



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



RASHID IDDRISU

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO INÓCULO EM AÇAÍ NO
ACOMETIMENTO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS BALB/C NA FASE
AGUDA DA INFECÇÃO ORAL EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi***

OURO PRETO-MG

2023

RASHID IDDRISU

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO INÓCULO EM MEIO AÇAÍ NO
ACOMETIMENTO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS BALB/C NA FASE
AGUDA DA INFECÇÃO ORAL EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como uma exigência parcial para obtenção do título do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Co-orientadora: Ms. Flávia de Souza Marques

OURO PRETO-MG

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

I18a Iddrisu, Rashid.

Avaliação da influência do inóculo em meio açai no acometimento cardíaco de camundongos balb/c na fase aguda da infecção oral experimental pelo trypanosoma cruzi. [manuscrito] / Rashid Iddrisu. - 2023.

26 f.: il.: color., gráf., tab.. + Fluxograma. + Curvas.

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

Coorientadora: Ma. Flávia de Souza Marques.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Infecção. 4. Coração - Doenças. 5. Açai. I. Vieira, Paula Melo de Abreu. II. Marques, Flávia de Souza. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Rashid Iddrisu

“Avaliação da influência do inóculo em açaí no acometimento cardíaco de camundongos Balb/c na infecção por via oral pelo *Trypanosoma cruzi*”

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

Aprovada em 03 de abril de 2023

Membros da banca

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

Paula Melo de Abreu Vieira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 12/04/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 12/04/2023, às 10:40, 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 **0507433** e o código CRC **EB781AE6**.

AGRADECIMENTOS

First and foremost, my appreciation goes to God almighty i.e my eternal Father who is the architect and builder of my life. I am eternally grateful for His Providence, for the gift of life, for His exceeding and abundant mercies and favor upon my life. To Him I give all the Glory, Honour and Adoration.

I also want to say thank you to my sister, Warihanatu and my beloved cousin, Hamdia for all their support and love.

To my parents, Addisah Issahaku and Iddrisu Riss Atta, to my brothers, Osman, Yussif and Wumpini, I say thank you for your prayers and for being an important part of my life.

Words are not enough to convey my gratitude to Paula, my supervisor and Flávia, my cosupervisor for their supervision, academic knowledge as well as the kindness shared all this while - The world needs more people like you.

I want to say a special thank you to my late grandmother, Nantogma Sanatu Pagnaa and my late friend, William John Harris. Though you are no longer here on earth, you still live on because your exemplary lives still inspire me.

To Diego, Dona Idalina, Pauliana, Luciana, Thaís, Yara, Ana Guilhermina, Kavya, all my Portuguese teachers at UFMG and to everyone who has one way or the other made a positive impact on my life, I say thank you!

To crown it all, I want to express my profound gratitude to the Federal University of Ouro Preto, the Faculty of Pharmacy and the Laboratory of Morphopathology.

EPÍGRAFE

“From birth I was cast on you;
from my mother's womb you have
been my God.”

Psalm 22:10

RESUMO

Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma protozoonose que tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Dados atuais da Organização Mundial de Saúde apontam que em todo mundo a doença acomete entre 6 a 7 milhões de pessoas, principalmente na América Latina, no qual é endêmica em 21 países. Medidas de combate ao triatomíneo e melhoria das moradias, levaram ao controle do principal vetor, o *Triatoma infestans*, culminando no controle da transmissão vetorial nos países endêmicos. Dessa forma, outras formas de transmissão ganharam importância. No Brasil, podemos destacar a transmissão oral, que é caracterizada pela ingestão de bebidas ou comidas contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas. Nos últimos 40 anos a grande maioria dos casos foram registrados na região Norte do país, quase sempre associados à ingestão de suco de frutas como a bacaba (*Oenocarpus bacaba*) e o açaí (*Euterpe oleracea*), contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas. No entanto, pouco se sabe sobre os impactos da infecção na por via oral pelo *Trypanosoma cruzi* no tecido cardíaco. Dessa forma, uma avaliação do processo inflamatório, do parasitismo tecidual e do estresse oxidativo nesse órgão possibilitou uma melhor compreensão do acometimento desse tecido na infecção oral e qual a repercussão para o organismo. Para a execução deste estudo foram utilizados um total de 50 camundongos *Balb/c* machos com 30 dias. Estes Camundongos foram distribuídos em três grupos experimentais: Não infectado (n= 12); infectado com parasito em meio RPMI (n= 19) e infectado com o parasito em Açaí (n= 19). Esses animais foram infectados com o inóculo de 1×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y(DTU II) do *Trypanosoma cruzi* pelo método de pipetagem. Os resultados mostraram que apesar da presença de parasitismo tecidual em ambos os grupos infectados, este não foi o suficiente para gerar de processo inflamatório. Em relação, as análises do estresse oxidativo foi observado um aumento significativo da atividade da enzima antioxidante catalase no grupo RPMI no 7º dias após a infecção e no 14º dias após a infecção, em ambos os grupos RPMI e Açaí. Nesse sentido, os dados demonstram que a ausência de processo inflamatório no coração pode estar relacionado ao aumento da atividade da enzima catalase observada nos grupos infectados, como um mecanismo de defesa do parasito às espécies reativas produzidas por macrófagos.

Palavras chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Infecção oral, Coração, Açaí.

ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is a protozoonosis that has a hemoflagellate protozoan called *Trypanosoma cruzi* as its etiological agent. Current data from the World Health Organization indicate that the disease affects between 6 and 7 million people worldwide, mainly in Latin America, where it is endemic in 21 countries. The classic form of transmission of the disease occurs through a vector called triatomine. It is characterized by contact with metacyclic trypomastigotes that are released in feces or urine of the triatomine during blood meal. These metacyclic trypomastigotes then penetrate the vertebrate host through microlesions in the skin or through the intact mucosa. Measures to combat the triatomine bug and improved housing led to the control of the main vector called the *Triatoma infestans*, culminating in the control of vector transmission in endemic countries. Thus, other forms of transmission gained relevance. In Brazil, we can highlight the oral transmission, which is characterized by the ingestion of drinks or food contaminated with metacyclic trypomastigotes forms. In the last 40 years, the vast majority of cases were registered in the Northern region of the country. These cases are almost always associated with the ingestion of fruit juice such as that of bacaba (*Oenocarpus bacaba*) and açaí (*Euterpe oleracea*), contaminated with metacyclic trypomastigotes forms. Acute oral Chagas disease is characterized by the severity of the disease, with reports of severe myocarditis and even death in members of the same family. It is known that besides serving as a reservoir for latent parasites, the heart is also one of the target tissues of *Trypanosoma cruzi*. However, little is known about the impacts of oral infection of *Trypanosoma cruzi* on the cardiac muscle. Thus, an assessment of the inflammatory process and oxidative stress in this organ will enable a better understanding of the involvement of this tissue in oral infection and the repercussions on the body. To carry out this study, a total of 50 male Balb/c mice, 30 days old, obtained from the Animal Science Center of the Federal University of Ouro Preto and approved by the ethics committee of the same institution were used. These mice were distributed into three experimental groups: Uninfected (n= 12); infected with the parasite in RPMI medium (n= 19) and infected with the parasite in açaí (n= 19). Prior to infection, mice belonging to the RPMI and açaí groups were starved for 6 hours and then inoculated using an inoculum of 1×10^5 metacyclic trypomastigotes of the Y strain (DTU II) of *Trypanosoma cruzi*, DTU II. The results showed that despite the presence of tissue parasitism in both infected groups, this was not enough to generate an inflammatory process. This fact may be related to the increased activity of the catalase enzyme observed in the infected groups, as a defense mechanism of the parasite against reactive species produced by macrophages.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Oral infection, Heart, Acai

