

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPGCBIOL

Tese

**Avaliação da influência do inóculo
em açaí (*Euterpe oleracea*) na
infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi*
em camundongos BALB/c**

Flávia de Souza Marques

Ouro Preto

2024



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas
Laboratório de Morfopatologia

**Avaliação da influência do inóculo em açai (*Euterpe oleracea*) na infecção oral pelo
Trypanosoma cruzi em camundongos BALB/c**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como parte das exigências do programa para aquisição do grau de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Autora: Flávia de Souza Marques

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melode Abreu Vieira

Coorientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Ouro Preto, Minas Gerais

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M357a Marques, Flávia de Souza.

Avaliação da influência do inóculo em açaí (*Euterpe oleracea*) na infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c. [manuscrito] / Flávia de Souza Marques. - 2024.

96 f.: il.: color., gráf., tab.. + Fluxograma. + Quadro.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Coorientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Protozoário. 2. Chagas, Doença de. 3. Infecção. 4. Açaí. 5. Estômago. 6. Camundongos como animais de laboratório. I. Vieira, Paula Melo de Abreu. II. Borges, William de Castro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.27:561.24

Bibliotecário(a) Responsável: Paulo Vitor Oliveira - CRB6/2551



FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia de Souza Marques

Avaliação da influência do inóculo em Açaí (*Euterpe oleracea*) na infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2024.

Membros da banca

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira- Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. William de Castro Borges - Co-orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Wanderson Geraldo Lima - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Joana do Amaral - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Daniel Menezes Souza - Universidade Federal de Minas Gerais
Dr. Max Jean de Ornelas Toledo - Universidade Estadual de Maringá

Paula Melo de Abreu Vieira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 05/03/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/03/2024, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0677626** e o código CRC **ED7475E1**.

COLABORADORES

Laboratório de Morfopatologia

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Dra. Thaís Vieira de Carvalho

Ms. Aline Coelho das Mercês

Ms. Viviane Flores Xavier

Rashid Iddrisu

Amanda de Oliveira Amanda de Oliveira Araújo

Laboratório de Imunopatologia

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Prof.^a Dra. Cláudia Martins Carneiro

Ms. Luciana da Fonseca Medeiros

Laboratório de Enzimologia e Proteômica

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Prof. Dr. William de Castro Borges

Camilo Elber Vital

Laboratório de Fisiologia Experimental

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Pedro Alves Machado Junior

Laboratório Multiusuário Análise de

Alimento

Escola de Nutrição – UFOP

Prof.^a Dra. Melina Oliveira de Souza

Isadora Mende

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas pessoas queridas que perdi no ano de 2022. À minha madrinha Tia Nega, obrigada por todo amor a mim dedicado durante a sua via. Ao André, técnico do laboratório de Morfopatologia, por toda convivência e contribuição na minha vida acadêmica. Vocês fazem falta...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todo o seu amor e misericórdia. A minha fé me deu forças para seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis e me fez chegar até aqui. Ao Senhor toda honra e glória.

Aos meus pais agradeço por terem dedicado as suas vidas em prol da educação de suas filhas.

Às minhas irmãs, minhas melhores amigas, por serem fonte de amor e diversão inesgotáveis. Obrigada por se fazerem presentes em cada momento da minha vida.

Ao meu marido Keké, por toda paciência e apoio durante essa jornada. Obrigada por prestar atenção em todas as mais de cinco mil vezes que apresentei meus dados para você. De tanto ouvir você já é capaz de fazer uma apresentação no meu lugar. Saber que eu posso contar com você faz tudo ficar mais fácil.

Ao Laboratório de Morfopatologia, minha segunda casa, por toda estrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que já passaram pelo Morfo pelas colaborações, conversas e risadas que tornaram o ambiente de trabalho mais leve. Em especial aos meus alunos de iniciação científica Amanda, Rashid e Otávio por poder contribuir para formação de vocês.

A Aline Coelho, minha primeira aluna de IC e agora companheira de pós-graduação. É muito gratificante poder acompanhar a sua evolução enquanto pesquisadora e saber que contribuí para o seu crescimento.

A Vivi e a Lu, grandes colaboradoras e parceiras deste trabalho. Obrigada pela paciência e por serem incansáveis nas realizações dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunopatologia e todos os pesquisadores pela amizade e momentos de confraternização.

A todos os funcionários do ICEB, NUPEB, e do Centro de Ciência Animal da UFOP por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e organizado. Em especial aos senhores Roberto, Antônio, Márcio e às meninas Josi, Lilian, Aline e Alessandra. Não há nada melhor do que começar o dia de trabalho com o bom dia de vocês.

Aos veterinários do CCA, Hugo e Bárbara, por orientar o manejo animal de forma a causar o menor sofrimento possível aos animais utilizados nesse trabalho.

A todos os animais utilizados nesse projeto, meu respeito e gratidão por toda vida.

Ao professor Willian pode ter aceitado me coorientar neste trabalho e por toda a

contribuição.

Por último, mas não menos importante, à Paula. Minha orientadora científica e pessoal. Tudo o que eu sou e tenho hoje eu devo a você. Deixo aqui registrado todo o amor e gratidão que tenho pelo nosso encontro. Não sou de expressar muito em palavras, e sim com ações. Sei que você sabe que pode contar comigo para tudo, e sei que a recíproca é verdadeira. Obrigada por ter me dado esse projeto que era um sonho para mim e por ter confiado na minha execução. O caminho até aqui não foi fácil, mas você nunca deixou de acreditar no potencial deste projeto e acredito que no final fizemos um grande trabalho em equipe. Que essa parceria perdure por muitos anos ainda.

EPÍGRAFE

“Eu não tenho nenhum talento especial.
Sou apenas apaixonadamente curioso.”

Albert Einstein

RESUMO

Por muito tempo, o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas foi o vetorial. Entretanto, após uma série de medidas de controle ao principal vetor, *Triatoma infestans*, ocorreu um decréscimo na transmissão vetorial no Brasil. Nesse cenário, a infecção por via oral se tornou o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas no Brasil. Essa via de infecção é caracterizada pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com as formas metacíclicas (TM) do *Trypanosoma cruzi*, sendo o açaí (*Euterpe oleracea*) o principal alimento envolvido. A alta capacidade antioxidante da pasta de açaí, com alto teor de polifenóis, especialmente antocianinas, já foi confirmada em vários estudos, entretanto existem poucos trabalhos na literatura que abordam a via oral, e complementarmente, a participação do açaí na interação parasito/hospedeiro. Nesse sentido, um estudo sobre a influência do açaí, frente a infecção por via oral possibilitará a compreensão de como o alimento no qual o parasito é inserido no organismo interfere na interação entre *T. cruzi*/hospedeiro. Baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do inóculo em açaí na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Para cumprir com esse objetivo, camundongos BALB/c foram divididos em três grupos experimentais, o grupo Controle (animais não infectados) e os grupos de animais infectados por via oral com formas TM da cepa Y (DTU II) do *T. cruzi* adicionadas ao meio RPMI ou ao açaí. Os animais inoculados com os parasitos em meio RPMI apresentaram 83% de sobrevivência, enquanto essa porcentagem no grupo inoculado com parasitos em açaí foi de 98%. Apesar do grupo Açaí apresentar período pré-patente de parasitemia mais longo, as curvas de parasitemia dos animais infectados foram semelhantes. A quantificação da carga parasitária tecidual mostrou um aumento do parasitismo na bochecha no grupo RPMI em relação ao grupo Açaí no 14º DAI (dias após a infecção). Já no estômago esse aumento foi observado precocemente no 5º DAI. Entretanto, no coração observou-se um perfil inverso, onde houve um aumento da carga no grupo Açaí no 7º DAI em relação ao grupo RPMI. Já no 14º DAI ocorre uma inversão. A avaliação do processo inflamatório mostrou que tanto no músculo próximo a bochecha, quanto no estômago há presença de processo inflamatório nos dias 2 e 5 após a infecção para ambos os grupos infectados. No 14º DAI esse aumento foi observado apenas na bochecha para animais infectados em meio RPMI. No coração apesar de não ter sido observado processo inflamatório, foram encontrados ninhos de amastigota no 14º DAI no grupo RPMI. A quantificação de citocinas no músculo próximo a bochecha mostrou que ocorre uma maior produção da citocina pró-inflamatória TNF aos 14 dias após a infecção no grupo RPMI em relação ao grupo Açaí. Já no estômago, a avaliação das citocinas mostrou que nos animais infectados com Açaí há uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras. A avaliação proteômica do estômago revelou 110 proteínas diferencialmente abundantes nos três grupos experimentais. Destas, 24 proteínas encontraram-se aumentadas no grupo Açaí e diminuídas no grupo RPMI em relação ao grupo Controle. Estas proteínas estão envolvidas no controle do processo inflamatório e na manutenção da integridade da barreira epitelial. Já os grupos infectados partilharam 17 proteínas com aumento da abundância em relação ao grupo Controle, entre as quais se destacam proteínas relacionadas à invasão celular e integridade da mucosa gástrica. Esses resultados sugerem que a infecção oral por ingestão de formas metacíclicas em meio RPMI, além de promover uma parasitemia mais precoce, foi responsável pelo estabelecimento da infecção no estômago no 5º DAI. Já no grupo Açaí, a infecção ocorre de forma mais silenciosa, com parasitemia mais tardia e estabelecimento da infecção apenas no 14º DAI. Este fato pode estar relacionado à uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias nos animais infectados com o Açaí, além do aumento de proteínas que dificultam a invasão celular pelo *T. cruzi*.

ABSTRACT

For a long time, vectorial transmission was the main mechanism for Chagas disease dissemination. However, after a series of control measures against the main vector, *Triatoma infestans*, there was a decrease in vector transmission in Brazil. In this scenario, oral infection has become the main mechanism of transmission of Chagas disease in Brazil. This route of infection is characterized by the ingestion of food or drinks contaminated with the metacyclic (MT) forms of *Trypanosoma cruzi*, with açai (*Euterpe oleracea*) being the main food involved. The high antioxidant capacity of açai paste, with a high content of polyphenols, especially anthocyanins, has already been confirmed in several studies, however there are few studies in the literature that address the oral route, and in addition, the participation of açai in the parasite/host interaction. In this sense, a study on the influence of açai on oral infection will make it possible to understand how the food in which the parasite is inserted into the body interferes with the interaction between *T. cruzi*/host. Based on this, the objective of this work was to evaluate the influence of açai inoculum on experimental infection by *T. cruzi*. To achieve this objective, BALB/c mice were divided into three experimental groups, the Control group (uninfected animals) and the groups of animals infected orally with MT forms of the Y strain (DTU II) of *T. cruzi* added to the RPMI medium or açai. Animals inoculated with parasites in RPMI medium had 83% survival, while this percentage in the group inoculated with parasites in açai was 98%. Although the Açai group had a longer pre-patent period of parasitemia, the parasitemia curves of infected animals were similar. Quantification of tissue parasite load showed an increase in parasitism in the cheek in the RPMI group in relation to the Açai group on the 14th DAI (days after infection). In the stomach, this increase was observed early on the 5th DAI. However, in the heart, an opposite profile was observed, where there was an increase in load in the Açai group on the 7th DAI in relation to the RPMI group. On the 14th DAI an inversion occurs. The evaluation of the inflammatory process showed that both in the muscle near the cheek and in the stomach there is the presence of an inflammatory process on days 2 and 5 after infection for both infected groups. On the 14th DAI this increase was only observed in the cheek for animals infected in RPMI medium. In the heart, despite no inflammatory process being observed, amastigote nests were found on the 14th DAI in the RPMI group. The quantification of cytokines in the muscle close to the cheek showed that there was a greater production of the pro-inflammatory cytokine TNF at 14 days after infection in the RPMI group compared to the Açai group. In the stomach, the evaluation of cytokines showed that in animals infected with Açai there is a lower production of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines. Proteomic evaluation of the stomach revealed 110 differentially abundant proteins in the three experimental groups. Of these, 24 proteins were increased in the Açai group and decreased in the RPMI group in relation to the Control group. These proteins are involved in controlling the inflammatory process and maintaining the integrity of the epithelial barrier. The infected groups shared 17 proteins with increased abundance compared to the Control group, among which proteins related to cell invasion and integrity of the gastric mucosa stand out. These results suggest that oral infection through ingestion of metacyclic forms in RPMI medium, in addition to promoting earlier parasitemia, was responsible for the establishment of the infection in the stomach on the 5th DAI. In the Açai group, the infection occurs more silently, with later parasitemia and establishment of the infection only on the 14th DAI. This fact may be related to a lower production of pro-inflammatory cytokines in animals infected with Açai, in addition to the increase in proteins that hinder cell invasion by *T. cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ATB: Ácido tiobarbitúrico

ATC: Ácido tricloroacético

BOD: *Biochemical Oxygen Demand*

CAT: Catalase

Ca²⁺: Cálcio

CBA: *Cytometric Bead Array*

CCA: Centro de Ciência Animal

CEM: Campanha de Erradicação da Malária

CHO: Carboidrato

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CuSO₄·5H₂O: Sulfato de cobre penta hidratado

DAI: após a infecção

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

ENUT: Escola de Nutrição

FMT-HVD: Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

FP: Fator Proteico

gp: Glicoproteína

HCl: Ácido clorídrico

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₃BO₃: Ácido bórico

H₃PW₁₂O₄₀: Ácido fosfotungstico

H₃PMO₁₂O₄₀: Ácido fosfomolibdico

HE: Hematoxilina/eosina

IAA: Índice de Atividade Antioxidante

IFN- γ : Interferon gama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17A: Interleucina 17A

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

LIT: *Liver Tryptose Infusion*

Ma: Massa da amostra

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEC: Matriz Extracelular

Mf: Massa final

Mi: Massa inicial

Mic: Massa inicial *cadinho*

mL: Mililitro

MTT: Brometo de 3-[4,5 - dimetiltiazol - 2H] - 2,5 - difenilterazolio

μ L: Microlitro

MS: Ministério da Saúde

NaOH: Hidróxido de sódio

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

NF-κβ: Fator nuclear

N,N,N: Neal, Novy, Nicolle

NO: Óxido nítrico

NK: *Natural killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PE: Ficoeritrina

pg: Picograma

RPM: Rotação por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido dismutase

ST: Sólidos Totais

SVS: Sistema de Vigilância em Saúde

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

T. cruzi: Trypanosoma cruzi

TGF- β : Fator de transformação do crescimento

TNF: Fator de necrose tumoral

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

V_{HCl}: Volume de HCl

VIG: Via Intra Gástrica

VO: Via Oral

W₈O₂₃: Óxido de tungstício

Mo₈O₂₃: Óxido de molibdênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mensal de casos confirmados da doença de Chagas aguda no Pará de 2002 a 2016.....	6
Figura 2. Curva Padrão de Ácido Gálico para o cálculo de Polifenóis Totais.....	22
Figura 3. Curva Padrão de DPPH* para cálculo da atividade antioxidante do açaí pelo método DPPH*.....	24
Figura 4. Curva Padrão de Trolox para cálculo da atividade antioxidante do açaí pelo método ABTS ⁺⁺	26
Figura 5. Blocos de parafina utilizados para confecção de lâminas.....	34
Figura 6. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em Açaí ou em meio RPMI.....	40
Figura 7. Parasitemia de camundongos BALB/c infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> no Açaí ou RPMI.....	41
Figura 8. Número de parasitos na bochecha (A), no estômago (B) e no coração (C) de camundongos BALB/c infectados por formas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açaí.....	42
Figura 9. Quantificação do processo inflamatório na bochecha (A), no estômago (B) e no coração (C) de camundongos BALB/c não-infectados, infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açaí.....	44
Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular próxima a bochecha de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açaí.....	45

Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos do da camada muscular do estômago de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açai.....	46
Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos meios RPMI ou Açai.....	47
Figura 13. Quantificação do estresse oxidativo no coração de camundongos BALB/c infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em meio RPMI ou Açai.....	48
Figura 14. Quantificação das citocinas no músculo próximo a bochecha de camundongos BALB/c não infectados ou infectados por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açai.....	49
Figura 15. Quantificação das citocinas no estômago de camundongos BALB/c não infectados (linha tracejada) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em RPMI ou Açai.....	50
Figura 16. Diagrama de <i>Venn</i> . Compartilhamento das proteínas totais pelos três grupos experimentais.....	52
Figura 17. Rede de interação das proteínas envolvidas em processos biológicos compartilhadas pelas três condições experimentais.....	53
Figura 18. Análise composicional.....	54
Figura 19. Rede de interação das proteínas envolvidas em processos biológicos.....	55
Figura 20. <i>Heatmap</i> . Perfil de expressão diferencial das 110 proteínas identificadas na análise quantitativa.....	64

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Caracterização do açaí.....	15
Fluxograma 2. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da polpa do açaí <i>in natura</i>	38
Tabela 2. Polifenóis e capacidade antioxidante em extrato hidroalcolico do açaí.....	39
Tabela 3. Taxa de infectividade.....	39
Tabela 4. Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> no meio RPMI ou Açaí.....	41
Tabela 5. Indicadores obtidos na plataforma UHPLC-MS/MS abrangendo a totalidade dos grupos.....	51
Tabela 6. Vias biológicas obtidas pelo enriquecimento funcional por meio da plataforma WikiPathways.....	53
Tabela 7. Vias biológicas obtidas pelo enriquecimento funcional por meio da plataforma WikiPathways.....	55
Tabela 8. Parte I - Proteínas unicamente identificadas em cada condição.....	56
Tabela 9. Proteínas reguladas positivamente no grupo Açaí e reguladas negativamente no grupo RPMI.....	65
Tabela 10. Proteínas reguladas negativamente nos grupos infectados Açaí e RPMI.....	66
Tabela 11. Proteínas reguladas positivamente nos grupos infectados Açaí e	

RPMI.....67

Tabela 12. Proteínas reguladas negativamente no grupo Açaí e positivamente no grupo RPMI.....68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Proteínas encontradas na análise quantitativa.....94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 A importância da infecção oral na transmissão da doença de Chagas.....	3
1.3 O açaí e a infecção oral pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 Interação parasito/hospedeiro e a resposta imune na doença de Chagas	8
1.5 Proteômica e a doença de Chagas	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVO GERAL.....	14
3.1 Objetivos específicos.....	14
3.1.1 Quantificar o açaí <i>in natura quanto</i> : composição centesimal; teor de polifenólicos totais atividade antioxidante pelos métodos do DPPH [·] e do Radical Livre ABTS ^{•+}	14
3.1.2 Avaliar os parâmetros da taxa de infecção, taxa de sobrevivência e curva de parasitemia...	14
3.1.3 Quantificar a carga parasitária no coração, na bochecha e no estômago nos dias 2, 5, 7 e 14 após a infecção	14
3.1.4 Quantificar o processo inflamatório no coração, na bochecha e no estômago nos dias 2, 5, 7 e 14 após infecção;.....	14
3.1.5 Quantificar o estresse oxidativo no coração aos 5, 7 e 14 dias após infecção;.....	14
3.1.6 Quantificar citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras na bochecha e no estômago nos 2, 5, 7 e 14 dias após a infecção;.....	14
3.1.7 Analisar o proteoma do estômago no dia 5 após a infecção.....	14
4. METODOLOGIA.....	15
4.1 Açaí.....	15
4.1.2 Análise da composição centesimal do açaí.....	15

4.1.2.1	Determinação da umidade	16
4.1.2.2	Determinação lipídeos totais	17
4.1.2.3	Determinação das cinzas	18
4.1.2.4	Determinação das proteínas	18
4.1.2.5	Determinação de carboidratos	20
4.1.3	Análise da atividade antioxidante do açaí	20
4.1.3.1	Obtenção do extrato hidroalcolico do açaí.....	20
4.1.3.2	Quantificação de polifenóis totais	21
4.1.3.3.	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre DPPH•	23
4.1.3.4	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre ABTS ^{•+}	25
4.2	Animais e infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4.3	Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de cultura	28
4.4	Infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
4.5	Curvas de parasitemia.....	28
4.6	Taxa de sobrevivida	29
4.7	Coleta de sangue.....	29
4.8	Eutanásia, coleta, fixação.....	29
4.9	Quantificação da carga parasitária e taxa de infectividade	29
4.10	Quantificação do processo inflamatório.....	30
4.11	Quantificação do estresse oxidativo	31
4.11.1	Determinação da atividade da Superóxido Dismutase.....	31
4.11.2	Determinação da atividade da Catalase	31
4.11.3	Determinação da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ...	32
4.12	Dosagem de citocinas por CBA (Cytometric Bead Array)	32

4.13	Análise Proteômica Baseada em Espectrometria de Massas	33
4.13.1	Digestão enzimática em solução.....	34
4.13.2	Aquisição dos Dados Espectrais em Plataforma UHPLC-MS/MS	35
4.13.3	Busca de Identidades e Quantificação de Proteínas.....	36
4.14	Análises Estatísticas	37
5.	RESULTADOS.....	38
5.1	Composição centesimal do açaí.....	38
5.2	Quantificação de Polifenóis Totais e determinação da capacidade antioxidante do açaí.....	38
5.3	Taxa de infectividade	39
5.4	Taxa de sobrevida	40
5.5	Curva de parasitemia	40
5.6	Carga parasitária	42
5.7	Processo inflamatório	43
5.8	Quantificação do estresse oxidativo no coração	48
5.9	Quantificação das citocinas na bochecha e no estômago	49
5.10	Análise proteômica do estômago baseada em espectrometria de massas.....	51
5.10.1	Análise composicional.....	51
5.10.2	Análise Quantitativa.....	63
6.	DISCUSSÃO.....	69
9		
7.	CONCLUSÃO.....	80
8.	BIBLIOGRAFIA.....	81
9.	ANEXOS.....	93
10.	MATERIAL SUPLEMENTAR	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A tripanossomíase americana, ou mais popularmente conhecida como doença de Chagas, é uma protozoonose descrita pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas durante um projeto de erradicação da malária na cidade de Lassance, no estado de Minas Gerais. A doença tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909) e possui como vetores insetos hematófagos da família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* e dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Inicialmente de natureza enzoótica, a doença de Chagas passou à condição de antroponose, a partir de intervenções humanas no ambiente silvestre, alterando o ambiente natural de circulação do *T. cruzi* (Coura, 2007; Dias, 2000).

A doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países da América Latina. O grande fluxo migratório de pacientes portadores da doença para países onde não existe um controle rígido dos bancos de sangue e controle dos transplantes de órgãos têm levado ao aumento da notificação de novos casos em países não endêmicos (Coura and Dias, 2009; Coura and Viñas, 2010; Schmunis, 2007). Dados atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que em todo o mundo há aproximadamente sete milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. Por ano mais de 30 mil novos casos são notificados, cerca de 75 milhões de pessoas nas regiões endêmicas correm o risco de contrair a doença, e mais de 10 mil mortes são registradas em decorrência das complicações da doença de Chagas. Mesmo com todos esses números, a doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada (OMS, 2020).

O mecanismo clássico de transmissão da doença é a forma vetorial, caracterizado pela penetração de formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas excretas do triatomíneo, hospedeiro invertebrado, através de lesões na pele ou na mucosa do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Chagas, 1909; Brener, 1973). Outras formas de transmissão incluem: a transmissão oral, caracterizada pelo consumo de bebidas ou alimentos contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (Shikanai- Yasuda *et al.*, 1991; Coura, 2006; Dias, 2006), transfusão de sangue (Young *et al.*, 2007), transmissão vertical (Schmunis, 2007; Coura and Dias, 2009), transmissão congênita (Gürtler, Segura and Cohen, 2003; Dorn *et al.*, 2007), através de transplante de órgãos (Prevention, 2006) e acidentes laboratoriais (Prata, 2001).

Independente do mecanismo de transmissão, a doença de Chagas pode ser dividida em duas fases clinicamente distintas. A fase aguda se inicia logo após a infecção e tem duração de aproximadamente oito semanas. Grande parte dos indivíduos apresentam alguns sinais ou sintomas inespecíficos e comuns a outras enfermidades como febre, mal-estar, edema de face e de membros inferiores. Além disso, podem estar presentes alguns sinais de porta de entrada do parasito como o sinal de Romanã (edema unilateral bipalpebral) e chagoma de inoculação (local da picada), ambos são caracterizados histologicamente por infiltrado de células mononucleares no local da infecção (Teixeira, Gazzinelli and Silva, 2002). Essa fase da doença é também caracterizada por elevados níveis de parasitemia e parasitismo tecidual (Andrade and Andrews, 2005). Muitos indivíduos não são corretamente diagnosticados e tratados nessa fase da doença e evoluem para fase crônica.

A maioria das pessoas portadoras da doença de Chagas, em torno de 70%, permanecem assintomáticas e evoluem para a fase crônica da doença, desenvolvendo a forma indeterminada. Esses pacientes apresentam positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas, eletrocardiograma e raio-x de cólon, esôfago e tórax normais (Rassi Jr, Rassi and Marin-Neto, 2010). No entanto, 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica sintomática ou determinada da doença. As manifestações clínicas dessa fase podem levar até 30 anos para aparecerem e podem apresentar-se sob as formas cardíaca, com acometimento do coração; digestiva, com quadros de megaesôfago e/ou megacólon; ou ainda a forma mista cardio-digestiva, com comprometimento concomitante do coração e do trato digestório (JC, 1995).

No início dos anos 40 iniciaram-se medidas de controle da transmissão vetorial através do melhoramento das moradias e pulverização de inseticidas para eliminação do inseto vetor. Com o surgimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) nos anos 80, amplificou-se a triagem dos doadores de sangue o que também contribuiu para uma redução da transmissão da doença de Chagas no Brasil. Em 1991, seis países da América do Sul incluindo Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Uruguai e Paraguai se reuniram no que ficou conhecido como Iniciativa Cone Sul para elaboração de medidas de combate ao principal vetor da doença, o *Triatoma infestans* (Schofield and Dujardin, 1997). Graças à essa iniciativa internacional coordenada pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS), a eliminação da transmissão vetorial clássica da doença foi alcançada no Uruguai, Chile e em grande parte do Brasil e da Argentina (Dias, Silveira and Schofield, 2002).

1.2 A importância da infecção oral na transmissão da doença de Chagas

Com o controle da transmissão vetorial nas regiões endêmicas, a transmissão oral se tornou a principal forma de transmissão da doença nesses locais. O primeiro relato da infecção oral experimental foi feito por (Nattan-Larrier, 1921), onde pode-se comprovar a transmissão oral em pequenos animais utilizando sangue infectado com formas tripomastigotas sanguíneas (Nattan-Larrier, 1921). Nas décadas de 60 e 70 coube a Carlos Díaz comprovar a transmissão oral em cães, cobaias e roedores com cepas provenientes de triatomíneos naturalmente infectados (Díaz-Ungría, 1968; Díaz-Ungría and Bracho, 1970). Até o final de década de 60 não existiam relatos de casos autóctones de doença de Chagas na Amazônia. No entanto, em 1968 a pedido do laboratório da Campanha de Erradicação da Malária (CEM) foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas amostras de sangue de três familiares com suspeita de malária. Durante a pesquisa por plasmódios, foram encontrados tripanossomas com morfologia típica do *T. cruzi*. Uma vez que casos da doença de Chagas eram desconhecidos na região, diferentes testes foram realizados para confirmação do diagnóstico: exame de gota fresca, xenodiagnóstico, semeadura de sangue periférico em meio N.N.N (Neal, Novy, Nicolle) e inoculação do sangue periférico dos pacientes em camundongos; sendo o xenodiagnóstico positivo para todos os pacientes. Como nenhum dos familiares estiveram em área endêmica para doença de Chagas, suas habitações não eram propícias para colonização de triatomíneos e todos os envolvidos negaram terem sido picados por triatomíneo, recebido transfusão de sangue ou transplantado de órgãos, pela primeira vez cogitou-se a transmissão por via oral na região Amazônica (Shaw, Lainson and Fraiha, 1969).

Durante o período de 2000-2010 mais de 1000 casos agudos foram relatados em 138 focos, sendo a maioria deles registrados na Amazônia brasileira. Destes, 776 (71%) foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminadas (Díaz and González, 2014). Somente em 2020 foram confirmados 146 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, sendo a maioria destes registrados na região Norte do país (SINAN/MS, 2021).

Os surtos da doença de Chagas oral normalmente atingem pessoas de uma mesma família que compartilham de um mesmo alimento. Este pode ser infectado com formas tripomastigotas metacíclicas presentes no intestino do barbeiro (que é triturado junto ao alimento durante seu processamento), ou formas metacíclicas presentes nas glândulas anais de marsupiais (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). Um importante fator que deve ser levado em consideração na infecção é a quantidade de parasitos ingeridos. Estipula-se que um triatomíneo triturado em um alimento pode fornecer mais de

600.000 formas tripomastigotas, ao passo que a quantidade de tripomastigotas liberadas no conteúdo fecal seja de aproximadamente 4000 formas por microlitro (Franco-Paredes *et al.*, 2020). Uma característica comum aos surtos agudos da doença de Chagas oral é a gravidade da doença, uma vez que muitos pacientes evoluem à óbito devido a uma intensa miocardite (Bastos *et al.*, 2010).

No Brasil já foram relatados casos de doença de Chagas aguda causado por alimentos como o açaí (Nóbrega *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2009), refrigerante caseiro (Dias *et al.*, 2008), caldo de cana (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Steindel *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2018) contaminados com o *T. cruzi*. Em países como Venezuela e Colômbia estes surtos foram atribuídos à ingestão de suco de frutas como goiaba e laranja contaminados (Alarcón de Noya *et al.*, 2010; Hernández, 2008).

Sucos caseiros feitos com frutas de palmeiras, como a bacaba e o açaí são as principais fontes de contaminação pela doença de Chagas oral no norte do Brasil. Isso se deve ao fato dessas árvores servirem como abrigo e nutrição aos triatomíneos. Além disso, as folhas dessas palmeiras também servem de cobertura para telhados das habitações humanas, o que pode facilitar a inserção do triatomíneo no ambiente domiciliar e nas amassadeiras, locais onde esses alimentos são processados sem boas práticas de manipulação na maioria das vezes (Franco-Paredes *et al.*, 2020).

Com o controle do principal vetor da doença de Chagas no Brasil, o *Triatoma infestans*, outros vetores ganharam importância na transmissão oral da doença. Entre eles podemos citar: *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes* (da Silva Monteiro *et al.*, 2012) e *Triatoma tibiamaculata* (Steindel *et al.*, 2008). Além disso, o vetor *Panstrongylus geniculatus* é frequentemente associado aos surtos orais e em locais de despejo de lixo em áreas urbanas e periurbanas esses vetores são presas de ratos (de Noya and González, 2015; Noya *et al.*, 2015). Já o vetor *Rhodnius prolixus* possui fitofagia facultativa, dependendo das condições ambientais em que se encontra. Na escassez de sangue, essa espécie de triatomíneo se alimenta de palmeiras como o açazeiro (Díaz- Albiter *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que no ciclo silvestre a infecção oral é a principal forma de transmissão e manutenção da doença de Chagas. Animais silvestres possuem uma barreira cutânea espessa, o que impossibilita a infecção pela via vetorial. Dessa forma, os mamíferos adquirem a infecção ao se alimentar de vetores triatomíneos infectados ou ao ingerirem alimentos contaminados com as excretas dos triatomíneos (Coura, 2014; Franco-Paredes *et al.*, 2020).

A possibilidade da transmissão oral pela ingestão de triatomíneos infectados foi sugerida pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Triatomíneos infectados foram encaminhados ao Instituto Oswaldo Cruz na tentativa de infectar um macaco *Callithrix penicillata*, permitindo que vários exemplares de insetos o picassem. Após 30 dias de observação, espécies conhecidas do gênero *Trypanosoma* foram encontradas no sangue periférico do macaco. Considerando que a transmissão do *T. cruzi* pela picada de um triatomíneo é muito rara, acredita-se que o macaco tenha comido alguns insetos e tenha se infectado por via oral.

