate future investigations concerning the in vivo effects of MoFTI on immune response in Chagas disease.

Keywords: cytokines; cytotoxicity; immunomodulatory agent; *Moringa oleifera*; protease inhibitor; trypanocidal agent

1. Introduction

The Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is an endemic and lethal disease common in Latin America. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and the transmission occurs when vertebrates come in contact with the feces of infected triatomine insects, popularly known as “kissing bugs”. The current situation of the Chagas disease is a concern, since it is estimated that about 6 to 7 million people worldwide are infected with *T. cruzi* [1].

The life cycle of *T. cruzi* is complex, comprising several evolutionary forms. The vector harbors epimastigotes and metacyclic trypomastigotes in its gut, while the blood trypomastigotes and the

intracellular amastigotes are found in vertebrate hosts. Trypomastigotes and amastigotes represent the main targets for therapies [2,3].

The World Health Organization [1] recommends treating Chagas disease using benznidazole and nifurtimox. Both medicines are effective if given early in the acute phase, but their effectiveness is reduced in the more advanced stages; in addition, there is an increase in the frequency of adverse effects with increasing patient age [4,5]. The most common side effects are rashes, fever, generalized edema, lymphadenopathy, myalgia, arthralgia, gastrointestinal disorders, neutropenia, thrombocytopenic purpura, and peripheral polyneuropathy [6].

This scenario stimulates the search for new trypanocidal agents that are more effective in the chronic phase of Chagas disease and less toxic to hosts [7]. The processes of infection of host cells by *T. cruzi* and the survival of the parasite depend on the activity of important proteases; thus, an imbalance in the activity of these enzymes can cause damages to the parasite [8–10]. In this sense, *T. cruzi* enzymes represent interesting targets for studies of new therapeutic approaches [11].

It is well reported that some compounds (called protease inhibitors) are able to interact with protease molecules at specific sites, leading to the reduction or blockage of their activities [12]. The deregulation of proteases is a triggering factor for the onset of various pathologies and recent research has pointed out protease inhibitors as promising pharmacological agents [13,14]. Antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antiviral, antimicrobial and antiparasitic activities of these molecules have been demonstrated [15–18]. Sengenito et al. [19] reported that inhibitors of HIV aspartyl peptidase affected the integrity of cellular structures of *T. cruzi* trypomastigotes, leading to metabolic disorders.

Moringa oleifera Lamarck (Moringaceae) is a pantropical tree (Figure 1A) that has aroused interest due to its medicinal properties and use as a source of oil and biogas, for example [20–22]. Its flowers (Figure 1B) contain a 18-kDa protein called MoFTI with trypsin inhibitory activity and toxicity to *T. cruzi* trypomastigotes with a lethal concentration that led to lysis of 50% of parasites (LC_{50}) of 41.20 $\mu\text{g/mL}$ [11]. MoFTI was more toxic to the parasites than to murine macrophages and Vero cells, with selectivity indexes (SI) of 9.8 and >12, respectively [11]. The statement that MoFTI is a trypanocidal agent stimulated the investigations described in the present manuscript. Here, we tested the hypothesis that this inhibitor may interfere with the immune response of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected with *T. cruzi*. In this sense, the assessment of MoFTI effects the viability and production of cytokines and nitric oxide (NO) by infected PBMCs are reported.



Figure 1. The *Moringa oleifera* tree (A) and its flowers (B).

2. Results and Discussion

The affinity chromatography of *M. oleifera* flower extract in the Trypsin–Agarose column resulted in isolation of MoFTI (Figure 2A), which was able to inhibit the hydrolyze of N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) by trypsin in a dose-dependent way (Figure 2B). The specific trypsin inhibitory activity of MoFTI was 62 U/mg, agreeing with previous reports [11,22]. Pontual et al. [22] reported that MoFTI showed an inhibition constant (K_i) of 2.4 μ M on bovine trypsin.

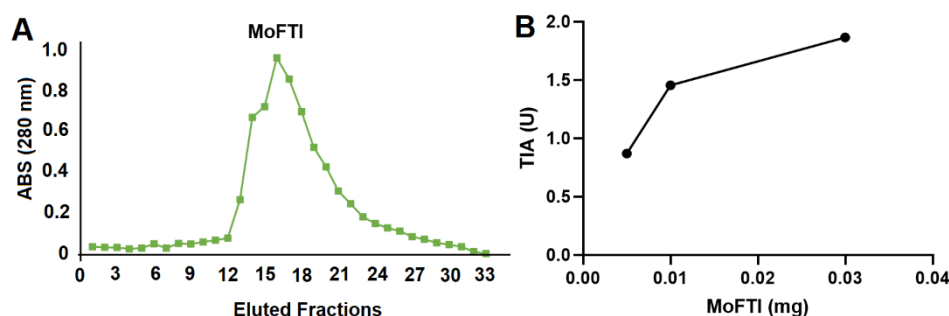


Figure 2. Isolation of MoFTI. (A) Affinity chromatography of *M. oleifera* flower extract in Trypsin–Agarose column. The elution step with 0.1 M KCl–HCl pH 2.0 can be seen and fractions of 1.0 mL were collected. (B) Trypsin inhibitor activity (TIA) of MoFTI on bovine trypsin.