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma experimental..... 9
- Figura 2:** Quantificação da sobrevivência dos animais infectados com formas TM do *T. cruzi*, no meio RPMI ou Açai..... 15
- Figura 3:** Parasitemia de camundongos *Balb/c* infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* nos meios RPMI ou Açai..... 16
- Figura 4:** Número de parasitos no coração de camundongos *BALB/C* infectados por formas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai 17
- Figura 5:** Análise do processo inflamatório do coração de camundongos Balb/C não-infectados, infectados com as formas TM da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai 18
- Figura 6:** Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos Balb/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* nos RPMI ou Açai 19
- Figura 7:** Quantificação do estresse oxidativo no coração de camundongos BALB/C infectados por via oral com as formas TM da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai 20

LISTA DE ABREVIATURAS

DAI: Dia após a infecção

DC: Doença de Chagas

DNDi: Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas

DOS: Superóxido Dismutases

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HE: Hematoxilina-Eosina

LIT: Liver Infusion Tryptose

NADPH: Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

OMS: Organização Mundial de Saúde

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Médium

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TM: Tripomastigota metacíclic

DCA: Doença de Chagas Aguda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do <i>T. cruzi</i> em meio RPMI ou Açaí.....	16
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3. JUSTIFICATIVA	7
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo geral.....	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
5. MATERIAIS E MÉTODOS	9
5.1- Animais e infecção.....	9
5.2 Obtenção de formas epimastigotas	10
5.3 Metacicloênese das formas epimastigotas	10
5.4 Preparo do inóculo.....	10
5.5 Taxa de sobrevivência.....	10
5.6 Parasitemia	11
5.7 Eutanásia, coleta, fixação	11
5.8 Parasitismo	11
5.8.1 Desparafinização das amostras	11
5.8.2 Extração de DNA	12
5.9 Quantificação do processo inflamatório	13
5.10 Quantificação do estresse oxidativo	13
5.10.1 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase	13
5.10.2 Determinação da atividade da Catalase	14
5.10.3 Determinação da presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	14
6. RESULTADOS.....	15
6.1 Taxa de Sobrevivência	15
6.2 Parasitemia	15
6.3 Parasitismo	17
6.4 Processo inflamatório	17
6.5 Estresse Oxidativo	19
7 DISCUSSÃO	
.....	
21	
8 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Descoberta pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, a doença de Chagas (DC), também denominada como Tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (CHAGAS, 1909).

A forma clássica de transmissão da doença se dá por meio da liberação de formas tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas junto as fezes do hospedeiro invertebrado, triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro, durante o repasto sanguíneo. (ZIGMAN BRENER, 1997).

Considerada como uma doença tropical negligenciada, é encontrada notadamente em 21 país da América Latina. No entanto, devido ao movimento migratório de pessoas infectadas, a doença de Chagas se espalhou para outros países se tornando um problema de saúde mundial. Um século depois da sua descoberta, ela ainda é uma doença ativa que compromete a saúde de aproximadamente 7 milhões de pessoas no mundo. Além disso, estima-se que em torno de 75 milhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção, 30.000 novos casos são notificados a cada ano e mais 12.000 mortes são registrados por ano em decorrência das complicações da doença. De forma desproporcional, somente 30% dos infectados com o *T. cruzi* são diagnosticados e menos de 1% dos doentes têm acesso ao tratamento. (WHO, 2022; DNDi, 2022).

Além da forma clássica de transmissão, o *T. cruzi* também pode ser transmitido para os seres humanos através da transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidente de laboratório, transmissão congênita, e transmissão pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com o *T. cruzi*, caracterizando a transmissão oral. (MP Santana, et al. 2018).

No Brasil, com o controle da transmissão vetorial por meio do combate e a erradicação do principal vetor, o *Triatoma infestans*, atualmente a transmissão pela via oral se destaca como a forma principal de transmissão da doença de Chagas, principalmente na região norte do Brasil. Isto porque os alimentos abundantes e culturais desta região como o açaí (*Euterpe oleracea*) e o suco de bacaba (*Oenocarpus bacaba*) são os principais alimentos e bebidas associadas à infecção aguda chagásica. Isso ocorre devido ao fato de que algumas espécies de triatomíneos utilizam as palmeiras dessas

frutas como abrigo e também como fonte de alimentação. Esses alimentos são muitas vezes consumidos minimamente processados, sem passar pela pasteurização ou pelo processamento adequado para eliminar formas tripomastigotas metacíclicas que habitam no intestino dos insetos vetores. (LV Pacheco, et al. 2021)

Nesse sentido, um estudo sobre a influência da cultura alimentar, já que o açaí tem sido ligado diretamente na maioria dos surtos orais e apresenta características antioxidantes e anti-inflamatórias, e uma avaliação das lesões cardíacas frente a infecção por via oral, possibilitará a compreensão de como o meio no qual o *T. cruzi* é inserido no organismo interfere na interação entre parasito/hospedeiro e a influência dessa interação no tecido cardíaco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, foi descoberta pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909 e é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina. Esta doença também está presente na América do Norte, Europa, Japão e Austrália. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América do Sul, estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, mais de 75 milhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção e 30.000 novos casos ocorrem por ano em todo o mundo. Além disso, cerca de 12.000 mortes causadas pela doença de Chagas são registradas por ano. (OMS,2023; DNDi,2022).

A doença de Chagas é uma antropozoonose de grande relevância na América Latina, acometendo, principalmente, populações suscetíveis de zonas rurais que vivem em precárias condições de habitação. Essa doença é originada de uma infecção causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, e tem como principal mecanismo de transmissão, a via clássica vetorial caracterizada pela liberação de formas TM nas excretas do triatomíneo infectado durante ou logo após o repasto sanguíneo, por via oral (ingestão de alimentos e bebidas contaminadas), via transfusional, vertical/gravidez, transplante de órgãos, e com menor incidência, por meio de acidentes laboratoriais (LHC Sangenis 2016, et al; MP Santana, et al. 2018).

Apenas algumas espécies do triatomíneo infestam casas e são, portanto, importantes vetores da doença de Chagas no ciclo doméstico. Destes, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* receberam a maior destque (Kollien & Schaub, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia quando o barbeiro, ao se alimentar do hospedeiro vertebrado, elimina suas fezes e urina, as formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas tripomastigotas podem penetrar o hospedeiro vertebrado por meio de lesões na pele ou na mucosa adjacente à picada, e infectam as células deste hospedeiro, transformando em formas amastigotas que, após período de latência de 20 a 30 horas, iniciam o seu processo de divisão binária intracelular. Quando as células estão repletas de parasitos, estes se transformam em formas tripomastigotas, que rompem a célula hospedeira e ao atingirem a corrente sanguínea recebem o nome de tripomastigotas

sanguíneas. Esta forma infectiva no hospedeiro vertebrado, ao cair na corrente circulatória podem infectar células vizinhas, disseminando a infecção para diferentes órgãos e tecidos. Nessa fase do ciclo, se o hospedeiro vertebrado for picado pelo triatomíneo, os protozoários serão transmitidos ao inseto, dando início a um novo ciclo. No estômago do barbeiro, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas, no qual multiplicam-se por divisão binária. No intestino posterior, essas se transformam em tripomastigotas metacíclicas, as formas infectantes aos vertebrados. (Zigman Brener, 1997).

