UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA):
exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos
senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?**

Vânia Brazão

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA):
exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos
senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Vânia Brazão

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Brazão, Vânia

Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA): exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?. Ribeirão Preto, 2008.

101p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: do Prado Júnior, José Clóvis.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Zinco. 3. Dehidroepiandrosterona.

Aluna: Vânia Brazão

Título: Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA): exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus..

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece (Filipenses 4.13)”.

“Por que o senhor Deus é sol e escudo: o senhor dá graça e glória (Salmo 84.11)”.

*Aos meus pais Manoel (in memoriam) e Darci que me deram a vida, exemplos de
dignidade, retidão, amor e carinho.*

*À Ana Lúcia, minha irmã, exemplo de coragem, determinação, e cujo incentivo foi
fundamental.*

*Aos meus irmãos Vanessa, Luciana, Eduardo e Carlos pelas alegrias, incentivo,
carinho e torcida positiva.*

Ao Gustavo pela cumplicidade e compreensão.

*Aos meus sobrinhos Ana Júlia, João Pedro, Gabriele, Mariângela, Brenda, Drielle,
Cássio, e Evandro pelas alegrias, amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior pela oportunidade e confiança a mim depositada. Sua alegria e incentivo foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho...

Muito obrigada!

À Miriam Paula Alonso Toldo, técnica do laboratório de parasitologia, pelo carinho e atenção sempre dispensados.

Às amigas Leony Cristina Caetano, Marina Del Vecchio Filipin e Fabrícia Helena Santello, pós-graduandas do laboratório de parasitologia, colaboradoras deste trabalho, cuja competência, sabedoria, incentivo, e carinho foram imprescindíveis.

À Luana Naiara Caetano pela disposição sempre demonstrada em acompanhar os experimentos.

Às amigas Jacqueline, Natalícia, Nunila, Rita e Roselaine pelo carinho e incentivo.

Aos meus cunhados Cristina, Sueli, Marcos e Jair pelo carinho.

À Juliana, Gláucia, Grace, Lidervan, Fernando, Silvânia, Joane, Luiz Eduardo (Gaio) e Fabrício pela amizade e convívio e a todos os demais colegas da casa 12.

Aos colegas Gláucio, Álvaro, Ricardo (Pancinha), Roberto, Flávio, João Paulo e Camilo.

Aos docentes de Parasitologia da FCFRP-USP Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque e
Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão.

Aos técnicos do laboratório de Parasitologia, Maria Antônia (Toninha) e Georgius
pela ajuda oferecida.

Às funcionárias da FCFRP-USP Aline Carolina Lemos, Maraísa Palhão Vérri,
Stella Felipe de Freitas, Regina de Albuquerque, Vânia Cláudia de
Albuquerque e Wânia Maria Tavares da Silva.

Ao prof. Dr. Sérgio Zucoloto e as técnicas Laura e Márcia, do laboratório de
Patologia da FMRP-USP, pela grande colaboração na confecção das lâminas histológicas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, agradeço a todos sem exceção.

Aos funcionários da seção de pós-graduação: Ana, Carlos Armando e Rosana.

Aos animais utilizados nos experimentos cuja colaboração involuntária foi essencial.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto-USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização
deste trabalho.

Sumário

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Doença de Chagas e o Sistema Imune.....	5
1.3 Correlação entre persistência do parasita e severidade da doença de Chagas na fase crônica.....	7
1.4 Atrofia Tímica.....	8
1.5 Zinco.....	11
1.6 Dehidroepiandrosterona (DHEA).....	16
2. OBJETIVOS	19
3. JUSTIFICATIVA	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Animais utilizados.....	22
4.2 Grupos Experimentais	22
4.3 Cepa de <i>T.cruzi</i> e Infecção.....	23
4.4 Tratamento – Suplementação de Zinco e DHEA.....	23
4.4.1 Suplementação de Zinco.....	23

4.4.2	Suplementação de DHEA.....	24
4.5	Dias de Experimento.....	24
4.6	Eutanásia e Coleta de sangue.....	24
4.7	Contagem de parasitas.....	25
4.8	Peso dos Órgãos.....	25
4.9	Contagem global de macrófagos peritoneais.....	25
4.10	Preparação da suspensão de células peritoneais e Dosagem de Óxido.....	26
4.11	Dosagens de IL-12.....	27
4.12	Dosagens de IFN- γ	28
4.13	Técnica histopatológica.....	29
4.14	Análise do parasitismo tecidual.....	29
4.15	Análise estatística.....	30
5.	RESULTADOS	31
5.1.	Parasitemia.....	31
5.2	Peso Cardíaco.....	33
5.3	Peso do Timo.....	35
5.4	Contagem global de macrófagos peritoneais.....	37
5.4.1	Grupos Controles (sem infecção).....	38
5.4.2	Grupos Infectados.....	37
5.5	Dosagem de Óxido Nítrico	40
5.5.1	Grupos Controles (sem infecção).....	40
5.5.2	Grupos Infectados.....	41
5.6	Dosagem de IL-12.....	43

5.6.1	Grupos Controles (sem infecção).....	43
5.6.2	Grupos Infectados.....	44
5.7	Dosagens de IFN- γ	46
5.7.1	Grupos Controles (sem infecção).....	46
5.7.2	Grupos Infectados	47
5.8	Parasitismo tecidual do Coração	49
5.9	Histopatologia do Coração.....	50
5.9.1	Grupos Controles (14° dia).....	50
5.9.2	Grupos Controles (180° dia).....	51
5.9.3	Grupos Infectados (14° dia).....	52
5.9.4	Grupos Infectados (180° dia).....	54
6.	DISCUSSÃO	56
7.	CONCLUSÃO	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

ANEXO D

ANEXO E

ANEXO F

Resumo

RESUMO

BRAZÃO, V. Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA): exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A modulação das respostas imunológicas frente à administração de substâncias farmacologicamente ativas em modelos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído de maneira importante nas investigações de novas terapias para a doença de Chagas. O presente estudo teve como objetivo avaliar um possível efeito sinérgico imunoestimulatório subsequente à administração de sulfato de zinco e DHEA durante o curso da infecção. O DHEA tem sido amplamente estudado e possui ação comprovada no direcionamento da resposta imune Th1, sendo muito efetivo para diferentes patógenos tais como vírus, bactérias e protozoários. O zinco é considerado um oligoelemento de extrema importância para a manutenção das funções imunes. Age como um inibidor da apoptose celular além de coordenar a seleção fisiológica de células intra-tímicas. Durante a fase aguda da infecção, zinco e DHEA apresentaram atividade estimulatória sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. Comprovamos também a ação sinérgica de DHEA e zinco, através dos parâmetros analisados tais como parasitemia sangüínea e tecidual, além de fatores imunológicos como aumento nas concentrações de NO, IFN- γ , IL-12, e número de macrófagos. Este efeito imuno-modulador durante a fase aguda da infecção chagásica pode contribuir para a prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*; Zinco; Dehidroepiandrosterona; Ratos Wistar

Abstract

ABSTRACT

BRAZÃO, V. **Administration of zinc and dehydroepiandrosterone (DHEA): would they exert a synergic role in the immune response of aged Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*?**. 2008. 101f. Dissertation (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The modulation of the immune responses as well as the administration of pharmacologically active substances in infected *T. cruzi* experimental models has contributed to important investigations of new therapies in the treatment of Chagas' disease. However, the use of antiparasitary drugs in the chronic indeterminate or in the cardiac chronic phases of Chagas disease is still a controversial issue. This study has as objectives to evaluate a possible synergic immunostimulatory effect after the administration of zinc and DHEA during the course of the infection. A bulk of evidences has been presented confirming the effectiveness action of DHEA on the Th1 immune response against a wide range of pathogens such like viruses, bacteria and protozoans. Zinc is considered an oligoelement of essential importance in the maintenance of the immune functions, as well as inhibiting cell apoptosis besides the function of coordinate the physiological selection of thymic T cells. During the acute phase of infection, zinc and DHEA displayed enhanced stimulatory activity on host's immune response. A synergistic action of zinc and DHEA was also observed through the evaluations of distinct parameters such as blood and tissue parasitism, number of macrophages and NO levels as well as elevated concentrations of some immunological interleukins such as IFN- γ and IL-12. This work also demonstrates that the enhanced immunostimulatory effect observed during the acute phase certainly contributes in the prevention of tissue damage that normally occurs during the late chronic phase.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Zinc; Dehydroepiandrosterone; Wistar rats.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante os 7°, 14° e 21° dias após a infecção.....**31**
- Figura 2.** Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mm³, de ratos *Wistar* machos controles (não infectados) durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias de experimentos.....**37**
- Figura 3.** Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mm³, de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias após a infecção.....**38**
- Figura 4.** Concentrações de NO (µM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante os 7°, 14°, 21°, e 180° dias de experimentos.....**40**
- Figura 5.** Concentrações de NO (µM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS (10µg/mL), coletadas de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias após a infecção.....**41**
- Figura 6.** Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias de experimentos.....**43**

Figura 7. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias após a infecção.....	44
Figura 8. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro ratos <i>Wistar</i> machos não infectados (controles) durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias de experimentos.....	46
Figura 9. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> durante os 7°, 14°, 21° e 180° dias após a infecção.....	47
Figura 10. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados (controles) colhidos no 14° dia de experimento.....	50
Figura 11. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados (controles) colhidos no 180° dia de experimento.....	51
Figura 12. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> colhidos no 14° dia após a infecção.....	52
Figura 13. Cortes histológicos (6 μ m) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> colhidos no 180° dia após a infecção.....	54

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso cardíaco de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante a evolução da doença de Chagas experimental.....**33**

Tabela 2. Peso do timo de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante a evolução da doença de Chagas experimental.....**35**

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante o 14º dia após a infecção.....**49**

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2 - B cell lymphoma-2 (Célula B de linfoma 2)

C – Controle

CZ - Controle Suplementado com Zinco

CD - Controle Suplementado com DHEA

CDZ - Controle Suplementado com DHEA e Zinco

DHEA - Dehidroepiandrosterona

DHEA-S - Sulfato de Dehidroepiandrosterona

HPA - eixo Hipófise-Hipotálamo-Adrenal

I - Infectado

IZ - Infectado Suplementado com Zinco

ID - Infectado Suplementado com DHEA

IDZ - Infectado Suplementado com DHEA e Zinco

IFN- γ - Interferon Gama

IgG- Imunoglobulina G

IL-1 - Interleucina 1

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

LPS – Lipopolissacarídeos

MHC - Complexo principal de Histocompatibilidade

NK - Células natural killer

NO - Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

RPMI - Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)

Th - T Helper

Th1 - T Helper 1

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNF- β - Fator de Necrose Tumoral Beta

ZnSO₄ - Sulfato de Zinco

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma das mais sérias doenças parasitárias da América Latina, com impacto social e econômico de peso bem maior do que os efeitos combinados de outras doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose (WORLD BANK, 1993). Segundo a Organização Mundial de Saúde existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas, e cerca de 120 milhões (equivalente a 25% da população da América Latina) correm o risco de serem infectadas. A importância dessa endemia se reflete no sentido econômico onde é responsabilizada pelas taxas de aposentadoria precoce, como consequência direta da doença (WHO, 2003).

Descrita por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, a tripanossomíase americana tem por agente etiológico o flagelado digenético *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção em seres humanos, ou outros vertebrados é transmitida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae contaminados por *T. cruzi* (CHAGAS, 1909). Essa via pode ser considerada como a principal maneira de transmissão da doença de Chagas nas Américas (DIAS, 2000). O triatomíneo após realizar a hematofagia em um hospedeiro, libera as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes ou urina que penetram através da solução de continuidade proliferando-se ativamente no interior de macrófagos. Findo esse ciclo, as células parasitadas se rompem, liberando centenas de tripomastigotas que ganham a circulação sendo sua detecção no sangue periférico uma característica da fase aguda da doença. Durante essa fase é observada uma imunossupressão com redução nas respostas linfoproliferativas para antígenos do parasito (REED et al., 1977; PINGE-FILHO et al., 1999).

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção é controlada através da resposta imune dirigida contra o parasita, determinando o desaparecimento das formas tripomastigotas do sangue. Estes indivíduos passam para uma fase assintomática onde somente exames sorológicos podem indiretamente detectá-los. Vários anos após a contaminação, dependendo do tipo de cepa e estado imunológico do hospedeiro dentre outros fatores, cerca de 30% dos indivíduos infectados desenvolvem manifestações cardíacas e/ou digestivas, enquanto a maioria permanece assintomática (ZANG & TARLETON, 1998; GARCIA et al., 2005). Na fase crônica da infecção humana por *T. cruzi*, para a análise do perfil parasitêmico utilizam-se preferencialmente reações sorológicas como: detecção de IgG (MONCAYO & YANINE, 2006), hemaglutinação indireta, imunofluorescência, exames de isolamento do parasita tais como xenodiagnóstico, hemocultura e mais recentemente através da biologia molecular com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RUSSOMANDO et al., 1998; GALVÃO et al., 2003).

Antes da presença humana nos ecótopos naturais, *T. cruzi* se encontrava restrito à situação silvestre, circulando entre mamíferos no ambiente natural, por meio do inseto vetor. Quando o homem invadiu esses ecótopos e se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, ofereceu novas opções de disseminação ao inseto vetor (DIAS & COURA, 1997). Os triatomíneos hematófagos encontraram naquelas habitações, condições ideais de abrigo e oferta alimentar abundante, tornando a transmissão vetorial o mecanismo primário de difusão da doença. Essa adaptação mostrou-se eficiente para cerca de uma dezena de espécies e é considerado um fator primordial na ocorrência da expansão da doença de Chagas humana.