After verifying that the protease inhibitor domain of MoFTI was active, we checked whether its antiparasitic property was also active. It was found that incubation with this inhibitor led to lysis of *T. cruzi* trypomastigotes, since the number of parasite cells counted in treatments with MoFTI was lower than in the negative control. After 24 h, the LC_{50} value was 43.5 (26.2–60.9) μ g/mL. Similarly, Pontual et al. [11] reported an LC_{50} value of 41.20 μ g/mL for MoFTI on *T. cruzi* trypomastigotes. In this same work, the authors showed that MoFTI was low in toxicity to murine peritoneal macrophages (50% cytotoxic concentration, CC_{50} , of 407.01 μ g/mL) and did not interfere with the viability of Vero cells at concentrations up to 500 μ g/mL.

In the present work, we investigated the effect of MoFTI on viability of human PBMCs. After 24, 72 and 120 h, it was revealed that MoFTI did not significantly ($p > 0.05$) affect the ability of these cells to metabolize the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), in comparison with negative control (Figure 3). Therefore, it was assumed that, under the conditions used here, MoFTI was not toxic to human PBMCs. As can be seen in Figure 3A, the significantly ($p < 0.05$) greater number of viable cells in treatment with the inhibitor at 15.62 μ g/mL, compared to the negative control group, suggest that MoFTI induced cell proliferation after exposure to 24 h. Benznidazole was also not able to interfere with PBMCs viability in comparison with the negative control.

It is well known that molecules with potential for use in therapy of infectious diseases need to be toxic to parasites without affecting the viability of host cells, or at least causing much more damage to parasites than to hosts [23]. The ratio between the CC_{50} value for PBMCs (>500 μ g/mL) and LC_{50} for trypomastigotes showed that MoFTI was selective ($SI > 11.48$) for the parasite regarding these human cells. To the best of our knowledge, this is the first report of MoFTI effects on human cells and this datum suggests that this protein can be an interesting starting material for the production of a new drug for Chagas disease therapy. In fact, it can be expected that a protease inhibitor will end up interacting unwantedly with important enzymes of host cells; however, this is not the only report of a non-cytotoxic protease inhibitor to human cells. For example, the trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves (TesTI) was also not toxic to human PBMCs [24].

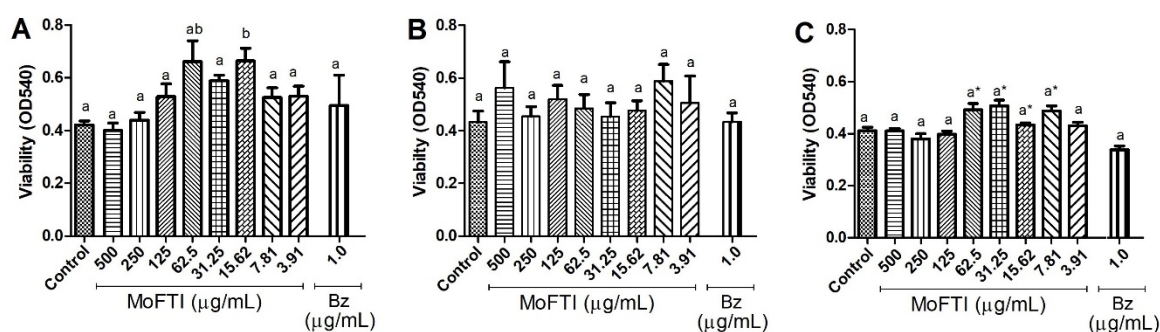


Figure 3. Effects of *M. oleifera* flower trypsin inhibitor (MoFTI) and benznidazole (Bz) on the viability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after exposure by 24 h (A), 72 h (B), and 120 h (C). Different letters (a,b) indicate significant differences between the negative control and the other treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$). The asterisk (*) indicates significant differences between Bz and the other treatments. Control: negative control (untreated cells).

Previous reports have shown that plant compounds can act as immunomodulatory agents, and this can be interesting from a therapeutic point of view since, when these agents modulate the production of cytokines and other immune mediators, they can increase body defense against pathogens or pathological conditions, even when there is no direct toxicity to the causative agent [25]; because of this, we evaluated the effect of MoFTI on the release of cytokines by PBMCs uninfected or infected by *T. cruzi*. Interestingly, no alterations of cytokine production were observed regarding to negative control group when uninfected PBMCs were exposed to MoFTI (Figures 4 and 5). After 48-h incubation, MoFTI was not able to affect the release of interferon (IFN) γ by infected cells (Figure 4A). On the other hand, the release of tumor necrosis factor (TNF) α and interleukin (IL) 10 (Figure 4B,C, respectively) by *T. cruzi*-infected PBMCs was stimulated by MoFTI at 87.0 $\mu\text{g/mL}$ ($2 \times \text{LC}_{50}$) in comparison with the control group.