A doença de Chagas se apresenta em duas fases clínicas distintas; fase aguda e crônica. Normalmente a fase aguda da doença de Chagas é caracterizada pela presença do parasito no sangue do paciente, permitindo assim a demonstração de tripomastigotas do *T. cruzi* por exame microscópico de um esfregaço de sangue fresco. Muitas vezes, a fase aguda da infecção não é percebida pelo paciente, ou seja, em cerca de 95% dos casos, tem a presença de sintomas inespecíficos, comuns a outras enfermidades. No restante dos casos sintomáticos, o paciente apresenta manifestações clínicas como febre, mal-estar, dores musculares e articulares, sonolência, cólicas e diarreia, edema e distúrbios respiratórios. Na forma clássica da doença, a porcentagem de número de pacientes que morrem na fase aguda é bem pequena (menos de 5%). A mortalidade nessa fase da doença é normalmente causada por miocardite ou meningoencefalite, com conseqüente complicações como broncopneumonia. Influenciado pelo sistema imune, a fase aguda da infecção por *T. cruzi* geralmente entra em remissão e em cerca de 3 a 4 meses de seu início, a infecção entra no estágio crônico. Os pacientes que não morrem em decorrência das complicações da doença, evoluem para a fase crônica. Cerca de dois terços de portadores da infecção crônica por *T. cruzi* não apresentam manifestação clínica detectável. Cerca de um terço da população humana cronicamente infectada desenvolve manifestações da doença. A doença sintomática afeta o coração em 94,5% dos casos; esses pacientes são considerados portadores de cardiopatia chagásica crônica. A insuficiência cardíaca está relacionada com a causa da morte em 58% dos pacientes, enquanto as arritmias têm sido associadas a mortes inesperadas em 36,5%. Os 4,5% restantes dos pacientes com infecção chagásica crônica apresentam megassíndromes, estado de doença que envolve o esôfago (megaesôfago) e o cólon (megacólon) (Teixeira, Nitz, Guimaro, et al. 2006).

Com o avanço do controle da transmissão vetorial, outras formas de transmissão ganharam importância (JCP Dias et al., 2011). Nos dias atuais, a transmissão oral é a principal forma de transmissão da doença de Chagas no Brasil, especialmente na Região Amazônica. Alimentos como caldo de cana-de-açúcar, açaí, suco de açaí, suco de bacaba e suco de goiaba contaminadas com as formas TM são os principais alimentos e bebidas associadas à infecção aguda chagásica. Dentre estes alimentos, o açaí (*Euterpe oleracea*) está presente na maioria dos surtos agudos associados à infecção oral ao longo dos últimos anos, principalmente na região amazônica e no Pará. (LV Pacheco, et al. 2021).

A contaminação de alimentos pelo *T. cruzi* pode ocorrer quando insetos triatomíneos depositam suas excretas infectadas com formas TM na superfície de alimentos, através do processo de aerossolização de formas TM das glândulas anais de marsupiais infectados, ou eventualmente, quando os insetos são triturados durante o processamento das frutas. Esta última é a principal hipótese explicativa para os diversos surtos ocorridos nos últimos anos no Norte brasileiro. (LAC Passos, et al. 2012).

Na região Norte do Brasil, a via oral tem assumido importância cada vez maior, principalmente em razão de sua associação com microepidemias. Na transmissão oral, a ingestão de formas TM do *T. cruzi* presentes em diferentes alimentos conduz a um quadro agudo que, em muitos casos, evolui para a morte. (LAC Passos, et al. 2012). De acordo com os dados registrados no SINAN em 2020, foram confirmados 146 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, com uma letalidade de 2%. A Região Norte foi a que apresentou maior número de casos confirmados de DCA (95%), em relação ao total de registros (SINAN 2021).

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira (Fruteira) típica da região norte do Brasil no qual se extrai o fruto (açaí) que fornece a polpa que é utilizada para produzir vários tipos de bebidas e produtos alimentares como sorvetes, licores, doces e geleias consumidos nos territórios nacionais do Brasil (BARCELOS et al, 2017). Originária da América do Sul, especialmente da Amazônia, a polpa de açaí tem recebido muita atenção nos últimos anos. Apresenta alta capacidade antioxidante e tem sido utilizada como ingrediente alimentar com contribuições funcionais na dieta além de sua composição nutricional básica. Em um estudo recente de Xie e colaboradores (2011), observou-se que a suplementação da dieta com polpa de açaí melhorou os biomarcadores de estresse oxidativo, resultando em um efeito hipocolesterolêmico em ratos. Isso sugere

que o consumo de açaí pode melhorar o status antioxidante e fornecer efeitos ateroprotetores em um modelo animal de hipercolesterolemia. A polpa de açaí ou suco de açaí também demonstraram possuir atividade anti-inflamatória (XIE; KANG; BURRIS; FERGUSON et al., 2011)

Em um estudo realizado por Kang et al. (2011), cinco compostos do açaí foram isolados e testados para atividades antiinflamatórias e antioxidantes. A flavona velutina apresentou excelente capacidade anti-inflamatória em macrófagos de camundongos, indicando uma potencial efeito ateroprotetor. Este potencial antiinflamatório foi confirmado pela inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Xie et al., 2012).

O consumo de açaí tem aumentado consideravelmente. Segundo o IBGE (2013), o Brasil produziu, em 2011, um total de 215,4 mil toneladas de açaí. O estado do Pará foi o principal contribuinte, com 50,8% da produção nacional em 2011. O estado do Amazonas vem em seguida, respondendo por 41,5% do total brasileiro. Somada à produção de todos os estados produtores brasileiros, a produção de açaí em 2011 foi de aproximadamente 215,3 mil toneladas, gerando uma movimentação monetária estimada em US\$ 700,000 mil (IBGE,2013; Yamaguchi et al.,2015).

O caminho para a comprovação da associação do açaí com a infecção oral da DC iniciou-se no dia 29 de dezembro de 2017, no qual uma mulher de 57 anos com síndrome febril agudo buscou ajuda em um centro de atenção terciária para doenças infecciosas chamado Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) em Manaus, capital do estado do Amazonas, Brasil, onde a malária é endêmica. Um esfregaçosanguíneo foi realizado e o resultado foi negativo para *Plasmodium spp.*, mas positivo para tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. A paciente relatou que três parentes em Manaus e mais seis parentes em Lábrea apresentavam quadro de febre e o fator comum entre esses nove parentes foi o consumo do açaí. Subsequentemente todos foram testados e a infecção foi confirmada. Uma amostra do açaí consumido pelos pacientes foi coletada por autoridades de saúde, submetido a descongelamento e centrifugação. 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 um dia de incubação foram observadas formas flageladas móveis na camada intermediária de gordura. (SANTANA;GUERRA; SOUSA; COUCEIRO et al., 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Após o controle da doença de Chagas vetorial no Brasil, a transmissão oral se tornou a principal forma de transmissão da doença. A grande maioria dos surtos agudos concentram-se na região Amazônica onde foram registrados mais da metade desses casos nos últimos 40 anos. Nessa região, a transmissão oral da doença de Chagas está relacionada com a ingestão de sucos de fruta como o açaí e a bacaba contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi*. Uma característica comum a todos os surtos é a gravidade da doença, com altas taxas de mortalidade, se comparadas a outras formas de transmissão. Nesse sentido, podemos sugerir que a infecção oral pode estar relacionada a modificação no perfil de infecção do parasito através do meio no qual é inserido no hospedeiro vertebrado. Dessa forma, uma avaliação das 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 *T. cruzi*/hospedeiro e a influência dessa interação no tecido cardíaco.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do inóculo em açai no acometimento cardíaco de camundongos *Balb/c* na fase aguda da infecção oral experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