Além disso, marsupiais como gambás e mucuras podem agir tanto como reservatório como vetor do *T. cruzi*. O processo de maturação de formas tripomastigotas metacíclicas que ocorre nas glândulas anais odoríferas desses mamíferos, de forma semelhante ao processo de maturação que ocorre no intestino dos triatomíneos. A participação desses animais na infecção oral está relacionada com a contaminação de alimentos destinados ao consumo humano, com formas tripomastigotas metacíclicas aerossolizadas durante o mecanismo de defesa desses animais. A transmissão do *T. cruzi* também pode ocorrer pela ingestão da carne crua ou mal passada ou até mesmo do sangue desses marsupiais infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (Franco-Paredes *et al.*, 2020).

1.3 O açaí e a infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi*

O açaí (*Euterpe oleraceae*) é uma planta nativa da Amazônia e possui grande importância, tanto econômica quanto cultural, para essa região. O açaí é considerado alimento de alto valor calórico, com elevado percentual de lipídeos, e nutricional, pois é rico em proteínas e minerais. O pH na matéria seca igual a 5,8. O óleo extraído do açaí é composto de ácidos graxos de boa qualidade, sendo 60% de monoinsaturados e 13% de poli-insaturados. Em relação às proteínas, possui teor superior ao do leite (3,50%) e do ovo (12,49%), enquanto o perfil em aminoácidos é semelhante ao do ovo. O açaí possui elevado teor de antocianinas, contendo cerca de 1,02 /100 g de extrato seco. As antocianinas são pigmentos naturais, pertencentes à família dos flavonoides, sendo estes responsáveis pela cor do açaí. Além disto, possuem função antioxidante, que assegura melhor circulação sanguínea e protegem o organismo contra o acúmulo de placas de depósito de lipídeos, causadores da aterosclerose (Xie *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A fruta geralmente é consumida *in natura*, e é a base da dieta do nortista brasileiro,

sendo consumida muitas vezes com farinha de mandioca, peixe assado e camarão. O consumo de açaí nessa região chega a ser duas vezes maior que o consumo de leite. O estado do Pará é o maior produtor e consumidor de açaí em todo o mundo. Estima-se que sejam consumidas mais de 300 mil toneladas de açaí por ano em Belém. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento mostraram que em 2015 só o estado do Pará foi responsável pela produção de mais de um milhão de toneladas do açaí, injetando R\$ 1,8 bilhão de reais na economia (Barbosa *et al.*, 2019). A colheita do fruto pode render até dois salários-mínimos aos ribeirinhos. As famílias se dedicam à extração da fruta no período da safra, que no Pará vai de setembro a janeiro. Nesse mesmo período é observado o aumento de caso da doença de Chagas no estado, mostrando uma sazonalidade da infecção aguda. Entre os anos de 2002 e 2016 foram registrados 2.030 casos de doença de Chagas aguda no estado do Pará entre os meses de agosto e setembro (Figura 1) (SINAN/2016).

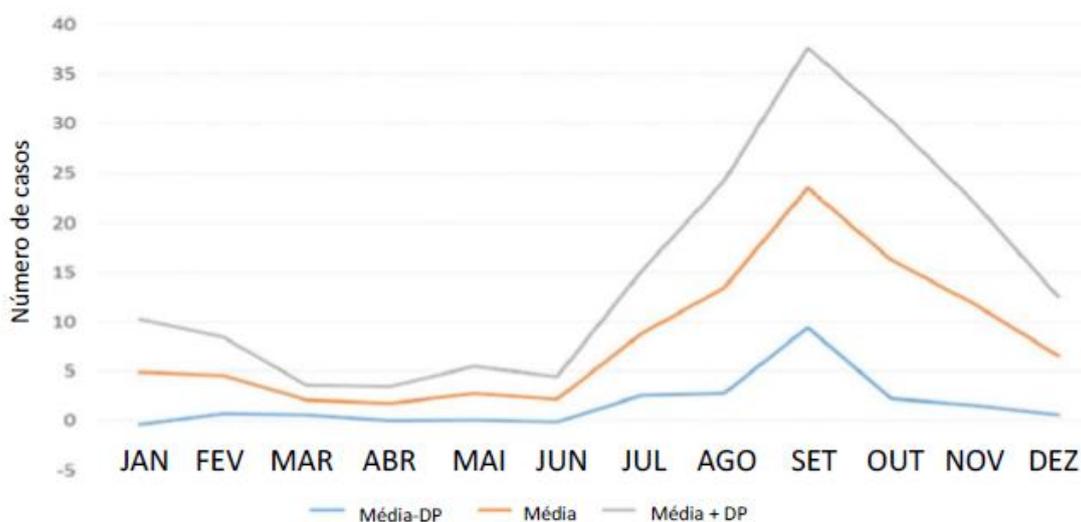


Figura 1. Distribuição mensal de casos confirmados da doença de Chagas aguda no Pará de 2002 a 2016 (SINAN).

Recentemente, o açaí tem recebido muita atenção como alimento funcional devido à sua composição química e bioatividades relacionadas à saúde. Os benefícios para saúde são atribuídos principalmente a presença de substâncias bioativas como compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides (de Lima Yamaguchi *et al.*, 2015). Somando-se a isso o fruto já tem comprovada atividade antioxidante e anti-inflamatória. Os mecanismos da atividade antioxidante dos flavonoides envolvem a eliminação de espécies reativas de oxigênio, bem

como a inibição de enzimas oxidativas que geram essas espécies reativas. Os flavonoides também mostraram atividade anti-inflamatória nas fases proliferativa e exsudativa da inflamação (Pietta, 2000; Rathee *et al.*, 2009).

O flavonoide velutina, único isolado da polpa do açaí, exibiu forte atividade anti-inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6). Também inibiu a ativação do fator nuclear (NF- κ B), bem como da proteína quinase p38 ativada por mitogênio e da fosforilação de JNK em macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos peritoniais murinos ativados por lipopolissacarídeos (Buratto, Cocero and Martín, 2021).

Em um estudo de caso controle e coorte realizado por Nóbrega e colaboradores (2009) com 11 pacientes diagnosticados com a doença de Chagas, todos negaram ter feito transfusões de sangue ou transplantes de órgãos, ter dormido em áreas rurais ou silvestres ou ter sido picado por triatomíneos. Em comum, todos haviam participado de uma reunião em que foi consumido açaí. Dessa forma, os achados desse estudo correlacionaram o açaí como fonte de contaminação em um surto de doença de Chagas aguda (Nóbrega *et al.*, 2009).

Entretanto, foi apenas em 2017 que se comprovou cientificamente a associação do açaí com a doença de Chagas oral. Uma mulher de 51 anos procurou a Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD, em Manaus por apresentar febre. Por se tratar de uma região endêmica de malária foi realizada a procura de *Plasmodium spp.* em esfregaço da gota de sangue, com resultado negativo. No entanto, foram encontradas formas tripomastigotas do *T. cruzi*. A paciente relatou que mais nove parentes apresentavam quadro de febre e todos tinham em comum o consumo do açaí, posteriormente todos foram testados e a infecção foi confirmada. Uma amostra do açaí consumido que havia sido armazenada em freezer -20 °C foi coletada por autoridades de saúde e levada ao FMT-HVD onde foi imediatamente descongelada e centrifugada. Após a centrifugação três camadas foram observadas: 1) polpa; 2) camada intermediária contendo gordura; 3) sobrenadante. Cada camada foi separada e ressuspendida em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Após 24 horas de incubação foram observadas formas flageladas móveis na camada intermediária de gordura (Santana *et al.*, 2019).

Embora o pH ótimo para a sobrevivência do parasito seja de 7,2 a 7,3, formas tripomastigotas do *T. cruzi* podem sobreviver ao pH ácido da polpa *in natura* do açaí (pH 5,8). Esses achados sugerem que a longa presença de formas tripomastigotas viáveis no açaí se deve à presença de crioprotetores presentes na camada de gordura do fruto. No entanto, pouco se

sabe sobre a capacidade de sobrevivência do parasito neste alimento a longo prazo e se sua permanência nesse meio alteraria sua infectividade. Dessa forma, estudos sobre a viabilidade e infectividade do *T. cruzi* após contato com o açaí se tornam necessários para se entender como o meio no qual o parasito foi ingerido pode influenciar na relação parasito-hospedeiro, uma vez que o açaí possui importância na cultura alimentar e econômica da região amazônica (Correa Passos *et al.*, 2012; Nóbrega *et al.*, 2009).

Já foram descritos processos que são capazes de inativar o *T. cruzi* em alimentos, como a pasteurização e o branqueamento. No entanto, esses procedimentos estão relacionados, respectivamente, com a perda da cor natural e perda de nutrientes do açaí, além da necessidade de equipamentos para congelamento imediato (Zapparoli *et al.*, 2022). Esses fatores dificultam o controle da transmissão oral, uma vez que grande parte da população responsável pela manipulação e extração da polpa muitas vezes não possuem conhecimento das técnicas de eliminação do parasito, tampouco acesso aos equipamentos necessários. É importante ressaltar que apenas congelar o açaí sem o processo de calor não impede a transmissão oral pelo *T. cruzi* (Correa Passos *et al.*, 2012) bem como a possibilidade de que a gordura presente no açaí possui um fator protetor para a sobrevivência deste parasito nos alimentos, o que reforça a necessidade de pasteurização do açaí (Santana *et al.*, 2019).

1.4 Interação parasito/hospedeiro e a resposta imune na doença de Chagas

O ciclo de vida do *T. cruzi* é um dos mais complexos na família dos tripassonomatídeos, com diferentes formas evolutivas presentes tanto no hospedeiro vertebrado, quanto nos insetos hematófagos invertebrados da família *Reduviidae*. Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar várias células nucleadas como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras. A invasão de diferentes células é crucial para sobrevivência do *T. cruzi*. O ciclo intracelular se inicia quando o *T. cruzi* interage com moléculas de superfície da célula a ser parasitada. Esse processo culmina na sinalização celular e consequente internalização do parasito (Maeda, Cortez and Yoshida, 2012; Barrias, Carvalho and De Souza, 2013; Cardoso, Reis-Cunha and Bartholomeu, 2016).

Tanto a imunidade inata quanto a adquirida têm papel crucial no controle da infecção causada pelo *T. cruzi*. Uma resposta imune eficiente é capaz de controlar o número de parasitos, além de limitar os danos causados pela infecção. Enquanto uma resposta imune ineficaz, não consegue reduzir a carga parasitária, levando a manutenção do processo inflamatório e consequentemente às lesões teciduais (Tarleton, 2001).

A imunidade inata tem papel crucial no controle da infecção pelo *T. cruzi* atuando no controle da replicação do parasito e impedindo sua disseminação no tecido hospedeiro. Durante a infecção intracelular do parasito, diferentes moléculas são coordenadas para iniciar uma resposta imune para controlar a replicação do parasito. Este controle é feito por meio da produção de mediadores pró-inflamatórios como interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (NO) através da ativação de receptores imunes. Nas respostas imunes a patógenos intracelulares como o *T. cruzi*, a IL-12 é um mediador chave da produção de interferon gama (IFN- γ) através da indução do desenvolvimento de células Th1 e da ativação de células *natural killer* (NK). O IFN- γ desempenha um papel crucial na ativação de macrófagos, responsável pela morte de patógenos intracelulares, incluindo parasitos protozoários. A morte desses patógenos é mediada pelo NO, que é produzido pelos macrófagos ativados. Nos macrófagos, o IFN- γ induz a expressão da NO sintase induzível (iNOS) (Kayama and Takeda, 2010).

Proteínas presentes no *T. cruzi* como gp82, gp80, gp35/50 e gp85, além de proteases como cruzipaina, oligopeptidase B e Tc80 estão envolvidas no processo de internalização. No hospedeiro vertebrado, moléculas de adesão celular como mucinas, VLA (*Very Late Antigen*) e proteínas da matriz extracelular (MEC) como laminina e fibronectina já foram descritas como necessárias para internalização do parasito (Schenkman *et al.*, 1991; Yoshida and Cortez, 2008; Buscaglia *et al.*, 2006; Yoshida, 2009; Villalta *et al.*, 2009; De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010; Maeda, Cortez and Yoshida, 2012). Já foi demonstrado que durante o processo inicial de invasão celular, o *T. cruzi* é capaz de aumentar a expressão de componentes da MEC. Além disso, o *T. cruzi* apresenta sítios de ligação à citoqueratina 18, laminina e integrinas (Ortega-Barria and Pereira, 1991; Calvet *et al.*, 2012).

Quanto à resposta imune adquirida, já foi demonstrado que tanto linfócitos TCD4⁺ quanto TCD8⁺ apresentam um papel importante no controle da infecção provocada pelo *T. cruzi*. O padrão funcional de células T (Th1 ou Th2) desenvolvido no curso inicial da infecção pode estar relacionado com a suscetibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção, uma vez que células Th1 induzem uma resposta inflamatória, enquanto células Th2 tem uma atividade reguladora anti-inflamatória. Além disso, sabe-se também que os linfócitos T CD8⁺ são as principais células responsáveis pelo controle do *T. cruzi*, uma vez que camundongos nocaute para essas células são incapazes de sobreviverem à infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1994).

Em relação à resposta imune na infecção oral, diferentes tipos celulares já foram encontrados no coração e no fígado de camundongos infectados, como CD4⁺, CD8⁺, neutrófilos e macrófagos, entre eles os macrófagos representam a maior fonte de TNF tecidual (Hoft *et al.*,

1996; Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015). Hoft e colaboradores (1996) mostraram que após infecção por via oral, o *T. cruzi* no epitélio gástrico é capaz de estimular células B com IgA e IgG específicos para o parasito. Além disso, linfócitos intraepiteliais gástricos e da lâmina própria produzem IFN- γ (Hoft *et al.*, 1996).

Já foi observada também apoptose no fígado e no coração de camundongos infectados pela via oral ainda na fase aguda da doença. Nesses animais os macrófagos eram a principal fonte de TNF. Altos níveis de TNF já foram relacionados à danos teciduais no baço, coração, fígado e ao choque tóxico em camundongos. Além disso, essa citocina também pode estar relacionada à mortalidade, uma vez que animais *knockout* para TNF apresentaram maiores taxas de sobrevivência e altos níveis séricos de IFN- γ (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015; Hoft *et al.*, 1996).

No que diz respeito às citocinas sistêmicas, camundongos infectados por via oral apresentam elevadas concentrações séricas de interleucina 4 (IL-4), no entanto as citocinas reguladoras interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento (TGF- β) se apresentam em baixas concentrações no soro desses animais e são responsáveis por inibir a função microbicida dos macrófagos, protegendo o hospedeiro vertebrado dos danos teciduais (Reed *et al.*, 1994; Hölscher *et al.*, 2000).

A interação entre o *T. cruzi* e o hospedeiro vertebrado na infecção oral vem sendo estudada ao longo dos anos em modelos experimentais. Hoft e colaboradores (1996) mostraram em camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuén, após 14 dias de infecção o *T. cruzi* invade e se multiplica no interior de células epiteliais da mucosa gástrica. Logo após a invasão inicial é possível observar gastrite e disseminação para outros tecidos, culminando em hipertrofia e presença do parasito nos linfonodos adjacentes do estômago, além de processo inflamatório em diferentes órgãos (pâncreas, fígado, baço, medula óssea, coração, duodeno, cérebro, músculo esquelético). Nesse trabalho também foram observados ninhos de amastigotas na mucosa epitelial gástrica. Todos esses achados sugerem que a mucosa gástrica é a porta de entrada do *T. cruzi* na infecção oral, seguida de disseminação sistêmica do parasito (Hoft *et al.*, 1996).

Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira ainda não estão completamente elucidados. Acredita-se que o epitélio gástrico expressa mucinas que interagem com glicoproteínas presentes no parasito como a gp82 e a gp30, levando à uma cascata de sinalização intracelular, tanto no *T. cruzi* quanto na célula a ser parasitada, resultando na mobilização de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, uma etapa essencial no

processo de internalização do parasito (Yoshida, 2008; Yoshida, 2009; Staquicini *et al.*, 2010; Yoshida, Tyler and Llewellyn, 2011).

Diferentes micro-organismos podem se ligar à cavidade oral através de moléculas como as mucinas, colonizando a região. A mucosa oral é revestida por um filme de muco constituído de lipídeos, proteínas glicosiladas, como imunoglobulinas mucinas e fatores de crescimento. As mucinas representam a primeira linha de defesa na cavidade oral. No entanto, alguns patógenos podem se ligar nas estruturas de carboidrato presente nas mucinas, como o ácido siálico, levando a interação com células epiteliais e invasão celular (Tabak, 1995; Derrien *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014).

O α – 2,3 ácido siálico é a principal molécula envolvida na ligação mediada pelas trans-sialidades do *T. cruzi*. Essa molécula representa um importante fator de virulência do *T. cruzi*, uma vez que é capaz de reduzir a resposta imune da célula hospedeira e promover a adesão do parasito à essas células (Freire-de-Lima *et al.*, 2015). Essas trans-sialidades se ligam aos sialoglicanos da célula hospedeira, gerando sinais de “coma-me” nas células epiteliais, facilitando a internalização do *T. cruzi* nas células não-fagocíticas.

No que diz respeito às formas de inóculo, um estudo conduzido por Barreto-de-Albuquerque e colaboradores (2015), demonstrou que quando o local de entrada do parasito é a boca (via oral- VO) – apresenta maior similaridade com a infecção natural do que a via intragástrica (VIG) – a infecção promove no hospedeiro vertebrado um perfil distinto de resposta imune e mortalidade. Animais infectados pela VO apresentam maior taxa de infecção, parasitemia, e maior concentração de citocinas Th1. Essas diferenças explicitam como o sítio primário de infecção *T. cruzi* pode alterar a patofisiologia no modelo murino quando o parasito é inserido diretamente na cavidade oral (VO) ou por gavagem no estômago (VIG) (Hoft *et al.*, 1996; Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015).

Além disso, Silva dos Santos e colaboradores (2017), mostraram que a cavidade oral é um potencial local de internalização inicial do *T. cruzi* antes da disseminação para outros tecidos durante a fase aguda da doença, pois foi observado que após inóculo oral o *T. cruzi* entra pelo palato, multiplica na cavidade nasal e dissemina-se para o Sistema Nervoso Central (SNC) e tecidos periféricos (Silva-dos-Santos *et al.*, 2017). Interessantemente, em pacientes infectados pelo *T. cruzi* pela VO, já foi observado edemate face e parestesia de língua, corroborando com a hipótese observada em modelo experimental (Pinto *et al.*, 2009).

1.5 Proteômica e a doença de Chagas

O termo proteoma foi criado em 1994 pelo pesquisador australiano Mark R. Wilkinse refere-se ao complemento proteico expresso pelo genoma. Mais recentemente, o pesquisador americano John R Yates ampliou o conceito o definindo como: “caracterização completa de todas as proteínas: que incluem características, mas não são limitadas a expressão, localização, interação, domínios de estrutura, modificações pós-traducionais e a atividade” (Wu and Yates III, 2003). Já o termo proteômica foi definido como “o uso de medição quantitativa do nível de proteína da expressão gênica para caracterizar processos biológicos (por exemplo, processos de doenças e efeitos de drogas) e decifrar os mecanismos de expressão gênica ao controle” (Anderson and Anderson, 1998).

O estudo do proteoma veio para complementar o do genoma, uma vez que este último não é capaz de fornecer dados completos de funções celulares, subcelulares e supracelulares os quais tem suas funções regidas por proteínas, e não por genes. Mudanças na expressão global de proteínas ou no proteoma, são responsáveis por diferentes estágios do desenvolvimento em animais, sem que haja alteração na expressão gênica.

A tecnologia da proteômica permite a identificação de proteínas em diversas amostras biológicas, desempenhando um importante papel na pesquisa clínica. No que diz respeito à saúde humana, pode ajudar na descoberta de marcadores de diagnóstico e prognóstico de doenças, avaliação de tratamentos, desenvolvimento de novas vacinas, compreensão de mecanismos de patogenicidade, alteração de padrões de expressão em resposta a diferentes sinais e interpretação de vias funcionais de proteínas em diferentes doenças (Aslam *et al.*, 2016).

Na literatura são escassos os estudos que abordam as mudanças a nível de proteínas no hospedeiro vertebrado durante a infecção pelo *T. cruzi*. Os poucos trabalhos existentes buscam entender os mecanismos de resistência e suscetibilidade aos tratamentos disponíveis para doença de Chagas (Santos, 2008) e a encontrar biomarcadores de prognóstico da doença (Wiktorowicz, Zago and Garg, 2019). No entanto, ainda não há estudos abordando a mudança do proteoma durante a infecção oral pelo *T. cruzi*. Uma vez que o proteoma representa a expressão de proteínas durante um processo biológico, a avaliação das proteínas presentes no estômago de camundongos não-infectados ou infectados pela via oral em meios RPMI ou Açai, pode ser uma ferramenta útil para detecção de possíveis biomarcadores da infecção oral, o que pode ajudar no diagnóstico diferencial de doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

Com o controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil, a infecção por via oral se tornou a principal via de infecção da doença. A maioria dos surtos tem sido relacionada ao consumo do açaí contaminado, o que representa um desafio no controle da doença de Chagas endêmica. Uma característica comum a todos os surtos é a gravidade da doença, onde a maioria dos pacientes apresenta intensa miocardite e uma alta taxa de mortalidade nas primeiras duas semanas após a infecção. No entanto, até o presente momento, ainda não existe um estudo avaliando a influência do meio no qual o parasito foi ingerido sobre a interação inicial no hospedeiro vertebrado. Sendo assim, visto que o açaí já tem comprovada atividade antioxidante e anti-inflamatória, um estudo sobre a influenciada cultura alimentar, já que o açaí tem sido ligado diretamente na maioria dos surtos orais e apresenta características antioxidantes, avaliando a resposta imune e as lesões frente a infecção por via oral possibilitaria a compreensão de como o meio no qual o parasito é inserido no organismo interfere na interação entre *Trypanosoma cruzi* e o hospedeiro vertebrado.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do inóculo em açaí por via oral na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Quantificar o açaí *in natura quanto*: composição centesimal; teor de polifenóis totais; atividade antioxidante pelos métodos do DPPH[·] e do Radical Livre ABTS^{•+}.

3.1.2 Avaliar os parâmetros da taxa de infecção, taxa de sobrevivência e curva de parasitemia;

3.1.3 Quantificar a carga parasitária no coração, na bochecha e no estômago nos dias 2, 5, 7 e 14 após a infecção;

3.1.4 Quantificar o processo inflamatório no coração, na bochecha e no estômago nos dias 2, 5, 7 e 14 após infecção;

3.1.5 Quantificar o estresse oxidativo no coração aos 5, 7 e 14 dias após infecção;

3.1.6 Quantificar citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras na bochecha e no estômago nos 2, 5, 7 e 14 dias após a infecção;

3.1.7 Analisar o proteoma do estômago no dia 5 após a infecção.

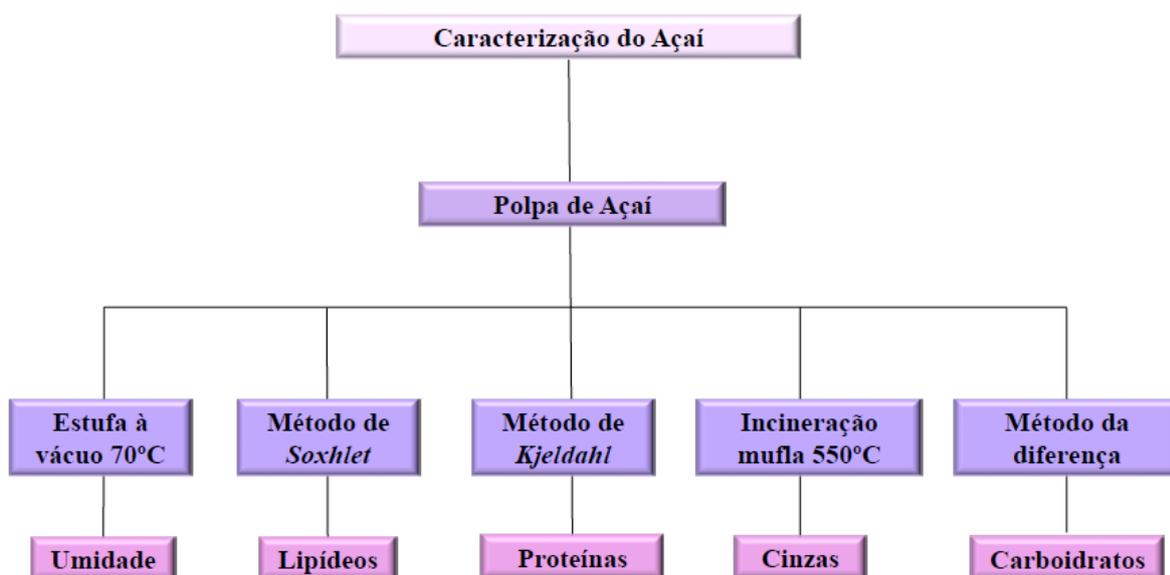
4. METODOLOGIA

4.1 Açaí

Para o presente estudo foram utilizadas frutas frescas de açaí adquiridas em novembro de 2020 no mercado Ver-o-Peso na cidade de Belém, Pará, Brasil. Estas, foram transportadas congeladas para Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. No dia da extração da polpa, as frutas congeladas foram submetidas ao processo de branqueamento: primeiramente foram lavadas com água corrente para eliminação de resíduos. Posteriormente, as frutas foram colocadas em água fervente por 10 segundos e logo em seguida, foram colocadas em uma solução de água gelada com hipoclorito por 20 minutos. Após esse tempo, as frutas foram lavadas em água corrente. Para obtenção da polpa, as frutas foram passadas em uma peneira. A polpa foi armazenada em freezer -20 °C até a realização dos experimentos.

4.1.2 Análise da composição centesimal do açaí

A determinação da composição centesimal do açaí foi realizada em colaboração com o Laboratório Multiusuário de Análise de Alimentos na Escola de Nutrição (ENUT) na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).



Fluxograma 1. Caracterização do açaí.

Inicialmente 12 placas de *Petri* com tampa, foram lavadas e colocadas para secagem em estufa convencional a 105 °C por uma hora. Em seguida, as placas foram colocadas para secagem em um dessecador de amostras por 30 minutos. Com auxílio de uma balança analítica, as placas vazias foram pesadas e as massas registradas como massa inicial (MI). Para determinação da umidade, lipídeos e teor de cinzas, massas de açaí de aproximadamente cinco gramas foram pesadas nas placas de *Petri* e registradas como Massa da Amostra (MA).

4.1.2.1 Determinação da umidade

Para determinar o teor de umidade presente no açaí *in natura*, utilizou-se a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Segundo esta metodologia, a umidade ou teor de água total presente em um alimento é obtida através da perda de massa da amostra a partir do seu aquecimento com monitoramento do tempo e da temperatura. No presente trabalho para determinação da umidade do açaí utilizou-se o método de secagem direta em uma estufa a vácuo com temperatura a 70 °C. Massas de açaí de aproximadamente cinco gramas foram pesadas em placas de *Petri* e colocadas na estufa a vácuo a 70 °C por uma hora. Após esse tempo as placas foram colocadas para resfriar em um dessecador por 30 minutos, e em seguida foi feita a pesagem das placas com as amostras. Esse procedimento foi repetido até que se atingisse massa constante nas amostras – Massa Final (MF) (nesse experimento o peso constante foi obtido após a oitava pesagem).

O percentual de umidade foi obtido através do seguinte cálculo:

$$\text{Sólidos totais (ST)} = \frac{\sum MF - \sum MI}{\sum MA} \times 100$$

$$\% \text{ umidade} = 100 - \text{ST}$$

Onde:

$\sum MF$: Somatório das Massas Finais (Placas de *Petri* + amostras)

$\sum MI$: Somatório das Massas Iniciais (Placas de *Petri* vazias)

$\sum MA$: Somatório das massas das amostras

4.1.2.2 Determinação lipídeos totais

Para determinação de lipídeos totais utilizou-se o método de *Soxhlet*, que consiste na extração do lipídeo de uma determinada amostra por um solvente orgânico e posterior evaporação deste solvente (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

Balões de vidro do tipo *Reboiler*, foram previamente lavados e colocados para secagem em estufa convencional a 105 °C por uma hora. Em seguida, foram colocados em um dessecador de amostras por 30 minutos. Após esse tempo, esses balões foram pesados com auxílio de uma balança analítica e as massas foram registradas (MI). Todo o procedimento foi realizado em quadruplicata. Dentro de cada balão foi adicionado cartuchos de celulose contendo massas de extrato seco de açaí de aproximadamente dois gramas (MA), previamente secas em estufa à 70 °C para eliminação da umidade. Em seguida, os balões de vidro contendo os cartuchos de celulose com as amostras foram acoplados ao aparelho de *Soxhlet* e foi adicionado éter de petróleo para iniciar a extração. Esse solvente ao ser aquecido passa pelo cartucho extraíndo os lipídeos da amostra, que são recolhidos no *Reboiler*. Ao final da extração, os balões de vidros foram levados para estufa de secagem a 105° C para eliminação residual do solvente. Em seguida, foram colocados em um dessecador de amostras para resfriarem por 30 minutos. Após esse tempo, os balões com os lipídeos extraídos foram pesados em balança analítica e as massas foram registradas (MF).

O percentual de lipídeos na amostra de açaí foi obtido por meio do seguinte cálculo:

$$\text{Lipídeos (g)} = \left(\frac{\sum MF - \sum MI}{\sum MA} \times 100 \right) \times ST / 100$$

Onde:

$\sum MF$: Somatório das massas finais (Balões de vidro + amostras)

$\sum MI$: Somatório massas iniciais (Balões de vidro vazios)

$\sum MA$: Somatório das massas das amostras

ST: sólidos totais

4.1.2.3 Determinação das cinzas

Para determinação das cinzas utilizou-se o método de incineração em forno do tipo mufla à temperatura de 550 °C (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Esse método determina o teor total de minerais presentes em determinado alimento. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Vasos de argila refratária, popularmente conhecidos como *cadinhos*, foram previamente lavados e colocados para secagem em estufa convencional a 105 °C por uma hora. Em seguida, foram calcinados em forno do tipo mufla a temperatura de 550 °C por uma hora. Posteriormente, foram colocados em um dessecador de amostras por 30 minutos. Após esse tempo, os *cadinhos* foram pesados com auxílio de uma balança analítica e as massas foram registradas (MIc). Aos *cadinhos* foram adicionados aproximadamente dois gramas de extrato seco de açaí. As amostras foram levadas à mufla à 550 °C até completa incineração (detectável pela mudança de coloração da amostra). Os *cadinhos* contendo as amostras foram resfriados em dessecador por 30 minutos, e em seguida, as massas foram registradas.

O teor de cinzas na amostra de açaí foi obtido por meio do seguinte cálculo:

$$\text{Cinzas (g)} = \frac{\Sigma MF - \Sigma MI}{\Sigma MA} \times 100$$

Onde:

ΣMF = Somatória da massa final do *cadinho* + amostra

ΣMIc = Somatória da massa inicial do *cadinho* vazio

ΣMA = Somatória da massa da amostra

4.1.2.4 Determinação das proteínas

Para determinar o teor de proteínas na amostra de açaí *in natura* utilizou-se o método de *Kjeldahl* (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Este método é dividido em três etapas:

- 1) digestão; 2) destilação; 3) titulação.

Digestão

Nesta etapa todo o nitrogênio presente na amostra é transformado em amônia. Resumidamente, tubos de digestão foram previamente lavados e colocados para secagem em estufa convencional a 105 °C por uma hora. Após esse tempo foram resfriados em um dessecador de amostras por 30 minutos e pesados com auxílio de uma balança analítica. As massas de cada tubo foram registradas. Em seguida foram adicionadas amostras de açaí em cada tubo com as massas de aproximadamente 0,4 gramas. Dentro de uma capela de exaustão foi adicionada em cada tubo uma mistura catalítica composta por sulfato de sódio (Na₂SO₄) e sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄·5H₂O). Posteriormente, os tubos de digestão foram levados para um bloco digestor onde a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 350 °C. O processo da digestão é finalizado quando todas as amostras ficam com aspecto límpido. Este procedimento foi realizado em quadruplicata, além de um tubo de digestão ter sido utilizado como “branco”.