TNF- α is a cytotoxic factor associated with Th1 response against microorganisms, while IL-10 is a Th2 anti-inflammatory interleukin that inhibits the release of pro-inflammatory cytokines. Clinical studies showed that individuals with the chronic cardiac Chagas disease produce pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , to control *T. cruzi* infection. Simultaneously, anti-inflammatory cytokines, especially IL-10, are released to prevent damages to the host tissues and to slow the progress of cardiac complications [26,27]. Individuals at the chronic phase of the indeterminate form of Chagas disease produce higher levels of IL-10 and this is the reason why they do not progress to the clinical stage of Chagas cardiomyopathy [28]. In this sense, the trypanocidal activity of MoFTI, along with the simultaneous stimulation of TNF- α and IL-10 release, suggests that this protein may be able to control parasitemia while regulating the inflammation, preventing the progress of Chagas disease.

Still, after 48-h exposure, increased release of IL-6 was detected for PBMCs infected with *T. cruzi* and treated with MoFTI ($2 \times \text{LC}_{50}$) at a similar level to that shown by the untreated infected cells (Figure 4D). This datum suggests that the release of IL-6 occurred because of *T. cruzi* infection and not due to MoFTI activity. IL-6 is a pleiotropic cytokine that influences antigen-specific immune responses and inflammatory reactions [29,30]. The profile of the other cytokines investigated here did not change in the untreated infected cells. The release of IL-4, IL-2 and NO by infected cells was not significantly affected by MoFTI after 48-h exposure (Figure 4E–G, respectively).

Unlike the results obtained for 48 h, the infected PBMCs had the release of INF- γ strongly increased in response to treatment for 120 h with both concentrations of MoFTI (Figure 5A) regarding the control. However, no differences were found for the release of TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 between the treatment groups (Figure 5B–F). When the infected PBMCs were treated with MoFTI at both concentrations, a significant increase in NO release was recorded (Figure 5G), but this does not seem to depend on the infection, because a similar result was detected for uninfected PBMCs treated

with the inhibitor. The NO release may have occurred due to direct action of MoFTI or in response to the production of $\text{INF-}\gamma$ [31]. Benznidazole did not affect cytokine release by both uninfected and infected cells.