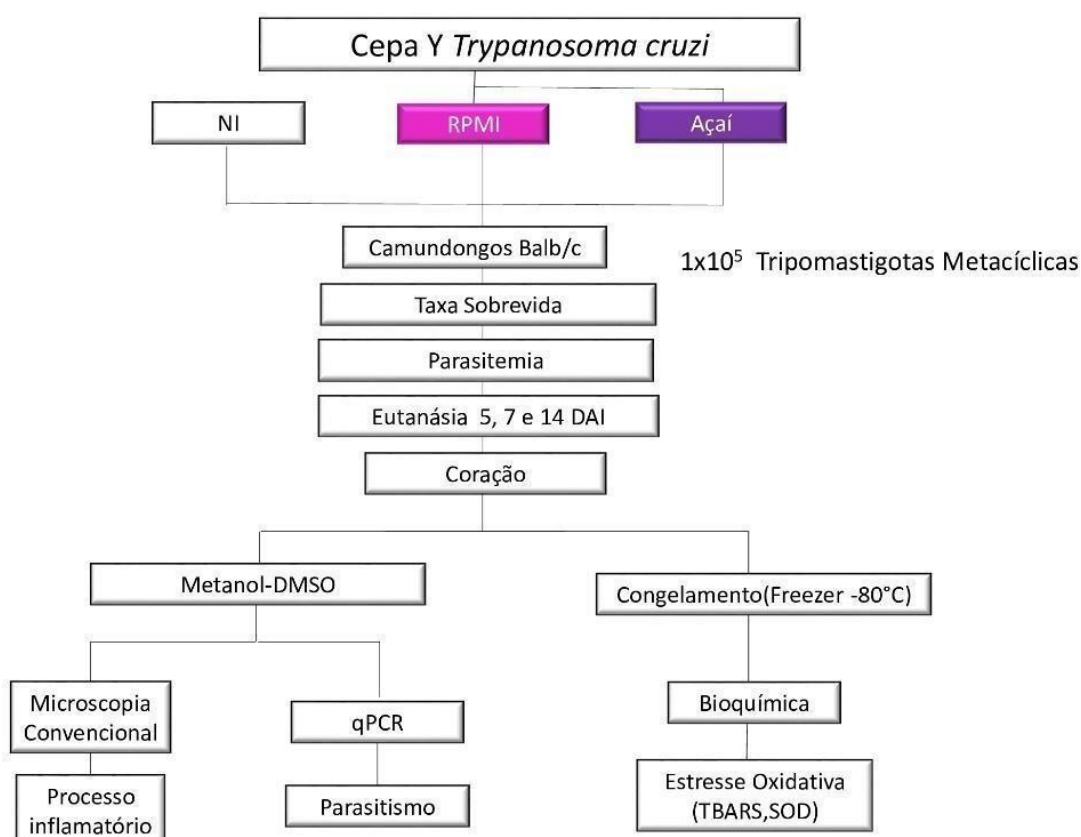
4.2 Objetivos específicos

- Determinar a taxa de sobrevivência até 42º DAI;
- Determinar a curva de parasitemia até 42º DAI;
- Quantificar parasitismo no coração aos 5, 7 e 14 dias após infecção;
- Quantificar o processo inflamatório no coração aos 5, 7 e 14 dias após infecção;
- Quantificar o estresse oxidativo no coração aos 5, 7 e 14 dias após infecção.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Animais e infecção:

Para a execução deste estudo foram utilizados um total de 50 camundongos *Balb/c* machos com 30 dias de idade provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto e com a aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA/UFOP) da mesma instituição sob o número de protocolo 6327160320. Estes Camundongos foram distribuídos em três grupos experimentais: Não infectado (n= 12); infectado com parasito em RPMI (n= 19) e infectado com o parasito em açaí (n= 19). Previamente à infecção, os camundongos pertencentes aos grupos RPMI e açaí foram mantidos em jejum por 6 horas e depois inoculados por pipetagem utilizando o inóculo 1×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y(DTU II)do *T. cruzi*.



Fluxograma 1: Delineamento experimental

5.2 Obtenção de formas epimastigotas

Foi coletado em EDTA aproximadamente 1 mL de sangue do plexo orbital de um camundongo sabidamente infectado com a cepa Y do *T. cruzi*. O sangue foi transferido para um tubo de 15 mL, onde foram adicionados 2 mL de meio de cultura LIT 10%. Os tubos foram mantidos em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand) à temperatura de 28°C por 15 dias. Após esse período foi realizado o repique da cultura de 15 em 15 dias por diversas vezes, até a purificação da cultura com observação da presença de epimastigotas viáveis (vivos, com morfologia e motilidade normais) em microscópio óptico em objetiva de 40x. Todo o procedimento foi feito em capela de fluxo laminar.

5.3 Metaciclogênese das formas epimastigotas

A cultura rica em epimastigotas viáveis obtidas da cepa Y foi submetida à metaciclogênese *in vitro*. Para isto, foram transferidas 5 mL de cultura de epimastigotas para uma garrafas de cultura contendo 10 mL de meio *Grace's Insect Medium* 20% com L-glutamina e NaHCO₃, Sigma® *Life Science* (Sigma, Aldrich, USA) estéril. Feita a homogeneização em movimentos circulares, a garrafa contendo a cultura foi mantida na horizontal em estufa BOD à 28°C, durante 15 dias. Após esse período, a cultura foi diluída 10x em PBS previamente autoclavado para observar a presença e posterior contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Após a contagem foi feito o ajuste de 1×10^5 parasitos / mL para os inóculos.

5.4 Preparo do inóculo

Após o ajuste do inóculo, a cultura com a 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* ressuspendido em Açai ou RPMI para a realização da infecção dos animais pela via oral.

5.5 Taxa de sobrevivência

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

5.6 Parasitemia

Para determinação da parasitemia, os camundongos foram avaliados diariamente a partir do 4° dia após infecção (DAI) até a negatização do exame por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia adaptada de Brener (1962). Cinco microlitros de sangue foram coletados da veia caudal dos camundongos para confecção de lâminas que foram observadas diariamente ao microscópio óptico. A curva de parasitemia foi plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada nos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneas por 0,1 mL de sangue e o período pré-patente, período patente e o pico máximo de parasitemia foram determinados.

5.7 Eutanásia, coleta, fixação

Os animais foram eutanasiados no 5°, 7° e 14° DAI e foi coletado o coração desses animais. Posteriormente à coleta, esses órgãos foram fixados em solução de Metanol-DMSO e processados rotineiramente para confecção de blocos de parafina. Esses blocos obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de quatro micrômetros. Foram confeccionadas lâminas dos blocos parafinizados do coração para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise do processo inflamatório.

5.8 Parasitismo

5.8.1 Desparafinização das amostras

Para a extração de DNA, os mesmos blocos de parafina descritos no item 5.7 foram usados. Quatro secções de 50 µm foram feitas em micrótomo e colocadas em microtubos de 1,5 mL para desparafinização, totalizando 200 µm de tecido. As navalhas foram higienizadas a cada corte com solução de hipoclorito a 2%. A desparafinização foi feita

seguindo o protocolo de (SILVA, 2015), com adaptações. Foram adicionados 1,5 mL de xilol no tubo com as amostras que foram mantidas em repouso por 10 minutos. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por três minutos e o xilol foi descartado vertendo-se o tubo. Em seguida, foram adicionados 1,5mL de xilol e centrifugado a 14.000 rpm por três minutos e novamente o xilol foi descartado. Após o descarte do xilol, a remoção do xilol bem como da parafina residual, foi feita com a adição de 1mL álcool absoluto. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. O álcool residual das amostras foi removido utilizando o concentrador de amostras à vácuo (CHRIST RVC 2-33), a 37° C, 1.300 rpm por 10 minutos.

5.8.2 Extração de DNA

Após a evaporação do etanol residual as amostras foram transferidas de tubos vertendo e com suaves batidas para o tubo de 2mL *Qiagen* com fundo redondo contendo uma unidade de *bead* para a etapa de digestão. A digestão do tecido foi feita em duas etapas: mecânica e química. A digestão mecânica se deu com a ruptura das células por meio de agitação em alta velocidade em tubos de plástico com *beads* de carboneto de tungstênio de 3mm. Para isso, foram utilizados dois ciclos de 30 segundos em uma frequência 25 agitações por segundo no *Tissue Lyser* (Tissue Lyser II, Qiagen) com a solução de lise nuclear do kit *Wizard™ Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, EUA). Após a digestão, o conteúdo macerado foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL *DNase E RNase free*. Em seguida, foram adicionados 3 µL de *RNase A solution* com posterior incubação a 37 graus por 30 minutos.