Destilação

Nesta etapa, os tubos de digestão foram acoplados em um destilador de nitrogênio (TECNAL, TE – 0363) onde foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) a 50% no copo dosador. O NaOH é responsável por liberar a amônia do sulfato de amônia presente no tubo de digestão que é depositada em um *erlenmeyer* contendo 50 mL de ácido bórico (H₃BO₃) e 5 gotas de indicador misto de *Tashiro*.

Titulação

A titulação do conteúdo do *erlenmeyer* foi realizada com uma microbureta de 5 mL contendo ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L; Fc = 0,9165 até o ponto de viragem (mudança de cor da solução titulada de verde para roxo).

O cálculo para obtenção do teor de proteína foi feito pela fórmula:

$$\text{Proteína} = \frac{V_{HCl} \times PF \times 0,14 \times 0,9165}{MA}$$

Onde:

VHCl= Volume gasto de HCl na itulação;

FP= Fator Proteico

MA = Massa de açáí pesada

4.1.2.5 Determinação de carboidratos

O teor de carboidratos presente na amostra de açáí *in natura* foi determinado utilizando-se o método da diferença, sendo calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas (Instituto Adolfo Lutz, 2008). O resultado encontrado para a quantificação de carboidrato se encontra no cálculo abaixo:

$$CHO = 100\% - \sum AB$$

Onde:

CHO: Carboidrato

AB: umidade, cinzas, lipídeos e proteínas.

4.1.3 Análise da atividade antioxidante do açáí

4.1.3.1 Obtenção do extrato hidroalcóolico do açáí

Para a obtenção do extrato foi utilizado a metodologia proposta por Larrauri e colaboradores (1997), com algumas adaptações (Larrauri, Rupérez and Saura-Calixto, 1997).

Em um tubo de 15 mL do tipo *Falcon*, foi pesada uma massa de açáí de aproximadamente cinco gramas em balança analítica. Em seguida foi adicionada 4 mL de uma mistura de metanol e água destilada (50:50, v/v). Essa mistura foi envolta em papel alumínio e deixada em repouso em temperatura ambiente por uma hora. Após este tempo, o tubo *Falcon* foi submetido a centrifugação durante 15 minutos, a 4000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, que foi tampado e deixado em repouso ao abrigo da luz. Ao precipitado foi adicionada uma mistura de 4 mL de acetona e água destilada (70:30, v/v), e a solução foi novamente deixada em repouso ao abrigo da luz por uma hora. Após esse período o tubo *Falcon* foi novamente submetido à centrifugação, nos mesmos parâmetros citados anteriormente. O sobrenadante obtido foi adicionado no mesmo balão volumétrico e o

seu volume foi completado com água destilada. O extrato hidroalcolico obtido foi armazenado em microtubos âmbar e mantidos em freezer -20 °C até o momento das análises.

4.1.3.2 Quantificação de polifenóis totais

Os polifenóis totais presentes no extrato hidroalcolico do açaí foram quantificados utilizando a metodologia do *Folin-Ciocalteu* (Georgé *et al.*, 2005). Nesta metodologia, o reagente *Folin-Ciocalteu* que é composto pelos ácidos fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e possui coloração verde, se torna azul ao oxidar os compostos fenólicos presentes no extrato do açaí pela redução dos seus ácidos em óxidos de tungstico (W_8O_{23}) e molibdênio (Mo_8O_{23}).

Preparo das soluções

A solução mãe de ácido gálico foi obtida através da dissolução de 20 mg de ácido gálico em água destilada. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. A partir desta solução mãe, foi criada uma curva padrão com diferentes concentrações da solução de ácido gálico (2,5 mg/L, 5,0mg/L, 10 mg/L, 15,0 mg/L, 25,0 mg/L, 50,0 mg/L, 75,0 mg/L e 100,0 mg/L).

Uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi preparada pela diluição de 3,76 g de Na_2CO_3 em água destilada. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada.

A solução de *Folin-Ciocalteu* foi preparada no momento da análise, em um tubo de vidro, observando-se a proporção de 1:9 (*Folin-Ciocalteu*: Água destilada).

Dosagem da curva

De forma sucinta: 100 microlitros de cada diluição da curva padrão foi transferida para um microtubo do tipo âmbar, seguida da adição de 600 microlitros da solução de *Folin-Ciocalteu* e deixado em repouso por 3 minutos. Após este período, foi adicionado sob homogeneização 500 microlitros da solução de Na_2CO_3 . O microtubo foi mantido em repouso em temperatura ambiente por 1 hora ao abrigo da luz. Após o período de incubação, 100

microlitros de cada diluição foram adicionados em placa de 96 poços e a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm.

Dosagem da amostra

O extrato hidroalcolico de açaí obtido previamente foi diluído em 3 concentrações distintas (10x; 15x e 20x), sendo cada diluição feita em quadruplicata. Para a análise, 100 microlitros da amostra foram adicionados em microtubos âmbar seguido da adição de 500 microlitros da solução de *Folin-Ciocalteu*). Após 3 minutos de repouso, foi adicionado sob homogeneização 400 microlitros da solução de Na_2CO_3 , seguido de repouso em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este tempo, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm.

Cálculo dos resultados

Foi construído um gráfico com os valores de absorvância e concentração da curva padrão e após uma análise de regressão linear foi obtido a equação da reta (Figura 2). O cálculo da quantidade de polifenóis totais presentes no açaí foi expresso em Equivalentes de Ácido Gálico por 100 g de amostra.

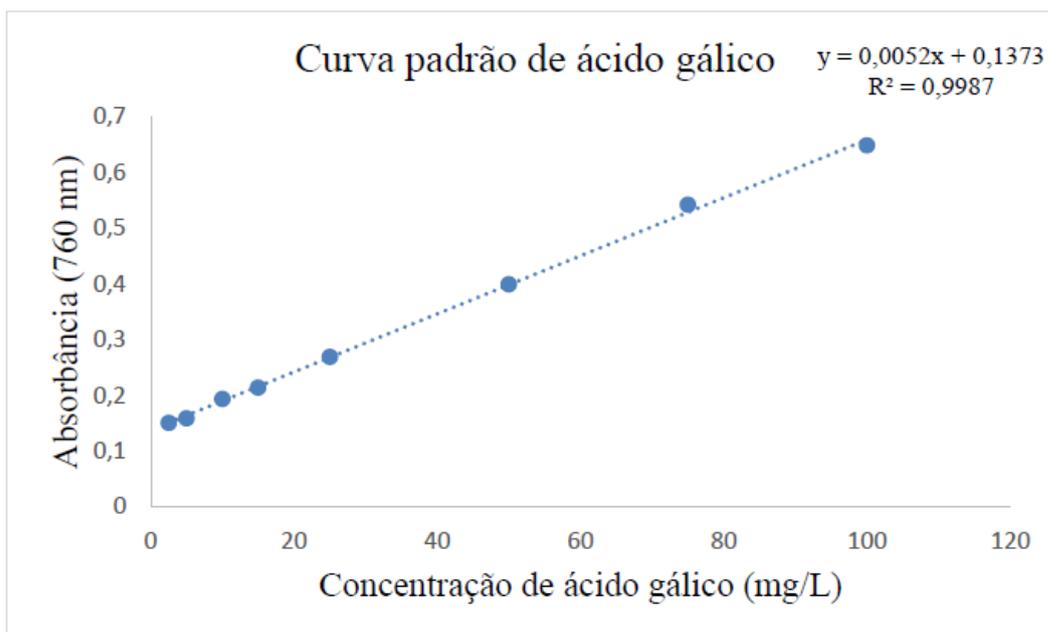


Figura 2. Curva Padrão de Ácido Gálico para o cálculo de Polifenóis Totais

4.1.3.3. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre DPPH^{*}

A determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}) utilizado foi o proposto por Sánchez e colaboradores (1998) com algumas modificações propostas pela Embrapa Agroindústria Tropical (2007). A técnica consiste no sequestro do radical livre DPPH^{*}, que possui cor púrpura, pela transferência de elétrons do antioxidante presente na amostra. Nesse processo, o DPPH^{*} é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Sua análise é feita pelo monitoramento do decréscimo da absorvância no comprimento de onda de 515 nm.(NASCIMENTO, 2011; EMBRAPA, 2018).

Preparo das soluções

A solução controle foi obtida pela adição de 4 mL da solução de álcool metílico 50%, 4 mL da solução de acetona 70% e 2 mL de água destilada em um tubo do tipo *Falcon* de 15 mL.

A solução de DPPH^{*} na concentração de 60 µM foi obtida por meio da pesagem de 0,6 mg de DPPH^{*} em um béquer que posteriormente foi diluído em álcool metílico, transferido para um balão volumétrico de volume final de 25 mL, e o volume aferido com álcool metílico. Essa solução ficou reservada ao abrigo da luz, sendo envolvida no papel alumínio.

Foram feitas 10 diferentes diluições a partir do extrato de açaí (100%) a fim de se obter concentrações iguais a 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% e 100%. Cada diluição foi feita em quadruplicata.

Procedimento de dosagem

Em microtubos do tipo âmbar foram adicionados 35 microlitros de cada diluição do extrato de açaí e 1365 microlitros da solução inicial de DPPH^{*}. Para o tubo nomeado de controle foi adicionado 35 microlitros de solução controle e 1365 microlitros da solução do radical DPPH^{*}. Todos os microtubos foram homogeneizados no vórtex. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. A leitura foi realizada no tempo zero e a cada 30 minutos, até o tempo final de 120 minutos. O equipamento foi calibrado com álcool metílico.

Adicionalmente foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 515 nm de diferentes diluições (em álcool metílico) da solução inicial do DPPH[•] (1 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM e 60 μM) para a determinação da curva do DPPH[•], utilizada nos cálculos posteriores.

Cálculo dos resultados

A partir do gráfico gerado com os valores da % de Inibição x concentração (μg/mL) do extrato foi possível encontrar o valor de EC₅₀ (Figura 3), que representa a concentração de açaí necessária para inibir a solução inicial de DPPH[•] em 50%. Também foi calculado o Índice de Atividade Antioxidante (IAA), segundo (Scherer and Godoy, 2009).

$$\text{IAA} = \text{Concentração da solução de DPPH}^{\bullet} (\mu\text{g/mL}) / \text{IC } 50\% (\mu\text{g/mL})$$

Onde:

IAA < 0,5: Pobre atividade antioxidante

IAA entre 0,5 e 1: Moderada atividade antioxidante

IAA entre 1 e 2: Forte atividade antioxidante

IAA > 2: Muito forte atividade antioxidante

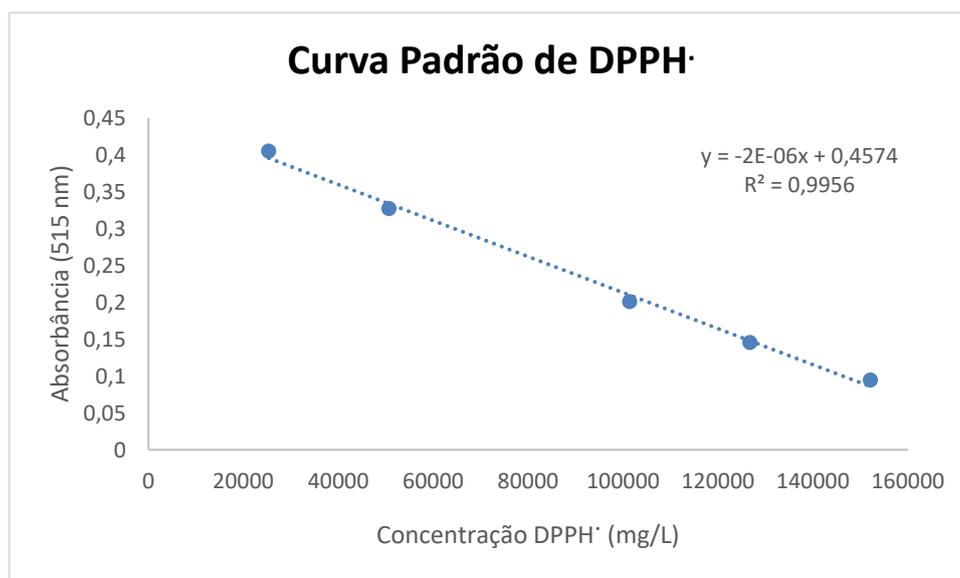


Figura 3. Curva Padrão de DPPH[•] para cálculo da atividade antioxidante do açaí pelo método DPPH[•].

4.1.3.4 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Radical Livre ABTS^{•+}

Foi utilizada a metodologia proposta por Kuskoski e colaboradores (2005) com adaptações sugeridas por (Rufino *et al.*, 2007) para a avaliação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical livre 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}). Este método permite avaliar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (TIVERON, 2010). Segundo esta metodologia, o radical ABTS^{•+}, que possui cor esverdeada, é reduzido à ABTS pelos antioxidantes presentes na amostra a ser avaliada, caracterizada pela observação do declínio da sua coloração por espectrofotometria no intervalo de comprimento de onda de 734 nm (Kuskoski *et al.*, 2005; Rufino *et al.*, 2007).

Preparo das soluções

Foi preparada uma solução de ABTS 7 mM a partir da dissolução de 38,9 mg de ABTS em água destilada. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. Também foi preparada uma solução de persulfato de potássio através da dissolução de 189,05 mg de persulfato de potássio em água destilada. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com água destilada. O radical ABTS^{•+} foi preparado através da reação de 10 mL da solução de ABTS 7 mM com 176 µL da solução de persulfato de potássio. A solução foi deixada por 16 horas em um tubo de vidro, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este período, a solução foi diluída em álcool etílico até obter valores de absorvância de 0,700 nm ($\pm 0,05$ nm) no comprimento de onda 734 nm. As concentrações utilizadas foram 25 µL de ABTS^{•+} e 175 µL de álcool etílico e a absorvância encontrada 0,746 nm.

A curva padrão foi preparada no dia da análise, sendo utilizado o antioxidante sintético Trolox na concentração de 1 mM. A solução mãe foi obtida através da diluição de 24,2 mg de Trolox em álcool etílico. A solução foi transferida para um volume de um balão volumétrico de 50 mL e volume foi completado com álcool etílico. A partir dessa solução mãe, foram realizadas diluições seriadas para se obter as seguintes concentrações do Trolox: 0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,7 mM e 0,8 mM.

Foram realizadas diferentes diluições do extrato de açaí de modo a se obter concentrações iguais a 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Todas as diluições foram feitas em quadruplicata.

Procedimento de dosagem

Em microtubos âmbar foram adicionados 10 µL de cada diluição da solução de trolox ou de cada diluição do extrato do açaí e 1,0 mL do ABTS⁺. Todos os microtubos foram homogeneizados em vórtex. Em seguida, 100 microlitros de cada diluição foram adicionados em uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm, 6 minutos após a adição dos reagentes.

Cálculo dos resultados

Através da curva padrão, foi construído um gráfico utilizando os valores de concentração (µM) x absorbância das diferentes diluições do trolox (Figura 4). Após a análise de regressão linear e a obtenção da equação da reta, foi realizado o cálculo da atividade antioxidante do açaí. O valor encontrado foi expresso em µM de Trolox por grama de açaí, mostrando a capacidade do açaí em promover o sequestro do radical ABTS⁺.

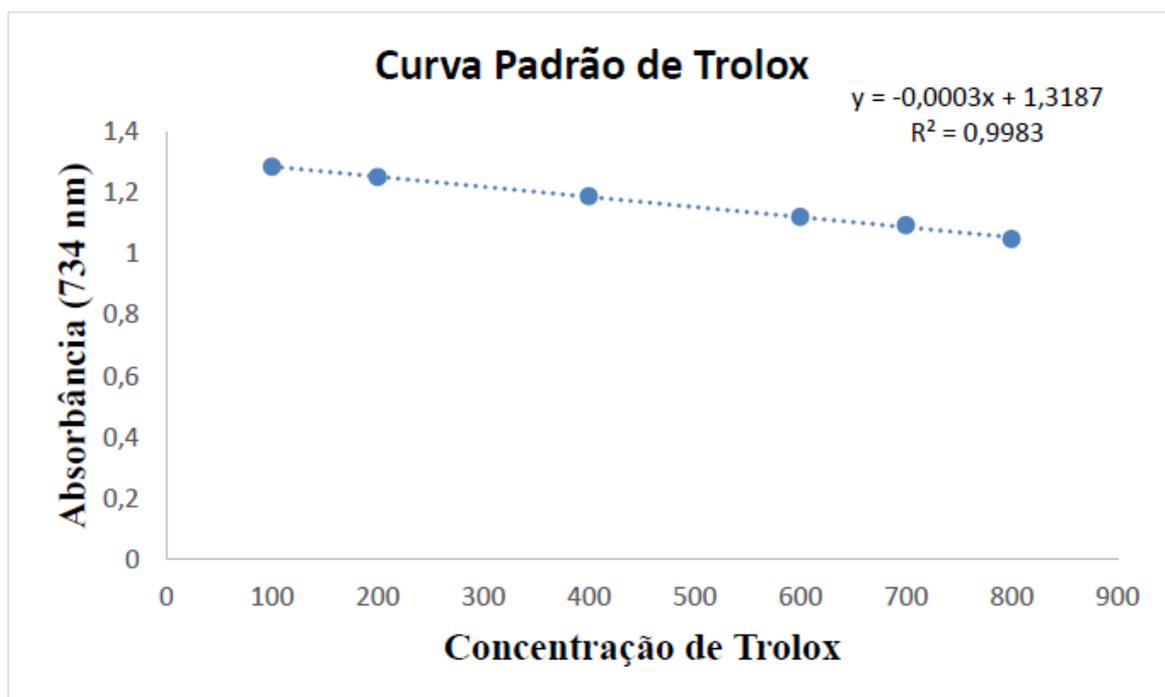
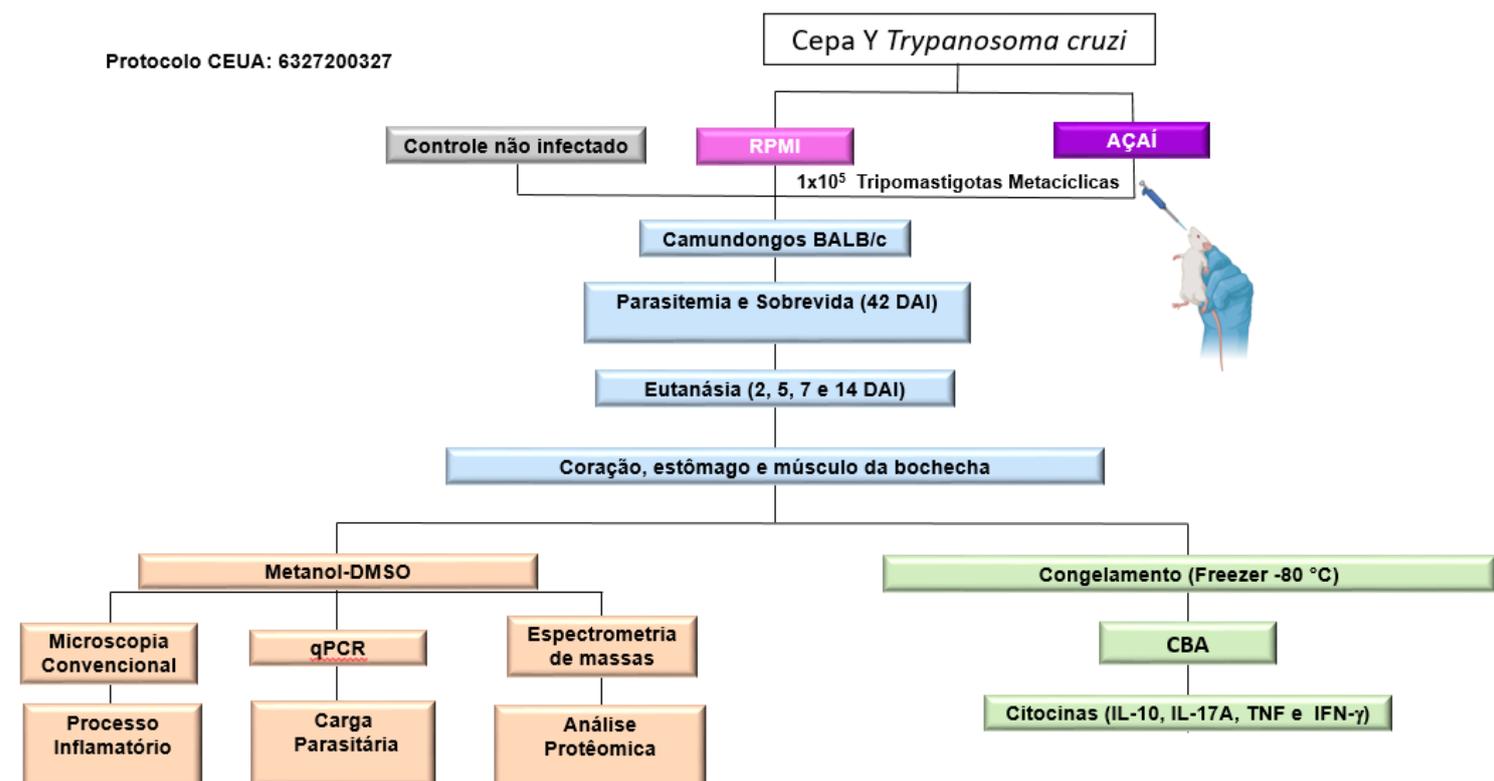


Figura 4. Curva Padrão de Trolox para cálculo da atividade antioxidante do açaí pelo método ABTS⁺.

4.2 Animais e infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados camundongos BALB/c, 30 dias de idade, machos, nascidos na Maternidade do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA–UFOP). Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em duplicata, em dois momentos distintos. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: não infectados (n=40), infectados com formas tripomastigotas metacíclicas, obtidas de cultura acelular, no grupo RPMI (n variando de 6 a 8) e infectados com formas tripomastigotas metacíclicas no Açaí (n variando de 4 a 9). O Fluxograma 2 apresenta a distribuição dos animais nos três grupos experimentais descritos acima. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 6327160320).



Fluxograma 2. Delineamento experimental *in vivo*.

4.3 Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de cultura

Um mL de sangue do plexo orbital de um camundongo sabidamente infectado com a cepa Y do *T. cruzi* foi coletado em anticoagulante. Em seguida o sangue foi transferido para um tubo do tipo *Falcon* de 15 mL, onde foram adicionados 2 mL de meio de cultura LIT 20%, sendo mantidos em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de 28 °C por 7 dias. Após esse período foi realizado o repique da cultura semanalmente, até a purificação da cultura com observação da presença de tripomastigotas metacíclicas viáveis (vivos, com morfologia e motilidade normais) em microscópio óptico na objetiva de 40x. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Após a purificação e o envelhecimento da cultura, ela foi diluída 10x em PBS estéril para contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de *Neubauer* em microscópio óptico. Em seguida o inóculo foi reajustado para 1×10^5 parasitos/mL. Posteriormente, a cultura, com quantidade de parasitos conhecida, foi centrifugada a 2200 rpm por 10 minutos à 4 °C para a obtenção de um *pellet* com as formas tripomastigotas metacíclicas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em RPMI ou Açaí para a realização da infecção dos animais pela via oral com auxílio de uma pipeta.

4.4 Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

No dia da inoculação, animais pertencentes aos grupos Açaí ou RPMI foram submetidos a um jejum de alimento e água por quatro horas antes do inóculo. Após esse período, os camundongos receberam o inóculo de 1×10^5 formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi*, pela via oral com auxílio de uma pipeta no meio RPMI ou no Açaí. O volume de inóculo foi ajustado de forma que não ultrapassasse 200 microlitros por animal.

4.5 Curvas de parasitemia

Vinte e seis camundongos dos grupos infectados foram avaliados diariamente para determinação da parasitemia a partir do 4º dia após a infecção (DAI) até não serem mais visualizados parasitos no sangue por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia adaptada de Brener (Brener, 1962). Brevemente, cinco microlitros de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada nos

animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneos por 0,1 mL de sangue e o período pré-patente, período patente, pico máximo de parasitemia e o dia do pico máximo de parasitemia foram determinados.

4.6 Taxa de sobrevivência

Os animais utilizados para a determinação da curva de parasitemia foram acompanhados diariamente até 42º DAI sendo a sobrevivência registrada e expressa em porcentagem cumulativa.

4.7 Coleta de sangue

Cem microlitros de sangue de cada animal de cada grupo foram coletados do plexo orbital aos dois, cinco, sete e 14 DAI para a realização da PCR para confirmação da infecção dos animais que não positivaram na parasitemia.

4.8 Eutanásia, coleta, fixação

Os animais foram eutanasiados nos dias dois, cinco, sete e 14 após a infecção. Foi coletado a musculatura próxima a bochecha, o coração e o estômago desses animais.

Posteriormente à coleta, metade desses órgãos foram fixados em solução de Metanol/Dimetilsulfóxido (DMSO) para análise do processo inflamatório, quantificação da carga parasitária e análise proteômica. A outra metade foi armazenada em nitrogênio líquido no momento da eutanásia e posteriormente foram transferidas para freezer -80 °C para quantificação das citocinas.

4.9 Quantificação da carga parasitária e taxa de infectividade

Os órgãos armazenados na solução de Metanol/DMSO foram processados rotineiramente para confecção de blocos de parafina e foram submetidos à microtomia para obtenção de quatro cortes com espessura de 50 micrômetros. Para desparafinação desses tecidos, esses cortes foram colocados em microtubos e posteriormente foi adicionado 1,5 mL de xilol, as amostras ficaram em repouso por 10 minutos e em seguida foram centrifugadas à 14.000 rpm durante 3 minutos. O xilol foi descartado e o procedimento foi repetido. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de álcool absoluto e os microtubos foram centrifugados à 14.000

rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado. Para a evaporação residual do álcool, as amostras foram secas no concentrador de amostras à 1300 rotações, durante 10 minutos e à 37 °C com os microtubos de tampa aberta. Em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA utilizando o kit *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Aos microtubos contendo os tecidos desparafinados foram adicionados 500 µL de solução de lise nuclear e estes foram mantidos a -20 °C por 2 minutos. Em seguida, foi feita homogeneização por inversão dos microtubos, seguido da adição de 20 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20 mg/mL. Os microtubos foram mantidos *overnight* em banho seco a 55 °C. Após este período, foram adicionados 3 µL de RNase e as amostras foram incubadas por 30 minutos em banho seco a 37 °C. Após o tempo de incubação, os microtubos foram resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g (Microcentrífuga Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Esse microtubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µL de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha). Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação a 16.000 g, e o sobrenadante foi novamente descartado. Os microtubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% residual e em seguida foram adicionados 100 µL de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24 h à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). Após a dosagem as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise por qPCR.

4.10 Quantificação do processo inflamatório

Os mesmos blocos de parafina descritos no item 4.9 foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de quatro micrômetros. Foram confeccionadas lâminas dos blocos parafinados do cor da musculatura próxima a bochecha e do estômago para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise do processo inflamatório. Para avaliação do infiltrado inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 25 imagens (coração e musculatura próxima a bochecha) e 30 imagens

(estômago) aleatórias com áreas totais percorridas iguais a 887.342,5 e 1.064.811 μm^2 , respectivamente.

4.11 Quantificação do estresse oxidativo

4.11.1 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi medida no tecido cardíaco de acordo com o metodologia descrita por Marklund e colaboradores (1974) (Marklund and Marklund, 1974). Esta metodologia baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol. Dessa forma, a concentração de SOD na amostra é inversamente proporcional a auto oxidação do pirogalol. Para reação foram utilizados os seguintes reagentes: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol, MTT e DMSO. Para dosagem, fragmentos do tecido cardíaco foram previamente homogeneizados com tampão fosfato. Em seguida, as amostras foram adicionadas à uma placa de Elisa. A placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Logo após 150 μL de DMSO foram adicionados para interromper a reação. Posteriormente, a placa foi lida em espectrofotômetro de placas à 570 nm. Após a leitura da placa, o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi representado em U/mg de proteína.

4.11.2 Determinação da atividade da Catalase

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a uma absorbância de 240 nm. Esse método baseia-se na decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase durante o tempo de um minuto (Aebi, 1984). A reação foi quantificada por espectrofotometria a 240 nm. Resumidamente, 100 mg do tecido cardíaco foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio(KH_2PO_4), 0,1 M (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 xg por 10 minutos à 4 °C. Para reação utilizou-se o sobrenadante e os seguintes reagentes: tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliquotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 μL e 30 μL ,

respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm, de acordo com a Lei de *Lambert Beer*, onde 1 U equivale a 1 μmol de hidrólise de H_2O_2 por minuto, por mL. O resultado foi expresso em U/mg de proteína.

4.11.3 Determinação da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método descrito por Buege e colaboradores (1978) (Buege, 1978). A determinação da concentração de TBARS baseia-se na capacidade do ácido tiobarbitúrico (ATB) em se ligar a lipídios oxidados. Resumidamente, 200 μL do tecido cardíaco foram homogeneizados com 1 mL de tampão por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e usado como amostra biológica. Quinhentos microlitros do sobrenadante do homogeneizado foram misturados com ácido tricloroacético (ATC) (28% p/v em HCL 0,25N) e ATB (1% em ácido) e colocados em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), seguindo a lei de *Lambert Beer*. Os resultados foram expressos em U/mL/mg de proteína (Soares *et al.*, 2016).

4.12 Dosagem de citocinas por CBA (Cytometric Bead Array)

A quantificação dos níveis de citocinas foi realizada pela técnica de Cytometric Bead Array (BD Biosciences) utilizando o *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit* que permite a quantificação das proteínas interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 17A (IL-17A).

Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de bochecha e estômago previamente coletados no momento da necropsia foram armazenados em freezer -80 °C. Esses fragmentos foram pesados a fim de se obter fragmentos com massa de aproximadamente 30 mg. Esses fragmentos foram macerados utilizando um homogeneizador de tecidos *Tissuelyser* (Quiagen) em 500 mL de um coquetel inibidor de

protease (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) em meio RPMI. Os homogenatos foram centrifugados a 14000 rpm durante 10 min a 4° C e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C. No dia da análise, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e, em seguida, centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4° C para a coleta do sobrenadante. O padrão (TS) foi reconstituído em 600 µL de Reagente G uma solução tampão usada como diluente, nas seguintes diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Foi preparada uma mistura de *Beads* (A1-A7), contendo 3µL de cada suspensão de *Beads*, a fim de se atingir um volume final de 21 µL para cada amostra. As *Beads* foram adicionadas a 25 µL dos padrões, em suas respectivas diluições, tal como a 25 µL de cada amostra em seu respectivo tubo. Foram adicionados a todos os tubos 18 µL do Reagente B, um reagente de detecção marcado com ficoeritrina (PE) e incubados por um período de 2 horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Terminado o período de incubação, foram adicionados 500 µL do Reagente F, uma solução tamponada de lavagem, em cada tubo e centrifugados a 1300 rpm por 7 min a 18 °C. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de bomba de vácuo, deixando cerca de 100 µL do sobrenadante em cada tubo. Foi realizada uma nova adição de 100 µL de Reagente F e em seguida foi realizada a leitura. Para aquisição e armazenamento dos dados foi empregado o citômetro de fluxo (FACSCALIBUR - BD Biosciences). As curvas padrão para cada citocina foram traçadas e as concentrações de cada amostra de teste em picogramas por mililitro (pg/mL) foram calculadas usando a matriz de *software* FCAP v.3(BD Biosciences).

4.13 Análise Proteômica Baseada em Espectrometria de Massas

A análise proteômica em larga escala foi realizada em cortes histológicos de estômago de animais controles e animais infectados e eutanasiados cinco dias após a infecção, em triplicata. Na Figura 5 encontram-se representados os blocos de parafina utilizados para obtenção dos cortes bem como o aspecto histológico dos tecidos.