Os triatomíneos possuem hábitos geralmente noturnos e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados ingerem os tripomastigotas circulantes, os quais após multiplicação e

metaciclologênese no tubo digestivo desses, são eliminados em suas fezes podendo infectar novos hospedeiros vertebrados.

Além da transmissão vetorial da doença, mecanismos secundários foram estabelecidos, tais como a transmissão congênita (BITTENCOURT, 2000), amamentação e via transfusional (MONCAYO & YANINE, 2006). Outras formas de transmissão incluem: transmissão acidental em laboratório, transplante de órgãos, oral e sexual (BRENER et al., 2000).

T. cruzi mostra uma patogenia especialmente determinada por características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores tais como: temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas e morfológicas da cepa infectante (BRENER et al., 2000). *T. cruzi*, por suas características biológicas e genéticas, constitui-se de cepas que podem ter comportamentos peculiares quando inoculadas em animais experimentais (BRENER, 1965).

ANDRADE et al. (1970), relataram a existência de cepas com predominância de formas delgadas e tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea, apresentando altos e precoces picos parasitêmicos. Entretanto, existem cepas que apresentam característica morfológica larga, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MELO & BRENER, 1978). Essa conformação morfológica confere a essa cepa uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência, os tripomastigotas permanecem por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

A parasitemia sangüínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessária para o

estabelecimento da correlação anátomo-patológica e o monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993). Sendo assim, o estudo da fase aguda da infecção, induzida por *T. cruzi*, pode ser de grande importância, considerando que diferentes autores sugerem que muitas lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença durante essa fase (MONCAYO & YANINE, 2006).

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente por meio do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, incluindo roedores silvestres (BORGES et al., 1982; BORGES et al., 1992; PRADO JÚNIOR et al., 1998; PRADO et al., 1999; DOST et al., 2002; CAETANO et al., 2006), camundongos (CARDILLO et al., 1996) e ratos (SANTELLO et al., 2007; SANTOS et al., 2007a; BRAZÃO et al., 2008a), podendo reproduzir nos mesmos os distintos aspectos patológicos da doença humana. Com relação à doença de Chagas, o estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhante às causadas pela doença humana (BRENER et al., 2000).

A doença de Chagas pode também estar associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. É de amplo conhecimento o envolvimento da resposta imune celular Th1 para o controle da doença de Chagas em sua fase inicial. Assim, indivíduos chagásicos crônicos e portadores do vírus HIV podem apresentar reativação da doença, provavelmente devido à supressão da imunidade celular, característica de indivíduos imunodeprimidos (COURA & CASTRO, 2002; BRITO et al., 2003).

1.2. Doença de Chagas e o Sistema Imune

A infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita, fato de extrema importância na redução da carga parasitária (ALIBERTI et al., 1996). Contudo, a resistência do hospedeiro durante a infecção experimental por *T. cruzi* depende da imunidade inata e da adquirida, que requer esforços combinados de células que incluem macrófagos, células natural killer (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como a produção de anticorpos por células B (BRENER & GAZZINELLI, 1997; MARTIN & TARLETON, 2004).

Animais durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* exibem nos tecidos ninhos contendo parasitos intactos e bem definidos, que são visíveis tanto por métodos histológicos convencionais quanto por métodos mais sensíveis como a técnica de PCR. Com a mobilização efetiva da resposta imune durante a fase aguda, ocorre redução significativa da carga parasitária sanguínea, assim como a diminuição de ninhos. Porém, tal resposta não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER et al., 2000), o que contribui para o aparecimento das manifestações crônicas (BUSTAMANTE et al., 2007). Camundongos que apresentam uma resposta imune deficiente, tais como T CD8⁺ knock-out exibem níveis elevados de ninhos nos tecidos, assim como alta mortalidade (TARLETON et al., 1992; TARLETON et al., 1996). Portanto, tais estudos sugerem que o desenvolvimento da resposta imune fornece meios para o reconhecimento e destruição de células infectadas por parasitas antes que os ninhos sejam completamente formados, o que contribui para que estes não sejam prevalentes na fase crônica da infecção (ZHANG & TARLETON, 1999).

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito. Esse último demonstrou-se altamente citotóxico contra as formas epimastigotas desse parasito (THOMSON et al., 1999). Quando os macrófagos são ativados, liberam óxido nítrico (NO) que está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, agregação de plaquetas, e neurotransmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA & HIGGS, 2006). É uma molécula efetiva contra patógenos intracelulares tais como *T. cruzi*, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007). NO é produzido pela enzima NO sintetase (NOS), a qual existe em 3 isoformas, que diferem na sua localização celular e expressão, sendo: constitutiva, induzida e neuronal (QUEIROZ & BATISTA, 1999). A NOS₂, também conhecida como óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), é produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células NK, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais, miócitos e fibroblastos (KILBOURN & BELLONI, 1990; VESPA et al., 1994). A expressão de iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, tais como IL-1, IFN- γ , TNF- α e outros produtos bacterianos (LPS), os quais aumentam a sua expressão, sendo que glicocorticóides, IL-4, IL-8, IL-10, e TNF- β , entre outros, são responsáveis por sua inibição (HIBBS et al., 1987; MARTIN et al., 1994; MAYER & HEMMENS, 1997).

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1996). Desta forma os macrófagos secretam IL-12 que ativa as células NK a produzirem IFN- γ (ALIBERTI et al., 1996). Este age sobre os macrófagos, ativando-os para atividade microbicida (GAZZINELLI, et al., 1992; REED, 1995). A citocina pró-

inflamatória TNF- α , produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1988), participa dessa interação de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ (OSWALD et al., 1992).

IL-12 além de atuar sobre as células NK, promove uma interação entre a imunidade inata e a adquirida por induzir a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ (ABBAS, 2005). Estudos utilizando animais IL-12 knock-out têm confirmado o importante papel desta citocina na resistência à infecção experimental por *T. cruzi* (MÜLLER et al., 2001).

O IFN- γ , produzido por células NK e células T ativadas, estimula eficientemente a fusão do fagossoma com o lisossoma e a expressão do MHC de classe II nos macrófagos, efetivo na contenção da replicação intracelular (*in vivo e in vitro*) do parasita através da indução da biosíntese de NO por macrófagos ativados (ALIBERTI et al., 1996). O papel protetor do IFN- γ no início da infecção foi amplamente demonstrado por REED em 1995. Esses estudos foram confirmados utilizando camundongos suscetíveis à infecção, geneticamente deficientes do IFN- γ (ROTTENBERG et al., 1996).

1.3. Correlação entre persistência do parasita e severidade da doença de Chagas na fase crônica.

Hipóteses e controvérsias têm sido propostas para explicar o mecanismo envolvido na lenta, mas progressiva cardiomiopatia característica da doença de Chagas. Essas hipóteses incluem, entre outros, a destruição de células miocárdicas por parasitas (SANTOS-BUCH & ACOSTA, 1985), danos a gânglios parassimpáticos de órgãos alvo (KOBBERLE, 1974),

anormalidades micro-vasculares (ROSSI, 1990) e auto-imunidade (CUNHA-NETO et al., 1995; CUNHA-NETO et al., 1996). ZHANG & TARLETON (1999), através de PCR, método este altamente sensível para a detecção de DNA de parasitas, que permite também detectar kDNA que podem ser liberados após a destruição do parasita nos sítios de resposta inflamatória. Os autores utilizando dois diferentes modelos de infecção por *T. cruzi* mostraram absoluta correlação entre a persistência de parasitas e a severidade da doença de Chagas em hospedeiros cronicamente infectados.

Estudos em humanos mostraram que a intensidade da miocardite crônica correlaciona-se diretamente com o nível de antígenos do parasita no coração (HIGUCHI et al., 2003). Trabalhos de JONES et al. (1993) e VAGO et al. (1996) detectaram DNA de *T. cruzi* somente nos órgãos que mostravam severa patologia. Estudos demonstram, portanto, que independente do mecanismo envolvido na destruição celular, a presença de parasitas tem papel crucial no desenvolvimento da patologia da doença de Chagas crônica, e sugere a perspectiva de protocolos terapêuticos que controlem a carga parasitária podendo com isso reduzir a patologia da doença de Chagas (MARINHO et al., 1999).

1.4. Atrofia Tímica

Diversos trabalhos enfatizam a importância de um adequado equilíbrio imuno-endócrino durante o curso de uma infecção (BECKAGE, 1993; KLEIN, 2004; ESCOBEDO et al., 2005), visando à manutenção da homeostasia corpórea (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996).

O curso da doença de Chagas pode ser intensamente influenciado pelo equilíbrio do sistema imuno-endócrino (ROGGERO et al., 2006; PÉREZ et al., 2007; SAVINO et al., 2007).

Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α ativam o eixo hipófise-hipotálamo-adrenal (HPA), causando elevação na produção de glicocorticóides. Distúrbios nestes sistemas inter-relacionados podem estar envolvidos na injúria tecidual, além de influenciar o curso de diversos estados infecciosos (BEFUS et al., 1999; BESEDOVSKY & DEL REY, 2000; ELENKOV et al., 2005). As características patológicas da infecção estão associadas com excessiva síndrome inflamatória, mediada principalmente por TNF- α (ROGGERO et al., 2002; ROGGERO et al., 2004). Vários trabalhos mostram que TNF- α possui um papel duplo na proteção durante a infecção aguda por *T. cruzi*, essa citocina é crítica para a defesa do hospedeiro (SILVA et al., 1995; CASTAÑOS-VELES et al., 1998), podendo também participar do dano tecidual e letalidade da doença (TRUYENS et al., 1995; TRUYENS et al., 1999).

Recentes trabalhos mostram que o desenvolvimento de timócitos e seu envio para outras partes do organismo podem ser alterados como resultado de doenças infecciosas. O timo é o órgão linfóide central, no qual as células T sofrem o processo de diferenciação, sendo responsável por prover as células imunocompetentes.

Alterações no desenvolvimento de timócitos durante a fase aguda da infecção podem ter importantes conseqüências no resultado da doença de Chagas (GIRONES & FRESNO, 2003). Sabe-se que em uma variedade de infecções agudas, tais como doença de Chagas (LEITE DE MORAES et al., 1992), Citomegalovírus (PRICE et al., 1993), Vírus da imunodeficiência (JOHNSON et al., 2001), Vírus da Hepatite (GODFRAIND et al., 1995), Parainfluenzavirus (SHIBUTA et al., 1982), *Toxoplasma gondii* (STAHL & TUREK, 1988), *Schistosoma mansoni* (WELLHAUSEN & BOROS, 1982), e Sépse polimicrobiana (BARKE et al., 1994), ocorre uma severa atrofia tímica devido à intensa depleção de timócitos corticais via apoptose, a maioria CD4⁺CD8⁺ (WELLHAUSEN & BOROS, 1982; WANG et al., 1994; KASEMPIMOLPORN et

al., 2001; BRITO et al., 2003). Adicionalmente, a proliferação de timócitos é freqüentemente diminuída.

Em alguns casos a depleção é tão intensa que a região cortical do lóbulo tímico virtualmente desaparece como consequência da severa depleção de timócitos $CD4^+CD8^+$ (SAVINO, 2006). No entanto, o mecanismo exato responsável pela atrofia tímica vista nas infecções agudas, ainda não está completamente elucidado, e pode variar nas distintas doenças.

Trabalhos demonstram que a depleção de timócitos por apoptose durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* é diretamente mediada por glicocorticóides (LEITE DE MORAES et al., 1991; ROGGERO et al., 2006; CORREA-DE-SANTANA et al., 2006; PÉREZ et al., 2007) e o $TNF-\alpha$ está envolvido na liberação desse hormônio durante a doença.

Glicocorticóides induzem a apoptose de timócitos através da elevação dos níveis de cálcio citosólico, resultando em ativação de endonuclease, fragmentação de DNA e consequente morte celular. Tais estudos foram confirmados pelo tratamento de timócitos de ratos com glicocorticóide sintéticos (metilprednisolona), resultando em extensiva fragmentação do DNA, a qual foi precedida por um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} (MCCONKEY et al., 1989).

O elegante trabalho de PÉREZ et al. (2007) demonstrou que a progressiva diminuição do peso absoluto e relativo do timo durante o curso da infecção chagásica ocorreu paralela a um aumento considerável no nível plasmático de $TNF-\alpha$ e glicocorticóides, sugerindo que ambos podem estar implicados na involução tímica durante a infecção (ROGGERO et al., 2006).

1.5. Zinco

RAULIN (1869) observou que o zinco era fundamental para o crescimento de *Aspergillus niger*. TODD et al. (1934) realizaram os primeiros trabalhos documentando a essencialidade desse elemento para o crescimento e sobrevivência de animais. No entanto, o papel essencial do zinco em humanos foi reconhecido somente em 1963 (PRASAD et al., 1963).

Nos últimos anos, a deficiência de zinco tornou-se um problema nutricional presente em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Essa abrange inúmeras anormalidades no metabolismo, podendo ter como causas a ingestão dietética inadequada, diminuição na absorção ou aumento na excreção urinária, presença de agentes da dieta que comprometem sua absorção, doenças gastrintestinais crônicas, síndromes de má-absorção, doenças renais, doenças hepáticas crônicas, câncer, diabetes, uso abusivo de álcool, nutrição parenteral total sem adição de zinco, alterações genéticas (acrodermatite enteropática), além de outras doenças crônicas (PRASAD, 1996; TUDOR et al., 2005). Os sintomas observados na deficiência desse elemento incluem lesões de pele, dificuldade de cicatrização, anorexia, retardo do crescimento, hipogonadismo e alterações na função imune (IBS & RINK, 2003). Tais efeitos podem ser revertidos pela suplementação de zinco (PRASAD, 1995; PRASAD, 2007).