A digestão química foi realizada utilizando 30µL de Proteinase K na concentração de 20mg/mL (Proteinase K from *Tritirachium album*, Sigma) incubadas por dezoito horas a 65°C. Após o período de incubação, foram adicionados 200µL de *Protein Precipitation Solution* e foram homogeneizadas no vórtex por vinte segundos e resfriadas em gelo por cinco minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente.

Após a realização dessas etapas, o sobrenadante contendo o DNA foi coletado e transferido para novo tubo contendo 400µL de Isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por inversão até a turvação do DNA. Subsequentemente, foi feita a centrifugação a 14.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente. Em seguida, 400µL

de Etanol 70% foram adicionados e posteriormente feita a inversão para lavar o DNA e novamente foram centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado vertendo o tubo. Os eppendorfs ficaram invertidos e as amostras secando por tempo variável de trinta minutos à duas horas.. A reidratação do DNA foi feita com a adição de 30µL de *DNA Rehydratarion Solution*, por dezoito horas em temperatura ambiente. A qualidade e a concentração do DNA foram determinadas pela razão de absorbância de 260 a 280nm ($A_{260} / 280$), utilizando o espectrofotômetro (Nanodrop, GE Healthcare Products). E posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

5.9 Quantificação do processo inflamatório

A quantificação do processo inflamatório foi realizada em cortes submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina. Para avaliação do infiltrado inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 25 imagens (campos) aleatórias (áreatotal percorrida igual a 35493,7 µm²).

5.10 Quantificação do estresse oxidativo

5.10.1 Determinação da atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi medida no tecido de acordo com o método de Marklund e colaboradores (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Esse método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol, portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), Pirogalol, MTT e DMSO (dimetilsulfóxido). Para a realização da dosagem, fragmentos do tecido cardíaco homogeneizado com tampão fosfato foram utilizados. Inicialmente as amostras foram pipetadas em uma placa de Elisa. A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C. Logo após 150 µL de DMSO foram adicionados para cessar a reação. Posteriormente, a placa foi lida em espectrofotômetro de

placas à 570 nm. Após a leitura da placa, o valor de absorvância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorvância 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.

5.10.2 Determinação da atividade da Catalase

A atividade da Catalase (CAT) foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a uma absorvância de 240 nm, representada por U/mg de proteína (AEBI, 1984). Esse método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 1 minuto por espectrofotometria a 240 nm. Resumidamente, 100 mg do tecido cardíaco foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante retirado foi utilizado como amostra biológica. Foram utilizados os reagentes: tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliquoteado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 μ L e 30 μ L, respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorvância a 240 nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μ mol de hidrólise de H_2O_2 por minuto, por mL.

5.10.3 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; AUST, 1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (ATB) em se ligar a lipídios oxidados. Resumidamente, 200 μ L do tecido cardíaco foram homogeneizados com 1 mL de tampão por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. 500 μ L 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 absorvância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$), seguindo a lei de Lambert Beer. Os resultados foram expressos em U/ml/mg proteína (SOARES; CAMPOS; PENA; BANDEIRA et al., 2016).

6. RESULTADOS

6.1 Taxa de Sobrevida

Na quantificação da sobrevida, os animais infectados com formas TM do *T. cruzi*, no meio Açai foi registrada uma taxa sobrevida de 98%, enquanto nos animais infectados com formas TM do *T. cruzi* no meio RPMI foi registrada uma taxa de 83% sobrevida.

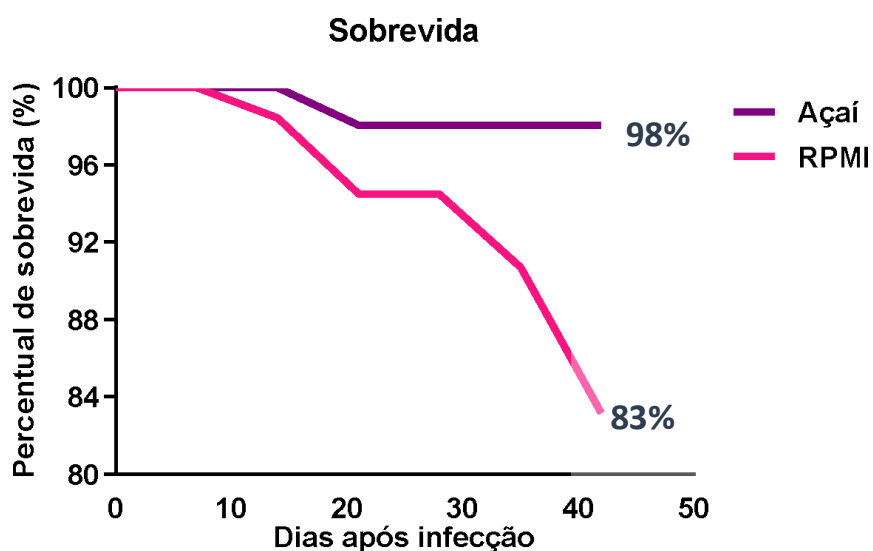


Figura 2: Taxa de sobrevivência de camundongos *Balb/c* infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* nos meios Açai (—) ou RPMI (—) . Cada curva representa a média de 24 animais de cada grupo infectado observados ao longo da fase aguda da infecção.

6.2 Parasitemia

Na Figura 3 e Tabela 1 observam-se as médias das curvas de parasitemia e dados obtidos das mesmas referentes aos animais pertencentes aos grupos Açai e RPMI. No grupo Açai constatou-se período pré-patente de 11 dias, patente de 28 dias e pico máximo de parasitemia no 16º DAI (11.475,00 tripomastigotas / 0,1 mL de sangue). Já no grupo RPMI o período pré-patente foi menor (4 dias), com período patente de apenas 26 dias e

o dia do pico máximo de parasitemia, no 12º DAI DPI (13.108,70 tripomastigotas/0,1 mL de sangue).

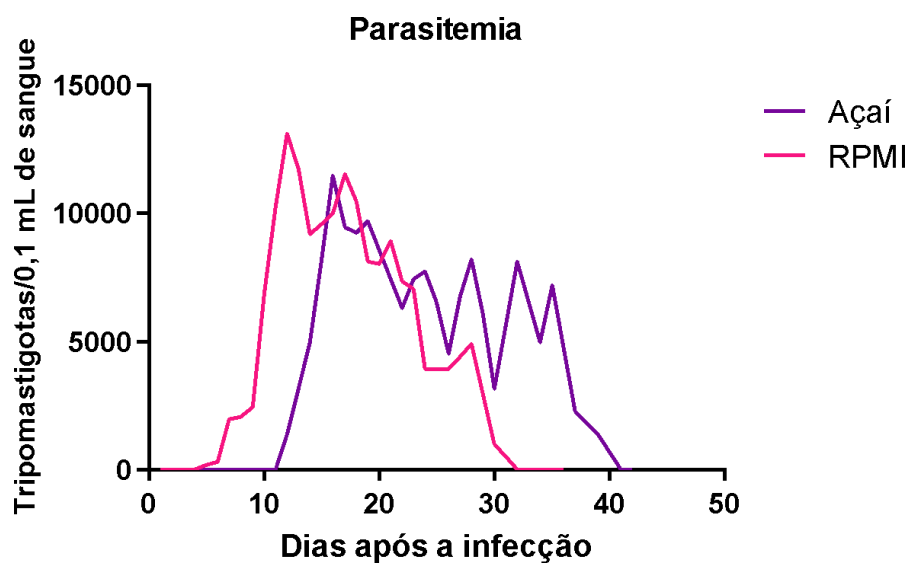


Figura 3: Parasitemia de camundongos *Balb/c* infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* nos meios Açai (—) ou RPMI (—). Cada curva representa a média de 24 animais de cada grupo infectado durante 42 dias após a infecção.