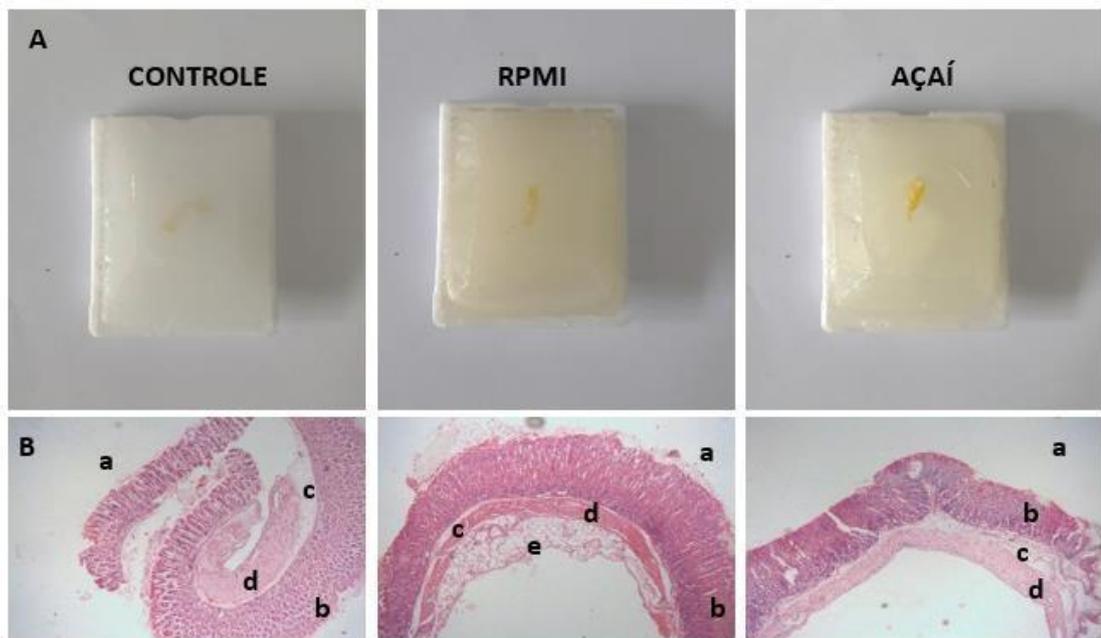


Figura 5. A) Blocos de parafina utilizados para confecção de lâminas com cortes de tecido com espessura de 10 μm para análise proteômica. B) Aspecto histológico dos tecidos obtidos em microscopia ótica, aumento de 5x (a. lúmen; b. mucosa; c. submucosa; d. muscular; e. serosa) coloração hematoxilina-eosina.

4.13.1 Digestão enzimática em solução

Os mesmos blocos de parafina descritos no item 4.9 foram submetidos novamente à microtomia para obtenção de três cortes com espessura de 10 micrômetros. Em seguida foi realizada a desparafinação desses tecidos: primeiramente as lâminas foram colocadas em estufa à 60 °C por 10 minutos, seguido de dois banhos em xilol por 10 e 5 minutos, respectivamente. Posteriormente realizou-se a hidratação dos cortes em soluções com graduações decrescentes de etanol conforme descrito por Coscia e colaboradores (2020) (Coscia *et al.*, 2020). Os cortes hidratados foram transferidos com auxílio de uma lâmina de bisturi para um microtubo *DNase/RNase free*, contendo uma solução de lise para extração e digestão direta das proteínas em solução.

Para a digestão trípica das proteínas, foram utilizadas triplicatas de amostras de estômago dos animais controles e infectados no tempo de 5 dias após a infecção. Primeiramente, 30 μg de proteínas foram diluídas em 160 μL de Bicarbonato de Amônio 25 mM. Em seguida, adicionou-se 10 μL de RapiGest™ 1% (p/v) (Waters) às amostras, e estas

foram incubadas a 80 °C, em termobloco (BIO-PLUS IT-2002 Incubator), durante 10 minutos. Após cinco minutos, as amostras foram homogeneizadas em vórtex. Em seguida, as amostras foram incubadas em DTT 9,2 mg/mL (Sigma Aldrich) a 60 °C por 10 minutos. Após este período de incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e em seguida, submetidas a alquilação com Iodoacetoamida 33 mg/mL (Sigma Aldrich), sendo essa etapa realizada ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a alquilação dos resíduos de cisteína, adicionou-se a enzima Tripsina (*Sequencing grade modified trypsin*; Promega, Madison, EUA) às amostras, na proporção de 50:1 (proteína: tripsina), incubando-as a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, foi realizada a inativação do RapiGest™ adicionando Ácido Trifluoroacético (Sigma Aldrich) a 1%. A confirmação da acidificação ($\text{pH} \leq 2$) foi feita em fitas indicadoras (pH-Fix, Macherey-Nagel). Em seguida, as amostras foram incubadas novamente à 37 °C em termobloco por 30 minutos. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 20.000 x g, por 15 minutos, a 7 °C (Hettich Zentrifugen Mikro 200R). Os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para os *vials* utilizados na plataforma de UHPLC.

4.13.2 Aquisição dos Dados Espectrais em Plataforma UHPLC-MS/MS

Após a digestão enzimática, injetou-se cerca de 500 ng de peptídeos na plataforma UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Inicialmente, os peptídeos foram direcionados à coluna Acclaim PepMap100 C18 Nano-Trap Column (100 µm i.d. × 2 cm, 5 µm, 100 Å; Thermo Scientific). Os peptídeos retidos foram lavados durante 3 minutos em 2% MeCN/0,05% TFA, em um fluxo de 7 µL/min, antes de serem submetidos à separação em nano cromatografia líquida de fase reversa. Essa separação ocorreu na coluna Acclaim PepMap100 C18 RSLC (75 µm i.d. × 15 cm, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific), em gradiente de acetonitrila a partir da combinação das fases A (0,1% ácido fórmico) e B (80% MeCN/0,1% ácido fórmico), sob fluxo de 300 nL/min, como a seguir: 3,8% de B durante 3 minutos, para equilibrar a coluna; em seguida, 3,8% - 30% de B até completar 120 min, subindo até 55% de B em 30 min; regeneração da coluna com 99% de B por 12 min e condicionamento do sistema com 3,8% de B durante 15 min. Ambas colunas foram mantidas à 40 °C durante o processo.

Os peptídeos eluídos, foram então direcionados ao espectrômetro de massas Q Exactive (Thermo Scientific) e com a fonte de ionização electrospray *Nanospray Flex Ion Source* (Thermo Scientific), operada a 3,8 kV, com o sistema parametrizado em modo positivo. A

temperatura do capilar de entrada foi mantida a 250 °C e o nível RF das *S-lens* em 55. A aquisição dependente de dados (DDA) foi realizada em Top12. Os espectros de íons precursores (MS) foram adquiridos em janela de 300 - 2.000 *m/z*, com resolução de 70.000 e tempo máximo de injeção de 120 ms para 1e6 íons. Até 12 íons por cada espectro MS, foram selecionados em ordem decrescente de abundância e isolados numa janela de 1,2 *m/z* para dissociação por HCD (*high energy collision dissociation*), desde que exibissem carga $\geq +2$ até $\leq +4$ e contagem de 5e5 íons em até 60 ms de injeção (*threshold* 6.25e3). A ativação dos íons precursores se deu na célula de colisão com gás nitrogênio, com energia de colisão normalizada em 28-30V. Espectros de íons produtos (MS/MS) foram adquiridos com resolução de 17.500. Um tempo de exclusão dinâmica de 40 segundos foi ativado, reduzindo a análise repetitiva por MS/MS de íons precursores previamente selecionados.

4.13.3 Busca de Identidades e Quantificação de Proteínas

Os dados espectrais foram submetidos à busca de identidades e à quantificação por meio do programa *PEAKS Studio* v8.5 (Bioinformatics Solutions Inc.). Os parâmetros de busca utilizados foram: enzima tripsina; no máximo 2 sítios de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas (+57,02 Da); oxidação de metioninas (+15,99 Da); tolerância de até 10 ppm para íons precursores (MS) e de 0,1 Da para erro de massa dos fragmentos gerados (MS/MS). Utilizou-se o banco de dados de proteínas referente à *Mus musculus* disponível na plataforma UNIPROT (Uniprot, 2016), contendo 54.188 sequências.

Os resultados obtidos foram filtrados com um *False Discovery Rate* (FDR) de 1%, considerando as proteínas identificadas com ao menos um peptídeo único. Para identificação de proteínas diferencialmente expressas, a análise quantitativa livre de marcadores (*Label-free*) foi realizada, a partir dos valores de área sobre a curva (AUC) dos peptídeos identificados nas respectivas proteínas. A área foi determinada através da médiade até três dos peptídeos únicos mais abundantes identificados em cada proteína, sendo utilizada como indicativo da abundância dessa última na amostra. Os resultados quantitativos foram filtrados para proteínas com significância ≥ 20 e *Fold Change* ≥ 2 , utilizando parâmetros do módulo estatístico PEAKS Q.

4.14 Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar os padrões de normalidade. Quando os dados foram paramétricos para comparação entre os grupos foram realizadas análises Teste T *Student* (quando era apenas entre os grupos infectados) ou de variância (ANOVA *one-way*), quando as alterações foram significativas, o teste de Bonferoni foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. Para os dados classificados como não-paramétricos foi realizada a análise de *Mann-Whitney* (quando era apenas entre os grupos infectados) ou de *Kruskal-Wallis* seguida pelo teste de Dunns. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Composição centesimal do açaí

Na tabela 1 encontram-se os valores obtidos na caracterização centesimal da polpa do açaí.

Tabela 1. Composição centesimal da polpa do açaí *in natura*.

Composição	100g de polpa	100 g de matéria seca	Desvio padrão
pH	4,8	-	-
Umidade	88,33	-	1,15
Carboidratos	4,66	39,93	0,93
Lipídeos	4,57	39,16	0,20
Proteínas	1,96	16,79	0,13
Cinzas	0,48	4,12	0,02

Valores representados como média \pm desvio padrão.

O percentual de umidade da polpa do açaí foi igual a 88,33% ($\pm 1,15$), dessa forma o valor de sólidos totais obtidos (matéria seca) foi igual a 11,67%. A composição centesimal dos macronutrientes carboidratos, lipídeos e proteínas na matéria seca do açaí foi igual a 39,93%, 39,16% e 16,79%, respectivamente. O percentual de cinzas encontrado na matéria seca foi igual a 4,12.

5.2 Quantificação de Polifenóis Totais e determinação da capacidade antioxidante do açaí

Os resultados obtidos para quantificação de polifenóis totais e a determinação da capacidade antioxidante do açaí estão resumidos na tabela 2. O valor de polifenóis encontrado foi de $198,77 \pm 1,63$ mg GAE em cada 100 g de açaí.

A determinação da capacidade antioxidante pela metodologia do DPPH[•] foi estabelecida por meio de dois parâmetros, EC₅₀ e IAA. O valor de EC₅₀ que representa a quantidade em

gramas de açaí necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH* encontrado foi igual a 46360,33 g \pm 76,57 de fruta para um grama de DPPH*. Já o Índice de Atividade Antioxidante calculado foi igual a 0,00018.

Por outro lado, a determinação da capacidade antioxidante pela metodologia ABTS que representa quanto 1 grama de açaí é capaz de inibir o radical livre ABTS⁺ comparado ao antioxidante Trolox apresentou resultado igual a 6,74 \pm 0,27.

Tabela 2. Polifenóis e capacidade antioxidante em extrato hidroalcolólico do açaí.

Polifenóis Totais (mg EAG /100 g de açaí)	DPPH (g de fruta/g de DPPH)	IAA	ABTS (μ mol Trolox/g)
198,77 \pm 1,63	46360,33 \pm 76,57	0,00018 \pm 0,000005	6,74 \pm 0,27

*Resultados expressos como média \pm desvio padrão. IAA- Índice de Atividade Antioxidante

5.3 Taxa de infectividade

A taxa de infectividade (Tabela 3) foi determinada a partir da quantificação da carga parasitária no estômago de camundongos BALB/c infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi*, uma vez que este órgão apresentou maiores índices de positividade do que a quantificação da carga no sangue desses animais (dados não apresentados).

Tabela 3. Taxa de infectividade

Dias após a infecção	RPMI	Total de animais positivos	Açaí	Total de animais positivos
2 DAI	6/13	46,15%	9/13	69,23%
5 DAI	8/13	61,53%	7/13	53,84%
7 DAI	8/13	61,53%	6/13	46,15%
14 DAI	7/13	53,84%	4/13	30,77%
Infectividade total	29/52	55,76%	2652	50,00%

5.4 Taxa de sobrevivida

Em relação a taxa de sobrevivida, nos animais infectados com *T. cruzi* em meio RPMI a taxa de sobrevivida foi de 83% enquanto nos animais infectados em Açai foi de 98%, ao longo dos 42 dias de infecção (Figura 6).

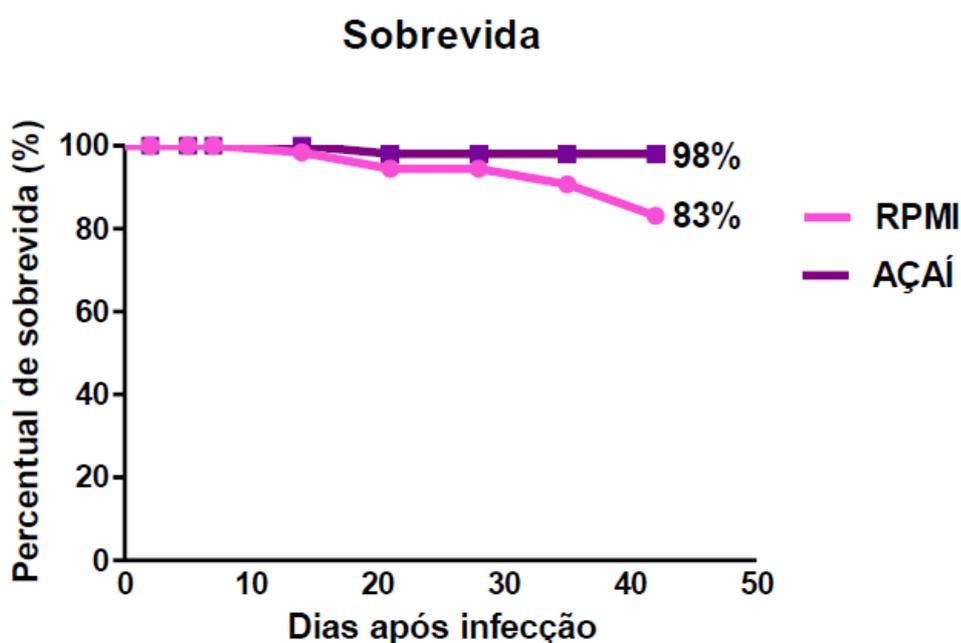


Figura 6. Taxa de sobrevivida de camundongos BALB/c infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI (—) ou em Açai (—). Cada curva representa a média de 26 animais de cada grupo infectado durante 42 dias após a infecção.

5.5 Curva de parasitemia

Na Figura 7 observam-se as curvas de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos RPMI e Açai. Nos animais infectados pela via oral com o meio RPMI o período pré-patente foi de 4 dias e patente de 26 dias, com pico de parasitemia no 12º DAI (13.108 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Já o grupo Açai apresentou período pré-patente de 11 dias, patente de 29 dias e pico de parasitemia no 16º DAI (11.475 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Os valores parasitêmicos obtidos a partir da Figura 7 encontram-se resumidos na Tabela 4.

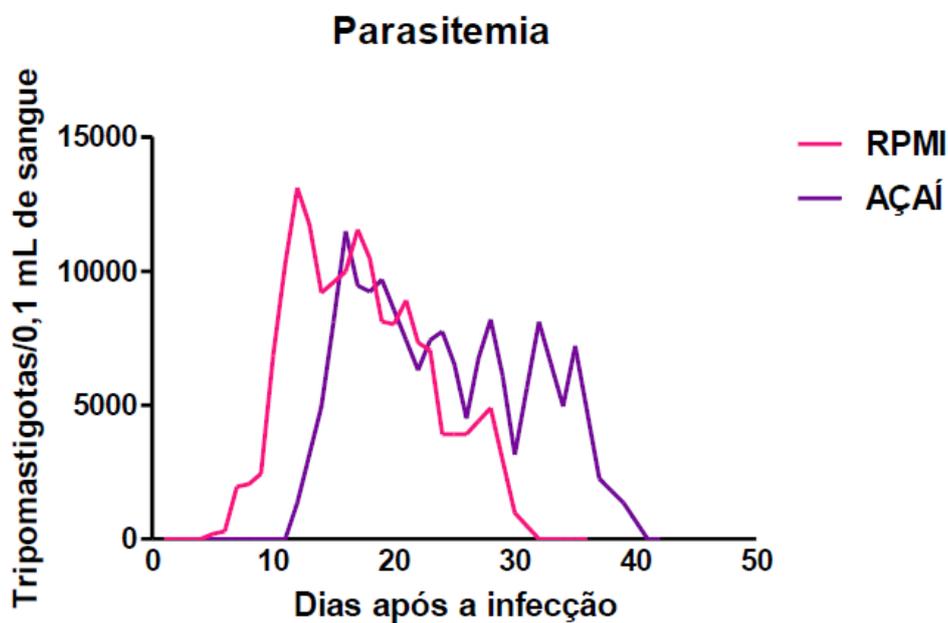


Figura 7. Curva de parasitemia média de camundongos BALB/c infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI (—) ou Açai (—). Cada curva representa a média de 26 animais de cada grupo infectado durante 42 dias após a infecção.

Tabela 4. Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* no meio RPMI ou Açai.

Grupos	PPP	PP	PMP	DPMP
RPMI	4	26	13.108	12
Açai	11	29	11.475	16

PPP: período pré-patente; PP: período patente; PMP: valor de tripomastigotas no pico máximo de parasitemia (tripomastigotas / 0.1 mL de sangue); DPMP: dia do pico máximo de parasitemia.

5.6 Carga parasitária

Para avaliar o impacto dos diferentes inóculos, RPMI e Açai, pelas formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi*, no parasitismo tecidual, foi feita a quantificação da carga parasitária por qPCR na bochecha, no estômago e no coração de camundongos BALB/c. Os resultados estão representados na Figura 8.

Foi observado maior parasitismo tecidual no músculo próximo a bochecha dos animais infectados com o meio RPMI em relação ao meio Açai no 14° DAI (Figura 8 A). Já a quantificação da carga parasitária no estômago foi maior no grupo RPMI no 5° DAI em relação ao grupo Açai (Figura 8 B).

Dados do coração mostraram maior parasitismo tecidual nos animais infectados com o meio Açai em relação ao meio RPMI no 7° DAI. Além disso, o parasitismo tecidual no grupo de animais infectados com o meio Açai no 7° DAI foi maior que o dos animais infectados com o mesmo meio no 5° DAI (Figura 8 C).

Por outro lado, a quantificação da carga parasitária no coração foi significativamente maior no grupo de animais infectados com o meio RPMI no 14° DAI em comparação com o grupo de animais infectados com o meio Açai nesse mesmo tempo de avaliação. Além disso, a carga parasitária no grupo RPMI foi maior no 14^a DAI em relação aos dias 5 e 7 neste mesmo grupo.

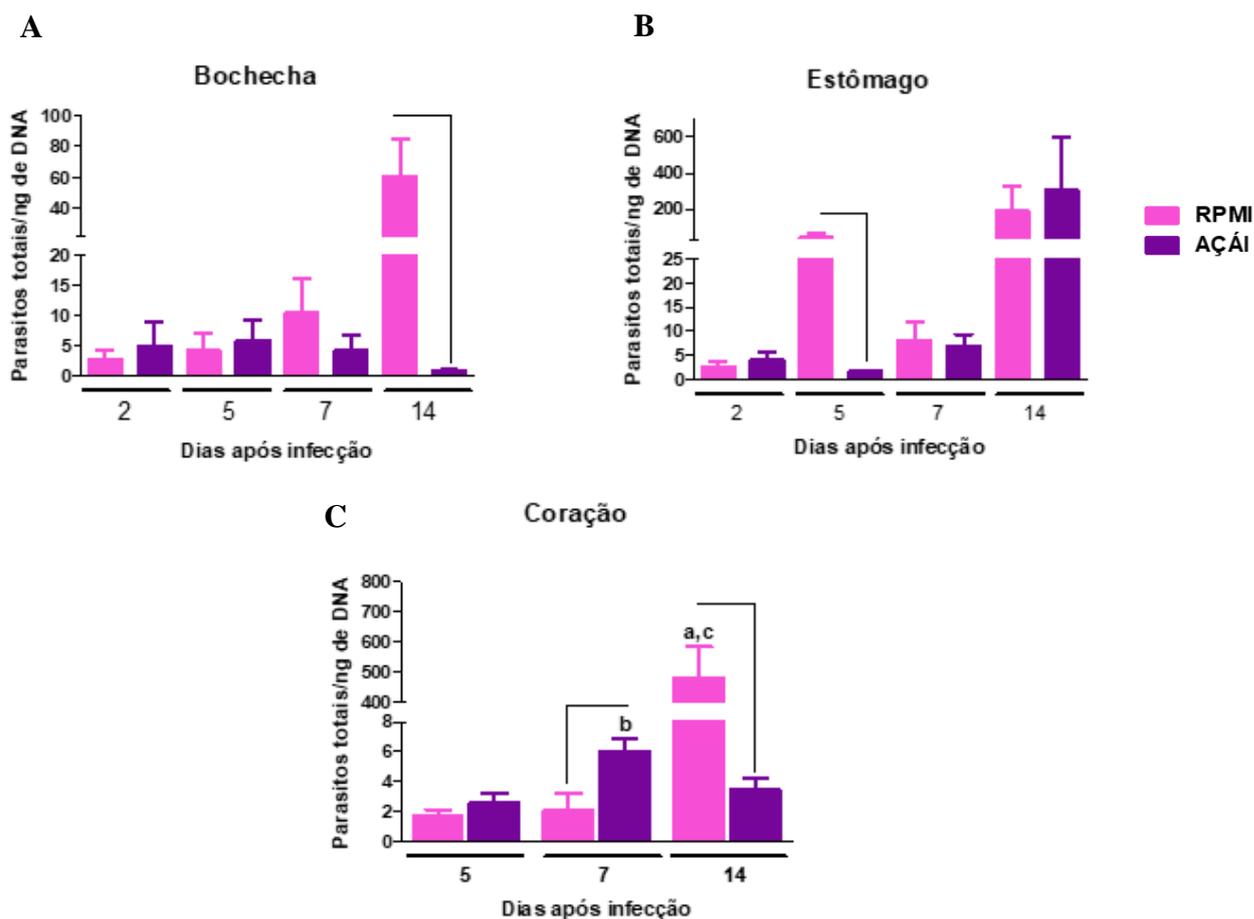


Figura 8. Número de parasitos na bochecha (A), no estômago (B) e no coração (C) de camundongos infectados por formas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em RPMI (■) ou Açai (■) e eutanasiados ao longo da fase aguda (2, 5, 7 e 14 DAI). Resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. Linhas conectoras representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). “a”, “b” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao 5º DAI para os grupos RPMI e Açai, respectivamente. A letra “c” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao 7º DAI para o grupo RPMI

5.7 Processo inflamatório

O impacto do inóculo com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) da cepa Y do *T. cruzi*, em RPMI e Açai, na infecção de camundongos BALB/c, foi verificado avaliando-se o processo inflamatório na bochecha, no estômago e no coração. Os resultados da análise quantitativa do processo inflamatório estão apresentados na Figura 9.

A análise morfométrica da camada muscular da bochecha mostrou que nos grupos dos animais infectados, foi observado processo inflamatório significativamente maior nos dias dois e cinco após a infecção em relação grupo Controle. Apenas no grupo RPMI, foi observado

processo inflamatório significativamente maior no 14º DAI em relação ao grupo controle (Figuras 9 A e 10).

Já a análise morfométrica da camada muscular do estômago mostrou que nos grupos dos animais infectados, RPMI e Açai, foi observado processo inflamatório significativamente maior nos dias dois e cinco após a infecção em relação grupo Controle (Figuras 9 B e 11).

A análise morfométrica do coração mostrou que mesmo não sendo estatisticamente significante, foi observado presença de processo inflamatório discreto em ambos os grupos infectados (Figura 9 C). Além disso, foram observados ninhos de amastigotas no grupo de animais infectados com formas TM da cepa Y do *T. cruzi* no meio RPMI e eutanasiados no 14º DAI (Figura 12).

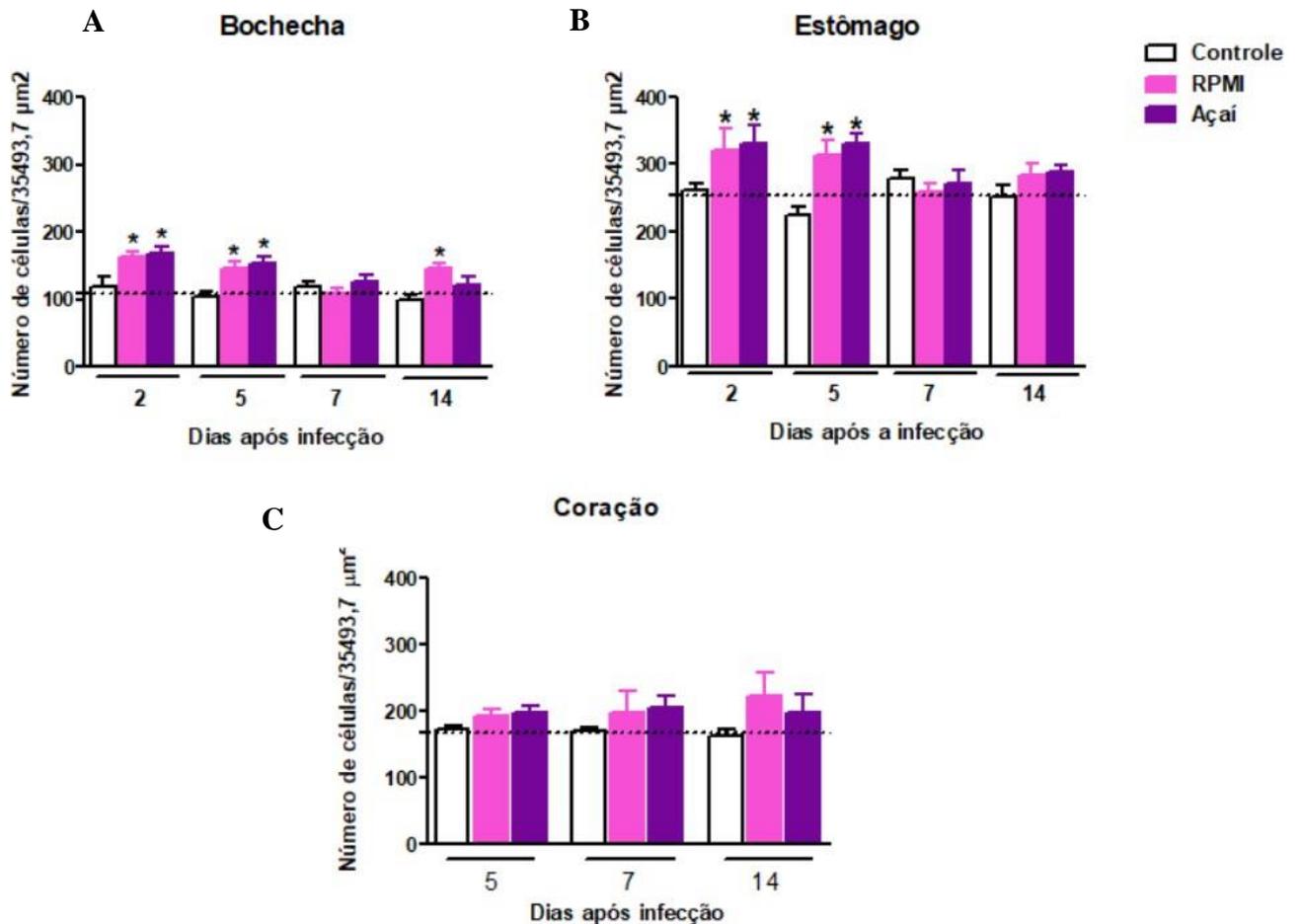


Figura 9. Quantificação do processo inflamatório na bochecha (A), no estômago (B) e no coração (C) de camundongos BALB/c não-infectados (□), infectados com as formas tripomastigotametacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em RPMI (■) ou Açai (■). “*” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais não infectados. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos de animais não infectados. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão.

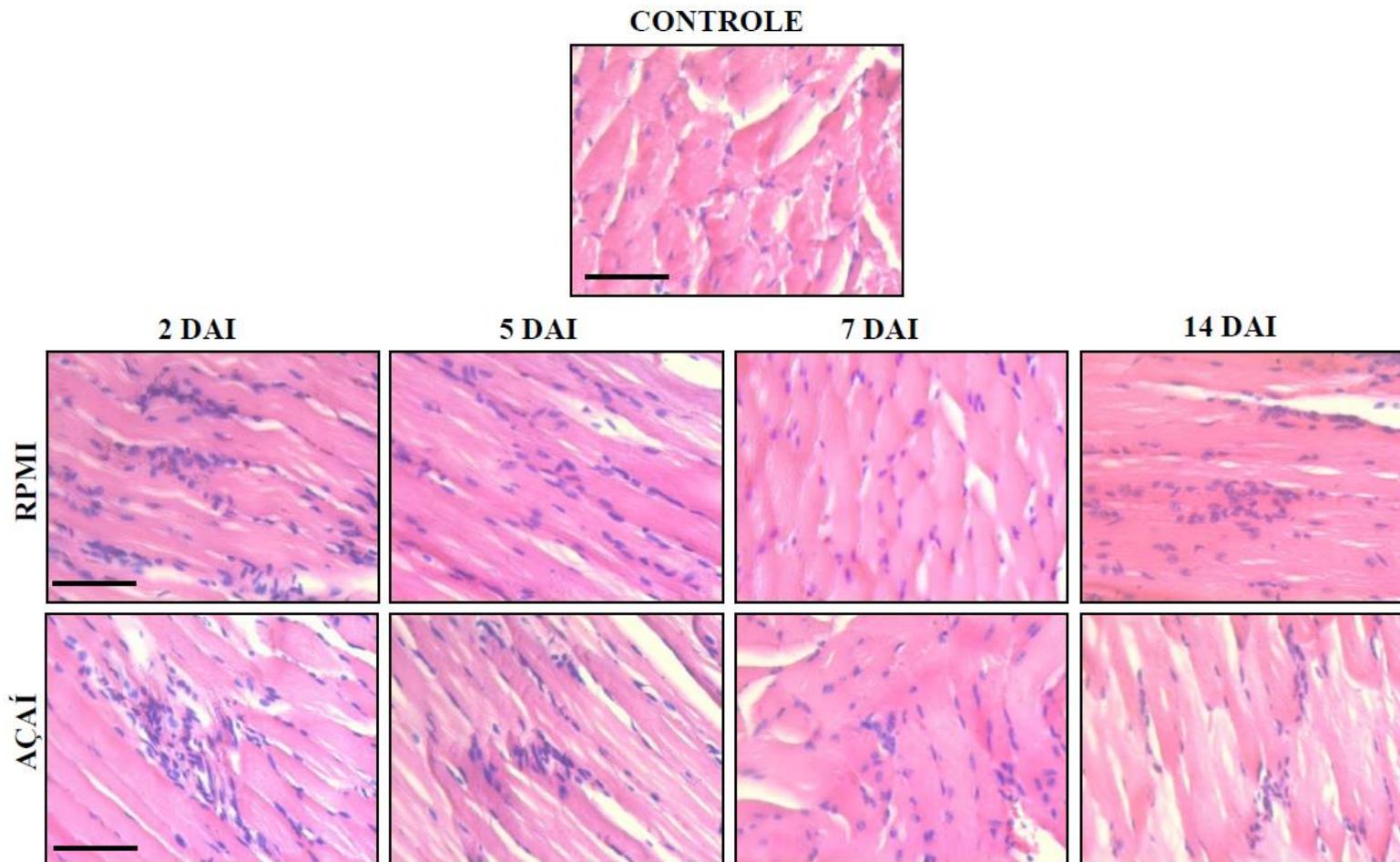


Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular próxima a bochecha de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em meio RPMI ou em Açai. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório moderado em dois e cinco dias após a infecção em ambos os grupos infectados. Aspecto histológico muscular normal em todos os grupos nos dias sete e 14 após a infecção. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μ m.