O conteúdo total de zinco no organismo humano varia de 2-4 gramas. É denominado elemento traço, pois no plasma sua concentração varia de 12-16 μ M, com taxas variando de 10.1-16.8 μ M em mulheres, e 10.6-17.9 μ M nos homens. No soro o zinco encontra-se predominantemente ligado a albumina (60%), α 2-macroglobulina (30%) e transferrina (10%) (SCOTT & BRADWELL, 1983), mas somente o zinco livre parece ser biologicamente ativo (BORTH & LUGER, 1989; GLESS et al., 1992; VALLEE & FALCHUK, 1993). A maioria do

zinco encontra-se localizado no interior das células, sendo que no organismo não existem sistemas para armazenamento desse metal. Portanto, alterações na ingestão, ou secreção podem levar rapidamente à deficiência de zinco e afetar as funções zinco-dependentes em vários tecidos, particularmente as funções do sistema imune (HAASE et al., 2006). O zinco está presente nos músculos (60%), ossos (30%) e outros órgãos (10%), que incluem fígado, rins, pâncreas, cérebro, pele, próstata, entre outros (FAVIER & FAVIER, 1990).

A biodisponibilidade de zinco depende da composição da dieta (RINK & GABRIEL, 2000). As principais fontes de zinco são os produtos de origem animal tais como ostras, fígado, carne bovina, carnes de aves, caranguejo e ovos. Embora a absorção de zinco nos vegetais seja menor, os grãos, trigo e o germe de trigo também constituem importantes fontes de zinco (SANDSTRÖM, 1997).

Entre os fatores nutricionais que mais afetam a biodisponibilidade do zinco, encontra-se o fitato (Hexafosfato de inositol). Estudos realizados em humanos demonstram que os fitatos apresentam uma potente capacidade de ligação com cátions divalentes, com o qual formam complexos insolúveis em baixo pH, podendo prejudicar a absorção de zinco. Este fenômeno é intensificado na presença de cálcio, gerando um complexo cálcio-fitato-zinco ainda mais insolúvel. Em dietas ricas em cereais integrais e leguminosas, que contêm teores elevados de fitatos, a absorção de zinco é menor que 15% (SANDSTRÖM, 1997). No entanto, o efeito do fitato pode ser modificado a partir da fonte e da quantidade de proteínas consumidas na dieta. As proteínas de origem animal, por exemplo, parecem neutralizar o efeito inibitório do fitato na absorção de zinco, atribuindo-se isto, possivelmente, aos aminoácidos liberados da fração protéica do alimento, responsáveis pela manutenção do zinco em solução (FAO & WHO, 2002).

A dose diária recomendada de zinco deve ser ajustada de acordo com as características de cada organismo, visto que a concentração de zinco é regulada não somente pela ingestão, mas também por flutuações na excreção, as quais podem estar associadas com várias doenças ou com inflamação (YUZBASIYAN-GURKAN et al., 1989; WEISS et al., 1998). Segundo WEISS et al. (1995) a diminuição dos níveis de zinco, que é observada principalmente durante a fase aguda de algumas doenças infecciosas e processos inflamatórios crônicos, funciona como um mecanismo de defesa do organismo.

O zinco age como um inibidor da apoptose celular (SUNDERMANN, 1995; TRUONG-TRAN et al., 2001), coordenando a seleção fisiológica de células intra-tímicas (TREVES et al., 1994; PROVINCIALI et al., 1995). JIANG et al. (1995) e UMEZAWA et al. (1999) evidenciaram que a quelatação de zinco em meio de cultura levava a apoptose. Por outro lado, a adição deste elemento no meio protegia as células da apoptose. Foi demonstrado que o zinco tinha capacidade de manter tal efeito protetor mesmo se adicionado após curtos períodos depois de agentes indutores de apoptose, tais como TNF- α e radiação γ (ZALEWSKI & FORBES, 1993). Possíveis mecanismos para este efeito anti-apoptose do zinco incluem: inibição da caspase 3 (fator pró-apoptose), interação direta com Bcl-2 (fator que previne a apoptose), indução da síntese de DNA (WYLLIE, 1980; FUKAMACHI et al., 1998; ISHIDO et al., 1999; MARET et al., 1999), e inibição da endonuclease $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependente, a qual é responsável pela fragmentação do DNA observada nas células que passam por apoptose (ZALEWSKI & FORBES, 1993).

Este oligoelemento é considerado um componente nutricional de extrema importância, sendo crítico para a integridade estrutural e funcional das células, contribuindo em processos biológicos importantes tais como expressão genética, síntese de DNA, catálise enzimática,

armazenamento e liberação de hormônios, neurotransmissão, memória e processos visuais (VALLEE & FALCHUK, 1993). É ativo em uma variedade de funções celulares, incluindo sinal de transdução, transcrição e replicação (COLEMAN, 1992; VALLEE & FALCHUK, 1993). Age influenciando o crescimento, afetando o desenvolvimento e integridade do sistema imune (DARDENNE, 2002), atuando tanto na imunidade inata quanto na adquirida (FRAKER et al., 2000). Exerce sua ação em mediadores chave da imunidade tais como enzimas, peptídeos tímicos e citocinas (DARDENNE, 2002). Sabe-se que o zinco é componente de mais de 300 metaloenzimas, que não funcionam na sua ausência, sendo essencial para a função da DNA polimerase, timidina quinase e RNA polimerase DNA dependente, cujo envolvimento na síntese de ácidos nucleicos pode explicar o efeito do zinco na proliferação das células linfóides (FRIEKE, 2000). A Timulina, hormônio nonapeptídico secretado pelas células epiteliais tímicas, e que promove a maturação dos linfócitos T, citotoxicidade, e produção de interleucina 2 (IL-2) requer a presença do zinco para exercer sua atividade biológica (DARDENNE et al., 1982; HADDEN, 1992). Tem sido demonstrado que a produção ou atividade biológica de IL-2 e IFN- γ são afetadas pela deficiência de zinco. Como citado anteriormente, a deficiência de zinco em humanos afeta a produção de citocinas Th1 levando a um desequilíbrio entre células Th1 e Th2 (SHANKAR & PRASAD, 1998; PRASAD, 2000; PRASAD, 2007).

Animais deficientes de zinco são suscetíveis a diversos agentes infecciosos, incluindo protozoários tais como parasitas *T. cruzi* (FRAKER et al., 1982), *Trypanosoma musculi* (LEE et al., 1983), *Toxoplasma gondii* (TASCI et al., 1995) e *Plasmodium yoelii* (SHANKAR et al., 1997); eucariotos tais como *Candida albicans* (SINGH et al., 1992) e helmintos como: *Heligmosomoides polygyrus* (SHI et al., 1994), *Strongyloides ratti* (FENWICK et al., 1990b),

Trichinella spiralis (FENWICK et al., 1990a), Fasciola hepática (FLAGSTAD et al., 1972) e *S. mansoni* (NAWAR et al., 1992).

Sabe-se que em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ocorre uma redução dos níveis de zinco, e esta redução tem sido associada com o aumento na incidência de infecções bacterianas por agentes oportunistas (KOCH et al., 1996), contudo tem-se evidenciado que a suplementação oral de zinco leva a um aumento do número de células CD4 e redução na incidência de tais infecções (ISA et al., 1992; MOCCHEGIANI et al., 1995) especialmente por *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* (MOCCHEGIANI et al., 1995).

Baixas concentrações *in vivo* de zinco levam à alterações no processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos, interferindo na lise celular mediada por células NK e ação citotóxica das células T (KEEN & GERSHWIN, 1990; MINGARI et al., 1998). WIRTH et al. (1989) e COOK-MILLS et al. (1990) observaram que macrófagos de animais deficientes de zinco apresentavam reduzida capacidade de fagocitar *T. cruzi*.

Resultados de recentes estudos clínicos têm evidenciado que a administração oral de sulfato de zinco é efetiva no tratamento tanto da leishmaniose cutânea aguda (SHARQUIE et al., 2001) quanto da forma disseminada da doença (SHARQUIE & NAJIM, 2004). *In vitro* o composto demonstrou-se ativo não somente contra *Leishmania major* e *L. tropica*, agentes da leishmaniose cutânea (NAJIM et al., 1998a), mas também contra *L. donovani*, responsável por muitos casos de leishmaniose visceral humana (NAJIM et al., 1998b). Em modelos murinos, o sulfato de zinco apresentou atividade profilática contra leishmaniose cutânea causada por *L. major* ou *L. tropica*, visto que nos animais em que se administrou oralmente sulfato de zinco, por 5 dias consecutivos previamente à infecção, nenhuma lesão se desenvolveu (NAJIM et al., 1998a).

A atividade anti-leishmanial *in vivo* do sulfato de zinco pode resultar da combinação de efeitos diretos e indiretos. O efeito direto pode ser representado pelo dano celular ou pela inibição de enzimas envolvidas no metabolismo do parasita ou virulência, apresentando como mecanismo indireto, o efeito imunomodulador, que resulta em aumento da fagocitose e atividade microbicida pelos macrófagos do hospedeiro (AL-MULLA HUMMADI et al., 2005).

Entretanto, a avaliação da suplementação de micronutrientes durante a infecção chagásica pouco tem sido estudada, razão pela qual este trabalho foi conduzido, apresentando caráter inédito.

1.6. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

O DHEA é um dos hormônios esteróides produzidos pela zona reticular da glândula adrenal. A enzima DHEA-sulfatase (DHEA-S) possui importante função na conversão do DHEA em DHEA sulfato (DHEAS), sendo esta última forma uma das substâncias encontradas na circulação (PARKER, 2000). Antes do nascimento e novamente na puberdade, DHEA é produzido em elevadas concentrações, alcançando picos ao redor de 20-30 anos de idade, e depois tem queda lenta e progressiva chegando a seus níveis mais inferiores em torno de 75 a 80 anos de idade (VON BAMBERGER, 2007).

A diminuição dos níveis de DHEA que acompanha o processo de envelhecimento, está associada com muitas doenças presentes na fase avançada da vida (DEBONNEUIL et al., 2006; LABRIE et al., 2007), como por exemplo doenças cardiovasculares (WU et al., 2007), osteoporose, depressão (LAMBERTS et al., 1997; HINSON & RAVEN, 1999) e síndrome de Alzheimer (SUNDERLAND et al., 1989). Além disso, baixos níveis de DHEA também estão

associados com câncer (SCHWARTZ et al., 1986), obesidade (SANTORO et al., 2005), e alterações na função imune (CASSON et al., 1993).

Estudos demonstram que o DHEA atua protegendo ratos de inúmeras infecções normalmente letais, tais como infecções bacterianas (BEN-NATHAN et al., 1999) e por parasitas como *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995), *Plasmodium falciparum* (KURTIS et al., 2001; LEENSTRA et al., 2003), *Schistosoma mansoni* (FALLON et al., 1998; MORALES-MONTOR et al., 2001) e *T. cruzi* (DOS SANTOS et al., 2005). O DHEA também está sendo utilizado como opção de tratamento em estudos sobre doenças virais (ZHANG et al., 1999), tais como a AIDS (CHRISTEFF et al., 1999; RABKIN et al., 2006).

DHEA age como um imuno ativador, modulando as funções das células T e B (YANG et al., 1998), atua na regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, e IL-1 (DANENBERG et al., 1992; JAMES et al., 1997), atenuando as conseqüências deletérias destas citocinas, além de induzir o aumento do título de anticorpos (DEGELAU et al., 1997).

DHEA melhora a resposta de anticorpos específicos (ABEBE et al., 2003), aumentando também o número e função das células NK (MORALES-MONTOR et al., 2001).

Estudos têm demonstrado a ação anti-glicocorticóide do DHEA (BROWNE et al., 1992; KALIMI et al., 1994; KROBOTH et al., 1999). SANTOS et al. (2005) e SANTOS et al. (2007b) comprovaram esta mesma ação do DHEA durante o desenvolvimento da doença de Chagas experimental.

Estudos inéditos demonstraram que a administração do hormônio durante a infecção experimental por *T. cruzi*, resultou em redução da carga parasitaria sangüínea e tecidual (DOS

SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2007a), ficando também evidenciada a atividade imuno-estimulatória do DHEA sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita (DOS SANTOS et al., 2005). Tais efeitos sugerem o efeito protetor do DHEA na infecção experimental por *T. cruzi*, tornando os animais tratados mais resistentes à doença.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Estudar os efeitos da suplementação de zinco e DHEA sobre a resposta imune de ratos Wistar machos infectados com *Trypanosoma cruzi* durante as fases aguda e crônica, utilizando os seguintes parâmetros:

- Parasitemia
- Peso do coração e timo
- Contagem global de macrófagos peritoneais
- Dosagem de Óxido Nítrico
- Dosagem de IFN- γ e IL-12
- Histopatologia do coração

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de todo o avanço científico relacionado à resposta imune do hospedeiro e a forma de evasão do parasita aliada às pesquisas para descoberta de uma droga eficiente para o seu tratamento, a doença de Chagas é ainda considerada um grande problema em saúde pública (WHO, 2003). Os poucos medicamentos disponíveis tem ação terapêutica somente na fase inicial da doença, ocasionam inúmeros efeitos colaterais e parecem não possuir a eficiência desejada quando comparados ao uso de placebo (REYES & VALLEJO, 2005).