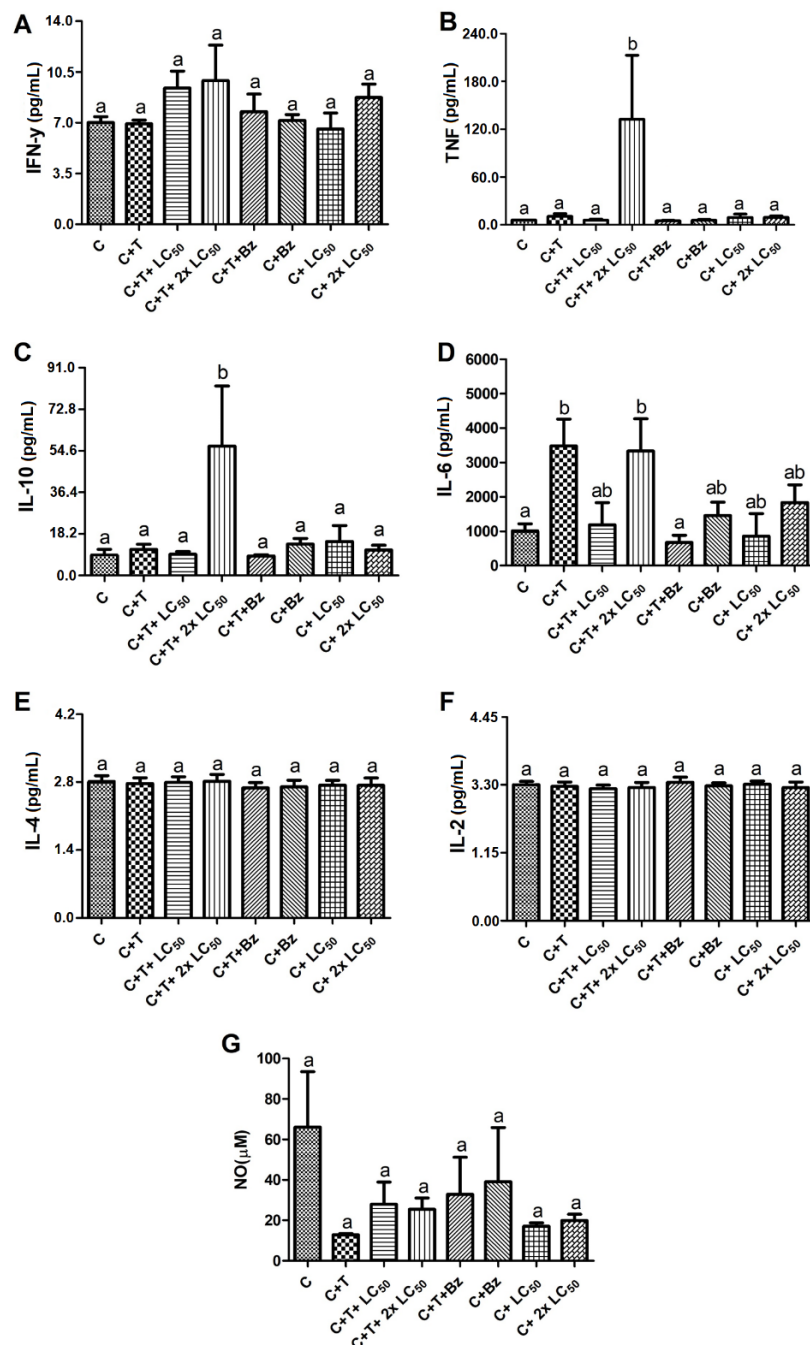


Figure 4. Effect of *M. oleifera* flower trypsin inhibitor (MoFTI) on the production of cytokines (A–F) and nitric oxide (G) by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected or not with *T. cruzi* trypomastigotes after 48-h exposure. The treatments were: negative control (C = untreated and uninfected PBMCs); untreated PBMCs infected with trypomastigotes (C + T); infected PBMCs treated with MoFTI at 43.5 $\mu\text{g/mL}$ (C + T + LC₅₀) and 87.0 $\mu\text{g/mL}$ (C + T + 2 $\times$ LC₅₀); infected PBMCs treated with benznidazole (C + T + Bz); uninfected PBMCs treated with benznidazole (C + Bz); uninfected PBMCs treated with MoFTI at 43.5 $\mu\text{g/mL}$ (C + LC₅₀) and 87.0 $\mu\text{g/mL}$ (C + 2 $\times$ LC₅₀). Different letters (a,b) indicate significant differences between treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test ($p < 0.05$).