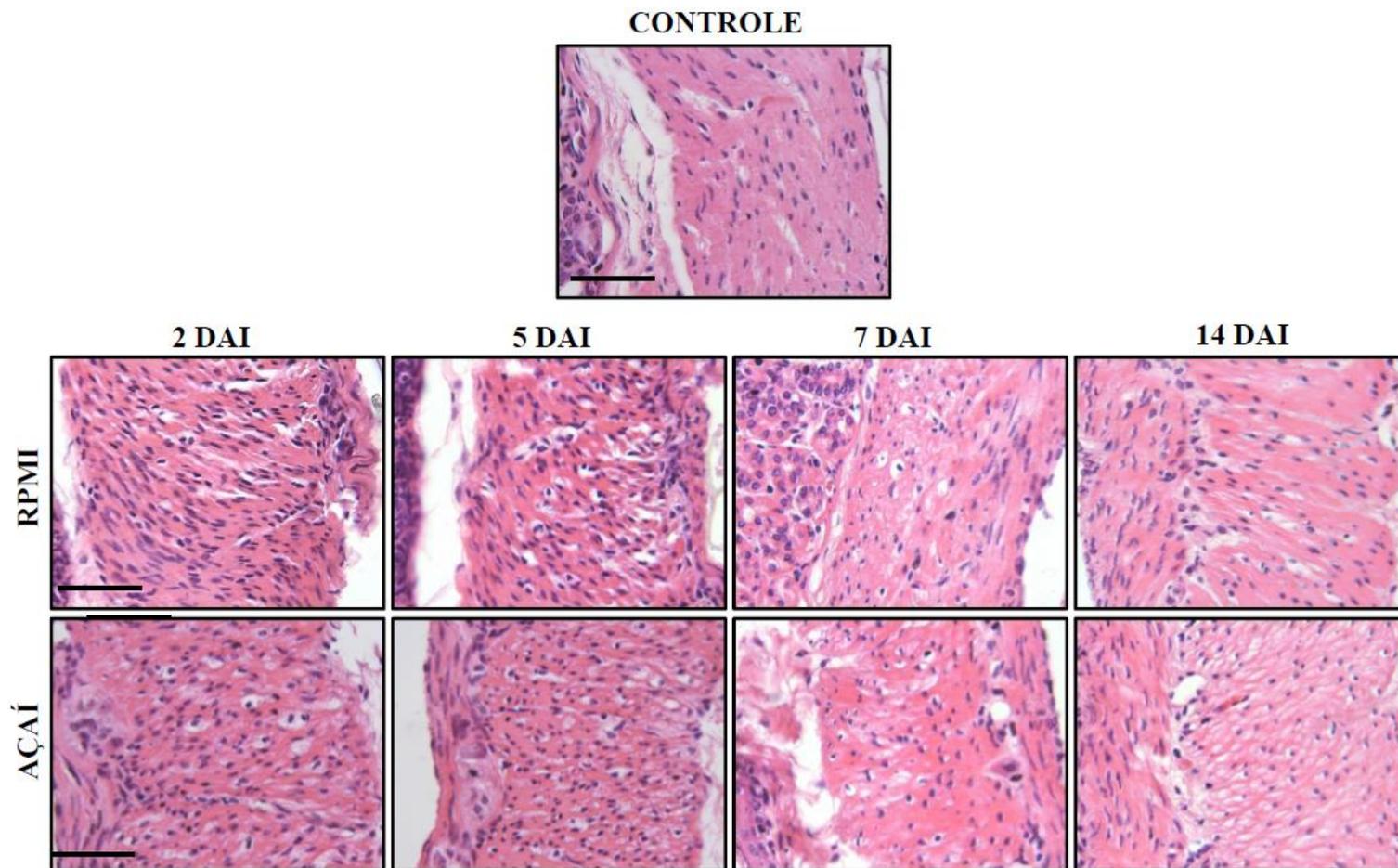


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos do da camada muscular do estômago de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em meio RPMI ou Açai. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório moderado em dois e cinco dias após a infecção em ambos os grupos infectados. Aspecto histológico muscular normal em todos os grupos nos dias sete e 14 após a infecção. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μ m.

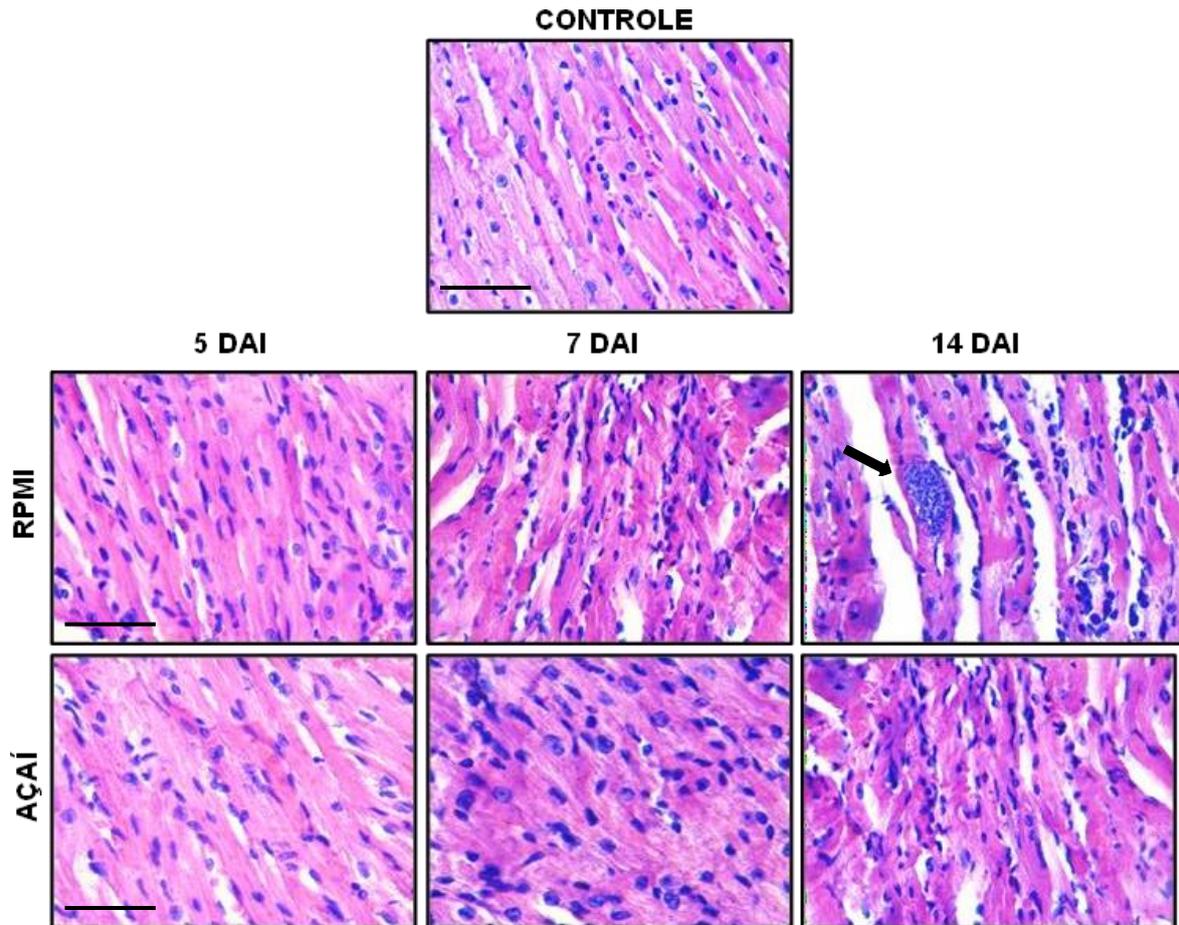


Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos BALB/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* nos meios RPMI ou Açai. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle) e em animais infectados de ambos os grupos. A seta preta (➔) indica a presença de ninho de amastigotas no coração de animais infectados em meio RPMI no 14° DAI. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μ m.

5.8 Quantificação do estresse oxidativo no coração

A quantificação da SOD no coração se mostrou significativamente reduzida em relação ao grupo Controle no grupo RPMI nos dias 7 e 14 após a infecção. No grupo Açai essa redução foi observada apenas no 14º DAI (Figura 13 A). Por outro lado, a quantificação da atividade da enzima antioxidante catalase apresentou-se aumentada em relação ao grupo Controle aos dias 7 e 14 após a infecção no grupo RPMI. Já no grupo Açai esse aumento foi observado apenas no 14º DAI (Figura 13 B).

A quantificação da atividade das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não resultou em diferenças significativas (Figura 13 C).

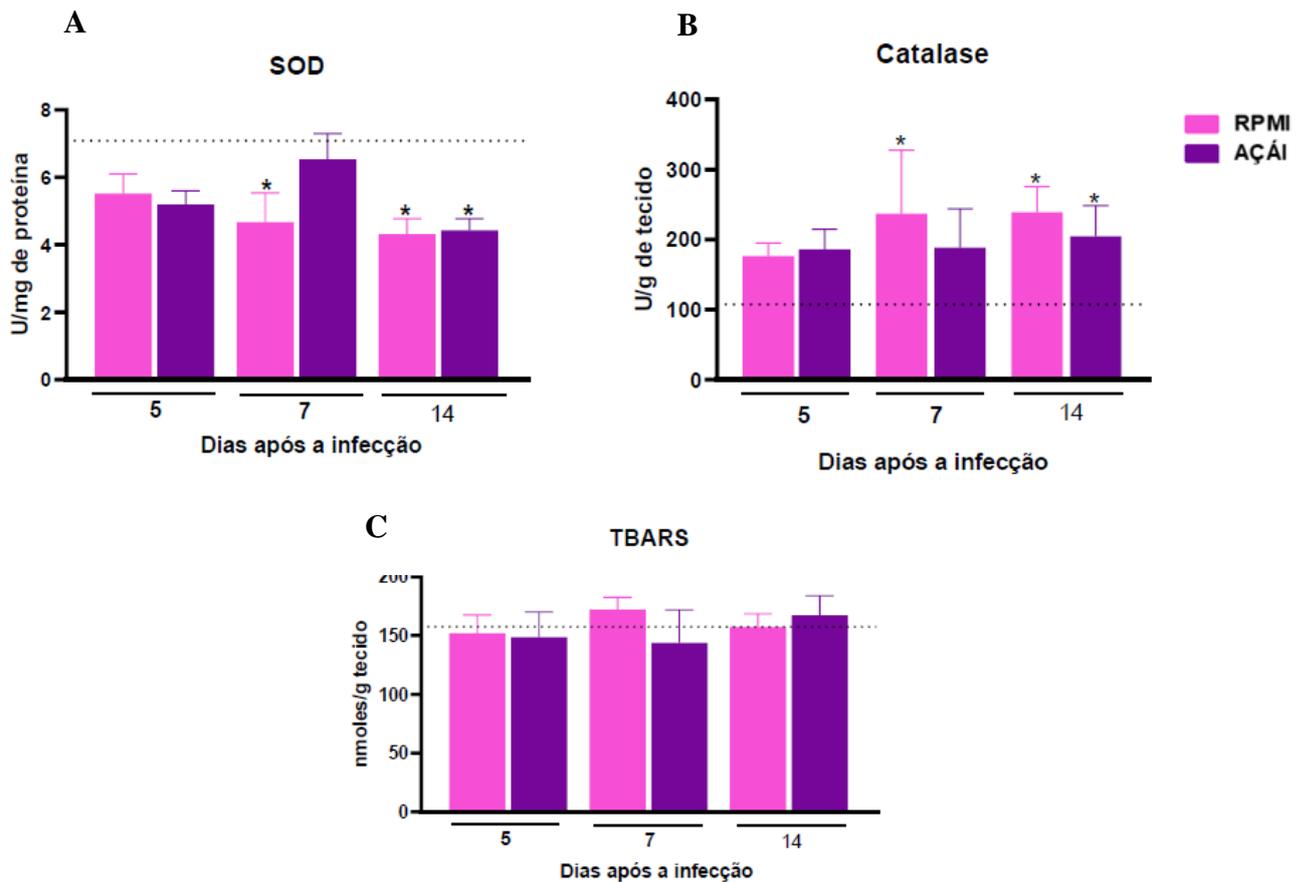


Figura 13. Quantificação do estresse oxidativo no coração de camundongos BALB/c infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai aos dias 5º, 7º e 14º após infecção.

5.9 Quantificação das citocinas na bochecha e no estômago

O impacto do inóculo com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e da citocina imunomoduladora IL-10 no músculo próximo a bochecha e no estômago está apresentado nas Figuras 14 e 15, respectivamente. A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ no músculo próximo a bochecha não resultou em quantidades detectáveis. O resultado da quantificação da citocina pró-inflamatória TNF nesse órgão, mostrou que ocorre um aumento dessa citocina no grupo de animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI em relação ao grupo Controle e ao grupo Açai no 14^o DAI (Figura 14).

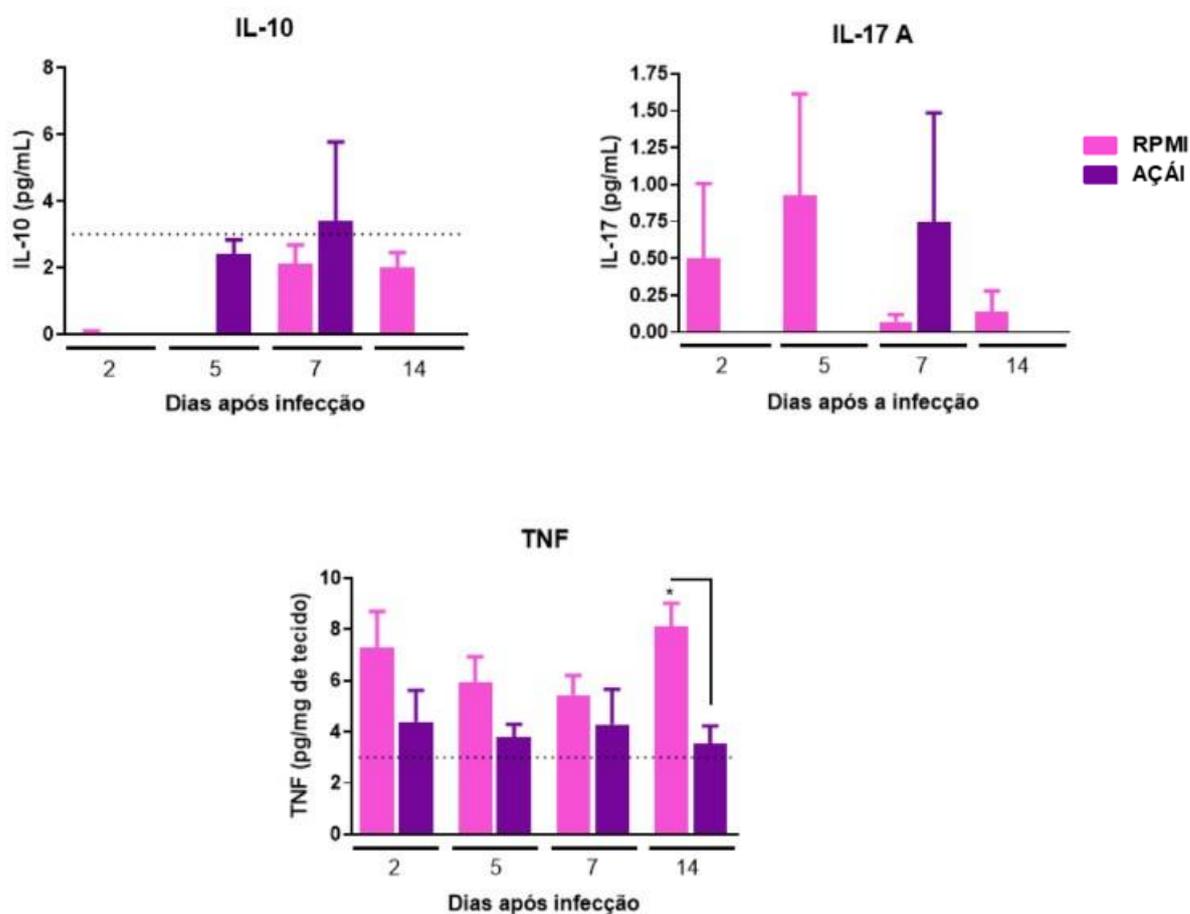


Figura 14. Quantificação das citocinas no músculo próximo a bochecha de camundongos BALB/c não infectados (linha tracejada) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* no RPMI (■) ou Açai (■). “*” indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo Controle. As linhas conectoras representam diferenças significativas no mesmo período entre os grupos de animais infectados. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

Os resultados da quantificação no estômago mostraram que de maneira geral, os animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas no meio RPMI apresentam um aumento na produção tanto de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF, quanto da citocina imunomoduladora IL-10 em relação aos animais infectados com as formas metacíclicas no meio Açai aos dois e sete dias após a infecção. De modo contrário, podemos observar de um modo geral uma redução na produção de citocinas no grupo Açai relação ao grupo Controle. Para a citocina pró-inflamatória TNF e para citocina IL-17 essa redução foi observada em todos os tempos de avaliação. Para a citocina IFN- γ essa diminuição foi observada no 7º DAI e para citocina imunomoduladora IL-10 no 2º e 7º DAI (Figura 14).

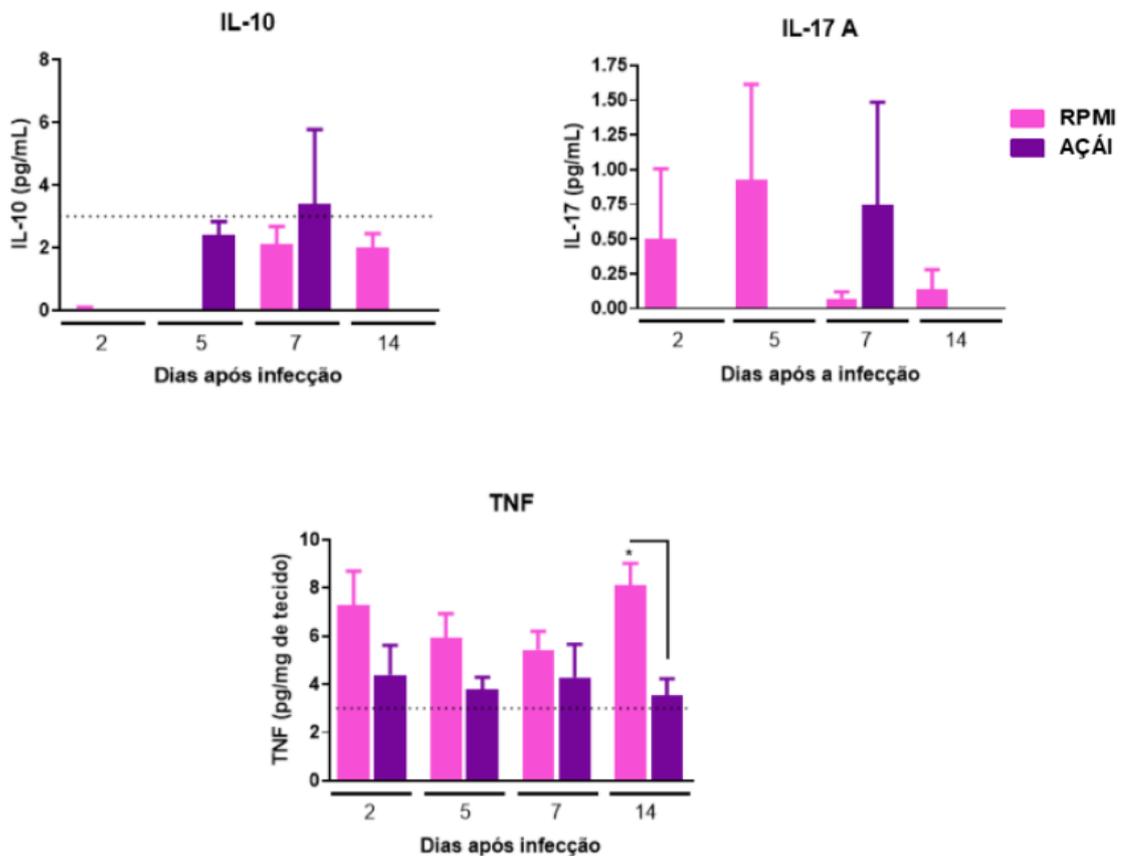


Figura 15. Quantificação das citocinas no estômago de camundongos BALB/c não infectados (linha tracejada) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* no RPMI (■) ou Açai (■). “*” indica diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo Controle. As linhas conectoras representam diferenças significativas no mesmo período de tempo entre os grupos de animais infectados. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

5.10 Análise proteômica do estômago baseada em espectrometria de massas

5.10.1 Análise composicional

Para a análise proteômica em larga escala utilizaram-se triplicatas das amostras do estômago de animais Controle e animais sabidamente infectados e eutanasiados cinco dias após a infecção. Na tabela 5 pode-se observar os indicadores obtidos pela plataforma de UHPLC-MS/MS. Foi aplicada uma pontuação de corte para aceitação do *False Discovery Rate (FDR)* de 1,1% para espectros, 4,3% para peptídeos e 5,3% para identificação de proteínas. Foram identificadas 1887 proteínas totais, resultando em 1251 grupos de proteínas no estômago dos animais pertencentes aos grupos Controle, RPMI e Açai (Tabela 5). A tabela com todas as proteínas identificadas encontra-se em material suplementar, tabela 1.

Tabela 5. Indicadores obtidos na plataforma UHPLC-MS/MS abrangendo a totalidade dos grupos.

INDICADORES	RESULTADOS
MS	242.783
MS/MS	178.876
<i>Peptide-Spectrum Matches (PSM)</i>	52.802
Sequência de peptídeos	7.760
Grupo de proteínas	1251
Proteínas com peptídeos únicos	1012 (>2); 369 (=2); 506 (=1)

Do total de proteínas identificadas, a grande maioria, 781(64,3%) foram compartilhadas entre as três condições. Para o grupo Controle observamos um total de 92 (7,6%) proteínas unicamente identificadas. Para o grupo RPMI esse valor foi de 35 (2,9%) proteínas. Já para o grupo Açai, foram identificadas 47 proteínas exclusivas (3,9%) (Figura 15). Na tabela 8, partes I, II e III, encontram-se listadas as proteínas unicamente identificadas em cada condição. Entre as proteínas mais abundantes e compartilhadas entre os três grupos experimentais podemos destacar proteínas envolvidas em vias de processamento do RNA (*splicing*), da cadeia respiratória, da síntese proteica, do proteassoma, do catabolismo de aminoácidos, da adesão celular, entre outras, as quais estão representadas na Figura 16. As vias biológicas nas quais as

proteínas citadas anteriormente fazem parte estão descritas na tabela 6. Para construção desta tabela utilizou-se a análise de enriquecimento funcional *WikiPathways*, uma plataforma científica aberta que integra uma ferramenta de edição gráfica e bancos de dados *BridgeDb*, cobrindo os principais genes, proteínas e sistemas metabólicos. Foram listadas vias biológicas com taxa de falsa descoberta de até 1×10^{-05} .

Na tabela 6 encontram-se a descrição das proteínas unicamente expressas em cada condição.

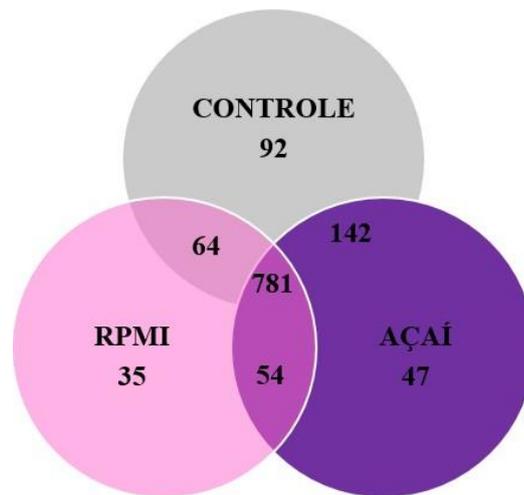


Figura 15. Diagrama de Venn. Compartilhamento das proteínas totais pelos três gruposexperimentais.

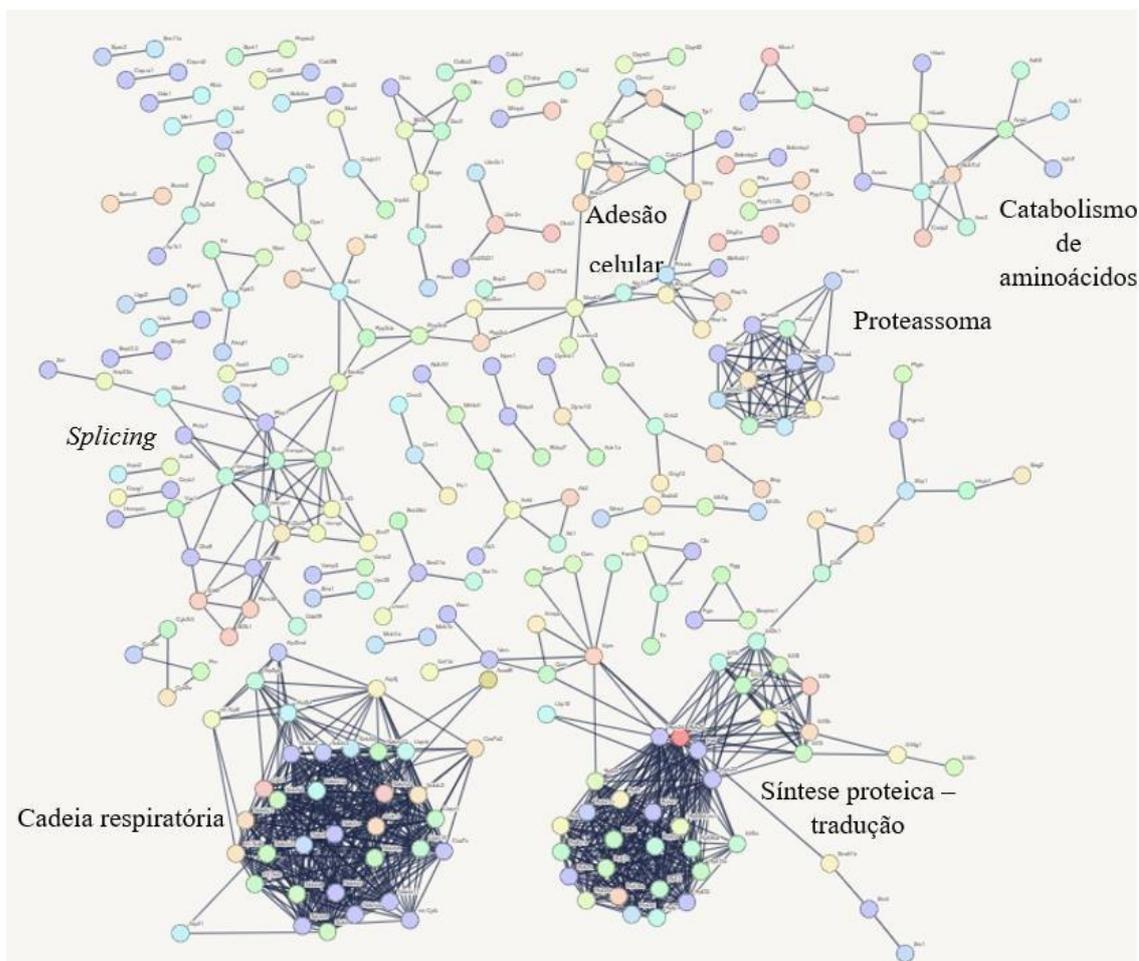


Figura 16. Rede de interação das proteínas envolvidas em processos biológicos compartilhadas pelas três condições experimentais. Rede obtida pelo programa *String* Versão 12.0, utilizando-se banco de dados para *Mus musculus*. A pontuação de corte de confiança escolhida foi de $> 0,9$.

Tabela 6. Vias biológicas obtidas pelo enriquecimento funcional por meio da plataforma WikiPathways.

Identificador	Via	Contagem genética observada	Contagem de genes de fundo	Força	Taxa de falsa descoberta
WP295	Cadeia transportadora de elétrons	28	92	1,13	8,64E-19
WP1248	Fosforilação oxidativa	20	54	1,22	8,61E-15
WP163	Proteínas ribossômicas citoplasmáticas	20	76	1,07	1,35E-12
WP310	Processamento mRNA	42	439	0,63	1,35E-12
WP662	Metabolismo de aminoácidos	18	95	0,93	1,94E-09
WP519	Degradação proteassoma	12	51	1,02	3,42E-07
WP5242	Sinalização de IL-17A	14	101	0,79	6,51E-06
WP307	Fatores de tradução	10	49	0,96	1,38E-05

Para avaliação da faixa dinâmica da abundância das proteínas foi traçado o gráfico Log10 das contagens espectrais para cada uma das proteínas, organizadas de acordo com sua contribuição para o sinal iônico total. Neste gráfico podemos observar uma capacidade de detecção de 4 ordens de magnitude entre a proteína que contribuiu com a maior parte em relação à de menor contribuição ao sinal iônico total da amostra (Figura 17 A). O gráfico de abundância acumulativa representa a contribuição de cada proteína para o sinal iônico total associado ao proteoma do estômago. Podemos observar que apenas 122 proteínas contribuem para 50% do sinal iônico. Além disso, grande parte das proteínas com menor contribuição para o sinal iônico representam 10% do extrato, o que corresponde a 650 proteínas (Figura 17 B). Na Figura 18 podemos observar que essas 122 estão envolvidas em vias relacionadas à proteção da barreira epitelial, contração muscular, compactação e descompactação do DNA, regulação proteica, cadeia respiratória, entre outros. Na tabela 7 encontram-se descritas as vias biológicas nas quais as proteínas citadas anteriormente fazem parte. O enriquecimento funcional dessas vias foi realizado utilizando-se a análise pela plataforma *WikiPathways*.

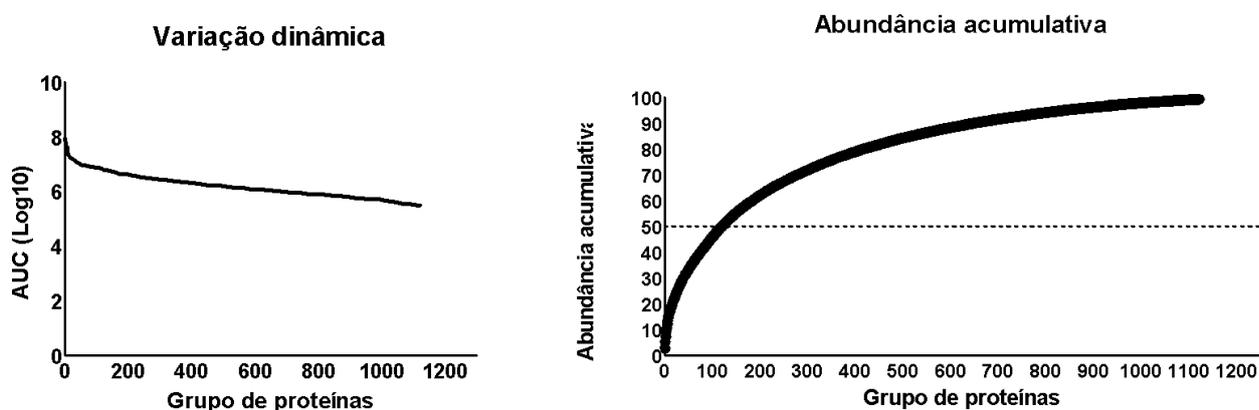


Figura 17. Variação dinâmica, em escala logarítmica (Log10), indicando uma detecção de quatro ordens de magnitude pela plataforma UHPLC-MS/MS (A). Abundância acumulativa: distribuição de frequência de abundância de proteínas no proteoma do estômago (B).