Tabela 1: Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas ou metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* nos meios RPMI ou Açai

Grupos	PPP (dia)	PP (dia)	PMP	DMPP
Açai	11	28	11.475,00	16
RPMI	4	26	13.108,70	12

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

6.3 Parasitismo

Na quantificação do parasitismo no tecido cardíaco, foi observado maior parasitismo tecidual nos animais infectados com o meio Açáí em relação ao meio RPMI no 7º DAI. Além disso, o parasitismo tecidual no grupo de animais infectados com o meio açáí no 7º DAI foi maior que o dos animais infectados com o mesmo meio no 5º DAI.

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

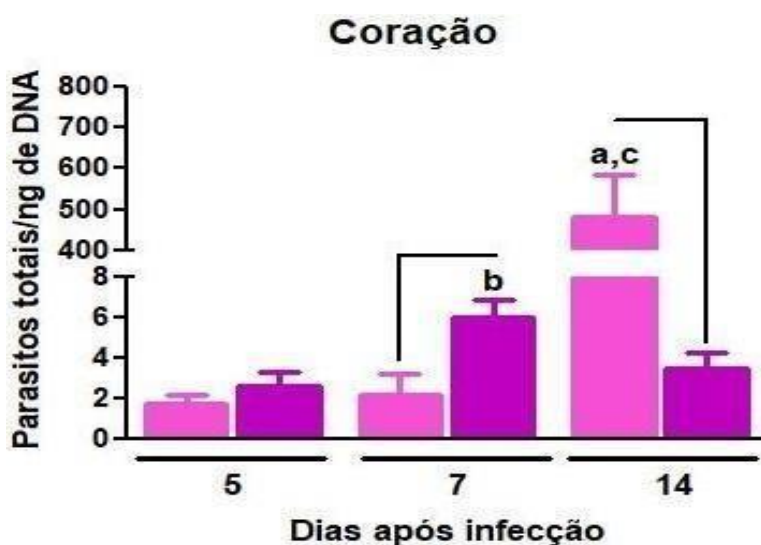


Figura 4: Número de parasitos no coração de camundongos *BALB/c* infectados por formas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi* em Açáí ou RPMI e eutanasiados ao longo das fases aguda (5, 7 e 14 DAI).

6.4 Processo inflamatório

O impacto da infecção pelas formas infectivas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* nos diferentes meios foi verificado sobre as alterações histopatológicas no coração no início da fase aguda da doença de Chagas e o resultado da análise quantitativa do processo inflamatório na camada muscular estão apresentados nas

Figuras 5. A análise morfométrica do coração mostrou a ausência de processo inflamatório em ambos os grupos infectados ao longo do período avaliado. No entanto, 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.

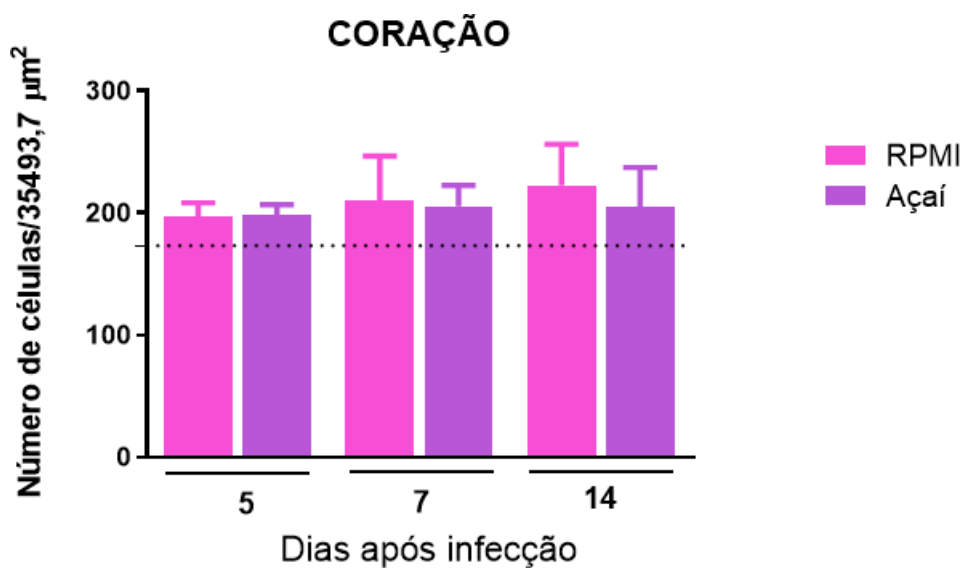


Figura 5: análise do processo inflamatório do coração de camundongos Balb/c não-infectados, infectados com as formas TM da cepa Y do *T. cruzi* em meio Açaí ou RPMI. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos de animais não infectados (n=12). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo.

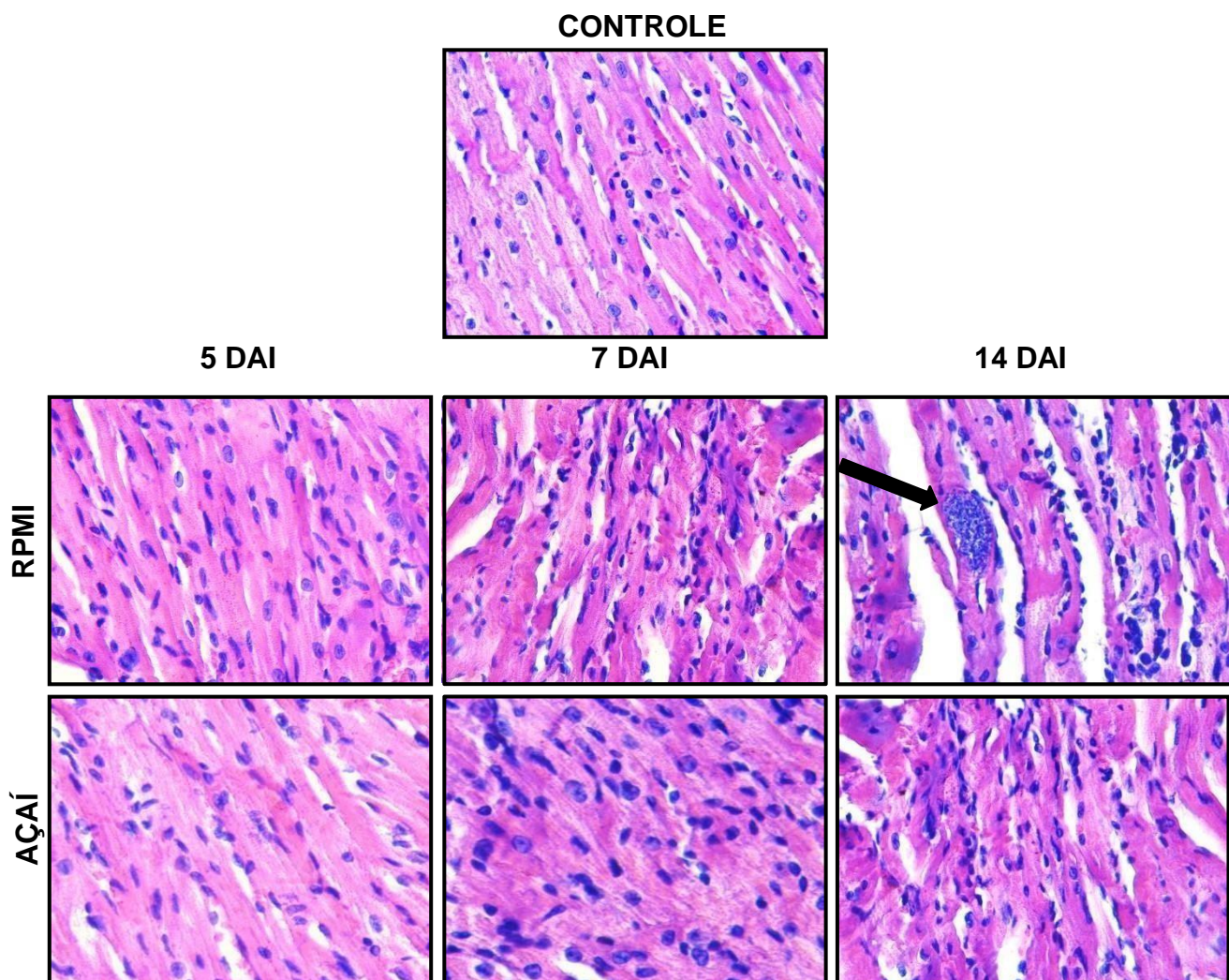


FIGURA 6: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos Balb/c após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* nos meios Açaí ou RPMI. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle) e em animais infectados de ambos os grupos. A seta preta indica a presença de ninho de amastigotas no coração de animais infectados em meio RPMI no 14° DAI.