A procura de novas terapias para o controle da doença de Chagas tem sido o objetivo maior de nosso grupo de pesquisa. O objetivo desta pesquisa não é encontrar uma droga com efetiva ação tripanossomicida, mas sim proporcionar ao hospedeiro condições de uma resposta imune mais efetiva amenizando as consequências patológicas provocadas pela ação do parasita. Através das ações imunomoduladoras do DHEA já comprovadas por outros trabalhos não apenas com *T.cruzi* (DOS SANTOS et al., 2005), mas com outros parasitas como *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995), *Plasmodium falciparum* (KURTIS et al., 2001; LEENSTRA et al., 2003), *Schistosoma mansoni* (FALLON et al., 1998; MORALES-MONTOR et al., 2001) pode abrir juntamente com a adição de outras drogas imunomoduladoras tais como o zinco novas perspectivas para o controle da doença de Chagas. Além disso, a associação de um oligoelemento como o zinco que comprovadamente age como um inibidor da apoptose celular além de coordenar a seleção fisiológica de células intra-tímicas (PROVINCIALI et al., 1995; TREVES et al., 1994) proporcionaria melhores condições de um direcionamento mais efetivo para a resposta Th1. Baseados em dados recentes da literatura, o presente trabalho estudou a interação de diferentes terapias alternativas, onde se espera alcançar um incremento na resposta imune do hospedeiro na fase aguda da infecção, conseqüentemente

minimizando as agressões parasitárias que ocorrem tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. A utilização conjunta dessas drogas se reflete ainda no prolongamento da expectativa de vida, já que o DHEA e o zinco por serem considerados potentes agentes anti-oxidantes, poderão proporcionar uma resposta imune mais efetiva contra o parasito, principalmente na fase senil da vida.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com aproximadamente 4 semanas, pesando entre 90 e 100 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com acesso livre a ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos laboratoriais envolvendo animais foram previamente autorizados pelo comitê de ética local (protocolo n° 06.1.427.53.2).

4.2. Grupos Experimentais

Grupo Controle

Controle (C) n = 05

Controle Suplementado com Zinco (CZ) n = 05

Controle Suplementado com DHEA (CD) n = 05

Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ) n = 05

Grupo Infectado pela cepa Y de *T. cruzi*

Infectado (I) n = 05

Infectado Suplementado com Zinco (IZ) n = 05

Infectado Suplementado com DHEA (ID) n = 05

Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ) n = 05

4.3. Cepa de *T. cruzi* e Infecção

Os animais dos grupos infectados foram inoculados intraperitonealmente (i.p) com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas. Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos *swiss* não isogênicos, através de repiques semanais de sangue infectado. A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA & SCORZA, 1972). Quando inoculada em ratos Wistar produz curva parasitêmica atingindo o pico ao redor do 7º dia após o inóculo, com pequenas variações, dependendo do número de parasitas inoculado, idade e sexo do animal. Após esse período há uma diminuição da parasitemia.

4.4. Tratamento – Suplementação de Zinco e DHEA

Os animais foram suplementados até o 21º dia, correspondendo à fase aguda. Para o grupo estudado no 180º dia, o tratamento também findava no 21º dia.

4.4.1. Suplementação de Zinco

Os animais foram suplementados com 0,1 mL de sulfato de zinco (ZnSO_4), diluído em água, sendo administrados por via oral na dose de 20mg/kg/dia de ZnSO_4 (PANEMANGALORE et al., 1983; BRAZÃO et al., 2008a), durante os dias de experimento, uma vez ao dia no período da manhã, obedecendo ao mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.4.2. Suplementação de DHEA

Os animais foram suplementados com 0,1 mL de DHEA, dissolvido em 0,05 mL de etanol e igual volume de água destilada, sendo administrados via subcutânea na dose de 40mg/kg/dia de DHEA (SANTOS et al., 2007a), durante os dias de experimento, uma vez ao dia durante o período da manhã, obedecendo ao mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.5. Dias de experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados: no 7°, 14°, 21° dias após o inóculo infectante (correspondentes à fase aguda da infecção), e 180° dia (período correspondente à fase crônica).

4.6. Eutanásia e Coleta de sangue

Os animais foram mortos, após anestesia com Tribomoetanol 2,5%, por decapitação. A eutanásia é realizada por decapitação para evitar que outras manipulações aumentem o efeito do estresse, provocando falsos resultados na dosagem de interleucinas.

Após a morte, foram coletados cerca de 2,0 mL de sangue em tubo plástico contendo 200µL de heparina sódica (1 mL: 5.000 U.I), para determinação da parasitemia. Para obtenção de soro e posterior dosagens imunológicas, foram coletados 2,0 mL de sangue em tubo plástico sem anticoagulante.

4.7. Contagem de parasitas

A contagem dos parasitas (parasitemia sangüínea) foi realizada pelo método de BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5 μ L de sangue em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22 x 22 mm. Determina-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos, selecionados em várias áreas do preparado. O número encontrado é multiplicado por um fator, calculado para cada microscópio e objetiva, que leva em consideração o número de campos microscópicos existentes na área da lamínula.

4.8. Peso dos Órgãos

Em cada dia de experimento, imediatamente após a morte dos animais, os órgãos foram retirados, lavados em solução fisiológica 0,9%, e pesados em balança eletrônica (Mettler H10W).

4.9. Contagem global de macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram coletados através da injeção 5 mL de meio RPMI 1640 estéril (Cultlab- Campinas Brasil) na cavidade peritoneal do animal. Após suave massagem abdominal, o líquido peritoneal foi retirado e centrifugado durante 15 minutos. Ressuspendeu-se o pellet em RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Utilizou-se solução de Turk juntamente com o lavado (1:100) para coloração e contagem de macrófagos em câmara de Neubauer.

4.10. Preparação da suspensão de células peritoneais e Dosagem de Óxido Nítrico

A técnica de quantificação de óxido nítrico em sobrenadante foi realizada de acordo com DOST et. al. (2006). Os ratos tiveram a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de meio RPMI 1640 a 4°C, como descrito anteriormente. O lavado que foi centrifugado em tubos Falcon durante 15 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante desprezado. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 10µL que foi então diluída em solução de Turk (990µL), para contagem das células viáveis (macrófagos). Depois de contadas em câmara de Neubauer, as concentrações foram acertadas para 5×10^6 cel/mL.

Foram distribuídos 100µL desta suspensão em placa de 96 poços, contendo 5×10^6 cel/poço. Adicionou-se 100µL de LPS (10 µg/mL) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA) para estimulação.

A placa foi levada à estufa contendo 5% de CO₂, durante 48 horas a 37°C. Após este período, submeteu-se a placa à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se 100µL do sobrenadante e transferiu-se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se igual volume de reagente de Griess (50 µL de sulfanilamida 1% (Sigma) e 50 µL de N-1-naftiletilenodiamina 0.1% (Sigma) diluídos em solução de ácido fosfórico 5%), permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando filtro de 540nm (Referência 0). A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando nitrito de sódio (TERENZI et al., 1995; HRUBY et al., 1997).

4.11. Dosagens de IL-12

Foram utilizadas placas de 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas pra ratos. Para a confecção da curva padrão, foram adicionados às placas os padrões de citocina recombinante (IL-12- 5000 pg/mL) na quantidade de 100µL/poço diluídos de forma seriada em tampão diluição padrão (15mM de azida de sódio em 25mL de solução) na concentração de 2000 pg/mL a 0 pg/mL em 8 poços da placa em duplicata, sendo um ponto para o branco. Nos outros poços, foram pipetados 100µL das amostras experimentais em duplicata (20µL de amostra + 80µL de tampão diluição padrão). Às placas, foi adicionado o anticorpo biotinilado anti-IL-12, e as mesmas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas quatro vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem (25 vezes concentrado/diluído 1:24 em água destilada).

A revelação enzimática foi feita pela adição de 100µL/poço de estreptavidina-peroxidase (HPR) (100 vezes concentrada, contendo 3,3 mM de timol por frasco de 0,125mL) diluída 1:100 em diluente para HPR (3,3 mM de timol por frasco de 25mL) e as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato revelador tetrametilbenzidina (TMB) 100µL/poço, incubando novamente por 30 minutos, protegendo da luz e parando a reação com a adição de 100µL de solução de parada.

As densidades ópticas (D.O) das placas foram lidas em leitor de microplacas (Teccan, Modelo Sunrise- µQuant) em um comprimento de onda de 450nm. O kit utilizado foi da empresa BIOSOURCE, Califórnia, U.S.A.: BIOSOURCE Imunoassay Kit Rat IL-12.

4.12. Dosagens de IFN- γ

Placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de anticorpo de captura purificado específico para IFN- γ , previamente preparado na diluição de 1:250 em tampão de sensibilização. As placas foram incubadas “overnight” (16-20 horas de incubação) à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas, por três vezes, com tampão de lavagem (PBS + Tween 20 0,05%) e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de tampão de diluição (PBS com 10% de soro bovino fetal (SBF) pH 7,0), seguindo de incubação por mais 1 hora em temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem, por três vezes. Para realização da curva foram adicionados os padrões de citocina recombinante (2000 pg/mL) na quantidade de 100 μ L/poço, em duplicata, diluídos de forma seriada com tampão de diluição Tween (PBS Tween 0,05% com SBF 10% pH 7,0) nas concentrações de 2000 pg/mL a 0 pg/mL em 7 poços da placa, sendo que no oitavo poço adicionou-se somente o tampão para a determinação do branco. Nos demais poços foram adicionados 100 μ L das amostras experimentais, incubando-se por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e adicionado o anticorpo de detecção (anticorpos biotinilados anti-citocina) (18 μ g/mL). As placas foram novamente incubadas por mais duas horas e em seguida lavadas por mais três vezes. A revelação enzimática foi feita pela adição de 100 μ L/poço de estreptavidina- peroxidase diluída em tampão de diluição Tween na proporção de 1:250 e posterior incubação de 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas por mais três vezes sendo adicionado substrato revelador (15 mL TMB + 15 mL de H₂O₂) nos poços. Incubou-se por mais 20 minutos, protegendo da luz e parando a reação com a adição de 50 μ L de solução de H₂SO₄ 1M.

As densidades ópticas (D.O) das placas foram lidas em leitor de microplacas (Teccan, Modelo Sunrise- μ Quant) em um comprimento de onda de 450nm. O kit utilizado foi da empresa BD Biosciences, San Diego, U.S.A.: BD OptEIA™SET Rat IFN- γ .

4.13. Técnica histopatológica

Foi realizada análise histopatológica do coração. Em cada dia do experimento, o órgão foi coletado e lavado em solução fisiológica 0,9%, pesado em balança eletrônica (Mettler H10W), fixado em Formaldeído a 10% tamponado e conservado em álcool 80%, até sua inclusão em parafina.

Foram confeccionados cortes histológicos de 6 μ m que foram corados por Hematoxilina-Eosina. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70 μ m, a fim de se evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS et al., 2000). Os cortes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 1000x (imersão) (MELO & BRENER, 1978).

4.14. Análise do parasitismo tecidual

O grau de parasitismo foi avaliado, através de análise quantitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo (CASTRO & BRENER, 1985). Para esta análise foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental.

4.15. Análise estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 4.0, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA. A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância: One-Way ANOVA e post test de Bonferroni. Considerando estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Parasitemia

Figura 1. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º e 21º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para todos os grupos de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

* $p < 0,05$

IZ vs I e IDZ (7º dia após a infecção)

ID vs I e IDZ (7º dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (14º dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (21º dia após a infecção)

** $p < 0,001$

IDZ vs I (7º dia após a infecção)

A contagem de parasitas sanguíneos foi realizada no 7º, 14º e 21º dias após a infecção. O pico parasitêmico ocorreu no 7º dia após o inóculo, sofrendo queda no 14º e 21º dias. Os animais que foram suplementados apresentaram níveis indetectáveis de parasitas no 21º dia.

Os grupos suplementados com zinco, DHEA ou associação de DHEA e zinco, apresentaram níveis parasitêmicos reduzidos quando comparados com o grupo infectado não submetido ao tratamento, em todos os dias experimentais.

No 7º dia após a infecção, a suplementação concomitante de DHEA e zinco mostrou-se mais efetiva na redução da parasitemia em relação ao tratamento isolado das substâncias.

5.2. Peso Cardíaco

Tabela 1. Peso cardíaco de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a evolução da doença de Chagas experimental.

Grupos Experimentais (n=5)	Peso Cardíaco (mg) (Média ± DP^I)			
	7º dia	14º dia	21º dia	180º dia
C	878 ± 62.1	1358 ± 69.6	1571 ± 61.2	1811 ± 61.0
CZ	865 ± 47.2	1346 ± 63.2	1552 ± 59.4	1841 ± 42.7
CD	820 ± 30.8	1378 ± 51.5	1594 ± 41.2	1765 ± 63.3
CDZ	830 ± 32.9	1317 ± 58.9	1500 ± 59.3	1782 ± 62.2
I	1735 ± 76.6 ^{***}	1916 ± 52.5 ^{***}	2048 ± 64.4 ^{***}	2636 ± 77.3 ^{***}
IZ	1252 ± 90.8	1558 ± 65.8	1809 ± 47.3	2003 ± 87.2
ID	1106 ± 63.5	1534 ± 78.3	1853 ± 66.3	2007 ± 75.16
IDZ	1009 ± 80.6 [*]	1454 ± 62.9	1697 ± 44.9	1970 ± 49.4

^I DP: Desvio Padrão

Grupo Controle (C), Controle suplementado com Zinco (CZ), Controle suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ), Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ).