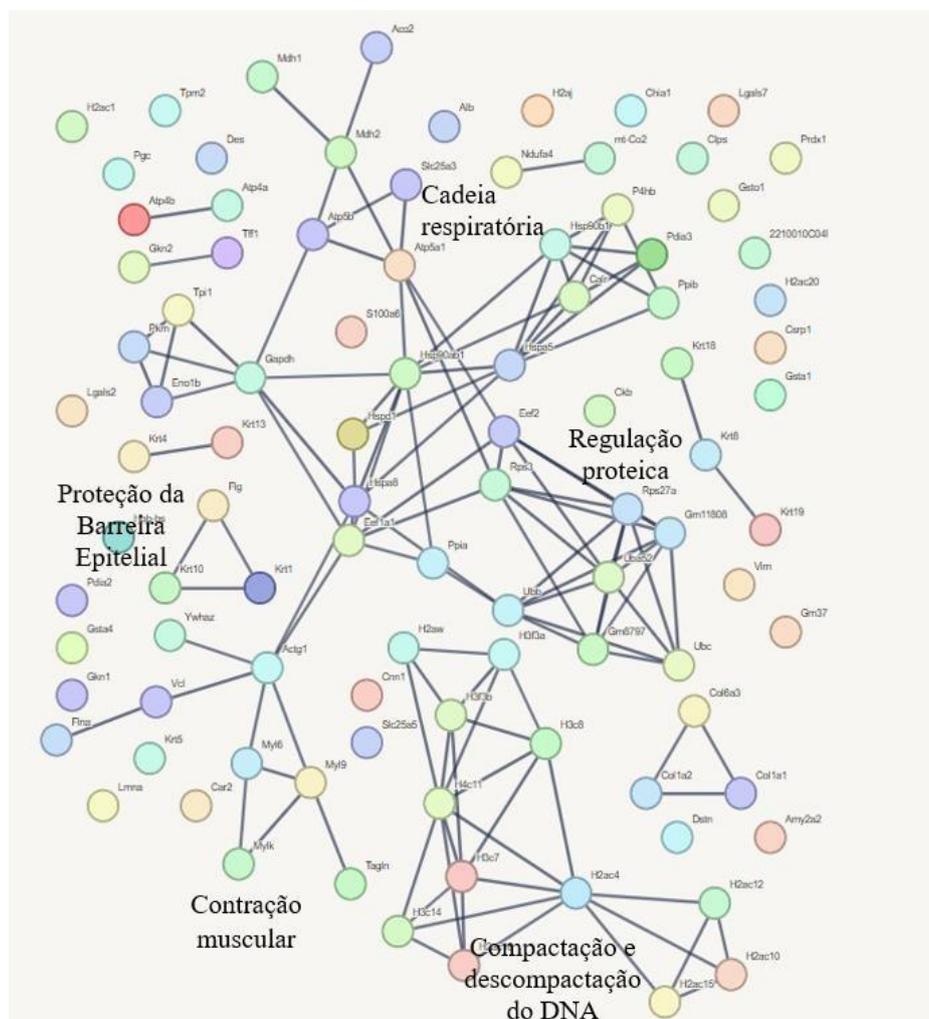


Figura 18. Rede de interação das proteínas envolvidas em processos biológicos nos quais estão envolvidas as proteínas que contribuíram para 50% do sinal iônico. Rede obtida do programa *String* Versão 12.0, utilizando-se banco de dados para *Mus musculus*. A pontuação de corte de confiança escolhida foi de > 0,9.

Tabela 7. Vias biológicas obtidas pelo enriquecimento funcional por meio da plataforma WikiPathways.

Identificador	Via	Contagem genética observada	Contagem de genes de fundo	Força	Taxa de falsa descoberta
WP157	Glicólise e gliconeogênese	6	49	1,44	3,10E-05
WP85	Adesão Focal	7	185	0,93	0,0023
WP662	Metabolismo de aminoácidos	5	95	1,07	0,0055
WP434	Ciclo do ácido tricarboxílico	3	31	1,34	0,0226
WP295	Cadeia transportadora de elétrons	4	92	0,99	0,0348
WP4466	Estresse oxidativo e via redox	4	92	0,99	0,0348

Tabela 8. Parte I - Proteínas unicamente identificadas no grupo Controle.

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área Controle
P05977	Myosin I light chain 1/3	35	3	20594	1,95E+07
E9PWG4	Myosin II light chain 1/3	40	3	17689	1,95E+07
Q62468	Villin-1	9	7	92775	1,72E+07
F8VQM0	Alkaline phosphatase	12	4	60291	1,15E+07
P55050	Fatty acid-binding protein intestinal	14	2	15126	9,40E+06
P70695	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	15	4	36947	8,28E+06
P20801	Troponin C skeletal muscle	19	2	18110	7,69E+06
Q8VCN5	Cystathionine gamma-lyase	13	5	43567	7,23E+06
Q99JW5	Epithelial cell adhesion molecule	6	1	35019	4,45E+06
Q9D2R4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 11	10	2	24842	4,35E+06
P47856	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	4	3	78539	4,23E+06
Q99PM0	Microfibril-associated glycoprotein 1	5	1	20781	4,16E+06
P55002	Microfibrillar-associated protein 2	5	1	20578	4,16E+06
Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X mitochondrial	10	3	57553	3,89E+06
Q9R100	Cadherin-17	3	2	91645	3,45E+06
A2AKS7	Cadherin-17	3	2	80655	3,45E+06
Q9EPC1	Alpha-parvin	6	2	42330	3,26E+06
O09165	Calsequestrin-1	6	2	46378	3,21E+06
P04247	Myoglobin	23	2	17070	2,81E+06
A0A571BF58	Nebulin	0	1	871252	2,76E+06
A0A571BF46	Nebulin	0	1	867113	2,76E+06
E9Q1W3	Nebulin	0	1	828679	2,76E+06
A2AQA9	Nebulin	0	1	800586	2,76E+06
E9Q264	Myosin heavy chain 15	2	2	221844	2,76E+06
Q8BK48	Pyrethroid hydrolase Ces2e	8	2	62318	2,21E+06
O08691	Arginase-2 mitochondrial	9	2	38878	1,83E+06

Q62446	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	5	1	25148	1,67E+06
Q91V04	Translocating chain-associated membrane protein 1	3	1	43039	1,60E+06
Z4YKB8	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	1	60851	1,59E+06
Q62318	Transcription intermediary factor 1-beta	3	2	88847	1,44E+06
Q64133	Amine oxidase [flavin-containing] A	5	2	59602	1,38E+06
P23492	Purine nucleide phphorylase	3	1	32277	1,37E+06
Q543K9	Purine nucleide phphorylase	3	1	32263	1,37E+06
F8VPQ6	Alkaline phphatase	7	1	59532	1,32E+06
D3YTQ9	40S ribomal protein S15	11	1	13742	1,21E+06
P62843	40S ribomal protein S15	9	1	17040	1,21E+06
Q8JZR0	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	4	1	76206	1,19E+06
Q3U125	Peroxiredoxin-like 2A	10	2	25682	1,18E+06
Q9CYH2	Peroxiredoxin-like 2A	11	2	24395	1,18E+06
P48024	Eukaryotic translation initiation factor 1	12	1	12747	1,18E+06
J3QPZ8	Eukaryotic translation initiation factor 1 (Fragment)	13	1	12100	1,18E+06
A0A1L1SSA3	Eukaryotic translation initiation factor 1b (Fragment)	14	1	11358	1,18E+06
J3QN87	Eukaryotic translation initiation factor 1 (Fragment)	16	1	10364	1,18E+06
Q9CXU9	Eukaryotic translation initiation factor 1b	12	1	12824	1,18E+06
Q8C196	Carbamoyl-phphate synthase [ammonia] mitochondrial	1	1	164617	1,06E+06
Q9QUI0	Transforming protein RhoA	6	1	21782	1,00E+06
O89094	Caspase-14	11	2	29458	9,24E+05
F8VQC1	Signal recognition particle subunit SRP72	6	3	21	8,22E+05
P38060	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase mitochondrial	3	1	34239	8,13E+05
Q8VDM4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	3	3	100203	7,99E+05
E9PYJ9	LIM domain-binding protein 3	2	1	72312	7,52E+05
E9Q559	Calcium-transporting ATPase	6	1	112504	5,58E+05
B1ATS5	Calcium-transporting ATPase	6	1	111709	5,58E+05
Q64518	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	6	1	109529	5,58E+05
B1ATS4	Calcium-transporting ATPase	6	1	107600	5,58E+05
A0A0J9YUL3	Septin	5	1	49782	4,54E+05

Q8C1B7	Septin-11	5	1	49695	4,54E+05
A0A0J9YTY0	Septin	5	1	48979	4,54E+05
Q9R0M5	Thiamin pyrophosphokinase 1	8	1	27068	4,03E+05
E9PZW8	Unconventional myin-IXb	0	1	240314	3,70E+05
Q9QY06	Unconventional myin-IXb	0	1	238832	3,70E+05
E9PWZ6	Unconventional myin-IXb	0	1	223924	3,70E+05
A0A1D5RLD1	Unconventional myin-IXb	0	1	222640	3,70E+05
E9QKV6	Unconventional myin-IXb	0	1	222440	3,70E+05
Q9QZ06	Toll-interacting protein	5	1	30345	3,65E+05
Q8C5G6	Toll-interacting protein	6	1	24540	3,65E+05
Q9CR60	Vesicle transport protein GOT1B	10	1	15422	3,38E+05
A0A1D5RLM8	Predicted gene 11639	0	1	654216	3,26E+05
O55135	Eukaryotic translation initiation factor 6	4	1	26511	3,24E+05
Q7M6Y3	Phphatidylinitol-binding clathrin assembly protein	5	1	71543	3,02E+05
K3W4L7	Phenazine biynthesis-like domain-containing protein 1	4	1	32190	2,86E+05
Q9DCG6	Phenazine biynthesis-like domain-containing protein 1	4	1	32048	2,86E+05
Q9CXN7	Phenazine biynthesis-like domain-containing protein 2	4	1	31983	2,86E+05
A0A1W2P7N2	Phenazine biynthesis-like domain-containing protein 1	9	1	14765	2,86E+05
A0A1W2P711	Melanoma inhibitory activity protein 2	1	1	156590	2,74E+05
Q91ZV0	Melanoma inhibitory activity protein 2	1	1	156461	2,74E+05
A0A5F8MPH8	Tenascin XB	0	1	474067	2,62E+05
A0A571BG59	Tenascin XB	0	1	447177	2,62E+05
O35452	Tenascin X	0	1	435481	2,62E+05
E9Q2T3	Tenascin XB	0	1	339905	2,62E+05
Q9QXC1	Fetuin-B	2	1	42713	2,50E+05
Q6YJU1	Fetuin-B	3	1	33880	2,50E+05
Q8K010	5-oxoprolinase	2	2	137611	2,24E+05
A2A702	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	4	1	27879	1,50E+05
Q99JX4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	3	1	42517	1,50E+05
A2AH25	Rho GTPase-activating protein 1	2	1	54437	1,38E+05

Q5FWK3	Rho GTPase-activating protein 1	2	1	50411	1,38E+05
P03921	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	3	1	68475	1,33E+05
P58389	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	3	1	36710	1,06E+05
Q3TXS7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	1	1	105730	9,86E+04
Q9JM83	Calmodulin-4	8	1	16767	1,75E+04
A2AQP0	Myosin-7B	4	1	221495	
D3Z5G7	Carboxylic ester hydrolase	6	1	62197	

Tabela 8. Parte II - Proteínas unicamente identificadas no grupo RPMI.

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área infectado
E9Q0T8	Dynein axonemal heavy chain 7A	0	1	460908	1,74E+07
L7N1Y0	Dynein axonemal heavy chain 7B	0	1	466694	1,74E+07
A0A571BD48	Dynein axonemal heavy chain 7B	0	1	461919	1,74E+07
G3UXL2	Ribe-phosphate diphosphokinase	4	1	34824	3,08E+06
E9Q7N9	Dynein axonemal heavy chain 11	0	1	516323	1,48E+06
Q9D8I3	Glyoxalase domain-containing protein 5	9	1	16595	1,22E+06
Q9D023	Mitochondrial pyruvate carrier 2	17	2	14286	1,02E+06
E9Q641	Nebulin-related-anchoring protein	1	1	167519	8,86E+05
A0A0U1RPJ3	Perilipin-1 (Fragment)	5	1	20135	6,15E+05
Q8CGN5	Perilipin-1	2	1	55596	6,15E+05
Q8BI08	Protein MAL2	6	1	19094	4,65E+05
P63321	Ras-related protein Ral-A	10	1	23553	4,17E+05
A0A1Y7VL93	Small monomeric GTPase (Fragment)	15	1	15353	4,17E+05
P58871	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1	1	181824	3,58E+05
Z4YJL4	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1	1	112648	3,58E+05
P58871	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1	1	181824	3,58E+05
Z4YJL4	182 kDa tankyrase-1-binding protein	1	1	112648	3,58E+05
A0A3B2WBH9	Tight junction protein ZO-2	1	1	131106	2,72E+05

P12815	Programmed cell death protein 6	5	1	21867	2,69E+05
P49586	Choline-phosphate cytidyltransferase A	4	1	41667	2,67E+05
D3Z3T5	Choline-phosphate cytidyltransferase	6	1	29761	2,67E+05
Q9JIG8	PRA1 family protein 2	6	1	19478	2,67E+05
B1AQZ0	Septin-8	4	1	55874	2,16E+05
B1AQY9	Septin	4	1	51146	2,16E+05
B7ZC46	Septin	4	1	50896	2,16E+05
Q8CHH9	Septin-8	4	1	49812	2,16E+05
Q8R180	ERO1-like protein alpha	3	1	1	1,97E+05
O54692	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	1	1	88063	1,87E+05
Q9WUQ2	Prolactin regulatory element-binding protein	2	1	45437	1,84E+05
D3Z3S1	Prolactin regulatory element-binding protein	3	1	37965	1,84E+05
Q91XH5	Sepiapterin reductase	6	1	27928	9,27E+04
Q64105	Sepiapterin reductase	6	1	27883	9,27E+04
G3UXX3	Sepiapterin reductase	7	1	23357	9,27E+04
Q62148	Retinal dehydrogenase 2	4	1	56626	7,59E+04
Q9JHW9	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	4	1	56157	7,59E+04

Tabela 8. Parte III - Proteínas unicamente identificadas no grupo Açaí.

Número de acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Massa molecular (Da)	Área infectado
Q9QXK3	Coatomer subunit gamma-2	3	1	97680	6,56E+06
Q9QX97	Trefoil Factor 2/Spasmolytic polypeptide protein	12	1	14271	1,98E+06
Q03404	Trefoil factor 2	12	1	14172	1,98E+06
Q5U4B1	Replication factor C subunit 1	1	1	126064	1,72E+06
A0A0N5E9G7	Replication factor C subunit 1	1	1	125865	1,72E+06
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa mitochondrial	3	1	80209	1,24E+06
Q9EST1	Gasdermin-A	11	1	49593	1,12E+06
P61087	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	14	2	22407	1,11E+06

A0A494BB95	Eukaryotic translation initiation factor 4C	4	1	28613	1,09E+06
Q60872	Eukaryotic translation initiation factor 1A	8	1	16502	1,09E+06
Q8BMJ3	Eukaryotic translation initiation factor 1A X-chromomal	8	1	16460	1,09E+06
Q8R2P8	Lysine--tRNA ligase	4	1	71291	1,07E+06
A0A6I8MWZ2	Tensin 1	5	1	197192	1,01E+06
Q8C6B0	Methyltransferase-like 7A1	10	1	28096	8,60E+05
A0A6I8MWZ0	Peptidylprolyl isomerase (Fragment)	1	1	114364	6,79E+05
A2AMT1	Filensin	1	1	73669	6,67E+05
Q8BGQ7	Alanine--tRNA ligase cytoplasmic	1	1	106908	6,54E+05
P97855	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	3	1	51829	6,31E+05
Q5SWT3	Solute carrier family 25 member 35	4	1	32631	6,15E+05
A0A0A0MQ70	Solute carrier family 25 member 35	4	1	32167	6,15E+05
A0A1B0GRP7	Pyridoxal phphate hometasis protein (Fragment)	4	1	36180	4,16E+05
Q9Z2Y8	Pyridoxal phphate hometasis protein	5	1	30049	4,16E+05
Q6P8V7	Proline synthetase co-transcribed	8	1	16937	4,16E+05
A0A1B0GRR5	Pyridoxal phphate hometasis protein (Fragment)	9	1	15275	4,16E+05
A0A1B0QY5	Pyridoxal phphate hometasis protein	10	1	14280	4,16E+05
A0A1B0GSA1	Pyridoxal phphate hometasis protein (Fragment)	19	1	7724	4,16E+05
Q8K1Z0	Ubiquinone biynthesis protein COQ9 mitochondrial	3	1	35083	3,75E+05
F6SFF5	Ubiquinone biynthesis protein (Fragment)	3	1	30282	3,75E+05
B0R091	Calcineurin B homologous protein 1	6	1	21998	3,40E+05
O88668	Protein CREG1	5	1	24452	2,78E+05
K4DI63	Protein CREG1	12	1	11021	2,78E+05
Q2TPA8	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	2	1	54208	2,40E+05
B1AX78	Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	2	1	41866	2,40E+05
Q6PA06	Atlastin-2	3	1	66224	2,09E+05
E9QND8	Atlastin-2	4	1	46876	2,09E+05
P62196	26S proteasome regulatory subunit 8	6	1	45626	2,03E+05
Q8K1K2	26S proteasome regulatory subunit 8	7	1	38752	2,03E+05
Q99KK2	N-acylneuraminate cytidyltransferase	3	1	48058	1,53E+05

A0A0M3HEP8	Vitamin-K-epoxide reductase (warfarin-sensitive)	8	1	14664	1,49E+05
Q6TEK5	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1	6	1	19779	1,49E+05
Q9DCG9	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	10	1	14141	1,22E+05
A2AAJ9	Obscurin	0	1	966606	6,00E+04
H7BX05	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	1	874552	6,00E+04
E9QQ96	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	1	815649	6,00E+04
Z4YJE4	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	1	781586	6,00E+04
A0A1W2P6H1	Non-specific serine/threonine protein kinase	0	1	725792	6,00E+04
Q9QYR9	Acyl-coenzyme A thioesterase 2 mitochondrial	2	1	49657	4,95E+04
Q6Q2Z6	Acyl-coenzyme A thioesterase 5	3	1	46573	4,95E+04

5.10.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa do proteoma do estômago de animais não infectados e infectados com a cepa Y do *T. cruzi* por meio de proteômica *shotgun Label-free* sob parâmetros de *fold* ≥ 2 e significância ≥ 20 revelou que das 1251 proteínas identificadas na análise composicional, 110 (8,8%) encontraram-se diferencialmente abundantes na amostra (Figura 19 e Quadro suplementar 1). Destas 110 proteínas, 49 não apresentaram quantificação da área do sinal iônico, apesar de terem sido identificadas e por essa razão não serão analisadas. Na tabelas 9, 10, 11 e 12 encontram-se as informações de todas as proteínas diferencialmente abundantes e que tiveram a quantificação da área associada ao sinal iônico registrado.

Entre as proteínas com área do sinal iônico quantificado, 24 (39,3%) foram representadas por proteínas reguladas positivamente no grupo Açai e reguladas negativamente no grupo RPMI, ambos em relação ao grupo Controle. Nos grupos infectados foram identificadas 17 proteínas (27,8%) reguladas negativamente e 17 proteínas reguladas positivamente, quando comparadas ao grupo Controle. Apenas 3 proteínas apresentaram-se reguladas positivamente no grupo RPMI e negativamente no grupo Açai, ambas em relação ao grupo Controle.

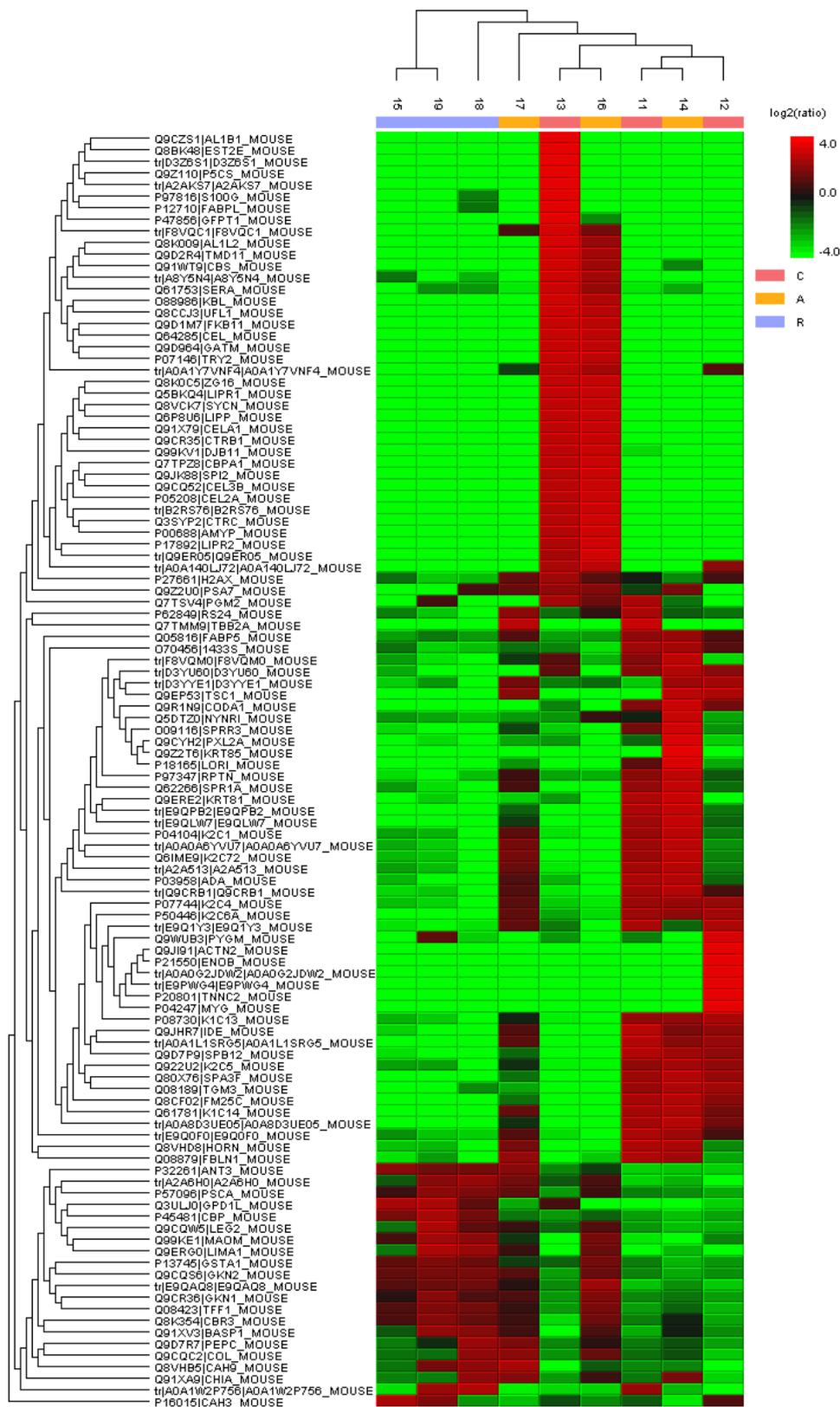


Figura 19. Heatmap. Perfil de expressão diferencial das 110 proteínas identificadas na análise quantitativa. Os retângulos em verde representam proteínas reguladas negativamente e em vermelho, proteínas reguladas positivamente.

Tabela 9. Proteínas reguladas positivamente no grupo Açai e reguladas negativamente no grupo RPMI

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Área Controle	Área Açai	Área RPMI	Razão C:A:R
Q9CR35	Chymotrypsinogen B	37	8	9,49E+07	1,08E+08	2,39E+05	1.00:1.13:0.00
P05208	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	46	8	2,48E+07	3,40E+07	5,13E+04	1.00:1.37:0.00
P00688	Pancreatic alpha-amylase	48	13	8,08E+07	1,25E+08	6,61E+05	1.00:1.54:0.01
Q9ER05	Chymopasin	30	5	1,41E+07	3,05E+07	6,43E+04	1.00:2.15:0.00
Q9Z2U0	Proteasome subunit alpha type-7	8	2	1,55E+06	2,48E+06	5,79E+05	1.00:1.60:0.37
Q05816	Fatty acid-binding protein 5	48	6	6,25E+07	6,63E+07	2,31E+07	1.00:1.06:0.37
F8VQM0	Alkaline phosphatase	15	4	6,21E+06	1,01E+07	9,79E+05	1.00:1.63:0.16
D3YYE1	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein	22	3	4,88E+06	6,64E+06	8,96E+05	1.00:1.36:0.18
Q5DTZ0	Protein NYNRIN	1	2	9,95E+05	3,50E+06	5,64E+05	1.00:3.52:0.57
O09116	Small proline-rich protein 3	46	8	1,15E+07	3,57E+07	7,44E+05	1.00:3.10:0.06
Q9CYH2	Peroxiredoxin-like 2A	15	3	1,40E+06	8,11E+06	2,18E+05	1.00:5.79:0.16
P18165	Loricrin	5	2	3,67E+06	1,67E+07	2,03E+04	1.00:4.55:0.01
P97347	Repetin	8	8	4,19E+06	7,34E+06	4,81E+05	1.00:1.75:0.11
Q62266	Cornifin-A	22	4	2,78E+07	5,23E+07	5,06E+06	1.00:1.88:0.18
Q9ERE2	Keratin type II cuticular Hb1	20	2	1,77E+06	2,59E+06	8,73E+04	1.00:1.47:0.05
E9QLW7	Dermokine	10	5	2,67E+06	4,30E+06	1,12E+05	1.00:1.61:0.04
P04104	Keratin, type II cytoskeletal 1	61	31	1,85E+08	3,13E+08	4,00E+07	1.00:1.69:0.22
A0A0A6YVU7	Filaggrin	29	4	5,34E+07	9,57E+07	8,64E+06	1.00:1.79:0.16
Q6IME9	Keratin type II cytoskeletal 72	9	1	1,25E+07	2,38E+07	1,96E+06	1.00:1.90:0.16
A2A513	Keratin 10	47	23	2,35E+08	3,51E+08	4,58E+07	1.00:1.50:0.20
P03958	Adenosine deaminase	52	14	2,15E+07	2,46E+07	1,78E+06	1.00:1.15:0.08
Q9CRB1	Galectin	68	7	5,73E+07	6,71E+07	4,83E+06	1.00:1.17:0.08
Q8VHD8	Hornerin	5	7	7,86E+06	9,91E+06	1,14E+06	1.00:1.26:0.14
Q08879	Fibulin-1	3	2	6,51E+05	9,31E+05	9,47E+04	1.00:1.43:0.15

Tabela 10. Proteínas reguladas negativamente nos grupos infectados Açai e RPMI

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Área Controle	Área Açai	Área RPMI	Razão C:A:R
P97816	Protein S100-G	44	4	2,56E+07	8,09E+04	1,75E+06	1.00:0.00:0.07
A8Y5N4	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13	19	3	1,46E+06	7,30E+05	2,43E+05	1.00:0.50:0.17
Q61753	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	20	9	8,31E+06	4,20E+06	1,36E+06	1.00:0.51:0.16
Q64285	Bile salt-activated lipase	23	13	2,60E+07	2,16E+07	1,87E+05	1.00:0.83:0.01
P27661	Histone H2AX	28	1	1,87E+06	1,23E+06	4,30E+05	1.00:0.66:0.23
Q7TSV4	Phosphopentomutase	4	2	1,09E+06	3,97E+05	2,14E+05	1.00:0.36:0.20
P62849	Small ribosomal subunit protein eS24	20	2	6,14E+06	5,45E+06	1,13E+06	1.00:0.89:0.18
O70456	14-3-3 protein sigma	51	8	7,69E+06	6,12E+06	1,82E+06	1.00:0.80:0.24
D3YU60	Microsomal glutathione S-transferase 1	13	1	8,60E+05	5,73E+05	5,22E+04	1.00:0.67:0.06
P07744	Keratin type II cytoskeletal 4	53	29	2,03E+08	1,55E+08	1,84E+07	1.00:0.76:0.09
E9Q1Y3	Apolipoprotein B-100 (Fragment)	0	2	1,48E+07	4,51E+06	6,61E+05	1.00:0.30:0.04
P08730	Keratin, type I cytoskeletal 13	54	16	1,75E+08	1,06E+08	1,62E+07	1.00:0.61:0.09
Q9JHR7	Insulin-degrading enzyme	3	3	1,09E+06	5,32E+05	2,99E+04	1.00:0.49:0.03
Q9D7P9	Serpin B12	21	8	7,62E+06	4,47E+06	1,93E+05	1.00:0.59:0.03
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	46	19	3,56E+07	3,07E+07	6,31E+06	1.00:0.86:0.18
Q08189	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	12	8	4,99E+06	3,02E+06	4,25E+05	1.00:0.61:0.09
E9Q0F0	Keratin 78	23	22	2,18E+07	1,82E+07	4,06E+06	1.00:0.83:0.19

Tabela 11. Proteínas reguladas positivamente nos grupos infectados Açai e RPMI

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Área Controle	Área Açai	Área RPMI	Razão C:A:R
P32261	Antithrombin-III	7	3	7,57E+05	2,00E+06	3,36E+06	1.00:2.64:4.44
A2A6H0	LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)	33	7	1,54E+06	4,65E+06	7,93E+06	1.00:3.03:5.17
P57096	Prostate stem cell antigen	22	2	4,92E+06	1,11E+07	1,85E+07	1.00:2.26:3.76
P45481	Histone lysine acetyltransferase CREBBP	1	2	5,87E+05	7,97E+05	3,20E+06	1.00:1.36:5.45
Q9CQW5	Galectin-2	66	8	2,22E+07	3,97E+07	7,99E+07	1.00:1.79:3.60
Q99KE1	NAD-dependent malic enzyme mitochondrial	7	3	5,47E+05	2,17E+06	4,89E+06	1.00:3.96:8.94
P13745	Glutathione S-transferase A1	27	6	6,31E+07	1,00E+08	1,66E+08	1.00:1.59:2.63
Q9CQS6	Gastrokine-2	39	8	8,15E+07	1,75E+08	2,72E+08	1.00:2.15:3.33
E9QAQ8	Mucin 5 subtypes A and C tracheobronchial/gastric	10	29	4,54E+06	1,98E+07	2,07E+07	1.00:4.36:4.56
Q9CR36	Gastrokine-1	40	7	1,41E+08	3,80E+08	4,36E+08	1.00:2.69:3.08
Q08423	Trefoil factor 1	53	3	5,84E+07	1,87E+08	2,44E+08	1.00:3.19:4.18
Q8K354	Carbonyl reductase [NADPH] 3	35	6	1,64E+06	5,54E+06	6,83E+06	1.00:3.37:4.16
Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	22	3	4,03E+05	1,66E+06	2,52E+06	1.00:4.11:6.27
Q9D7R7	Gastricsin	7	3	5,90E+07	1,44E+08	1,60E+08	1.00:2.44:2.71
Q9CQC2	Colipase	50	5	3,88E+07	1,26E+08	1,01E+08	1.00:3.24:2.61
Q8VHB5	Carbonic anhydrase 9	7	3	1,96E+05	1,60E+06	1,63E+06	1.00:8.14:8.31
Q91XA9	Acidic mammalian chitinase	26	10	3,78E+07	1,46E+08	1,04E+08	1.00:3.85:2.75

Tabela 12. Proteínas reguladas negativamente no grupo Açaí e positivamente no grupo RPMI

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	Área Controle	Área Açaí	Área RPMI	Razão C:A:R
A0A1W2P756	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	33	2	2,53E+06	5,12E+05	6,11E+06	1.00:0.20:2.41
P16015	Carbonic anhydrase 3	32	6	8,47E+06	2,42E+06	1,59E+07	1.00:0.29:1.87
Q3ULJ0	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	8	2	8,96E+05	2,21E+05	5,13E+06	1.00:0.25:5.73

6. DISCUSSÃO

Após o controle da transmissão vetorial, a infecção oral se tornou o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas no Brasil. O principal alimento envolvido nos surtos orais é o açaí, uma fruta da região norte do país com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já bem descritas na literatura (Pietta, 2000; Rathee *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011). No entanto, não há nenhum relato de como a interação entre o *T. cruzi* e o açaí pode impactar no curso da infecção no hospedeiro vertebrado. Sendo assim, o presente trabalho aborda pela primeira vez as alterações na bochecha, no estômago e no coração de camundongos BALB/c infectados experimentalmente pela via oral com açaí contaminado com formas tripomastigotas metacíclicas obtidas de cultura acelular.