6.5 Estresse Oxidativo

O resultado da análise do estresse oxidativo e da atividade antioxidante no coração mostrou uma redução significativa da atividade de superóxido dismutase em comparação com o grupo controle no grupo RPMI no 7° DAI e em ambos os grupos infectados e no 14° DAI. Por outro lado, foi observado um aumento significativo da atividade da enzima antioxidante catalase no grupo RPMI nos dias 7 e 14 após infecção e no grupo Açaí no 14° DAI.

A avaliação da atividade das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não resultou em diferenças significativas.

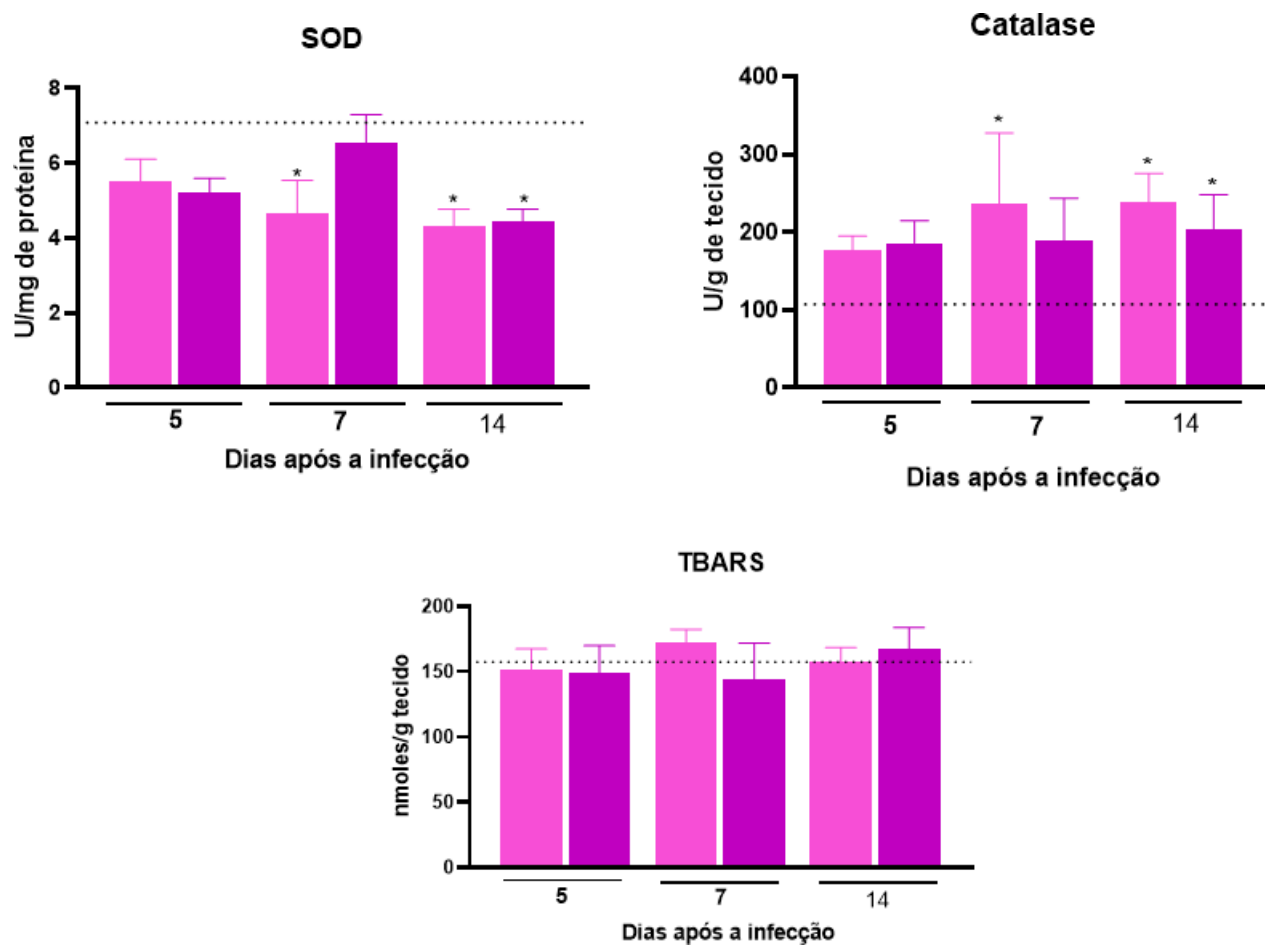


Figura 7: Quantificação do estresse oxidativo tecidual no coração de camundongos BALB/C infectados por via oral com as formas TM da cepa Y do *T. cruzi* em meio RPMI ou Açai aos dias 5^o, 7^o e 14^o após infecção.

7 DISCUSSÃO

Esse trabalho proporcionou um melhor entendimento da influência do meio no qual o parasito é inserido no hospedeiro vertebrado na infecção oral com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y do *T. cruzi*. No que diz respeito à taxa de sobrevivência, foi observado que os animais infectados pelas formas TM no meio açai tiveram uma taxa de sobrevivência maior do que aqueles infectados pelo meio RPMI. No grupo Açai a taxa de sobrevivência foi de 98%, já no grupo RPMI foi de 83%. Os dados encontrados no grupo RPMI condizem com aqueles observados nos surtos orais, onde a taxa de mortalidade dos pacientes varia entre 8-35%, superando a taxa observada na infecção clássica vetorial (5-10%).(CHATELAIN,2017; BERN,2015)

Além disso, apesar de nesse trabalho a infecção nos diferentes meios apresentarem níveis parasitêmicos semelhantes, animais infectados com formas TM no meio açai apresentaram período pré-patente mais longo. No entanto, nesses animais o período patente foi maior, com níveis parasitêmicos mais baixos do que os animais infectados com formas TM no meio RPMI. Em um estudo conduzido por Silva-dos-Santos e colaboradores (2017), camundongos Balb/C infectados pela via oral com formas TM da cepa Dm28c-luc, apresentaram curva de parasitemia semelhante ao que foi observado no grupo RPMI. Apesar da cepa do *T. cruzi* utilizada ser diferente, pode-se especular que a influência da fonte do inóculo na interação inicial parasito/célula hospedeira e consequentemente, no curso da infecção ocorre de forma distinta, sendo dependente do meio de inóculo.