* $p < 0,05$

IDZ vs IZ e ID (7º dia após a infecção)

*** $p < 0,001$

I vs C, IZ, ID, IDZ (7º, 14º, 21º e 180º dias após a infecção)

Nos grupos controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas quanto ao peso cardíaco. O peso cardíaco foi estatisticamente maior no grupo infectado (I), em relação ao grupo controle (C), durante a evolução da infecção experimental.

A administração de zinco, DHEA ou DHEA e zinco nos animais infectados induziu uma diminuição do peso cardíaco em todos os dias de experimentos, quando comparado com o grupo infectado sem suplementação. No entanto, no 7º dia após a infecção, a suplementação concomitante de DHEA e zinco mostrou-se mais efetiva na redução do peso cardíaco em relação ao tratamento isolado das substâncias.

5.3. Peso do Timo

Tabela 2. Peso do timo de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a evolução da doença de Chagas experimental.

<i>Grupos Experimentais</i> (n=5)	<i>Peso do Timo (mg) (Média ± DP¹)</i>			
	7º dia	14º dia	21º dia	180º dia
C	523 ± 47.0*	836 ± 22.2	1005 ± 63.4*	827 ± 29.7**
CZ	541 ± 26.3	881 ± 20.9	1060 ± 41.9	851 ± 38.5
CD	533 ± 13.0	832 ± 20.5	1005 ± 72.2	836 ± 40.9
CDZ	546 ± 20.3	879 ± 39.6	1144 ± 54.6	867 ± 27.4
I	377 ± 23.4**	723 ± 17.9***	754 ± 54.1***	670 ± 58.9*
IZ	580 ± 15.2	1039 ± 45.1	1197 ± 78.1	795 ± 47.5
ID	568 ± 30.1	1018 ± 56.2	1178 ± 35.9	799 ± 67.9
IDZ	625 ± 26.3***	1217 ± 38.3*	1345 ± 61.9	877 ± 47.2***

¹ DP: Desvio Padrão

Grupo Controle (C), Controle Suplementado com Zinco (CZ), Controle Suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ), Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ).

* $p < 0,05$

C vs I (7º dia de experimento)

IDZ vs IZ e ID (14º dia após a infecção)

C vs I (21º dia de experimento)

C (21° dia de experimento) vs C (180° dia de experimento)

I vs IZ e ID (180° dia após a infecção)

****** $p < 0,01$

I vs IZ e ID (7° dia após a infecção)

C vs I (180° dia após a infecção)

******* $p < 0,001$

IDZ vs I (7° dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (14° dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (21° após a infecção)

IDZ vs I (180° dia após a infecção)

A infecção por si provocou diminuição no peso do timo quando comparado ao grupo controle sem infecção, o que pode ser observado no 7°, 21° e 180° dias após o inóculo.

A administração de zinco, DHEA ou DHEA e zinco nos animais infectados induziu uma elevação no peso do timo em todos os dias de experimentos, quando comparado com o grupo infectado sem suplementação. No entanto, no 14° dia após a infecção, a suplementação concomitante de DHEA e zinco mostrou-se mais efetiva na elevação do peso do timo em relação ao tratamento isolado das substâncias.

Os animais controle (sem infecção) que passaram pelo processo de envelhecimento (180° dia de experimento) apresentaram uma redução do peso do timo quando comparado ao grupo controle do 21° dia de experimento.

5.4. Contagem global de macrófagos peritoneais

5.4.1. Grupos Controles (sem infecção)

Figura 2. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mm³, de ratos *Wistar* machos controles (não infectados) durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Suplementado com Zinco (CZ), Controle Suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5.

Nos grupos Controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas quanto ao número de macrófagos peritoneais.

5.4.2. Grupos Infectados

Figura 3. Contagem global de macrófagos peritoneais, expressa em cel/mm³, de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5.

* $p < 0,05$

I vs IZ e ID (7º dia após a infecção)

I vs IZ e ID (14º dia após a infecção)

** $p < 0,01$

IDZ vs I (21º dia após a infecção)

*** $p < 0,001$

IDZ vs I, IZ e ID (7º dia após a infecção)

IDZ vs I (14º dia após a infecção)

No 7º e 14º dias após a infecção, a suplementação dos animais com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco provocou aumento do número de macrófagos. No entanto, no 21º dia após a infecção o número de macrófagos foi estatisticamente mais elevado apenas no grupo submetido ao tratamento conjunto de DHEA e zinco. No 7º dia após a infecção, este tratamento também mostrou-se mais efetivo na elevação do número de macrófagos, em relação ao tratamento isolado das substâncias.

5.5. Dosagem de Óxido Nítrico

5.5.1. Grupos Controles (sem infecção)

Figura 4. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante os 7º, 14º, 21º, e 180º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Suplementado com Zinco (CZ), Controle Suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

* $p < 0,05$

CDZ vs C (com LPS / 14º dia de experimento)

** $p < 0,01$

CDZ vs C (com LPS / 21º dia de experimento)

Nos grupos controles (sem infecção), a terapia concomitante de DHEA e zinco elevou a produção de óxido nítrico por células estimuladas com LPS, em relação aos demais grupos, no 14º e 21º dias de experimentos.

5.5.2. Grupos Infectados

Figura 5. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoneais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos Wistar machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

* $p < 0,05$

I vs IZ e ID (sem LPS/ 7º dia após a infecção)

I vs IZ e ID (sem LPS/ 21º dia após a infecção)

IDZ vs I (sem LPS/ 180º dia após a infecção)

IDZ vs IZ e ID (com LPS/ 7º dia após a infecção)

I vs IZ e ID (com LPS/ 14º dia após a infecção)

IDZ vs I (com LPS/ 180º dia após a infecção)

** $p < 0,01$

I vs IZ e ID (sem LPS/ 14º dia após a infecção)

IDZ vs I (com LPS/ 14º dia após a infecção)

*** $p < 0,001$

IDZ vs I (sem LPS/ 7º dia após a infecção)

IDZ vs I (sem LPS/ 14° dia após a infecção)

IDZ vs I, IZ e ID (sem LPS/ 21° dia após a infecção)

I vs IDZ (com LPS/ 7° dia após a infecção)

IDZ vs I, IZ e ID (com LPS/ 21° dia após a infecção)

Sem LPS: No 7°, 14° e 21° dias após a infecção, os grupos suplementados com zinco, DHEA ou DHEA e zinco apresentaram concentrações de NO estatisticamente mais elevadas que os animais do grupo infectado sem suplementação. No 21° dia, a suplementação de DHEA e zinco mostrou comportamento sinérgico com acentuada elevação na produção de NO em relação ao tratamento isolado das substâncias.

No 180° dia após a infecção, o grupo suplementado com DHEA e zinco apresentou uma redução na produção de NO quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

Com LPS: A suplementação dos animais com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco provocou aumento na produção de óxido nítrico durante os 7°, 14° dias após a infecção, quando comparado aos animais do grupo infectado sem tratamento. No 21° dia após a infecção, apenas os animais submetidos à terapia conjunta de DHEA e zinco apresentaram níveis de NO estatisticamente mais elevados quando comparado aos animais infectados não suplementados.

Além disso, no 21° dia de experimento pode ser observada uma ação sinérgica quando se administrou DHEA e zinco juntos, visto que animais submetidos a este tratamento apresentaram aumento significativo na produção de NO em relação ao tratamento isolado das substâncias.

No 180° dia após a infecção, o grupo suplementado com DHEA e zinco apresentou uma redução na produção de NO quando comparado ao grupo infectado sem tratamento.

5.6. Dosagem de IL-12

5.6.1. Grupos Controles (sem infecção)

Figura 6. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Suplementado com Zinco (CZ), Controle Suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

Nos grupos Controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas na produção de IL-12.

5.6.2. Grupos Infectados

Figura 7. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção $n = 5$.

* $p < 0,05$

IZ vs I e IDZ (7º dia após a infecção)

ID vs I e IDZ (7º dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (14º dia após a infecção)

IDZ vs I (21º dia após a infecção)

I vs IZ e ID (180º dia após a infecção)

** $p < 0,01$

IDZ vs I (180º dia após a infecção)

*** $p < 0,001$

IDZ vs I (7° dia após a infecção)

No 7° e 14° dias de experimentos, a suplementação dos animais com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco provocou aumento das concentrações de IL-12 nos grupos submetidos ao tratamento, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. No entanto, no 21° dia após o inóculo apenas o grupo submetido à administração simultânea de DHEA e Zinco apresentou níveis elevados de IL-12 quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. Além disso, no 7° dia após a infecção a terapia conjunta promoveu uma ação sinérgica, visto que os grupos suplementados com DHEA e zinco apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-12 quando comparados ao tratamento isolado das substâncias.

No 180° dia após a infecção, os grupos suplementados com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco apresentaram uma redução dos níveis de IL-12 quando comparados ao grupo infectado sem tratamento.

5.7. Dosagem de IFN- γ

5.7.1. Grupos Controles (sem infecção)

Figura 8. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Suplementado com Zinco (CZ), Controle Suplementado com DHEA (CD), Controle Suplementado com DHEA e Zinco (CDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

Nos grupos Controles (sem infecção), não foram observadas alterações significativas na produção de IFN- γ .

5.7.2. Grupos Infectados

Figura 9. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º, 21º e 180º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção $n = 5$.

* $p < 0,05$

IDZ vs I (21º dia após a infecção)

** $p < 0,01$

I vs IZ e ID (14º dia após a infecção)

I vs IZ, ID e IDZ (180º dia após a infecção)

*** $p < 0,001$

I vs IZ, ID e IDZ (7º dia após a infecção)

IDZ vs I (14º dia após a infecção)

No 7° e 14° dias de experimentos, a suplementação dos animais com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco provocou aumento das concentrações de IFN- γ nos grupos submetidos ao tratamento, quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. No entanto, no 21° dia após o inóculo apenas o grupo submetido à administração simultânea de DHEA e zinco apresentou níveis elevados de IFN- γ .

No 180° dia após a infecção, os grupos suplementados com zinco, DHEA ou simultaneamente DHEA e zinco apresentaram uma redução dos níveis de IFN- γ quando comparados ao grupo infectado sem tratamento.

5.8. Parasitismo tecidual do Coração

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o 14º dia após a infecção.

<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Número de animais</i>	<i>Número de ninhos amastigotas (Média ± DP^I)</i>
I	05	38 ± 9.8
IZ	05	14 ± 5.8*
ID	05	16 ± 6,2*
IDZ	05	9 ± 4.6**

^I DP: Desvio Padrão

Infectado (I), Infectado Suplementado com Zinco (IZ), Infectado Suplementado com DHEA (ID), Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n = 5.

* $p < 0,05$

IZ vs I e IDZ

ID vs I e IDZ

** $p < 0,001$

IDZ vs I

O tratamento dos animais com zinco ou DHEA foi efetivo e reduziu o número de ninhos de amastigotas nos animais infectados e submetidos à suplementação. No entanto, o tratamento concomitante de DHEA e zinco demonstrou ser mais efetivo na redução do parasitismo tecidual, quando comparado ao tratamento isolado das substâncias.

5.9. Histopatologia do Coração

5.9.1. Grupos Controles (14° dia)

Figura 10. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) colhidos no 14° dia de experimento, nos seguintes grupos: **A:** Grupo Controle, **B:** Controle Suplementado com Zinco, **C:** Controle Suplementado com DHEA, **D:** Controle Suplementado com DHEA e Zinco. Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

As fibras cardíacas dos animais pertencentes aos grupos controles do 14° dia de experimento apresentaram aspecto histológico normal, sem alterações teciduais.

5.9.2 Grupos Controles (180° dia)

Figura 11. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) colhidos no 180° dia de experimento, nos seguintes grupos: **A:** Grupo Controle, **B:** Controle Suplementado com Zinco, **C:** Controle Suplementado com DHEA, **D:** Controle Suplementado com DHEA e Zinco. Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

As fibras cardíacas dos animais pertencentes aos grupos controles do 180° dia de experimento apresentaram aspecto histológico normal, sem alterações teciduais.

5.9.3. Grupos Infectados (14° dia)

Figura 12. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* colhidos no 14° dia após a infecção, nos seguintes grupos: **A:** Infectado (I), **B:** Infectado Suplementado com Zinco (IZ), **C:** Infectado Suplementado com DHEA (ID), **D:** Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

Observou-se presença de grandes ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas de animais pertencentes ao grupo infectado. Nos grupos infectados e suplementados com zinco ou DHEA notou-se diminuição no tamanho dos ninhos de amastigotas presentes nas fibras cardíacas. No entanto, a terapia conjunta de DHEA e zinco foi mais efetiva na redução do número e tamanho dos ninhos de amastigotas em relação ao tratamento isolado das substâncias.

5.9.4. Grupos Infectados (180° dia)

Figura 13. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* colhidos no 180° dia após a infecção, nos seguintes grupos: **A:** Infectado (I), **B:** Infectado Suplementado com Zinco (IZ), **C:** Infectado Suplementado com DHEA (ID), **D:** Infectado Suplementado com DHEA e Zinco (IDZ). Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

No 180º dia após a infecção os ninhos de amastigotas não são prevalentes. No entanto, os animais infectados e submetidos à suplementação de zinco, DHEA, ou simultaneamente DHEA e zinco apresentaram preservação da arquitetura tecidual com reduzida desorganização das fibras cardíacas, quando comparado ao grupo infectado não submetido a nenhum tipo de tratamento.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos já ressaltaram a importância de um adequado equilíbrio imuno-endócrino durante o curso de doenças infecciosas (KLEIN, 2004; ESCOBEDO et al., 2005), visando à manutenção da homeostasia corpórea (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996; TURNBULL & RIVIER, 1999). Trabalhos de ROGGERO et al. (2006) comprovaram a importância deste equilíbrio durante a evolução da doença de Chagas experimental. Sabe-se que IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF- α são potentes ativadores do eixo HPA (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996; LIEGE et al., 2000, CHESNOKOVA & MELMED, 2002), e como consequência ocorre liberação de glicocorticóides na circulação (corticosterona em roedores e cortisol em humanos). Estudos de SEYLE (1936) demonstraram que diversos estressores podem ativar o eixo HPA, resultando em involução tímica.