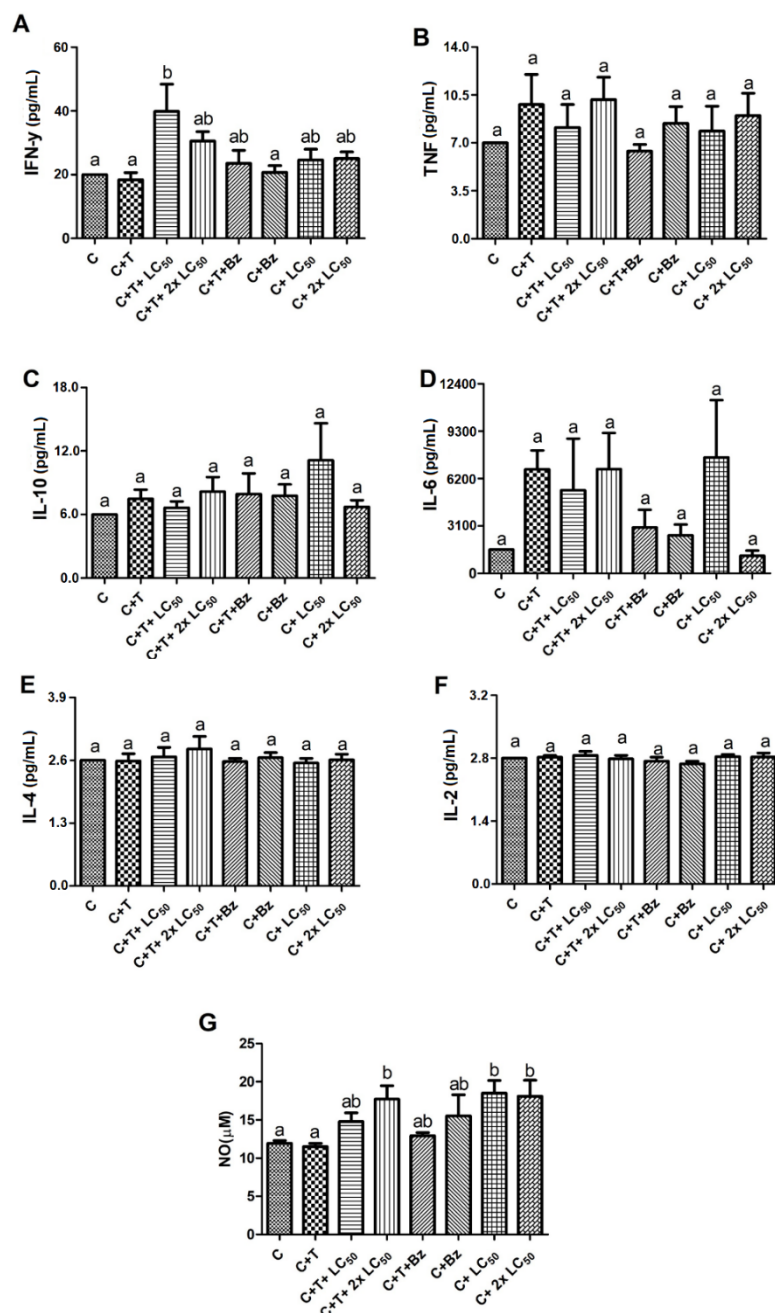


Figure 5. Effect of *M. oleifera* flower trypsin inhibitor (MoFTI) on the production of cytokines (A–F) and nitric oxide (G) by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected or not with *T. cruzi* trypomastigotes after 120-h exposure. The treatments were: negative control (C = untreated and uninfected PBMCs); untreated PBMCs infected with trypomastigotes (C + T); infected PBMCs treated with MoFTI at 43.5 μ g/mL (C + T + LC₅₀) and 87.0 μ g/mL (C + T + 2 $\times$ LC₅₀); infected PBMCs treated with benznidazole (C + T + Bz); uninfected PBMCs treated with benznidazole (C + Bz); uninfected PBMCs treated with MoFTI at 43.5 μ g/mL (C + LC₅₀) and 87.0 μ g/mL (C + 2 $\times$ LC₅₀). Different letters (a,b) indicate significant differences between treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test ($p < 0.05$).

NO plays an important role in the defense of macrophages against *T. cruzi* by damaging parasite biochemistry and causing, for example, the inhibition of metalloproteins that mediate crucial metabolic processes, including cruzipain. This enzyme participates in parasite nutrition and the infection of host cells [32].

3. Materials and Methods

3.1. Isolation of MoFTI

The collection of *M. oleifera* flowers occurred in Recife city (8°02'57.9" S, 34°56'47.8" W), Pernambuco, Brazil, and a voucher specimen (number 73345) is deposited at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* (Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brazil). MoFTI was purified as described by Pontual et al. [22]. The procedure started from the maceration (10 min at 27 °C) of fresh flowers (50 g) with distilled water (100 mL) in a blender. The mixture was filtered through gauze and centrifuged (9000× g, 15 min, 4 °C) to remove suspended material. The crude preparation was dialyzed (6 h) against 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.02 M CaCl₂ and loaded (4 mL; 66.8 mg of proteins) onto a Trypsin-Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) column (4.5 × 1.0 cm). MoFTI was eluted with 0.1 M KCl-HCl, pH 2.0, and the presence of proteins in the collected fractions was accompanied by the measurement of absorbance at 280 nm. After dialysis (16 h) against distilled water, MoFTI was lyophilized to dryness and resuspended to a concentration of 1000 µg/mL in distilled water, for assessment of trypsin inhibitory activity, or in Rockwell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) complete medium (Sigma-Aldrich), for the assays with *T. cruzi* or PBMCs. Protein concentration was determined according to Lowry et al. [33] using bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL) as standard.

3.2. Trypsin Inhibitory Activity

The ability of MoFTI to inhibit trypsin was assayed according to Pontual et al. [22]. In a microtiter plate, bovine trypsin (5 µL, 0.1 mg/mL in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.02 M CaCl₂) was added to 5 µL of 8.0 mM BApNA and MoFTI (0.005 to 0.03 mg/mL). Next, each well received Tris buffer to complete a volume of 200 µL. After incubation (30 min at 37 °C), the absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader (Multiskan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). One unit of trypsin inhibitor activity corresponded to the amount of MoFTI able to reduce the absorbance by 0.01 in accordance with trypsin activity in absence of the inhibitor.

3.3. Obtaining of *T. cruzi* Trypomastigotes

Cryopreserved trypomastigotes (10⁷ trypomastigotes/mL) were thawed in a water bath at 37 °C. After centrifugation (400× g, 10 min, 22° C), the supernatant was discarded, and the pellet resuspended with 5 mL of complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium. The suspension was distributed in culture bottles containing Vero cells and incubated (37 °C, 5% CO₂) for 24 h. Next, the supernatant was removed to withdraw parasites that did not infect cells. RPMI 1640 complete medium (5 mL) was added and the cultures were incubated for 7 days. During this time, the multiplication of intracellular parasites was daily observed using an inverted microscope. After cell disruption, the trypomastigotes were collected for the subsequent assays.