No que diz respeito do parasitismo tecidual, nesse estudo foi observado a presença de parasitos no tecido cardíaco nos animais infectados em ambos os grupos ao longo de todo o período de avaliação. No 7º DAI o grupo de animais infectados com Açai apresentou um aumento da carga parasitária em relação aos animais infectados também com Açai no 5ª DAI, além de um aumento da carga em relação aos animais infectados em meio RPMI no mesmo dia. No 14º é possível observar uma inversão desse resultado, sendo que o grupo de animais infectados em meio RPMI apresentou um parasitismo tecidual elevado em relação ao grupo Açai. Somando-se a isso, na análise longitudinal do grupo RPMI, mostrou um aumento da carga parasitária no coração dos animais infectados em relação aos dias 5 e 7. Esse achado observado no grupo Açai corrobora

com o estudo de Santo-Albuquerque e colaboradores (2017) no qual foram observados, a presença de parasitismo no 7º DAI no tecido cardíaco de camundongos Balb/C infectados pela via oral com a cepa Dm28c (DTU-TcI) geneticamente modificado e a cepa Tulahue'n (DTU-TcVI).

Nesse estudo a via oral foi o sítio de entrada do parasito, e mesmo não sendo observado processo inflamatório em ambos os grupos infectados ao longo dos dias de análise, foi possível perceber a presença de ninhos de amastigotas nos animais infectados e eutanasiados no 14º DAI do grupo RPMI. Em um estudo que avaliou, experimentalmente, a infecção pela via oral da cepa SC2005 do *T. cruzi* obtida de um paciente da Santa Catarina, Brazil, Domingues e colaboradores (2015) observaram ninhos de amastigotas e intenso infiltrado inflamatório no coração de camundongos swiss 26 DAI. Apesar do fato de que foi observado ninhos amastigotas no 14º DAI no presente estudo, o achado do Domingues e colaboradores difere da análise do processo inflamatório feita no presente estudo já que não foi observado processo inflamatório entre os grupos de animais infectados no presente estudo.

No que diz respeito à avaliação do estresse oxidativo no coração, não foi observado diferença significativa de TBARS (o único parâmetro para quantificação de estresse oxidativo nesse estudo) entre os animais infectados e os animais pertencentes ao grupo controle.

É sabido que o *T. Cruzi* possui um mecanismo de escape da resposta imune, ou seja, após a fagocitose do *T. cruzi*, a NADPH oxidase associada à membrana do macrófago é ativada, produzindo o radical superóxido O_2^- – que pode ser convertido em H_2O_2 dentro do lúmen do fagolisossomo. Macrófagos estimulados com citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF) induzem a expressão da óxido nítrico sintase (iNOS), gerando óxido nítrico (NO) no citoplasma a partir da oxidação da l-arginina. O NO então se difunde no vacúolo do fagolisossoma e reage com o O_2^- – para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente oxidante. Radicais livres secundários, como carbonato CO_3^- , dióxido de nitrogênio (NO_2) e radicais hidroxila (OH), são produzidos a partir do $ONOO^-$. Essas espécies reativas de oxigênio (ROS) podem causar vários danos celulares e morte do parasita dentro do fagolisossoma. Para sobreviver nesse ambiente altamente oxidativo, o parasito possui uma complexa rede de enzimas antioxidantes, como peroxidases (TcAPX, TcCPX e TcMPX), Catalases e superóxido dismutases (SOD), que atuam na detoxificação de ROS, e estão distribuídas em diversos compartimentos celulares (Cardoso et al., 2016).

Baseando nisso, podemos hipotetizar que o aumento da catalase induzido pelos parasitos no tecido cardíaco que foi observado nesse estudo provavelmente é um mecanismo de defesa do parasito para se proteger dos efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio. Anulação dos efeitos das ROS pelas catalases provavelmente resultou na anulação dos seus efeitos danosos e proinflamatórios, por isso a ausência de inflamação no tecido cardíaco.

Diante do exposto, é importante salientar que mesmo havendo comprovação científica (Moura et al., 2015) dos efeitos antioxidantes do açaí, nesse trabalho o meio no qual o parasito é inserido no hospedeiro vertebrado, não é capaz de interferir no curso da infecção, uma vez que em ambos os grupos infectados, a infecção oral pelo *T. cruzi* não foi capaz de gerar processo inflamatório cardíaco, ainda que tenha sido detectado parasitismo tecidual nesse órgão. Além disso, foi observado aumento da atividade da enzima catalase tanto no grupo de animais infectado com TM do *T. cruzi* no meio RPMI, quanto no grupo Açaí.

8 CONCLUSÃO

Ao final desse estudo foi possível concluir que a infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* em diferentes meios, RPMI e Açaí, foi responsável pelo parasitismo cardíaco em ambos os grupos infectados. No entanto a presença dos parasitos no coração não foi capaz de desencadear processo inflamatório ao longo do período de avaliação, ainda que tenha sido observado presença de ninhos de amastigotas em camundongos infectados no meio RPMI. Esse fato está associado, possivelmente, ao aumento da atividade da enzima antioxidante catalase no tecido cardíaco, como um mecanismo de proteção do *T. cruzi* às espécies reativas produzidas por macrófagos na tentativa de eliminação do parasito.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization(WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1 > Acesso em: 12 Mar. 2023.
2. DRUGS for Neglected Diseases initiative (DNDi). Chagas disease. Disponível em: < [Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease | DNDi](#) >. Acesso em: 13 Mar. 2023.
3. LHC Sangenis. Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: revisão sistemática. Brasil Scientific Electronic Library Online (SciELO – Brasil). Disponível em: < <https://www.scielo.org/article/rbepid/2016.v19n4/803-811/pt/> > .Acesso em: 13 Mar. 2023
4. MP Santana. Prevalência da doença de Chagas entre doadores de sangue do Estado do Piauí, Brasil, no período de 2004 a 2013. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/csp/a/yPHWvmp4HwwdtVNsNYqHg3q/abstract/?lang=pt> > Acesso em: 14 Mar. 2023
5. Kollien & Schaub . The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475800017245?casa_token=dVh1D05DDjEAAAAA:-3eMFI-G8ChxukWzF6jeJaxgfuspSzCXg0NgLmL8Zh1lCWW8Xby8Eb4_tbS_MZ6vdomBHdoeNNO > Acesso em: 15 Mar. 2023
6. Zigman Brener. *Typanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Disponível em: < <https://static.scielo.org/scielobooks/nf9bn/pdf/dias-9788575412435.pdf#page=27> > Acesso em: 16 Mar. 2023
7. Teixeira. Chagas disease. Disponível em: < https://pmj.bmj.com/content/82/974/788.short?casa_token=wLxp-j8bqCIAAAAA:FXwqsux2lv2M4Nos-en-ohhss2-mgqBGs4AdNWvFVgMmb2nzLHD-FzwmTv0vxG_wXXwgCAYrLmms > Acesso em: 17 Mar. 2023
8. JCP Dias,et al. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/KDWQ4Vhbb6ppyXGm4bDjFvQ/?format=pdf&lang=pt> > Acesso em: 18 Mar. 2023

9. LV Pacheco, et al. Transmissão oral da doença de Chagas: Uma revisão de literatura. Disponível em: < <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12636/11312> > Acesso em: 19 Mar. 2023
10. Passos. Sobrevivência e infectividade do Trypanosoma cruzi na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. Disponível em: < http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?pid=S1679-49742012000200005&script=sci_arttext&tlng=en > Acesso em: 20 Mar. 2023
11. Barcelos. Qualidade Microbiológica de Polpas de Açaí Comercializadas no Município de Ji – Paraná, Rondônia. Disponível em: < <https://revista.pgskroton.com/index.php/uniciencias/article/view/4316> > Acesso em: 21 Mar. 2023
12. XIE. Açaí juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021915011001997?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=7acee3b66ec8a4fb > Acesso em: 21 Mar. 2023
13. Santana. Oral Transmission of Trypanosoma cruzi, Brazilian Amazon. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302584/> >
14. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 1974, 47, 469–474. [CrossRef] [PubMed]
15. Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzym. 1984, 105, 121–126. [CrossRef]
16. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978, 52, 302–310. [CrossRef] [PubMed]
17. Domingues. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0122566> > Acesso em: 30 Mar. 2023