Inúmeros trabalhos demonstram que durante a fase aguda da infecção chagásica experimental também ocorre uma diminuição da massa tímica (HENRIQUES-PONS et al., 2004, OLIVIERI et al., 2005, PÉREZ et al., 2007).

Atualmente já está bem estabelecido o importante papel do zinco como elemento essencial para a função imune (KRUSE-JARRES, 1989; CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 1990; KEEN & GERSHWIN, 1990; WELLINGHAUSEN et al., 1997; WELLINGHAUSEN & RINK, 1998; PRASAD, 2007; RINK & HAASE, 2007) tanto em humanos como em outros animais (PRASAD, 1996; SHANKAR & PRASAD, 1998).

Experimentos de FRAKER et al. (1982) demonstraram a vulnerabilidade de camundongos deficientes de zinco a alguns patógenos, inclusive a *T. cruzi*, resultando na morte de tais animais em decorrência da alteração no sistema imune. Sabe-se que a deficiência de zinco

pode comprometer primariamente a função de células T, além de alterar a função de outras células do sistema imune (RINK & HAASE, 2007), fato que pode ser observado através da redução na formação de anticorpos, diminuição da atividade de células NK, e da capacidade fagocítica de células tais como monócitos e macrófagos (WELLINGHAUSEN et al., 1997; IBS & RINK, 2003).

A ação imunoestimulatória do DHEA, opondo-se aos efeitos imunossupressores dos glicocorticóides, também já esta bem esclarecida (BUTCHER et al., 2005), assim como sua ação moduladora durante a infecção por *T. cruzi* (DOS SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2007a).

Em razão da importância do zinco e do DHEA para a manutenção da homeostasia do sistema imune, este estudo avaliou o possível efeito imunomodulador da suplementação desses dois elementos no comportamento da Doença de Chagas experimental.

Recentes estudos clínicos têm evidenciado que a administração oral de sulfato de zinco é efetiva no tratamento tanto da leishmaniose cutânea aguda (SHARQUIE et al., 2001) quanto da forma disseminada da doença (SHARQUIE & NAJIM, 2004). Outros estudos demonstram os efeitos terapêuticos desse elemento na infecção por *Plasmodium falciparum* (BATES et al., 1993). No entanto, a avaliação da suplementação de zinco durante a infecção chagásica pouco tem sido estudada. LEE et al. (1983) demonstrou que animais deficientes de zinco e infectados com *T. musculi* apresentavam três vezes mais parasitas quando comparado aos animais do grupo controle. Nossos experimentos concordam indiretamente com esses, visto que nos animais infectados e suplementados com zinco houve redução dos níveis de parasitas circulantes, em relação aos animais controle em todos os dias de experimento (BRAZÃO et al., 2008a). Tais dados apresentam caráter inédito visto que a maioria dos trabalhos documentados na literatura

relaciona a deficiência de zinco à suscetibilidade a infecções tais como por *T. cruzi* (FRAKER et al., 1982; DARDENNE, 2002).

O DHEA vem sendo utilizado como opção de tratamento em estudos sobre doenças virais, como a AIDS (CHRISTEFF et al., 1999; RABKIN et al., 2006), doenças bacterianas (BEN-NATHAN et al., 1999) e infecções parasitárias, como Criptosporídeo (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995) e *Schistosoma mansoni* (MORALES-MONTOR et al., 2001). Estudos de SANTOS et al. (2007a), revelaram que a administração de DHEA durante a infecção aguda causada por *T. cruzi* reduziu a parasitemia sangüínea, tornando os animais mais resistentes à doença. Estes dados concordam com os nossos, pois os animais infectados e suplementados com DHEA apresentaram redução nos níveis de parasitas circulantes quando comparados aos animais infectados não submetidos à suplementação. Deve-se também ressaltar que no sétimo dia após a infecção, a administração conjunta de DHEA e zinco foi mais efetiva na redução dos níveis parasitêmicos quando comparado ao tratamento isolado de tais substâncias.

Segundo DOS SANTOS et al. (2005) e SANTOS et al. (2007a), durante a infecção chagásica em ratos Wistar ocorre comprometimento cardíaco envolvendo a presença de infiltrado inflamatório, eventual destruição de fibras, bem como a presença de ninhos de amastigotas e elevação no peso cardíaco em função da hipertrofia do órgão.

MARINHO et al. (1999) ressaltaram que a presença de parasitas tem papel crucial no desenvolvimento da patologia da doença de Chagas crônica, e sugerem a perspectiva de protocolos terapêuticos que controlem a carga parasitária podendo com isso reduzir a patologia da doença de Chagas.

DOS SANTOS et al. (2005) e SANTOS et al. (2007a) relataram que o tratamento de ratos Wistar com doses diárias de DHEA durante a infecção aguda por *T. cruzi* ocasiona redução

do parasitismo sanguíneo e tecidual, paralela a uma redução no peso cardíaco (SANTOS et al., 2005).

Nossos resultados são compatíveis com trabalhos anteriores, e revelam que nos animais submetidos à terapia de suplementação com zinco, DHEA ou DHEA e zinco, além da redução da carga parasitária, houve redução do peso cardíaco em todos os dias de experimento quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. Observou-se também uma ação sinérgica de DHEA e zinco quando comparado ao tratamento isolado das substâncias. Através da análise histopatológica, observamos que os animais infectados e suplementados apresentaram uma redução do número de ninhos de amastigotas, que também eram menores em tamanho quando comparados aos dos animais infectados não submetidos à suplementação.

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* podem ser observadas alterações estruturais e funcionais no timo, com evidente involução tímica, caracterizada pela redução da massa absoluta e do número de células T CD4⁺CD8⁺, principalmente via apoptose (SAVINO et al., 1989; LEITE-DE-MORAES et al., 1991). Estudos de ROGGERO et al. (2006) sugerem que glicocorticóides e TNF- α podem estar envolvidos neste fenômeno.

Sabe-se que o zinco age como um inibidor da apoptose celular (SUNDERMANN, 1995; TRUONG-TRAN et al., 2001). Além disso, diversos trabalhos científicos comprovaram a ação do DHEA, acentuando a resposta imune, e opondo-se à ação supressora dos glicocorticóides (BUTCHER et al., 2005).

Nossos resultados confirmam os anteriores visto que a infecção com *T. cruzi* por si, já ocasionou uma redução na massa tímica quando comparado aos animais do grupo controle. Nos animais infectados e submetidos à suplementação de zinco, DHEA ou associação das duas substâncias, foi observado um aumento da massa tímica quando comparado ao grupo infectado e

não suplementado, provavelmente induzindo uma melhor proliferação das células T neste órgão e direcionando o tipo de resposta imune.

Atrofia tímica é também evidenciada durante o processo de envelhecimento, período no qual o sistema imune passa por profundas alterações associadas com o progressivo declínio da resposta imune tanto celular quanto humoral. O aumento das taxas de morbidade e mortalidade nos idosos, principalmente devido a infecções, tem sido associado com a atrofia tímica observada na senescência (DORIA et al., 1992; ASPINALL et al., 2000) e com o declínio na resposta imune (YOSHIKAWA et al., 1981).

Nossos dados também evidenciam essa atrofia tímica que ocorre com a senescência, pois nos animais do grupo controle (sem infecção) que passaram pelo processo de envelhecimento observou-se uma redução no peso do timo comparado aos animais jovens (grupo controle-vigésimo primeiro dia).

A participação de macrófagos, na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecida (TALIAFERRO & PIZZI, 1995; SAVINO et al., 2007). Os macrófagos e as células T, juntamente com as citocinas desempenham importante função no controle da infecção chagásica (DOS REIS et al., 2005; COSTA et al., 2006; PADILLA et al., 2007). Sabe-se que a deficiência de zinco compromete primariamente a função de células T, no entanto a função de outras células do sistema imune, tais como macrófagos, também é afetada. Tais efeitos do zinco, nestes mediadores imunológicos, podem ser explicados por sua participação em processos biológicos importantes tais como replicação do DNA, transcrição do DNA, divisão e ativação celular (SHANKAR & PRASAD, 1998).

Efeitos na função de monócitos e macrófagos durante a deficiência de zinco também foram observados por WIRTH et al. (1989). Estudos *in vitro* utilizando monócitos obtidos de

animais deficientes de zinco mostraram a reduzida capacidade destas células em inibir o desenvolvimento de *T. cruzi*. No entanto, a atividade microbicida era rapidamente restaurada após a adição de zinco (WIRTH et al., 1989).

DOS SANTOS et al. (2005) observaram os efeitos do DHEA na contagem de macrófagos peritoneais durante a infecção por *T. cruzi*, e demonstraram um aumento do número de tais células em animais infectados e submetidos à suplementação.

A análise de nossos resultados mostra que no sétimo e décimo quarto dias após a infecção, os animais submetidos ao tratamento com zinco apresentaram um aumento na contagem global de macrófagos peritoneais (BRAZÃO et al., 2008a), quando comparado ao grupo infectado não suplementado. Nestes dias experimentais, o tratamento com DHEA também foi efetivo na elevação do número de macrófagos comparado ao grupo não tratado com DHEA. Além disso, pode ser observada uma ação sinérgica quando se administrou DHEA e zinco juntos.

ST PIERRE et al. (1995) afirmam que a resistência às infecções causadas por parasitas intracelulares está fortemente associada à ativação de macrófagos e posterior produção de óxido nítrico por essas células. IL-12 é liberada primariamente por células específicas apresentadoras de antígeno, e estimula os linfócitos Th ($CD4^+$) e células NK, a proliferarem-se liberando citocinas como o IFN- γ , que agirá sobre os macrófagos ativando-os e resultando na expressão de enzimas óxido nítrico sintetase, com conseqüente produção de óxido nítrico e controle da replicação parasitária.

Diversos autores têm comprovado a importância de IL-12 e IFN- γ na resistência à infecção experimental por *T. cruzi*. Os autores demonstraram que camundongos tratados com anticorpos anti-IL-12 ou anti-IFN- γ apresentam um agravamento da infecção chagásica (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; ALIBERTI et al., 1996; HUNTER et al., 1996).

GALVÃO DA SILVA & ABRAHAMSOHN (2001) confirmando tais evidências observaram que os animais tratados com anticorpos anti-IL-12 apresentavam alta parasitemia e mortalidade, quando comparado aos animais tratados com anticorpos IgG normais para rato. Complementando os dados anteriormente apresentados, observou-se que nos animais tratados com anticorpos anti-IL-12 ocorria uma redução na síntese de IFN- γ pelas células esplênicas, indicando que a produção de IFN- γ depende de IL-12 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).

Nossos dados indiretamente confirmam os anteriores, pois os animais durante a fase aguda da infecção chagásica e que foram submetidos à suplementação de zinco (BRAZÃO et al., 2008b), DHEA ou DHEA e zinco apresentaram um aumento na produção de NO, e das citocinas IL-12 e IFN- γ . Esta estimulação do sistema imune do hospedeiro ocorreu paralela à redução da carga parasitária sangüínea.

Durante as primeiras semanas de infecção por *T. cruzi* as citocinas, principalmente IFN- γ , são essenciais para o controle do parasitismo sangüíneo e tecidual (ROPERT & GAZZINELLI, 2000). No entanto, sabe-se que as citocinas também podem estar associadas com o desenvolvimento do processo patológico (HIGUCHI et al., 2003, GOMES et al., 2003, TALVANI et al., 2004). REIS et al. (1997) e BAHIA-OLIVEIRA et al. (1998), demonstraram que durante a fase crônica da doença de Chagas o IFN- γ atua promovendo dano tecidual, particularmente no coração, com destruição citolítica do miocárdio.

Confirmando tais dados, observamos que os animais infectados sem suplementação de nenhuma das substâncias e que foram deixados envelhecer apresentaram uma maior concentração de IFN- γ , assim como de IL-12, quando comparado aos animais do grupo infectado, que passaram pelo processo de envelhecimento, e além disso, foram suplementados com zinco, DHEA ou associação de DHEA e zinco, durante a fase aguda da infecção. Na fase crônica da

infecção os ninhos de amastigotas não são prevalentes (ZHANG & TARLETON, 1999), no entanto, através da análise histopatológica observamos nos animais infectados e suplementados uma menor alteração das fibras cardíacas.

Durante a fase aguda da infecção, zinco e DHEA apresentaram atividade estimulatória sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. Comprovamos também a ação sinérgica de DHEA e zinco, através dos parâmetros analisados tais como parasitemia sangüínea e tecidual, além de fatores imunológicos como aumento nas concentrações de NO, IFN- γ , IL-12, e número de macrófagos.

Este efeito imuno-modulador durante a fase aguda da infecção chagásica pode contribuir para a prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que zinco e DHEA apresentaram atividade estimulatória sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. Além disso, os dados revelaram a ação sinérgica de DHEA e zinco, promovendo um direcionamento efetivo na resposta imune do hospedeiro, através da indução de uma resposta Th1 que resultou em significativa redução da parasitemia sangüínea.