O açaí possui um alto valor nutricional devido ao seu alto teor de proteínas, fibras e lipídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, recentemente o fruto tem se destacado como alimento funcional, ou seja, um alimento capaz de trazer benefícios à saúde, além do seu valor nutricional (Ozen, Pons and Tur, 2012), isso acontece devido ao seu potencial antioxidante. As antocianinas são compostos fenólicos, sendo os principais componentes fitoquímicos presentes no açaí. Além de serem responsáveis pela coloração roxa do fruto, contribuem para a sua capacidade antioxidante (Schauss *et al.*, 2006).

Para a avaliação da composição centesimal e análise antioxidante do açaí foi utilizada a polpa extraída manualmente de frutas congeladas compradas no mercado Ver-o-Peso em Belém-PA em agosto de 2020 e armazenadas em freezer -20 °C até o momento das análises (março/2023).

O valor de pH obtido para a polpa foi de 4,8. Este valor está dentro do limite determinado pelo Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta (Instrução Normativa nº 01 de 07 de janeiro de 2000) que estabelece os limites entre 4,0 e 6,2 (Brasil, 2000). Além disso, um trabalho realizado em 2019 por Silva e colaboradores avaliou 10 amostras de polpas de açaí compradas em pontos comerciais de Belém e submetidas ao processo de liofilização (da Silva *et al.*, 2019). Os valores de pH obtidos variaram entre 4,46 e 5,12, estando de acordo com o valor encontrado no presente trabalho. Esses resultados permitem concluir que ambos os processos de conservação, liofilização ou congelamento, não foram capazes de alterar o pH da fruta.

O teor de umidade da polpa do açaí foi igual a 88,33% \pm 1,15, resultando em sólidos totais (matéria seca) igual a 11,67%. Em um estudo conduzido por Nascimento e colaboradores,

o percentual de umidade encontrado para polpa de açaí congelado foi de $87,57 \pm 0,24\%$, mostrando um valor de 12,43% de matéria seca (Nascimento, 2021). Os dados encontrados em ambos os trabalhos estão de acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta que preconiza os limites de sólidos totais entre 8 e 14%.

O açaí possui um elevado índice calórico principalmente devido ao seu conteúdo lipídico (Oliveira *et al.*, 2006). Na análise da composição centesimal da polpa de açaí utilizada no presente estudo foi encontrado um teor de lipídeos na matéria seca igual a 39,16%. Este valor está dentro do limite indicado pela normativa 01, que estipula uma margem entre 20 a 60 gramas de lipídeos em 100 gramas de matéria seca (BRASIL, 2000). Além disso, valor semelhante (40,75%) foi encontrado por Menezes e colaboradores (2008) para polpa de açaí liofilizado (Menezes, Torres and Sabaa Srur, 2008).

Já foi demonstrado que o açaí é um alimento com teor relativamente baixo de carboidratos (Oliveira *et al.*, 2006). A análise dos carboidratos pelo método da diferença neste estudo revelou um valor igual a 39,93%. Como já é de conhecimento que o açaí é um alimento rico em fibras, e como estas não foram determinadas em nossas análises, especula-se que o teor de carboidratos esteja superestimado, uma vez que o teor de fibras foi incluído no cálculo dos açúcares totais.

As cinzas de um alimento são obtidas após a queima total da matéria orgânica em uma mufla a 550 °C, sendo composta por sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês e outros compostos minerais (Zambiasi, 2010). Apesar de a legislação brasileira não estabelecer nenhum limite para a presença desses resíduos inorgânicos na polpa do açaí comercializada, os dados encontrados no presente trabalho vão de encontro aos dados encontrados na literatura. O teor de cinzas presente na amostra utilizada nesse experimento foi igual a $4,12 \pm 0,02$. Para a polpa de açaí liofilizada, Menezes e colaboradores (2008) encontraram um teor de cinzas igual a $3,68 \pm 0,08$ (Menezes, Torres and Sabaa Srur, 2008). Já Mattietto e colaboradores (2016), ao analisarem o teor de cinzas de diferentes genótipos do açaí branco e roxo liofilizados, encontraram teor de cinzas entre 2,65 e 4,98, sendo o maior teor encontrado nos genótipos de açaí roxo (Mattietto *et al.*, 2016).

Já foi demonstrado que a capacidade antioxidante do açaí se deve ao seu elevado conteúdo de polifenóis, principalmente antocianinas (del Pozo-Insfran, Brenes and Talcott, 2004). O teor de polifenóis encontrado na polpa utilizada nesse trabalho foi igual a $198,77 \pm 1,63$ mg EAG/100 g de açaí. Maria do Socorro e colaboradores (2010) encontraram um valor igual a $454 \pm 44,6$ mg EAG/100 g para a polpa fresca do açaí (Maria do Socorro *et al.*, 2010).

Em um estudo conduzido por Heemann e colaboradores (2019) foi avaliada a estabilidade das antocianinas no extrato de açaí solúvel em diferentes condições de temperatura e na presença ou ausência de luz durante um período de 28 dias. Resultados deste trabalho mostraram que a estabilidade do extrato é dependente das condições do meio em que está inserido. Apesar das reações metabólicas acontecerem de forma mais lenta a temperaturas mais baixas, observou-se uma redução na concentração das antocianinas ao longo do tempo de armazenamento. Além disso, a incidência de luz no extrato também foi responsável pela redução nessa concentração (de Paula *et al.*, 2019).

No presente trabalho a caracterização antioxidante da polpa do açaí foi realizada dois anos após a infecção oral dos animais. Além disso, apesar das amostras estarem acondicionadas em freezer, elas não ficaram protegidas da luz, justificando um teor de polifenóis menor do que aquele observado por Maria do Socorro e colaboradores (2010).

Os métodos mais comuns para determinação da capacidade antioxidante são FRAP, ABTS, DPPH e ORAC. Devido às limitações e vantagens de cada metodologia, recomenda-se que sejam utilizadas pelo menos duas para obtenção de uma melhor análise antioxidante. A determinação do potencial antioxidante do açaí neste trabalho foi mensurada pelas técnicas ABTS e DPPH. O resultado obtido para a metodologia ABTS foi igual a $6,74 \pm 0,27$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ e para DPPH foi igual a $46360,33 \pm 76,57$ g de fruta/g de DPPH. Além disso, o IAA encontrado foi igual a $0,00018 \pm 0,000005$, o que caracteriza o extrato do açaí como pobre capacidade antioxidante (Scherer and Godoy, 2009).

Maria do Socorro e colaboradores (2010) ao determinarem a capacidade antioxidante da polpa fresca do açaí utilizando as metodologias ABTS e DPPH, encontraram valores iguais a $15,1 \pm 4,1$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ e 4264 ± 1381 g de fruta/g de DPPH, respectivamente (Maria do Socorro *et al.*, 2010). Uma vez que o método de extração dos antioxidantes presentes nas amostras de ambos os estudos citados anteriormente foi o mesmo, a discrepância nos resultados obtidos pode ser explicada pelas condições de processamento e armazenamento. O açaí utilizado no presente estudo foi submetido ao processo de branqueamento e ficou armazenado em freezer a -20 °C por mais de dois anos, enquanto o estudo de Maria do Socorro (2010) utilizou a polpa fresca. Além disso, Olsson e colaboradores (2004) ao avaliarem a capacidade antioxidante de morangos obtidos de diferentes locais de cultivo, com diferentes graus de amadurecimento e submetidos a diferentes condições de armazenamento, observaram que a capacidade antioxidante total é diretamente proporcional ao grau de amadurecimento do fruto e inversamente proporcional ao tempo de armazenamento do mesmo (Olsson *et al.*, 2004).

Para avaliar como o meio no qual o parasito é inserido pode impactar no curso da infecção oral no hospedeiro vertebrado, camundongos BALB/c foram infectados com 100.000 formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou em Açaí. Uma das características dos surtos orais é a grande quantidade de parasitos que são ingeridos junto aos alimentos ou bebidas. Por essa razão justifica-se o inóculo de 10 a 20 vezes maior do que o utilizado em estudos do nosso grupo de pesquisa que mimetizaram a infecção pela via vetorial (Carneiro *et al.*, 2007; de Souza Marques *et al.*, 2021; Fonseca *et al.*, 2021).

Na literatura, os poucos estudos que avaliam o impacto da infecção oral experimental diferem quanto a maneira de realizar o inóculo (gavagem incompleta ou orofaríngea; gavagem completa ou intragástrica; ou ainda inóculo feito diretamente na cavidade bucal) (Kirchhoff and Hoft, 1990; Hoft *et al.*, 1996; Camandaroba, Pinheiro Lima and Andrade, 2002). Essa divergência na forma de realizar o inóculo impacta diretamente na taxa de infectividade. Em um estudo feito em nosso grupo de pesquisa, foi realizada a padronização do inóculo pela via oral. Taxa de infectividade igual a 100% foi obtida com as vias de inóculo orofaríngea e cavidade bucal, utilizando o meio RPMI. Para o inóculo intragástrico, as taxas de infectividade variaram de 22 a 75% (Carvalho *et al.*, 2020; Carvalho, 2020). Além disso, Barreto de Albuquerque e colaboradores (2015) mostraram que camundongos BALB/c infectados na cavidade bucal apresentaram maior parasitemia, taxa de mortalidade e maior produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , do que àqueles animais infectados pela via intragástrica (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015; Barreto de Albuquerque *et al.*, 2018).

Dessa forma, para o presente trabalho estabeleceu o inóculo diretamente na cavidade bucal como forma de mimetizar o inóculo pela via oral. Para maior conforto dos animais os volumes de inóculo foram ajustados a não exceder 0,2 mL. Os animais infectados em meio RPMI tiveram uma taxa de infectividade de 55,7%, enquanto nos animais infectados com Açaí esse percentual foi de 50%. Uma das prováveis explicações para a baixa infectividade do grupo Açaí baseia-se no pH. Alguns estudos já demonstraram que o meio ácido é capaz de causar perda de motilidade e morte dos parasitos (Hoft *et al.*, 1996; Neira *et al.*, 2003).

Além disso, Dias e colaboradores em 2013, mostraram que o volume do inóculo de *T. cruzi* quando administrado pela via intragástrica influencia na taxa de infectividade. Este trabalho demonstrou que camundongos infectados pela via oral com um inóculo de 1,0 mL apresentaram maior taxa de infectividade e parasitemia do que aqueles animais infectados com um inóculo de 0,1 mL. Um maior volume de inóculo pode estar associado a uma diluição do suco gástrico, levando ao aumento do pH e favorecendo a infecção (Dias *et al.*, 2013).

De acordo com alguns autores a taxa de mortalidade observada nos casos sintomáticos dos surtos agudos orais é maior do que aquela observada nas infecções crônicas (Pereira *et al.*, 2009; Alarcón de Noya *et al.*, 2010; de Noya and González, 2015; Noya *et al.*, 2015; Silva-dos-Santos *et al.*, 2017) e são frequentemente associadas à quantidade de parasitos ingeridos (Franco-Paredes *et al.*, 2020). Para o grupo RPMI a taxa de sobrevivida foi igual a 83%, o que representa uma taxa de mortalidade igual a 17%. No entanto, para o grupo Açai a taxa de sobrevivida foi igual a 98%, resultado em uma mortalidade de 2%. Barreto de Albuquerque e colaboradores (2015) ao infectarem camundongos BALB/c também pela cavidade bucal com um inóculo de 50.000 tripomastigotas da cepa Tulahúen (DTU VI) do *T. cruzi*, observaram uma taxa de mortalidade igual a 85% (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015). Em um estudo conduzido por Camandaroba e colaboradores (2002), camundongos *Swiss* foram infectados com 50.000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas colombiana (DTU I) e peruana (DTU II) do *T. cruzi* pela via intragástrica. Para os animais infectados com a cepa Colombiana não foi observado mortalidade, já para os animais infectados com a cepa Peruana, esta foi igual a 20% (Camandaroba, Pinheiro Lima and Andrade, 2002). A discrepância nos dados apresentados demonstra que fatores como tamanho e via de inóculo, forma evolutiva e cepa utilizada podem influenciar no curso da infecção, e ressaltam a necessidade de padronização desses parâmetros para a infecção oral experimental do *T. cruzi*.

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada pela presença de sinais e sintomas inespecíficos e muitas vezes comuns à outras enfermidades, como febre e dispneia, o que dificulta o diagnóstico (Bastos *et al.*, 2010; de Noya *et al.*, 2016; Rincón-Acevedo *et al.*, 2021). Essa fase também caracterizada por parasitemia patente e parasitismo tecidual (Andrade and Andrews, 2005). No nosso trabalho, apesar das curvas de parasitemia serem semelhantes para os grupos infectados, o período pré-patente no grupo Açai foi mais longo (11 dias), o que sugere uma infecção mais silenciosa. Em um trabalho feito por Fonseca e colaboradores em camundongos *Swiss* infectados 5.000 formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* pela via intraperitoneal apresentaram um período pré-patente mais longo (18 dias) do que o observado no presente trabalho para ambos os grupos infectados. No entanto, apesar do inóculo utilizado ser 20 vezes menor do que o utilizado por nós, o pico máximo de parasitos foi igual a 568.800 parasitos/0,1 mL de sangue. Já foi observado por diferentes estudos que a infecção por vias parenterais (intravenosa, subcutânea e intramuscular) é responsável por elevados níveis de parasitemia, infecção e mortalidade quando comparados à infecção por vias mucosas (oral, intragástrica, intrarectal, conjuntival ou genitália) (Marsden, 1967; Caradonna and Pereira Perrin,

2009; de Meis *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2013). Na infecção pela via oral, o período pré-patente mais longo e um pico de parasitemia com menos formas circulantes podem ser resultado das barreiras físicas e químicas que o parasito enfrenta para alcançar a corrente sanguínea (Carvalho *et al.*, 2020).

Na literatura há muita controvérsia sobre qual seria a local de entrada do *T. cruzi* na infecção oral. No presente trabalho observamos que a carga parasitária na bochecha e no coração de camundongos infectados em açai é muito baixa ao longo dos dias observados. Além disso, no estômago só ocorre um estabelecimento da infecção no grupo Açai no 14 DAI. Esses dados estão de acordo com Hoft e colaboradores (1996) que mostraram que o *T. cruzi* é capaz de invadir e se replicar no epitélio da mucosa gástrica, mas não na mucosa orofaríngea ou esofágica (Hoft *et al.*, 1996). Esse achado pode ser justificado pelo fato de que formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* expressam em suas membranas glicoproteínas, como a gp82, que interagem especificamente com a mucosa gástrica levando à invasão e replicação do parasito neste local, com posterior disseminação sistêmica (Cortez *et al.*, 2003; Staquicini *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2016). De fato, foi observado aumento do parasitismo no coração nos dias 7 e 14 após a infecção e na bochecha no décimo quarto dia.

Apesar de ter sido detectado DNA do *T. cruzi* no estômago ao longo de todo o período avaliado, foi observada presença de processo inflamatório, em ambos os grupos, apenas nos dias 2 e 5 após a infecção. A ausência do processo inflamatório nos demais dias avaliados pode estar associado à produção da citocina IL-17 A. O envolvimento desta citocina já está bem estabelecido em infecções bacterianas através de mucosas (intranasal ou oral), como ocorre na infecção por *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* e *Francisella tularensis* (Hu and Pasare 2013). Os antígenos entregues na mucosa promovem uma produção de IL-17, o que também foi observado por Barreto de Albuquerque e colaboradores (2015) na infecção pelo *T. cruzi* (Hu and Pasare, 2013; Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015).

O papel inflamatório desta citocina é bem descrito, uma vez que está envolvida na secreção de metaloproteinases, mucinas e citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1 e TNF. Além disso, essa citocina atua no controle da infecção pelo *T. cruzi* através do recrutamento e ativação de neutrófilos (Weaver *et al.*, 2007).

É de conhecimento que durante a infecção pelo *T. cruzi* o controle da infecção sem grandes danos colaterais ao hospedeiro é resultado do equilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias, que vão levar à morte do parasito, e anti-inflamatórias, responsáveis por limitar o dano tecidual. Em um estudo conduzido por (Tosello Boari *et al.*, 2012), ficou evidente o

papel anti-inflamatório da IL-17A. Esse estudo mostrou que camundongos *knockout* para o receptor da citocina IL-17A apresentaram maior taxa de mortalidade, e uma produção exacerbada de IFN- γ e TNF em relação à camundongos *wildtype* (WT). Além disso, camundongos WT apresentaram infiltrado inflamatório rico em neutrófilos. Nesse estudo foi observado que a citocina IL-17A foi responsável por regular a produção de IFN- γ , limitando o dano tecidual, além de recrutar neutrófilos produtores de IL-10 (Tosello Boari *et al.*, 2012).

Já foi demonstrado que durante a infecção pelo *T. cruzi* a citocina imunomoduladora IL-10 é necessária para redução dos danos teciduais e da mortalidade (Hunter *et al.*, 1997; Hölscher *et al.*, 2000). Dessa forma o controle do processo inflamatório no grupo RPMI após o quinto dia após a infecção pode estar associado ao aumento dos níveis da citocina IL-17A e consequentemente da citocina IL-10 nos primeiros dias de infecção. Além disso, a presença de IL-17 já foi associada à formação de uma barreira gastrointestinal, por meio de diferentes mecanismos, que ao serem ativados resultam em uma resposta da mucosa voltada para eliminação de patógenos (Blaschitz and Raffatellu, 2010).

Já no grupo Açai, a ausência de infiltrado inflamatório nos últimos dias avaliados pode ser explicado pela ação antioxidante da fruta. Já foi demonstrado que o único flavonoide já extraído, a velutina, mostrou capacidade anti-inflamatória por reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF. De fato, foi observado níveis reduzidos de TNF no grupo Açai em todos os dias de avaliação em relação ao grupo controle (Buratto, Cocero and Martín, 2021).

A análise do proteoma de animais não infectados e infectados após 5 dias após a infecção foi capaz de fornecer dados que ajudam a explicar a dinâmica do parasitismo tecidual e do processo inflamatório. Os dados gerados pelo *heatmap* foi capaz de identificar 110 proteínas diferencialmente abundantes em todos os grupos experimentais. Os grupos Controle e Açai compartilharam 37 dessas proteínas, dentre as quais podemos destacar diferentes tipos de queratina do citoesqueleto.

Queratinas são proteínas típicas do filamento intermediário do epitélio (Owens and Lane, 2004). Diferentes estudos já demonstraram a sua importância para estabilidade mecânica e manutenção da integridade de células epiteliais (Moll, Divo and Langbein, 2008). Além disso, já foi demonstrado que a produção de diferentes tipos de queratina leva à polarização de macrófagos ao fenótipo M2, que tem como característica produção de IL-10 e diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1b e IL-6, acelerando assim o reparo tecidual (Waters, VandeVord and Van Dyke, 2018; Fearing and Van Dyke, 2014). Somando-se a isso nos grupos

controle e Açai também foi observado maior abundância da proteína Mucina 16, que está associada à regulação negativa da produção de IL-6 e ao reparo tecidual. Em conjunto, um aumento na produção de queratinas tipo II do citoesqueleto e um aumento da produção da Mucina 16 no quinto dia após a infecção podem estar relacionados com a diminuição do processo inflamatório no grupo Açai.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é caracterizado por uma fase intracelular obrigatória no hospedeiro vertebrado. O processo de invasão celular é constituído por 4 etapas diferentes: mobilização, adesão, reconhecimento e internalização. Durante o processo de mobilização, formas tripomastigotas podem se ligar à diferentes componentes da matriz extracelular em direção às células do hospedeiro vertebrado (Rodríguez-Bejarano, Avendaño and Patarroyo, 2021). Além disso, para um processo de invasão eficiente, deve ocorrer um rearranjo nos componentes do citoesqueleto do hospedeiro vertebrado. Nos grupos controle e Açai foram observadas maior abundância de proteínas relacionadas a organização do citoesqueleto e da matriz extracelular, e regulação negativa da adesão celular, como a Tubulina b-2, Hemartina, Fibulina. Já foi demonstrado experimentalmente que o bloqueio farmacológico da estabilidade da dinâmica dos microtúbulos por sua interação com as tubulinas da célula do hospedeiro foi responsável por reduzir a invasão parasitária em células não fagocíticas como fibroblastos e miócitos (Rodriguez *et al.*, 1996). Dessa forma, uma menor abundância dessas proteínas no grupo RPMI pode estar relacionada à maior infectividade observada nesse grupo.

A avaliação proteômica mostrou também que animais pertencentes aos grupos infectados Açai e RPMI compartilharam 57 proteínas, entre as quais destacamos um aumento na abundância da Proteína 1 de domínio LIM e SH3, Galectina-2, Quitinase ácida de mamífero, Trefoil-1 e Gastrocina-1.

Como dito anteriormente, o sucesso da invasão celular pelo *T. cruzi* depende da interação do parasito com componentes do citoesqueleto. Os filamentos de actina devem ser reorganizados em um processo mediado por Ca^{2+} para facilitar a internalização do parasita (Rodríguez-Bejarano, Avendaño and Patarroyo, 2021). A proteína 1 de domínio LIM e SH3 se acumula em adesões focais permitindo adesão, migração e comunicação celular ao se ligar aos filamentos de actina (Orth *et al.*, 2015). Dessa forma um aumento dessa proteína nos grupos infectados pode estar relacionado ao processo de internalização do *T. cruzi*.

Galectina-2 é uma proteína altamente expressa no trato gastrointestinal, sendo também encontrada em outros tecidos como a placenta e no sistema cardiovascular. Esta proteína já foi associada à regulação de diferentes condições fisiológicas e patológicas, como a manutenção

da integridade da camada epitelial, processo inflamatório, resposta imune e apoptose (Negedu, Duckworth and Yu, 2022). Além disso, distúrbios na sua produção já foram relacionados a doenças inflamatórias intestinais, distúrbios na gravidez, e à diferentes tipos de câncer (Paclik *et al.*, 2008; Sindrewicz, Lian and Yu, 2016; Meister *et al.*, 2022). Um estudo conduzido por Paclik e colaboradores (2011) abordou a relação da Galectina-2 com o sistema imune (Paclik *et al.*, 2011). Essa proteína foi capaz de se ligar à glicoproteínas presentes em células T, levando a um aumento da produção de IL-10 e IFN- γ , resultando na apoptose dessas células. No grupo RPMI foi observado um aumento na produção dessas duas citocinas, o que pode ter contribuído para diminuição do processo inflamatório pela eliminação das células infectadas pelo *T. cruzi*.

A Quitinase ácida de mamíferos (CHIA) é uma enzima encontrada no pulmão e no trato gastrointestinal de humanos e camundongos. Já foi demonstrado que essa enzima se encontra aumentada em células epiteliais e em macrófagos durante a infecção gastrointestinal de helmintos, conferindo um papel protetor ao hospedeiro direcionando a resposta inflamatória para o subtipo Th2. Durante a infecção, ocorre produção de IL-13 concomitantemente ao aumento da produção de muco na tentativa de eliminar o parasito (Vannella *et al.*, 2016). Dessa forma, tendo em vista o papel da CHIA na resposta imune a parasitas gastrointestinais, essa enzima pode representar um alvo importante no diagnóstico de doenças gastrointestinais (Hu *et al.*, 2021). No nosso trabalho foi observado aumento dessa enzima no estômago de animais em ambos os grupos infectados. Este aumento pode estar relacionado a um mecanismo de proteção do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, o aumento da CHIA observado apenas nos grupos infectados torna essa enzima uma possível candidata a biomarcador da infecção oral pelo *T. cruzi*.

Um outro possível candidato a biomarcador da infecção oral pelo *T. cruzi* é a proteína Trefoil fator-1 (TFF1). Essa é uma proteína expressa principalmente no epitélio gástrico e tem como função a manutenção da integridade da mucosa (Esposito *et al.*, 2015). No entanto, alguns estudos já demonstraram uma relação entre doenças inflamatórias intestinais como pancreatite crônica, esôfago de Barrett, úlcera péptica, doença inflamatória intestinal, e um aumento exacerbado na produção de TFF1 por meio de mecanismos ainda não totalmente elucidados (Koike *et al.*, 2007). No nosso trabalho foi observado um grande aumento na abundância de TFF1 em ambos os grupos infectados, sem aumento no grupo controle. Esse aumento pode ter sido gerado em resposta ao dano tecidual provocado na tentativa de eliminação do *T. cruzi*, a fim de se manter a integridade do epitélio gastrointestinal.

Nos grupos infectados RPMI e Açai, foi encontrada uma maior abundância da proteína

específica do estômago, Gastrocina-1 (GKN1). O papel biológico desta proteína ainda é pouco conhecido. Alguns estudos indicam que a GKN1 atua no reparo da mucosa gástrica após lesão tecidual por meio de proliferação e diferenciação celular. Devido a esse importante papel na mucosa gástrica, alguns trabalhos sugerem a GKN1 como importante biomarcador para o câncer gástrico (Yoshihara *et al.*, 2006; Moss *et al.*, 2008). Toback e colaboradores (2003) e Walsh-Reitz e colaboradores (2005) mostraram que a aplicação de GNKI às células gastrointestinais levou à restauração do epitélio em camundongos submetidos à lesão epitelial do cólon (Toback *et al.*, 2003; Walsh-Reitz *et al.*, 2005). Nesse sentido, o aumento dessa proteína no presente trabalho pode ser associado à uma tentativa de restaurar a integridade da mucosa gástrica após injúria tecidual causada pelo *T. cruzi*. Visto que nos animais controles não há aumento na abundância desta proteína, a GNK1 se torna um potencial biomarcador para doença de Chagas oral.

Embora alguns trabalhos que avaliaram tanto o modelo humano quanto o modelo animal apontem uma relação positiva entre parasitismo tecidual, processo inflamatório e a gravidade da doença (Borges *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2013), a mesma associação não foi encontrada ao avaliar o tecido cardíaco no presente trabalho.

A análise da carga parasitária no coração foi capaz de detectar DNA do *T. cruzi* em todos os dias avaliados, e ainda mostrou aumento do parasitismo tecidual no grupo Açai em relação ao grupo RPMI no 7º DAI, já no 14º há uma inversão, sendo o grupo RPMI com maior carga. No entanto, não foi observado presença de processo inflamatório em nenhum dos dias observados, apesar de terem sido encontrados ninhos de amastigotas no grupo RPMI no 14º DAI. Após a fagocitose do parasito por macrófagos, a enzima NADPH oxidase é ativada levando à produção do radical superóxido (O_2^-) que dentro do fagolisossomo pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, outros radicais livres secundários são gerados criando um ambiente extremamente oxidante, podendo causar danos celulares e a morte do parasito dentro do fagolisossomo. Para sobreviver a esse ambiente oxidante o *T. cruzi* conta com uma complexa rede de enzimas antioxidantes como peroxidases e superóxido dismutases. A catalase é uma peroxidase que tem como função a detoxificação das células por meio da decomposição do H_2O_2 , formando gás oxigênio e água. No presente trabalho, animais infectados pelo *T. cruzi*, independente do meio utilizado, mostraram um aumento da atividade da catalase em relação aos animais controle. Esse aumento pode estar relacionado com o mecanismo de defesa do parasito para se evadir do sistema imune do hospedeiro e pode estar relacionado com a ausência do processo inflamatório no coração.

A ausência de processo inflamatório no tecido cardíaco no grupo RPMI, mesmo que tenha sido observado aumento da carga parasitária nesse órgão, pode ser também explicada pelo aumento da produção da citocina IL-17 nos dias 2 e 7 após a infecção. Apesar desta citocina ter reconhecida ação pró-inflamatória, alguns estudos já demonstraram que quando produzida na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é capaz de controlar a inflamação cardíaca (Guedes *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2010) bem como foi observado no presente estudo.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos afirmar que a infecção oral experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em Açaí ocorre de forma mais silenciosa com um período pré-patente de parasitemia mais longo. No grupo RPMI o estabelecimento da infecção no estômago ocorre no quinto dia após a infecção. No entanto, no grupo Açaí a infecção se apresenta de forma subclínica com o estabelecimento da infecção no estômago apenas no décimo quarto após a infecção. Esses achados relacionam-se com os dados da quantificação de citocinas e da proteômica, uma vez que se observou no estômago de animais infectados em Açaí um perfil de regulação negativa na produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o proteoma se assemelha ao proteoma do grupo Controle, com um aumento da abundância de proteínas que parecem dificultar a invasão pelo *Trypanosoma cruzi*.

8. BIBLIOGRAFIA

Aebi, H. (1984) '[13] Catalase in vitro', *Methods in enzymology*: Elsevier, pp. 121-126.

Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J. A., Abate, T., Naranjo, L. and Paiva, M. (2010) 'Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela', *The Journal of infectious diseases*, 201(9), pp. 1308- 1315.

Anderson, N. L. and Anderson, N. G. (1998) 'Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words', *Electrophoresis*, 19(11), pp. 1853-1861.

Andrade, L. O. and Andrews, N. W. (2005) 'The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention', *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), pp. 819.

Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. and Rasool, M. H. (2016) 'Proteomics: technologies and their applications', *Journal of chromatographic science*, pp. 1-15.

Barbosa, R. L., Dias, V. L., Lorosa, E. S., de Góes Costa, E., Pereira, K. S., Gilioli, R., Guaraldo, A. M. A. and Passos, L. A. C. (2019) 'Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açai pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil', *Experimental Parasitology*, 197, pp. 68-75.

Barreto-de-Albuquerque, J., Silva-dos-Santos, D., Pérez, A. R., Berbert, L. R., Santana-van-Vliet, E. d., Farias-de-Oliveira, D. A., Moreira, O. C., Roggero, E., Carvalho-Pinto, C. E. d. and Jurberg, J. (2015) '*Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new diseaseform from an old infection?', *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6), pp. e0003849.

Barreto de Albuquerque, J., Silva dos Santos, D., Stein, J. V. and de Meis, J. (2018) 'Oral versus intragastric inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental infection? From target tissues, parasite evasion, and immune response', *Frontiers*

Barrias, E. S., Carvalho, T. M. U. and De Souza, W. (2013) '*Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation', *Frontiers in immunology*, 4, pp. 186.

Bastos, C. J., Aras, R., Mota, G., Reis, F., Dias, J. P., de Jesus, R. S., Freire, M. S., De Araújo, E. G., Prazeres, J. and Grassi, M. F. R. (2010) 'Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil', *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6).

Blaschitz, C. and Raffatellu, M. (2010) 'Th17 cytokines and the gut mucosal barrier', *Journal of clinical immunology*, 30, pp. 196-203.

Borges, D. C., Araújo, N. M., Cardoso, C. R. and Lazo Chica, J. E. (2013) 'Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection', *Immunology*, 138(2), pp. 145-156.

Brener, Z. (1962) 'Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4(6), pp. 389-96.

Brener, Z. (1973) 'Biology of *Trypanosoma cruzi*', *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), pp. 347-382. Buege, J. A. (1978) 'Microsomal lipid peroxidation', *Methods in enzymology*, 52, pp. 302-310.

Buratto, R. T., Cocero, M. J. and Martín, Á. (2021) 'Characterization of industrial acai pulp residues and valorization by microwave-assisted extraction', *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 160, pp. 108269.

Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasc, A. C. and Di Noia, J. M. (2006) '*Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity', *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), pp. 229-236.

Calvet, C. M., Melo, T. G., Garzoni, L. R., Oliveira-Jr, F. O. R., Neto, S., Teixeira, D., Meirelles, M. d. N.S. L. and Pereira, M. C. D. S. (2012) 'Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction', *Frontiers in immunology*, 3, pp. 327.