3.4. Trypanocidal Activity of MoFTI

Culture-derived trypomastigotes (Y strain) were maintained by weekly passages in Vero cells cultured in complete RPMI 1640 medium. Trypomastigotes (10⁶ parasites/mL, 100 µL) were placed in 96-well plates and treated with MoFTI (100 µL, 6.25–100 µg/mL) in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). In negative control, parasites were incubated with complete RPMI medium in the absence of MoFTI. Benznidazole (1.0 µg/mL) was used as positive control. The assays were incubated for 24 h at 37 °C. Next, the number of trypomastigotes was determined by counting cells using a Neubauer chamber in a E100 LED microscope (Nikon, Melville, NY, USA). The percentage of lysis (%) was estimated regarding the number of trypomastigotes in the negative control (100%). Three independent experiments were performed in quadruplicate and the concentration (µg/mL) of MoFTI that leads to lysis of 50% of trypomastigote cells (LC₅₀) for 24 h was calculated using the software MedCalc version 17.9.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

3.5. Isolation of Human PBMCs

The blood collection was performed following the protocol approved (process: 07511612.2.0000.5190) by the Research Ethics Committee of the Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ). The blood was collected from ten healthy individuals (6 women and 4 men) through a vacuum system (Vacutainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in tubes containing sodium heparin, and homogenized (15 mL) with an aliquot of filtered and sterile phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 (15 mL). Next, 15 mL of this mixture was added to 50 mL Falcon polypropylene tubes containing 15 mL of Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). After centrifugation ($900\times g$, 30 min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$), PBMCs appeared as a ring between Ficoll and plasma and were collected using a sterile transfer pipette and placed in 15 mL Falcon polypropylene tubes. PBMCs were resuspended using 14 mL of incomplete RPMI 1640 medium containing 1% penicillin/streptomycin and centrifuged ($400\times g$, 10 min). This procedure was repeated twice. Following, the cells were resuspended in 2 mL of RPMI 1640 complete medium supplemented with FBS (10%) and containing 1% penicillin/streptomycin. The cells ($10\text{ }\mu\text{L}$) were subsequently stained with Trypan Blue (Sigma-Aldrich) dye ($90\text{ }\mu\text{L}$) and counted in a Neubauer chamber. The number of cells were recorded and adjusted to the desired concentration of 10^6 cells/mL.

3.6. Effect of MoFTI on PBMCs Viability

The effect of MoFTI on viability of PBMCs was assayed measuring the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase [34]. Cell suspension (10^6 cells) was placed in 96-well culture plates with complete RPMI 1640 medium and exposed to MoFTI (3.9 to $500.0\text{ }\mu\text{g/mL}$). In negative control, PBMCs were incubated with RPMI 1640 medium in absence of MoFTI. Benznidazole ($1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$) was also tested. The plates were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 for 24, 72 and 120 h. Next, the culture medium was removed and RPMI medium containing 5.0 mg/mL of MTT (Sigma-Aldrich) was added. After incubation ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) for 3 h, the culture medium containing MTT was removed and $100\text{ }\mu\text{L}$ of dimethyl sulfoxide was added. The presence of formazan crystals derived from MTT reduction was immediately recorded by measuring the absorbance at 540 nm. The experiment was conducted in triplicates and the selectivity index (SI) was calculated from the ratio between cytotoxicity to PBMCs (CC_{50}) and the LC_{50} of MoFTI.

3.7. Treatment of *T. cruzi*-Infected PBMCs with MoFTI

PBMCs (1 mL , 2×10^6 cells) in complete RPMI medium were placed in 48-well polystyrene culture plates, which were incubated ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h) to fix adherent cells (mainly monocytes). Next, 0.5 mL of the RPMI medium was removed from each well, and trypomastigotes (0.5 mL , 10^6 cells) were added. The plates were incubated ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) for 2 h to allow the infection of PBMCs. The mixture (RPMI medium containing infected adherent and non-adherent cells) was treated with MoFTI at $43.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (LC_{50}) and $87.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ($2\times \text{LC}_{50}$). In negative control, the mixture was maintained without MoFTI, while benznidazole ($1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$) was used in positive control. To compare the cell response in the presence or absence of parasites, uninfected cells were incubated in the absence or presence of MoFTI (LC_{50} and $2\times \text{LC}_{50}$) or benznidazole ($1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$), as described above. The plates were incubated ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) for 48 or 120 h, and $700\text{ }\mu\text{L}$ of the supernatant from each well was removed and immediately stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later use to measure cytokine and nitric oxide (NO) levels.

3.8. Effect of MoFTI on Cytokine Release by *T. cruzi*-Infected PBMCs

The release of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α by PBMCs was quantified using the Cytometric Bead Array (CBA) system, following the instructions of the manufacturer (BD Biosciences). The data were acquired on the FACScalibur flow cytometer. The acquisitions and analyses were performed using the CellQuestPro software (BD Biosciences) and 5000 events were acquired within the lymphocyte population. The analyses were performed using the BD CBA software.