O efeito imuno-modulador durante a fase aguda da infecção chagásica pode ser comprovado através da análise de parâmetros imunológicos, tais como aumento do número de macrófagos, das concentrações de óxido nítrico, IL-12 e IFN- γ , conseqüentemente minimizando as alterações patológicas teciduais observadas durante a fase aguda, e reveladas pela redução do número de ninhos de amastigotas, contribuindo de forma marcante para a prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.A.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.308-326.

ABEBE, F.; BIRKELAND, K.I.; GAARDER, P.I.; PETROS, B.; GUNDERSEN, S.G. The relationships between dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), the intensity of *Schistosoma mansoni* infection and parasite-specific antibody responses. A cross-sectional study in residents of endemic communities in north-east Ethiopia. **APMIS**, v.111, p.319-328, 2003.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.155, p.3955-3963, 1995.

AKAMINE, M.; HIGA, F.; HARANAGA, S.; TATEYAMA, M.; MORI, N.; HEUNER, K.; FUJITA, J. Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.279-287, 2007.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v.64, p.1961-1967, 1996.

AL-MULLA HUMMADI, Y. M.; NAJIM, R.A.; AL-BASHIR, N.M. The mechanism behind the antileishmanial effect of zinc sulphate. I. An in-vitro study. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.99, p.27-36, 2005.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gazeta Médica da Bahia**, v.70, p.32-42, 1970.

ASPINALL, R.; ANDREW, D. Thymic involution in aging. **Journal of Clinical Immunology**, v.20, p.250-256, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O.; MOREIRA, M.C.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.; PEREIRA, M.E.; COFFMAN, R.L.; DIAS, J.C.; CANCADO, J.R.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.127-131. 1998.

BARKE, R.A.; ROY, S.; CHAPIN, R.B.; CHARBONEAU, R. The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. **Archives of Surgery**, v.129, p.1256-1261, 1994.

BATES, C.J.; EVANS, P.H.; DARDENNE, M. A trial of zinc supplementation in young rural Gambian children. **Journal of Nutrition**, v.69, p.243-255, 1993.

BECKAGE, N.E. Endocrine and neuroendocrine host-parasite relationships. **Receptor**, v.3, p.233-245, 1993.

BEFUS, A.D.; MATHISON, R.; DAVISON, J. Integration of neuroendocrine immune responses in defense of mucosal surfaces. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, p.26-34, 1999.

BEN-NATTHAN, D.; PADGETT, D.A.; LORIA, R.M. Androstenediol and Dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolisaccharide toxicity. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, p.421-431, 1999.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v.17, p.64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.59, p.26-30, 2000.

BITTENCOURT, A.L. Transmissão vertical da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.16-20.

BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v.16, p.233-242, 1982.

BORGES, M. M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; DO PRADO JÚNIOR, J.C.; KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.493-502, 1992.

BORTH, W.; LUGER, T.A. Identification of α 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.5818-5825, 1989.

BRAZÃO, V.; DEL VECCHIO FILIPIN, M.; CAETANO L.C.; TOLDO, M.P.; CAETANO, L.N.; DO PRADO JC, JR. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v.118, p.549-554, 2008a.

BRAZÃO, V.; CAETANO, L.C.; DEL VECCHIO FILIPIN, M.; PAULA ALONSO TOLDO, M.; CAETANO, L.N.; DO PRADO JC, JR. Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.32-37, 2008b.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.4, p.389-396, 1962.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.59, p.19-26, 1965.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.114, p.103-110, 1997.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.55-56.

BRITO, M.M.; PIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV coinfection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastide Biology and Disease**, v.2, p.1-7, 2003.

BROWNE, E.S.; WRIGHT, B.E.; PORTER, J.R.; SVEC, F. Dehydroepiandrosterone: antiglucocorticoid action in mice. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.303, p.366-371, 1992.

BUSTAMANTE, J.M.; NOVARESE, M.; RIVAROLA, H.W.; LO PRESTI, M.S.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; FRETES, R.; PAGLINI-OLIVA, P.A. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitology Research**, v.100, p.1407-1410, 2007.

BUTCHER, S.K.; KILLAMPALLI, V.; LASCELLES, D.; WANG, K.; ALPAR, E. K.; LORD, J.M. Raised cortisol: DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity **Aging Cell**, v. 4, p.319-324, 2005.

CAETANO, L.C.; ZUCOLOTO, S.; KAWASSE, L.M.; TOLDO, M.P.; DO PRADO, J.C. Influence of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in the depletion of esophageal neurons in *Calomys callosus*. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.1796-1800, 2006.

CAMARGOS, E.R.; FRANCO, D.J.; GARCIA, C.M.; DUTRA, A.P.; TEIXEIRA AL, JR.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats, cardiac sympathetic denervation and involvement of digestive organs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.604-612, 2000.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and Interleukin 10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-134, 1996.

CASSON, P.R.; ANDERSEN, R.N.; HERROD, H.G.; STENTZ, F.B.; STRAUGHN, A.B.; ABRAHAM, G.E.; BUSTER, J.E. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in post menopausal women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.169, p.1536-1539, 1993.

CASTAÑOS-VELES, E.; MAERLAN, S.; OSORIO, L.; ABERG, F.; BIBERFELD, P.; ÖRN, A.; ROTTENBERG, M. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infection and Immunity**, v.66, p.2960-2968, 1998.

CASTRO, M.P.A.; BRENER, Z. Estudo parasitológico e anátomo patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, p.233-239, 1985.

CHAGAS, C. Nova Tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CHESNOKOVA, V.; MELMED, S. Minireview: neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. **Endocrinology**, v.143, p.1571-1574, 2002.

CHRISTEFF, N.; MELCHIOR, J.C.; MAMMES, O.; GHERBI, N.; DALLE, M.T.; NENUS, E.A. Correlation between increase cortisol: DHEA ratio and malnutrition in HIV-positive men. **Nutrition**, v.15, p.534-539, 1999.

COLEMAN, J.E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.16, p.897-946, 1992.

COOK-MILLS, J.M.; WIRTH, J.J.; FRAKER, P.J. Possible roles for zinc in destruction of *Trypanosoma cruzi* by toxic oxygen metabolites produced by mononuclear phagocytes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.262, p.111-121, 1990.

CORREA-DE-SANTANA, E.; PAEZ-PEREDA, M.; THEODOROPOULOU, M.; GRUEBLER, Y.; NIHEI, O.K.; BOZZA, M. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v.173, p.12-22, 2006.

COSTA, V.M.; TORRES, K.C.; MENDONÇA, R.Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K.J.; ABRAHAMSOHN, I.A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 3193-3200, 2006.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p. 3541-3545, 1995.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein cross-reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.1709-1712, 1996.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; BOCKMAN, R.S.; LIN, A.; GIARDINA, P.V.; HILGARTNER, M.W.; CALDWELL-BROWN, D.; CARTER, D.M. Physiological and pharmacological effects of zinc on immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.587, 113-122, 1990.

DANENBERG, H.D.; ALPERT, G.; LUSTIG, S.; BEN-NATHAN, D. Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.2275-2279, 1992.

DARDENNE, M.; PLÉAU, J.M.; NABARRA, B.; LEFRANCIER, P.; DERRIEN, M.; CHOAY, J.; BACH, J.F. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p.5370-5373, 1982.

DARDENNE, M. Zinc and immune function. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.20-23, 2002.

DEBONNEUIL, E.H.; QUILLARD, J.; BAULIEU, E.E. Hypoxia and dehydroepiandrosterone in old age: a mouse survival study. **Respiratory Research**, v.7, p.144, 2006.

DEGELAU, J.; GUAY, D.; HALLGREN, H. The effects of DHEAS on influenza vaccination in aging adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v.45, p.747-751, 1997.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. **Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p.33-66.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.

DORIA, G.; FRASCA, D.; COVELLI, V. An Immunological approach to Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.673, p.226-230, 1992.

DOS REIS, G.A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M.P.; LOPES, M.F. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. **Trends Parasitology**, v.21, p.237-243, 2005.

DOS SANTOS, C.D.; TOLDO, M.P.; DO PRADO JÚNIOR, J.C. *Trypanosoma cruzi*: the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. **Acta Tropica**, v.95, p.109-115, 2005.

DOST, C.K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO JC, JR. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitology Research**, v.88, p.609-616, 2002.

DOST, C.K.; SARAIVA, J.; ZENTGRAF, U.; MONESI, N.; ENGELS, W.; ALBUQUERQUE, S. Is nitric oxide involved in the tolerance of *Calomys callosus* as a reservoir host towards *Trypanosoma cruzi* infection? **The Journal of Infection**, v.52, p.49-55, 2006.

ELENKOV, I.J.; IEZZONI, D.G.; DALY, A.; HARRIS, A.G.; CHROUSOS, G.P. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. **Neuroimmunomodulation**, v.12, p.255-269, 2005.

ESCOBEDO, G.; ROBERTS, C.W.; CARRERO, J.C.; MORALES-MONTOR, J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? **Trends in Parasitology**, v.12, p.588-593, 2005.

FALLON, P.G.; RICHARDSON, E.J.; JONES, F.M.; DUNNE, D.W. Dehydroepiandrosterone sulphate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.5, p.251-253, 1998.

FAVIER, A.; FAVIER, M. Consequences des deficits en zinc durant la grossesse pour la mère et le nouveau-né (Consequences of zinc deficits during pregnancy for the mother and newborn). **Revue Française de Gynecologie et d'Obstetrique**, v.85, p.13-27, 1990.

FENWICK, P.K.; AGGETT, P.J.; MACDONALD, D.C.; HUBER, C.; WAKELIN, D. Zinc deficiency and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Trichinella spiralis*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.52, p.166-172, 1990a.

FENWICK, P.K.; AGGETT, P.J.; MACDONALD, D.C.; HUBER, C.; WAKELIN, D. Zinc deprivation and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Strongyloides ratti*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.52, p.173-177, 1990b.

FLAGSTAD, T.; ANDERSEN, S.; NIELSEN, K. The course of experimental *Fasciola hepatica* infection in calves with a deficient cellular immunity. **Research in Veterinary Science**, v.13, p.468-475, 1972.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira**, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok: FAO AND WHO.

FRAKER, P.J.; CARUSO, R.; KIERSZENBAUM, F. Alteration in the immune and nutritional status of mice by synergy between Zn deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Nutrition**, v.112, p.1224-1229, 1982.

FRAKER, P.J.; KING, L.E.; LAAKKO, T.; VOLLMER, T.L. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1399-1406, 2000.

FRIEKE, C. Function and Mechanism of zinc. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1437-1446, 2000.

FUKAMACHI, Y.; KARASAKI, Y.; SUGIURA, T.; ITOH, H.; YAMAMURA, K.; HIGASHI, K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.246, p.364-369, 1998.

GALVÃO DA SILVA, A.P.; ABRAHAMSOHN, I.A. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v.104, p.349-354, 2001.

GALVÃO, L.M.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; SILVA, S.A.; ANDRADE, A.L. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5066-5070, 2003.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.V.; VILAS BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.1521-1528, 2005.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming grow factor-beta. **European Journal of Immunology**, v.22, p.2501-2506, 1992.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology**, v.19, p.19-22, 2003.

GLESS, U.; SCHMITT, Y.; ZIEGLER, S.; KRUSE-JARRES, J.D. Chromatographic separation of serum proteins and estimation of their zinc and copper content. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v.6, p.245-250, 1992.

GODFRAIND, C.; HOLMES, K.V.; COUTELIER, J.P. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. **Journal of Virology**, v.69, p.6541-6547, 1995.

GOMES, J.A.S.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; ROCHA, M.O.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1 specific response. **Infection and Immunity**, v.71, p.1185-1193, 2003.

HAASE, H.; MOCCHEGIANI, E.; RINK, L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. **Biogerontology**, v.7, p.421-428, 2006.

HADDEN, J.W. Thymic endocrinology. **International Journal of Immunopharmacology**, v.14, p.345-352, 1992.

HENRIQUES-PONS, A.; DEMEIS, J.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SAVINO, W.; ARAUJO-JORGE, T.C. Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection **Experimental Parasitology**, v.107, p.1-4, 2004.

HIBBS, J.B.; TAINTOR JR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v.235, p.473-476, 1987.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p.96-107, 2003.

HINSON, J.P.; RAVEN, P.W. DHEA deficiency syndrome: a new term for old age? **The Journal of Endocrinology**, v.163, p.1-5, 1999.

HRUBY, K.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P.; NOBILIS, M. Potential cancerostatic benfluron is metabolized by peroxidase: in vitro biotransformation of benfluron by horseradish peroxidase. **General Physiology and Biophysics**, v.16, p.321-327, 1997.

HUNTER, C.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor α and γ interferon. **Infection and Immunity**, v.64, p.2381-2386, 1996.

IBS, K.H.; RINK, L. Zinc-altered immune function. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.1452-1456, 2003.

ISA, L.; LUCCHINI, A.; LODI, S.; GIACHETTI, M. Blood zinc status and zinc treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v.22, p.45-47, 1992.

ISHIDO, M.; SUZUKI, T.; ADACHI, T.; KUNIMOTO, M. Zinc stimulates DNA synthesis during its antiapoptotic action independently with increments of an antiapoptotic protein, Bcl-2, in porcine kidney LLC-PK cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.290, p.923-928, 1999.

JAMES, K.; PREMCHAND, N.; SKIBINSKA, A.; SKIBINSKI, G.; NICOL, M.; MASON, J.L. IL-6, DHEA and the aging process. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.93, p.15-24, 1997.