Camandaroba, E. L. P., Pinheiro Lima, C. M. and Andrade, S. G. (2002) 'Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, pp. 97-103.

Caradonna, K. and PereiraPerrin, M. (2009) 'Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*', *Infection and immunity*, 77(4), pp. 1349-1356.

Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L. and Bartholomeu, D. C. (2016) 'Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection', *Frontiers in Immunology*, 6, pp. 659.

Carneiro, C. M., Martins-Filho, O. A., Reis, A. B., Veloso, V. M., Araújo, F. M. G., Bahia, M. T., de Lana, M., Machado-Coelho, G. L. L., Gazzinelli, G. and Correa-Oliveira, R. (2007) 'Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs', *Acta tropica*, 101(2), pp. 120-129.

Carvalho, L. M., de Carvalho, T. V., Ferraz, A. T., de Souza Marques, F., Roatt, B. M., da Silva Fonseca, K., Reis, L. E. S., Carneiro, C. M. and de Abreu Vieira, P. M. (2020) 'Histopathological changes in the gastrointestinal tract and systemic alterations triggered by experimental oral infection with *Trypanosoma cruzi*', *Experimental Parasitology*, 218, pp. 108012.

Carvalho, T. V. d. (2020) 'Lesões cardíacas associadas à infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos'.

Chagas, C. (1909) 'Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp. 159-218.

Correa Passos, L. A., Aparecida Guaraldo, A. M., Barbosa, R. L., Dias, V. L., Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Bueno Franco, R. M. and Alves, D. P. (2012) 'Survival and infectivity of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp: in vitro and in vivo study', *Epidemiologia e servicos de saude*, 21(2), pp. 223-232.

Cortez, M., Neira, I., Ferreira, D., Luquetti, A. O., Rassi, A., Atayde, V. D. and Yoshida, N. (2003) 'Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30', *Infection and immunity*, 71(11), pp. 6184-6191.

Coscia, F., Doll, S., Bech, J. M., Schweizer, L., Mund, A., Lengyel, E., Lindebjerg, J., Madsen, G. I., Moreira, J. M. and Mann, M. (2020) 'A streamlined mass spectrometry-based proteomics workflow for large-scale FFPE tissue analysis', *The Journal of pathology*, 251(1), pp. 100-112.

Coura, J. (2006) 'Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39, pp. 113-117.

Coura, J. R. (2007) 'Chagas disease: what is known and what is needed-A background article', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, pp. 113-122.

Coura, J. R. (2014) 'The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, pp. 277-282.

Coura, J. R. and Dias, J. C. P. (2009) 'Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, pp. 31-40.

Coura, J. R. and Viñas, P. A. (2010) 'Chagas disease: a new worldwide challenge', *Nature*, 465(n7301_supp), pp. S6-S7.

da Silva Monteiro, V., D. R. T. de Sousa, M. d. G. V. B. Guerra, B. C. de Albuquerque and J. A. de Oliveira Guerra "Avaliação do surto de doença de Chagas aguda (DCA) EM Lábrea-Amazonas."

da Silva, W. B. C., Carvalho, A. V., William Bonny Chagas da Silva, G. U. and Carvalho, A. V. (2019) 'Avaliação físico-química de polpas comerciais de açai'.

de Lima Yamaguchi, K. K., Pereira, L. F. R., Lamarão, C. V., Lima, E. S. and da Veiga-Junior, V. F. (2015) 'Amazon acai: chemistry and biological activities: a review', *Food chemistry*, 179, pp. 137-151.

de Meis, J., Barreto de Albuquerque, J., Silva dos Santos, D., Farias-de-Oliveira, D. A., Berbert, L. R., Cotta-de-Almeida, V. and Savino, W. (2013) '*Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice', *Frontiers in immunology*, 4, pp. 216.

de Noya, B. A., Colmenares, C., Díaz-Bello, Z., Ruiz-Guevara, R., Medina, K., Muñoz-

Calderón, A., Mauriello, L., Cabrera, E., Montiel, L. and Losada, S. (2016) 'Orally-transmitted Chagas disease: epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela', *Parasite epidemiology and control*, 1(2), pp. 188-198.

de Noya, B. A. and González, O. N. (2015) 'An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission', *Acta tropica*, 151, pp. 94-102.

de Paula, A. G. P., Heemann, A. C. W., Heemann, R. and de Lima, C. P. (2019) 'Avaliação da estabilidade das antocianinas do açaí no período de 28 dias em diferentes condições/Evaluation of the stability of the anthocyanins of açaí in the period of 28 days under different conditions', *Brazilian Journal of Health Review*, 2(5), pp. 4811-4823.

de Souza Marques, F., Duarte, T. H. C., Xavier, V. F., Ferraz, A. T., das Mercês, A. C., Silva, T. V. C., Mendes, L. C., da Fonseca Medeiros, L., Perin, L. and Mathias, F. A. S. (2021) 'Different infective forms trigger distinct lesions in the colon during experimental Chagas disease', *Parasitology Research*, 120, pp. 3475-3486.

De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. and Barrias, E. S. (2010) 'Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction', *International journal of cell biology*, 2010.

del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H. and Talcott, S. T. (2004) 'Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), pp. 1539- 1545.

Derrien, M., van Passel, M. W., van de Bovenkamp, J. H., Schipper, R., de Vos, W. and Dekker, J. (2010) 'Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract', *Gut microbes*, 1(4), pp. 254-268.

Dias, G. B. M., Gruending, A. P., Araújo, S. M., Gomes, M. L. and de Ornelas Toledo, M. J. (2013) 'Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II', *Experimental parasitology*, 135(3), pp. 511-517.

Dias, J. C. P. (2000) 'Epidemiological surveillance of Chagas disease', *Cadernos de Saúde Pública*, 16, pp. S43-S59.

Dias, J. C. P. (2006) 'Doença de Chagas: sucessos e desafios', *Cadernos de Saúde Pública*, 22, pp. 2020- 2020.

Dias, J. C. P., Silveira, A. C. and Schofield, C. J. (2002) 'The impact of Chagas disease control in Latin America: a review', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), pp. 603-612.

Dias, J. P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A. V., Martins Netto, E., Grassi, F., Silva, M., Tatto, E., Mendonça, J. and Araújo, R. F. (2008) 'Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(3), pp. 296-300.

Diaz-Ungría, C. (1968) 'Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión', *Kasmera*, 3, pp. 73-88.

- Díaz-Ungría, C. and Bracho, J. (1970) 'Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectados por vía bucal: nuevos estudios', *Revista Veterinaria Venezolana*, 29(171), pp. 271.
- Dorn, P. L., Perniciaro, L., Yabsley, M. J., Roellig, D. M., Balsamo, G., Diaz, J. and Wesson, D. (2007) 'Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana', *Emerging infectious diseases*, 13(4), pp. 605.
- Díaz, M. L. and González, C. I. (2014) 'Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente', *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 46(2), pp. 177-188.
- Díaz-Albiter, H. M., Ferreira, T. N., Costa, S. G., Rivas, G. B., Gumiel, M., Cavalcante, D. R., Pavan, M. G., Gonzalez, M. S., De Mello, C. B. and Dillon, V. M. (2016) 'Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines', *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 1-8.
- Esposito, R., Montefusco, S., Ferro, P., Monti, M. C., Baldantoni, D., Tosco, A. and Marzullo, L. (2015) 'Trefoil Factor 1 is involved in gastric cell copper homeostasis', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 59, pp. 30-40.
- Fearing, B. V. and Van Dyke, M. E. (2014) 'In vitro response of macrophage polarization to a keratin biomaterial', *Acta biomaterialia*, 10(7), pp. 3136-3144.
- Fonseca, K. d. S., Perin, L., de Paiva, N. C. N., da Silva, B. C., Duarte, T. H. C., Marques, F. d. S., Costa, G. d. P., Molina, I., Correa-Oliveira, R. and Vieira, P. M. d. A. (2021) 'Benznidazole treatment: time- and dose-dependence varies with the *Trypanosoma cruzi* strain', *Pathogens*, 10(6), pp. 729.
- Franco-Paredes, C., Villamil-Gómez, W. E., Schultz, J., Henao-Martínez, A. F., Parra-Henao, G., Rassi Jr, A., Rodríguez-Morales, A. J. and Suarez, J. A. (2020) 'A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America—Public health and travel medicine importance', *Travel medicine and infectious disease*, 36, pp. 101565.
- Freire-de-Lima, L., Fonseca, L., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L. and Previato, J. (2015) 'The trans- sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: three decades of studies', *Glycobiology*, 25(11), pp. 1142-1149.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P. and Amiot, M. J. (2005) 'Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products', *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), pp. 1370-1373.
- Guedes, P. M. d. M., Gutierrez, F. R., Maia, F. L., Milanezi, C. M., Silva, G. K., Pavanelli, W. R. and Silva, J. S. (2010) 'IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis', *PLoS neglected tropical diseases*, 4(2), pp. e604.
- Gürtler, R. E., Segura, E. L. and Cohen, J. E. (2003) 'Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina', *Emerging infectious diseases*, 9(1), pp. 29.
- Hernández, L. M. 'Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008'.

- Hoft, D. F., Farrar, P. L., Kratz-Owens, K. and Shaffer, D. (1996) 'Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses', *Infection and immunity*, 64(9), pp. 3800- 3810.
- Hu, C., Ma, Z., Zhu, J., Fan, Y., Tuo, B., Li, T. and Liu, X. (2021) 'Physiological and pathophysiological roles of acidic mammalian chitinase (CHIA) in multiple organs', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, pp. 111465.
- Hu, W. and Pasare, C. (2013) 'Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses', *Journal of leukocyte biology*, 94(3), pp. 409-421.
- Hunter, C. A., Ellis-Neyes, L. A., Slifer, T., Kanaly, S., Grünig, G., Fort, M., Rennick, D. and Araujo, F. G. (1997) 'IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(7), pp. 3311-3316.
- Hölscher, C., Mohrs, M., Dai, W. J., Köhler, G., Ryffel, B., Schaub, G. A., Mossmann, H. and Brombacher, F. (2000) 'Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice', *Infection and immunity*, 68(7), pp. 4075-4083.
- JC, P. D. (1995) 'Natural history of Chagas disease', *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 65(4), pp. 359-366.
- Kayama, H. and Takeda, K. (2010) 'The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection', *Microbes and infection*, 12(7), pp. 511-517.
- Kirchhoff, L. and Hoft, D. (1990) 'Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*', *Parasite immunology*, 12(1), pp. 65-74.
- Koike, T., Shimada, T., Fujii, Y., Chen, G., Tabei, K., Namatame, T., Yamagata, M., Tajima, A., Yoneda, M. and Terano, A. (2007) 'Up-regulation of TFF1 (pS2) expression by TNF- α in gastric epithelial cells', *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(6), pp. 936-942.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. and Fett, R. (2005) 'Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos', *Food Science and Technology*, 25, pp. 726-732.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P. and Saura-Calixto, F. (1997) 'Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels', *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(4), pp. 1390-1393.
- Lemos, J. R. D., Rodrigues, W. F., Miguel, C. B., Parreira, R. C., Miguel, R. B., de Paula Rogerio, A., Oliveira, C. J. F. and Chica, J. E. L. (2013) 'Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*', *PloS one*, 8(8), pp. e71772.
- Maeda, F. Y., Clemente, T. M., Macedo, S., Cortez, C. and Yoshida, N. (2016) 'Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients', *Parasites & Vectors*, 9, pp. 1-12.

Maeda, F. Y., Cortez, C. and Yoshida, N. (2012) 'Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion', *Frontiers in immunology*, 3, pp. 361

Magalhães, L. M., Villani, F. N., Nunes, M. d. C. P., Gollob, K. J., Rocha, M. O. and Dutra, W. O. (2013) 'High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease', *The Journal of infectious diseases*, 207(4), pp. 661-665.

Maria do Socorro, M. R., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. and Mancini-Filho, J. (2010) 'Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil', *Food chemistry*, 121(4), pp. 996-1002.

Marklund, S. and Marklund, G. (1974) 'Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase', *European journal of biochemistry*, 47(3), pp. 469-474.

Marsden, P. (1967) '*Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice: II.—Infections induced by different routes', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 61(1), pp. 62-67.

Mattietto, R. d. A., Carvalho, A., Lanes, J., de Oliveira, M., Rosário, V., Julieta, D. J. D. S. N., Maria, D. S. P. D. O. and Rosário, V. N. 'Composição química e nutricional da polpa de açaí: comparação entre as variedades roxa e branca'. *XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Gramado: SBCTA Regional*. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150120/1/CBCTA-ID-948.pdf>.

Meister, S., Hahn, L., Beyer, S., Mannewitz, M., Perleberg, C., Schnell, K., Anz, D., Corradini, S., Schmoeckel, E. and Mayr, D. (2022) 'Regulatory T cell apoptosis during preeclampsia may be prevented by Gal-2', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), pp. 1880.

Menezes, E. M. d. S., Torres, A. T. and Sabaa Srur, A. U. (2008) 'Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada', *Acta amazônica*, 38, pp. 311-316.

Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y. and Yoshida, H. (2010) 'IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection', *The Journal of Immunology*, 185(2), pp. 1150-1157.

Moll, R., Divo, M. and Langbein, L. (2008) 'The human keratins: biology and pathology', *Histochemistry and cell biology*, 129, pp. 705-733.

Moss, S. F., Lee, J.-W., Sabo, E., Rubin, A. K., Rommel, J., Westley, B. R., May, F. E., Gao, J., Meitner, P. A. and Tavares, R. (2008) 'Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis', *Clinical Cancer Research*, 14(13), pp. 4161-4167.

Nascimento, T. D. d. (2021) 'Caracterização nutricional e antioxidante in vitro do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) in natura'.

Nattan-Larrier, L. (1921) 'Infections à Trypanosomes et voies de penetrations dès virus', *Bull*

Soc Pathol Exot, 14, pp. 537-42.

Negedu, M. N., Duckworth, C. A. and Yu, L.-G. (2022) 'Galectin-2 in Health and Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), pp. 341.

Neira, I., Silva, F. A., Cortez, M. and Yoshida, N. (2003) 'Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells', *Infection and immunity*, 71(1), pp. 557-561.

Noya, B. A. d., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A. and Noya, O. (2015) 'Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, pp. 377-386.

Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J. and Araujo, W. N. (2009) 'Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil', *Emerging infectious diseases*, 15(4), pp. 653.

Oliveira, M., de Farias Neto, J., Nogueira, O. and Rogez, H. (2006) 'Açaí: manejo, produção e processamento'.

Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K.-E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Åkesson, B. and Nyman, M. G. (2004) 'Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria* × *ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), pp. 2490-2498.

Ortega-Barria, E. and Pereira, M. E. (1991) 'A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells', *Cell*, 67(2), pp. 411-421.

Orth, M. F., Cazes, A., Butt, E. and Grunewald, T. G. (2015) 'An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein', *Oncotarget*, 6(1), pp. 26. Owens, D. and Lane, E. (2004) 'Keratin mutations and intestinal pathology', *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 204(4), pp. 377-385.

Ozen, A. E., Pons, A. and Tur, J. A. (2012) 'Worldwide consumption of functional foods: a systematic review', *Nutrition reviews*, 70(8), pp. 472-481.

Paclik, D., Lohse, K., Wiedenmann, B., Dignass, A. U. and Sturm, A. (2008) 'Galectin-2 and -4, but not galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism', *Inflammatory bowel diseases*, 14(10), pp. 1366-1372.

Paclik, D., Werner, L., Guckelberger, O., Wiedenmann, B. and Sturm, A. (2011) 'Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function', *Cellular immunology*, 271(1), pp. 97-103.

Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M., Franco, R. M., Dias, V. L. and Passos, L. A.

(2009) 'Chagas' disease as a foodborne illness', *Journal of food protection*, 72(2), pp. 441-446.

Pietta, P.-G. (2000) 'Flavonoids as antioxidants', *Journal of natural products*, 63(7), pp. 1035-1042. Pinto, A. Y. d. N., Ferreira Jr, A. G., Valente, V. d. C., Harada, G. S. and Valente, S. A. d. S. (2009) 'Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole', *Revista panamericana de salud pública*, 25, pp. 77-83.

Prata, A. (2001) 'Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease', *The Lancet infectious diseases*, 1(2), pp. 92-100.

Rassi Jr, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. (2010) 'Chagas disease', *The Lancet*, 375(9723), pp. 1388-1402.

Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V. and Kohli, K. (2009) 'Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review', *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy) (Discontinued)*, 8(3), pp. 229-235.

Reed, S. G., Brownell, C. E., Russo, D. M., Silva, J. S., Grabstein, K. H. and Morrissey, P. J. (1994) 'IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection', *The Journal of Immunology*, 153(7), pp. 3135-3140.

Rincón-Acevedo, C. Y., Parada-García, A. S., Olivera, M. J., Torres-Torres, F., Zuleta-Dueñas, L. P., Hernández, C. and Ramírez, J. D. (2021) 'Clinical and epidemiological characterization of acute Chagas disease in Casanare, Eastern Colombia, 2012–2020', *Frontiers in Medicine*, pp. 1178.

Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A. and Andrews, N. W. (1996) 'Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport', *The Journal of cell biology*, 134(2), pp. 349-362.

Rodríguez-Bejarano, O. H., Avendaño, C. and Patarroyo, M. A. (2021) 'Mechanisms associated with *Trypanosoma cruzi* host target cell adhesion, recognition and internalization', *Life*, 11(6), pp. 534.

Rufino, M., Alves, R. E., de Brito, E. S., de Moraes, S. M., Sampaio, C. d. G., Pérez-Jimenez, J. and Saura-Calixto, F. D. (2007) 'Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH'.

Santana, R. A. G., Guerra, M. G. V., Sousa, D. R., Couceiro, K., Ortiz, J. V., Oliveira, M., Ferreira, L. S., Souza, K. R., Tavares, I. C. and Moraes, R. F. (2019) 'Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon', *Emerging infectious diseases*, 25(1), pp. 132.

Santos, S. L. d. (2008) Análise proteômica da forma tripomastigota de uma população de *Trypanosoma cruzi* susceptível e outra resistente ao benzonidazol.

Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D. and Kababick, J. P. (2006) 'Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, Euterpe

oleraceae Mart.(Acai)', *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22), pp. 8598-8603.

Schenkman, S., Jiang, M.-S., Hart, G. W. and Nussenzweig, V. (1991) 'A novel cell surface trans- sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells', *Cell*, 65(7), pp. 1117-1125.

Scherer, R. and Godoy, H. T. (2009) 'Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method', *Food chemistry*, 112(3), pp. 654-658.

Schmunis, G. A. (2007) 'Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, pp. 75-86.

Schofield, C. J. and Dujardin, J. P. (1997) 'Chagas disease vector control in Central America', *Parasitology Today*, 13(4), pp. 141.

Shaw, J., Lainson, R. and Fraiha, H. (1969) 'Observations on the epidemiology of the first autochthonous cases of Chagas' disease in Belém, State of Pará, Brazil', *Revista de Saúde Pública*, 3(2), pp. 153-157.

Shikanai-Yasuda, M. A., Brisola Marcondes, C., Guedes, L., Siqueira, G., Barone, A., Dias, J. C. P., Amato Neto, V., Tolezano, J., Peres, B. A. and Arruda Jr, E. (1991) 'Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(5), pp. 351-357.

Shikanai-Yasuda, M. A. and Carvalho, N. B. (2012) 'Oral transmission of Chagas disease', *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), pp. 845-852.

Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O. C., Berbert, L. R., Ramos, M.T., Mascarenhas, B. A. S., Britto, C., Morrot, A. and Serra Villa-Verde, D. M. (2017) 'Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), pp. e0005507.

Sindrewicz, P., Lian, L.-Y. and Yu, L.-G. (2016) 'Interaction of the oncofetal Thomsen–Friedenreich antigen with galectins in cancer progression and metastasis', *Frontiers in oncology*, 6, pp. 79.

Soares, N. P., Campos, K. K. D., Pena, K. B., Bandeira, A. C. B., Talvani, A., Silva, M. E. and Bezerra, F.S. (2016) 'The effects of the combination of a refined carbohydrate diet and exposure to hyperoxia in mice', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Staquicini, D. I., Martins, R. M., Macedo, S., Sasso, G. R., Atayde, V. D., Juliano, M. A. and Yoshida, N. (2010) 'Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*', *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), pp. e613.

Steindel, M., Pacheco, L. K., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T.C. M., Stoco, P. H. and Murta, S. M. F. (2008) 'Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil', *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 60(1), pp. 25-32.

- Tabak, L. A. (1995) 'In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins', *Annual review of physiology*, 57(1), pp. 547-564.
- Tarleton, R. L. (2001) 'Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease', *International journal for parasitology*, 31(5-6), pp. 550-554.
- Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L. and Postan, M. (1994) 'Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease', *Infection and immunity*, 62(5), pp. 1820-1829.
- Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T. and Silva, J. S. (2002) 'Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection', *Trends in parasitology*, 18(6), pp. 262-265.
- Toback, F. G., Walsh-Reitz, M. M., Musch, M. W., Chang, E. B., Del Valle, J., Ren, H., Huang, E. and Martin, T. E. (2003) 'Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(2), pp. G344-G353.
- Tosello Boari, J., Amezcua Vesely, M. C., Bermejo, D. A., Ramello, M. C., Montes, C. L., Cejas, H., Gruppi, A. and Acosta Rodríguez, E. V. (2012) 'IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils', *PLoS pathogens*, 8(4), pp. e1002658.
- Valente, S. A. d. S., da Costa Valente, V., das Neves Pinto, A. Y., de Jesus Barbosa César, M., dos Santos, M. P., Miranda, C. O. S., Cuervo, P. and Fernandes, O. (2009) 'Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3), pp. 291-297.
- Vannella, K. M., Ramalingam, T. R., Hart, K. M., de Queiroz Prado, R., Sciarba, J., Barron, L., Borthwick, L. A., Smith, A. D., Mentink-Kane, M. and White, S. (2016) 'Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes', *Nature immunology*, 17(5), pp. 538-544.
- Vargas, A., Malta, J. M. A. S., Costa, V. M. d., Cláudio, L. D. G., Alves, R. V., Cordeiro, G. d. S., Aguiar, L. M. A. and Percio, J. (2018) 'Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016', *Cadernos de saude publica*, 34, pp. e00006517.
- Villalta, F., Scharfstein, J., Ashton, A. W., Tyler, K. M., Guan, F., Mukherjee, S., Lima, M. F., Alvarez, S., Weiss, L. M. and Huang, H. (2009) 'Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions', *Parasitology research*, 104(6), pp. 1251-1260.
- Walsh-Reitz, M. M., Huang, E. F., Musch, M. W., Chang, E. B., Martin, T. E., Kartha, S. and Toback, F. G. (2005) 'AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1), pp. G163-G171.

- Waters, M., VandeVord, P. and Van Dyke, M. (2018) 'Keratin biomaterials augment anti-inflammatory macrophage phenotype in vitro', *Acta Biomaterialia*, 66, pp. 213-223.
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E. (2007) 'IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages', *Annu. Rev. Immunol.*, 25, pp. 821-852.
- Wiktorowicz, J. E., Zago, M. P. and Garg, N. J. (2019) 'Fluorescence Proteomic Technology to Analyze Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chronic Chagas Disease', *T. cruzi Infection: Methods and Protocols*, pp. 363-380.
- Wu, C. C. and Yates III, J. R. (2003) 'The application of mass spectrometry to membrane proteomics', *Nature biotechnology*, 21(3), pp. 262-267.
- Wu, R.-Q., Zhang, D.-F., Tu, E., Chen, Q.-M. and Chen, W. (2014) 'The mucosal immune system in the oral cavity—an orchestra of T cell diversity', *International journal of oral science*, 6(3), pp. 125-132.
- Xie, C., Kang, J., Burris, R., Ferguson, M. E., Schauss, A. G., Nagarajan, S. and Wu, X. (2011) 'Açaí juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities', *Atherosclerosis*, 216(2), pp. 327-333.
- Yoshida, N. (2008) 'Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity', *Parasitology international*, 57(2), pp. 105-109.
- Yoshida, N. (2009) 'Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, pp. 101-107.
- Yoshida, N. and Cortez, M. (2008) 'Trypanosoma cruzi: parasite and host cell signaling during the invasion process', *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*, pp. 82-91.
- Yoshida, N., Tyler, K. M. and Llewellyn, M. S. (2011) 'Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites', *Trends in parasitology*, 27(10), pp. 459-466.
- Yoshihara, T., Kadota, Y., Yoshimura, Y., Tatano, Y., Takeuchi, N., Okitsu, H., Umemoto, A., Yamauchi, T. and Itoh, K. (2006) 'Proteomic alteration in gastric adenocarcinomas from Japanese patients', *Molecular Cancer*, 5(1), pp. 1-12.
- Young, C., Losikoff, P., Chawla, A., Glasser, L. and Forman, E. (2007) 'Transfusion-acquired Trypanosoma cruzi infection', *Transfusion*, 47(3), pp. 540-544.
- Zambiasi, R. C. (2010) 'Análise Físico Química de Alimentos', *Pelotas: Editora Universitária/UFPEL*, 1, pp. 202.
- Zapparoli, D., Bertozzo, T. V., Alexandrino, M., Sanches, D. F., Aires, I. N., Manzini, S., de Medeiros, M. I. M., Kurokawa, C. S., Dos Santos, R. M. and Lucheis, S. B. (2022) 'Commercially acquired açaí pulps contamination by Trypanosoma cruzi', *International Journal of Food Microbiology*, 363, pp. 109508.

9. ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AÇAÍ NA INFECÇÃO ORAL PELO *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS Balb/c", protocolada sob o CEUA nº 6327160320 (ID 000381), sob a responsabilidade de **Paula Melo de Abreu Vieira e equipe; Flávia de Souza Marques; Aline Coelho das Mercês; Aline Tonhela Ferraz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 18/05/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE INFLUENCE OF AÇAÍ IN ORAL INFECTION BY *TRYPANOSOMA CRUZI* IN MICE Balb / c", utilizing 226 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 6327160320 (ID 000381), under the responsibility of **Paula Melo de Abreu Vieira and team; Flávia de Souza Marques; Aline Coelho das Mercês; Aline Tonhela Ferraz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 05/18/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\) e Treinamento](#)

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 08/2023 Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Centro de Ciência Animal		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas
		idade:	30 a 40 dias
		N:	226
Linhagem:	Balb/c	Peso:	18 a 22 g

Local do experimento: Todos os experimentos envolvendo a utilização dos animais será realizada dentro do Centro de Ciência Animal

Ouro Preto, 26 de janeiro de 2022



Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

10. MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro 1. Proteínas encontradas na análise quantitativa

Acesso	Cobertura (%)	Peptídeos	Peptídeos únicos	Perfil da amostra C: A: R	Perfil do Grupo C A R	Descrição
Q8K0C5	20	2	2			Zymogen granule membrane protein 16
A0A8D3UE05	12	2	2			Retroviral-like aspartic protease 1
A0A1L1SRG5	23	3	3			Alpha-crystallin B chain (Fragment)
Q9JK88	24	11	11			Serpín I2
Q8VCK7	18	2	2			Syncollin
Q88986	10	3	3			2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial
E9PWG4	40	6	3			Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform
A0A0G2JDW2	64	10	7			Myosin light chain 3
Q9Z2T6	23	14	4			Keratin, type II cuticular Hb5
Q922U2	46	31	19			Keratin, type II cytoskeletal 5
Q9D7P9	21	9	8			Serpín B12
O09116	46	8	8			Small proline-rich protein 3
Q9D964	8	3	3			Glycine amidinotransferase, mitochondrial
Q3SYP2	7	2	2			Chymotrypsin-C
Q8VHD8	5	7	7			Hornerin
P47856	4	3	3			Glutamine-Fructose-6-phosphate aminotransferase
Q99KV1	7	2	2			DnaJ homolog subfamily B member 11
P18165	5	2	2			Loricrin
E9QLW7	10	5	5			Dermokine
Q9CYH2	15	3	3			Peroxiredoxin-like 2A
Q9JI91	17	16	4			Alpha-actinin-2
Q9CZS1	9	4	3			Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial
E9QPB2	20	10	10			Suprabasin
Q9JHR7	3	3	3			Insulin-degrading enzyme
A0A1W2P756	33	2	2			Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13
Q8CF02	24	1	1			Protein FAM25C
P04247	32	3	3			Myoglobin
Q9Z110	7	5	5			Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
Q3ULJ0	8	3	2			Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein
Q99KE1	7	3	3			NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial
Q9WUB3	14	11	5			Glycogen phosphorylase, muscle form
E9Q1Y3	0	2	2			Apolipoprotein B-100 (Fragment)
Q08879	3	2	2			Fibulin-1
E9QA08	10	29	29			Mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric

Acesso	Cobertura (%)	Peptídeos	Peptídeos únicos	Perfil da amostra C:C:C:A:A:A:R:R:R	Perfil do grupo C A R	Descrição	
Q9ERE2	-	20	11	2			Keratin, type II cuticular Hb1
F8VQC1		6	3	3			Signal recognition particle subunit SRP72
Q9ERG0	-	5	3	3			LIM domain and actin-binding protein 1
Q08189	-	12	8	8			Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
Q9CQ56	-	39	9	8			Gastrokine-2
F8VQM0		15	8	4			Alkaline phosphatase
Q08423	-	53	3	3			Trefoil factor 1
Q8VHB5	-	7	3	3			Carbonic anhydrase 9
P97347		8	8	8			Repetin
P16015		32	6	6			Carbonic anhydrase 3
E9Q0F0		23	25	22			Keratin 78
Q9CQW5	-	66	8	8			Galectin-2
Q8K354	-	35	9	6			Carbonyl reductase [NADPH] 3
Q61753	-	20	9	9			D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
A0A1Y7VNF4		12	5	5			ERO1-like protein beta
Q7TSV4	-	4	2	2			Phosphopentomutase
A8YSN4		19	5	3			17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13
Q5DIZ0	-	1	2	2			Protein NYNRIN
P57096		22	2	2			Prostate stem cell antigen
P27661		28	5	1			Histone H2AX
P45481		1	3	2			Histone lysine acetyltransferase CREBBP
A2A6H0		33	7	7			LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)
P32261		7	3	3			Antithrombin-III
O70456		51	12	8			I4-3-3 protein sigma
Q9CR36	-	40	7	7			Gastrokine-1
P13745		27	9	6			Glutathione S-transferase A1
Q9Z2U0	-	8	2	2			Proteasome subunit alpha type-7 O
P17892		9	4	2			Pancreatic lipase-related protein 2
Q91XA9	-	26	10	10			Acidic mammalian chitinase
Q91XV3	-	22	3	3			Brain acid soluble protein 1
D3YYE1		22	4	3			Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A (Fragment)
Q9D7R7	-	7	3	3			Gastricsin
Q9RIN9	-	2	1	1			Collagen alpha-1(XIII) chain
Q9CQC2	-	50	5	5			Colipase
A0A140LJ72		0	1	1			Mucin 16
P20801		19	3	2			Troponin C, skeletal muscle

Acesso	Cobertura (%)	Peptídeos	Peptídeos únicos	Perfil da amostra C:C:C:A:A:A:R:R:R	Perfil do grupo C A R	Descrição
Q9EP53	-	1	1			<i>Hamartin</i>
Q8CCJ3	-	3	2			<i>E3 UFM1-protein ligase 1</i>
Q7TMM9	-	41	14			<i>Tubulin beta-2A chain</i>
P12710		9	1			<i>Fatty acid-binding protein, liver</i>
P21550		13	6			<i>Beta-enolase</i>
Q8K009	-	4	3			<i>Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolatedehydrogenase</i>
Q9D2R4	-	10	2			<i>Transmembrane emp24 domain-containing protein 11</i>
P62849		20	2			<i>40S ribosomal protein S24</i>
P50446		30	19			<i>Keratin, type II cytoskeletal 6A</i>
Q91WT9	-	4	2			<i>Cystathionine beta-synthase</i>
A2AKS7		3	2			<i>Cadherin-17</i>
Q8BK48	-	8	4			<i>Pyrethroid hydrolase Ces2e</i>
D3Z6S1		3	2			<i>Transmembrane protein 214</i>
Q05816		48	6			<i>Fatty acid-binding protein 5</i>
Q80X76		8	3			<i>Serine protease inhibitor A3F</i>
D3YU60		13	1			<i>Microsomal glutathione S-transferase 1</i>