3.9. Effect of MoFTI on NO Production by *T. cruzi*-Infected PBMCs

Aliquots (50 μ L) of the supernatants removed from the plates referred to in Section 3.7 were added to the Griess reagent (50 μ L) in 96 well microplates, according to Resende et al. [35]. After incubation (28 °C, 15 min), NO production was estimated by measuring the absorbance at 540 nm and a standard curve of nitrite (3.12–400.0 μ M).

3.10. Statistical Analysis

The results regarding cytokine and NO levels were statistically evaluated using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). The data that passed the Kolmogorov–Smirnov normality test were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test, while the data that did not pass the normality test were analyzed by the Kruskal–Wallis test followed by the Dunnet post-test. Significance level at 5% was considered.

4. Conclusions

The data reported herein point to the trypanocidal trypsin inhibitor of *M. oleifera* flowers as an immunomodulatory agent on *T. cruzi*-infected human PBMCs by stimulating the release of pro-inflammatory (TNF- α and INF- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, as well as NO. In addition, MoFTI was more toxic to the parasite cells than to the human immune cells. Our findings stimulate future investigations of MoFTI in vivo effects on immune response in Chagas disease. It should be remembered that MoFTI is a proteinaceous inhibitor. In this sense, some points must be addressed to develop drug formulations using MoFTI, such as its stability and immunogenicity. Finally, strategies for producing MoFTI at a large scale must be designed so that it can be inserted in the pharmaceutical industry.

Author Contributions: Conceptualization, I.C.V.N., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; methodology, I.C.V.N., L.R.M., D.J.L.T., K.K.d.S.O., L.L.d.S.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; software, I.C.V.N., L.R.M., D.J.L.T., K.K.d.S.O. and L.L.d.S.P.; validation, I.C.V.N., L.R.M., D.J.L.T., K.K.d.S.O., L.L.d.S.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; formal analysis, I.C.V.N., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; investigation, I.C.V.N., L.R.M., D.J.L.T., K.K.d.S.O., L.L.d.S.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; resources, T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; data curation, I.C.V.N., L.R.M., D.J.L.T., K.K.d.S.O. and L.L.d.S.P.; writing—original draft preparation, I.C.V.N.; writing—review and editing, L.C.B.B.C., P.M.G.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; visualization, L.C.B.B.C., P.M.G.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P.; supervision, V.M.B.d.L. and E.V.P.; project administration, V.M.B.d.L. and E.V.P.; funding acquisition, L.C.B.B.C., P.M.G.P., T.H.N., V.M.B.d.L. and E.V.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 408789/2016-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. World Health Organization. Chagas Disease. Available online: [http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed on 20 June 2020).
2. Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 269–285. [CrossRef] [PubMed]
3. Echeverria, L.E.; Morillo, C.A. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2019**, *33*, 119–134. [CrossRef] [PubMed]
4. Ferreira, A.M.; Damasceno, R.F.; Monteiro-Junior, R.S.; Oliveira, I.A.C.D.; Prates, T.E.C.; Nunes, M.C.P.; Haikal, D.S.A. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: Revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. *Cad. Saúde Colet.* **2019**, *27*, 354–362. [CrossRef]
5. Francisco, A.F.; Jayawardhana, S.; Olmo, F.; Lewis, M.D.; Wilkinson, S.R.; Taylor, M.C.; Kelly, J.M. Challenges in Chagas Disease drug development. *Molecules* **2020**, *25*, 2799. [CrossRef]

6. Molina-Morant, D.; Fernández, M.L.; Bosch-Nicolau, P.; Sulleiro, E.; Bangher, M.; Salvador, F.; Sanchez-Montalva, A.; Ribeiro, A.L.P.; de Paula, A.M.B.; Eloí, S.; et al. Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): Study protocol for a multicenter randomized Phase II non-inferiority clinical trial. *Trials* **2020**, *21*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
7. Juárez-Saldivar, A.; Schroeder, M.; Salentin, S.; Haupt, V.J.; Saavedra, E.; Vázquez, C.; Reyes-Espinosa, F.; Herrera-Mayorga, V.; Villalobos-Rocha, J.C.; García-Pérez, C.A.; et al. Computational drug repositioning for Chagas Disease using protein-ligand interaction profiling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4270. [\[CrossRef\]](#)
8. Cazzulo, J.J.; Couso, R.; Raimondi, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *33*, 33–42. [\[CrossRef\]](#)
9. Cazzulo, J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: Potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1261–1271. [\[CrossRef\]](#)
10. Ferreira, R.A.A.; Pauli, I.; Sampaio, T.S.; Souza, M.L.; Ferreira, L.L.G.; Magalhães, L.G.; Rezende, C.O., Jr.; Ferreira, R.S.; Krogh, R.; Dias, L.C.; et al. Structure-based and molecular modeling studies for the discovery of cyclic imides as reversible cruzain inhibitors with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 798. [\[CrossRef\]](#)
11. Pontual, E.V.; Pires-Neto, D.F.; Fraige, K.; Higino, T.M.M.; Carvalho, B.E.A.; Alves, N.M.P.; Lima, T.A.; Zingali, R.B.; Coelho, L.C.B.B.; Bolzani, V.S.; et al. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 2940–2944. [\[CrossRef\]](#)
12. Marathe, K.R.; Patil, R.H.; Vishwakarma, K.S.; Chaudhari, A.B.; Maheshwari, V.L. Protease inhibitors and their applications: An overview. In *Studies Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 62, pp. 211–242.
13. Agbowuro, A.A.; Huston, W.M.; Gamble, A.B.; Tyndall, J.D. Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*, 1295–1331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Cotabarren, J.; Lufano, D.; Parisi, M.G.; Obregón, W.D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Trends Plant. Sci.* **2020**, *262*, 110398. [\[CrossRef\]](#)
15. Shamsi, T.N.; Parveen, R.; Afreen, S.; Azam, M.; Sen, P.; Sharma, Y.; Haque, Q.M.R.; Fatma, T.; Manzoor, N.; Fatima, S. Trypsin inhibitors from *Cajanus cajan* and *Phaseolus limensis* possess antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activity. *J. Diet. Suppl.* **2018**, *15*, 939–950. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Blisnick, A.; Šimo, L.; Grillon, C.; Fasani, F.; Brûlé, S.; Le Bonniec, B.; Prina, E.; Marsot, M.; Relmy, A.; Blaise-Boisseau, S.; et al. The immunomodulatory effect of IrSPI, a tick salivary gland serine protease inhibitor involved in *Ixodes ricinus* tick feeding. *Vaccines* **2019**, *7*, 148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Mishra, U.N.; Reddy, M.V.; Prasad, D.T. Plant serine protease inhibitor (SPI): A potent player with bactericidal, fungicidal, nematocidal and antiviral properties. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* **2020**, *8*, 2985–2993. [\[CrossRef\]](#)
18. Pramanik, A.; Paik, D.; Pramanik, P.K.; Chakraborti, T. Serine protease inhibitors rich *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract induces protective immune responses in murine visceral leishmaniasis. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 224–235. [\[CrossRef\]](#)
19. Sangenito, L.S.; Menna-Barreto, R.F.; Oliveira, A.C.; d’Avila-Levy, C.M.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L. Primary evidence of the mechanisms of action of HIV aspartyl peptidase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2018**, *52*, 185–194. [\[CrossRef\]](#)
20. Makkar, H.A.; Becker, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1996**, *63*, 211–228. [\[CrossRef\]](#)
21. Karadi, R.V.; Gadge, N.B.; Alagawadi, K.R.; Savadi, R.V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 306–311. [\[CrossRef\]](#)
22. Pontual, E.V.; Santos, N.D.L.; Moura, M.C.; Coelho, L.C.B.B.; Navarro, D.M.A.F.; Napoleão, T.H.; Paiva, P.M.G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 727–733. [\[CrossRef\]](#)
23. Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J.P.; Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* **2016**, *156*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Patriota, L.L.S.; Procópio, T.F.; Souza, M.F.D.; Oliveira, A.P.S.; Carvalho, L.V.N.; Pitta, M.G.R.; Rego, M.J.B.M.; Paiva, P.M.G.; Pontual, E.V.; Napoleão, T.H. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 611. [[CrossRef](#)]
25. Jantan, I.; Ahmad, W.; Bukhari, S.N.A. Plant-derived immunomodulators: An insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dutra, W.O.; Menezes, C.A.; Magalhães, L.M.; Gollob, K.J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* **2014**, *36*, 377–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vallejo, A.; Monge-Maillo, B.; Gutiérrez, C.; Norman, F.F.; López-Vélez, R.; Pérez-Molina, J.A. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. *Acta Trop.* **2016**, *164*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Álvarez, J.M.; Fonseca, R.; Silva, H.B.; Marinho, C.R.; Bortoluci, K.R.; Sardinha, L.R.; D'império-Lima, M.R. Chagas disease: Still many unsolved issues. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kishimoto, T. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8*, S2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jones, S.A.; Jenkins, B.J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 773–789. [[CrossRef](#)]
31. Roffê, E.; Rothfuchs, A.G.; Santiago, H.C.; Marino, A.P.M.P.; Ribeiro-Gomes, F.L.; Eckhaus, M.; Antonelli, L.R.V.; Murphy, P.M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 649–660. [[CrossRef](#)]
32. Cardoso, M.S.; Reis-Cunha, J.L.; Bartholomeu, D.C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front. Immunol.* **2016**, *6*, 659. [[CrossRef](#)]
33. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[PubMed](#)]
34. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]
35. Resende, L.A.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Viana, K.F.; Mendonça, L.Z.; Lanna, M.F.; Silveira-Lemos, D.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Fujiwara, R.T.; et al. Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* **2013**, *198*, 371–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).