JIANG, S.; CHOW, S.C.; MCCABE MJ, JR.; ORRENIUS, S. Lack of Ca^{2+} involvement in thymocyte apoptosis induced by chelation of intracellular Zn^{2+} . **Laboratory Investigation**, v.73, p.111-117, 1995.

JOHNSON, C.M.; BORTNICK, S.J.; CRAWFORD, P.C.; PAPADI, G.P. Unique susceptibility of the fetal thymus to feline immunodeficiency virus infection: an animal model for HIV infection in uterus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.45, p.273-288, 2001.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK, J.C.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.48, p.348-357, 1993.

KALIMI, M.; SHAFAGOJ, Y.; LORINA, R.; PADGETT, D.; REGELSON, W. Anti-glucocorticoid effects of DHEA. **Molecular and Cellular Biology**, v.131, p.99-104, 1994.

KASEMPIMOLPORN, S.; TIRAWATNAPONG, T.; SAENGSEESOM, W.; NOOKHAI, S.; SITPRIJA, V. Immunosuppression in rabies virus infection mediated by lymphocyte apoptosis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.54, p.144-147, 2001.

KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Zinc deficiency and immune function. **Annual Review of Nutrition**, v.10, p.415-431, 1990.

KILBOURN, R.G.; BELLONI, P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.772-776, 1990.

KLEIN, S.L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v.26, p.247-264, 2004.

KOBERLE, F. **Pathogenesis of Chagas' disease: trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas disease**. Amsterdam: Elsevier, 1974. p.137-158.

KOCH, J.; NEAL, E.A.; SCHLOTT, M.J.; GARCIA-SHELTON, Y.L.; CHAN, M.F.; WEAVER, K.E.; CELLO, J.P. Zinc levels and infections in hospitalized patients with aids. **Nutrition**, v.12, p.515-518, 1996.

KROBOTH, P.D.; SALEK, F.S.; PITTENGER, A.L.; FABIAN, T.J.; FRYE, R.F. DHEA and DHEA-S: a review. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.39, p.327-348, 1999.

KRUSE-JARRES, J.D. The significance of zinc for humoral and cellular immunity. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v.3, p.1-8, 1989.

KURTIS, D.J.; MTALIB, R.; ONYANGO, K.F.; DUFFY, E.P. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. **Infection and Immunity**, v.69, p.123-128, 2001.

LABRIE, F.; BÉLANGER, A.; BÉLANGER, P.; BÉRUBÉ, R.; MARTEL, C.; CUSAN, L.; GOMEZ, J.; CANDAS, B.; CHAUSSADE, V.; CASTIEL, I.; DELOCHE, C.; LECLAIRE, J. Metabolism of DHEA in postmenopausal women following percutaneous administration. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.103, p.178-188, 2007.

LAMBERTS, S.W.; VAN DEN BELD, A.W.; VAN DER LELY, A.J. The endocrinology of aging. **Science**, v.278, p.419-424, 1997.

LEE, C.M.; HUMPHREY, P.A.; ABOKO-COLE, G.E. Interaction of nutrition and infection: effect of zinc deficiency on resistance to *Trypanosoma musculi*. **The International Journal of Biochemistry**, v.15, p.841-847, 1983.

LEENSTRA, T.; KUILE, F.O.; KARIUKI, S.K.; NIXON, C.P.; OLOO, A.J.; KAGER, P.A.; KURTIS, J.D. Dehydroepiandrosterone sulfate levels associate with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.297-304, 2003.

LEITE DE MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; LÉBOULANGER, F.; SAVINO, W.; DARDENNE, M.; LEPAULT, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi* infected mice: relationship to stress. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.33, p.267-275, 1991.

LEITE DE MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v.77, p.95-99, 1992.

LIEGE, S.; MOZE, E.; KELLEY, K.W.; PARNET, P.; NEVEU, P.J. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in IL-1 β -converting enzyme- deficient mice. **Neuroimmunomodulation**, v.7, p.189-194, 2000.

MARCACCINI, A.; LÓPEZ-PEÑA, M.; BERMÚDEZ, R.; QUIROGA, M.I.; GUERRERO, F.H.; NIETO, J.M.; ALEMAÑ, N. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.232-243, 2007.

MARET, W.; JACOB, C.; VALLEE, B.L.; FISCHER, E.H. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.1936-1940, 1999.

MARINHO, C.R.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitism, and Activation of the Immune System at the Late Chronic Phase of Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v.67, p.308-318, 1999.

MARTIN, E.; NATHAN, C.; XIE, Q.W. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v.180, p.977-984, 1994.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8 + T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, v.201, p.304-317, 2004.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v.22, p.477-481, 1997.

MCCONKEY, D.J.; NICOTERA, P.; HARTZELL, P.; BELLOMO, G.; WYLLIE, A.H.; ORRENIUS, S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.269, p.365-370, 1989

MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Parasitology**, v.64, p.475-482, 1978.

MINGARI, M.C.; MORETTA, A.; MORETTA, L. Regulation of KIR expression in human T-cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. **Immunology Today**, v.19, p.153-157, 1998.

MOCCHIGIANI, E.; VECCIA, S.; ANCARANI, F.; SCALISE, G.; FABRIS, N. Benefit of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine (AZT) therapy against opportunistic infections in AIDS. **International Journal of Immunopharmacology**, v.17, p.719-727, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.176, p.176: 213-254, 2006.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.100, p.663-677, 2006.

MORALES-MONTOR, J.; NEWHOUSE, E.; MAHAMED, F.; BAGHDATI, A.; DAMIAN, R.T. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.313-320, 2001.

MÜLLER, U.; KÖHLER, G.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; ALBER, G.; DI SANTO, J.; BROMBACHER, F.; HÖLSCHER, C. IL-12-independent IFN- γ production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. **Journal of Immunology**, v.167, p.3346-3353, 2001.

NAJIM, R.A.; SHARQUIE, K.E.; FARJOU, I.B. Zinc sulfate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vitro* and animal study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p.831-837, 1998a.

NAJIM, R.A.; SHARQUIE, K.E.; TURKI, K.M.; FARJOU, I.B. The *in vitro* effect of zinc against *Leishmania donovani*. **Journal of the Faculty of Medicine**, v.40, p.29-34, 1998b.

NAWAR, O.; AKRIDGE, R.E.; HASSAN, E.; EL-GAZAR, R.; DOUGHTY, B.L.; KEMP, W.M. The effect of zinc deficiency on granuloma formation, liver fibrosis, and antibody responses in experimental schistosomiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.47, p.383-389, 1992.

OLIVIERI, B.P.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; ARAUJO-JORGE, T.C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. Benznidazole therapy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice blocks thymic involution and apoptosis of CD₄⁺ CD₈⁺ double-positive thymocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49 p.1981-1987, 2005.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.8676-8680, 1992.

PADILLA, A.; XU, D.; MARTIN, D.; TARLETON, R. Limited role for CD4⁺ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8⁺ T cells. **Infection and Immunity**, v.75, p.231-235, 2007.

PANEMANGALORE, M.; BANERJEE, D.; ONOSAKA, S.; CHERIAN, M.G. Changes in intracellular accumulation and distribution of Metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. **Developmental Biology**, v.97, p.95-102, 1983.

PARKER, CR.JR.; JIAN, M.; CONLEY, A.J. The localization of DHEA sulfotransferase in steroidogenic and steroid metabolizing tissues of the adult rhesus macaque monkey. **Endocrine Research**, v.26, p.517-522, 2000.

PÉREZ, A.R.; ROGGERO, E.; NICORA, A.; PALAZZI, J.; BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; BOTTASSO, O.A. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, p.890-900, 2007.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, v.193, p.90-98, 1999.

PRADO JÚNIOR, J.C.; LEAL, MDE.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; DE ANDRADE JÚNIOR, H.F.; KLOETZEL, J.K. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.84, p.100-105, 1998.

PRADO, J.C. JR; LEVY, A.M.; LEAL, M.P.; BERNARD, E.; KLOETZEL, J.K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.85, p.826-829, 1999.

PRASAD, A.S.; MIAIE, A.JR.; FARID, Z.; SCHULERT, A.; SANDSTEAD, H.H. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency, hypogonadism and dwarfism. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.83, p.537-549, 1963.

PRASAD, A.S. Zinc: an overview. **Nutrition**, v.11, p.93-99, 1995.

PRASAD, A. S. Zinc: The Biology and Therapeutics of an Ion. **Annals of Internal Medicine**, v.125, p.142-143, 1996.

PRASAD, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, p.62-68, 2000.

PRASAD, A. S. Zinc: mechanisms of host defense. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.1345-1349, 2007.

PRICE, P.; OLVER, S.D.; GIBBONS, A.E.; TEO, H.K.; SHELLAM, G.R. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. **Immunology and Cell Biology**, v.71, p.155-165, 1993.

PROVINCIALI, M.; DI STEFANO, G.; FABRIS, N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, v.17, p.735-744, 1995.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Biological functions of nitric oxide. **Química Nova**, v.22, 1999.

RABKIN, J.G.; MCELHINEY, M.C.; RABKIN, R.; MCGRATH, P.J.; FERRANDO, S.J. Placebo-controlled trial of dehydroepiandrosterone (DHEA) for treatment of nonmajor depression in patients with HIV/AIDS. **The American Journal of Psychiatry**, v.163, p.59-66, 2006.

RASMUSSEN, K.R.; MARUN, E.G.; HEALY, M.C. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Parasitology**, v.79, p.364-370, 1993.

RASMUSSEN, K.R.; HEALEY, M.C.; CHENG, L.; YANG, S. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Parasitology**, v.81, p.429-433, 1995.

RAULIN, J. Etudes chimique sur la vegetation (Chemical studies on plants). **Annales des Sciences Naturelles Botanique et Biologie Vegetale**, v.11, p.293-299, 1869.

REED, S.G.; LARSON, C.L.; SPEER, C.A. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas disease. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.52, p.11-17, 1977.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Molecular Approaches to Parasitology**. New York: Wiley-Liss, 1995. p.443-445.

REIS, M.M., HIGUCHI, M.L., BENUENUTI, L.A., AIELLO, V.D., GUTIERREZ, P.S., BELLOTTI, G., PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines

and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.830, p.165-172, 1997.

REYES, P.; VALLEJO, M. Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, DOI: 10.1002/14651858.CD004102, 2005

RINK, L.; GABRIEL, P. Zinc and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.541-552, 2000.

RINK, L.; HAASE, H. Zinc homeostasis and immunity. **Trends Immunology**, v.28, p.1-4, 2007.

ROGGERO, E.; PÉREZ, A.R.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clinical and Experimental Immunology**, v.128, p.421-428, 2002.

ROGGERO, E.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; PÉREZ, A.R.; VELIKOVSKY, A.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.41, p.123-131, 2004.

ROGGERO, E.; PÉREZ, A.R.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; BESEDOVSKY, H.O.; BOTTASSO, O.A.; DEL REY, A. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Endocrinology**, v.190, p.495-503, 2006.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.395-403, 2000.

ROSSI, M.A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **American Heart Journal**, v.120, p.233-236, 1990.

ROTTENBERG, M.E.; CASTANOS-VELES, E.; DE MESQUITA, R.; LAGUARDIA, O.G.; BIBERFIELD, P.; ORN, A. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **European Journal of Immunology**, v.26, p.3203-3213, 1996.

RUSSOMANDO, G.; TOMASSONE, M.M.; GUILLEN, I.; ACOSTA, N.; VERA, N.; ALMIRON, M.; CANDIA, N.; CALCENA, M.F.; FIGUEREDO, A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p. 487-491, 1998.

SANDSTRÖM, B. Bioavailability of zinc. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.17-19, 1997.

SANTELLO, F.H.; FRARE, E.O.; SANTOS, C.D.; TOLDO, M.P.; KAWASSE, L.M.; ZUCOLOTO, S.; PRADO, J.C. Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.359-363, 2007.

SANTORO, N.; TORRENS, J.; CRAWFORD, S.; ALLSWORTH, J.E.; FINKELSTEIN, J.S.; GOLD, E.B.; KORENMAN, S.; LASLEY, W.L.; LUBORSKY, J.L.; MCCONNELL, D.; SOWERS, M.F.; WEISS, G. Correlates of circulating androgens in mid-life women: the study of women's health across the nation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.4836-4845, 2005.

SANTOS CD, CALDEIRA JC, TOLDO MP, PRADO, J.C. *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v.110, p.96-101, 2005.

SANTOS, C.D.; TOLDO, M.P.; LEVY, A.M.; KAWASSE, L.M.; ZUCOLOTO, S.; DO PRADO JC, JR. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. **Acta Tropica**, v.102, p.143-150, 2007a.

SANTOS, C.D.; PRADO, J.C. JR.; TOLDO, M.P.; LEVY, A.M.; FRANCI, C.R.; CALDEIRA, J.C. *Trypanosoma cruzi*: plasma corticosterone after repetitive stress during the acute phase of infection. **Experimental Parasitology**, v. 117, p.405-410, 2007b.

SANTOS-BUCH, C.A.; ACOSTA, A.M. Pathology of Chagas' disease. In: TIZARD, I. **Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis**. 1.ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. p.145-183.

SAVINO, W.; LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; LEBOULENGER, F.; DARDENNE, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*, **European Journal of Immunology**, v.19, p.1727-1733, 1989.

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PLoS Pathogens**, v.2, p.472-483, 2006.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D.M.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; MONTEIRO, E.S.; PEREZ, A.R.; AOKI, M.D.P.; BOTTASSO, O.; GUINÁZÚ, N.; SILVA-BARBOSA, S.D.; GEA, S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.18, p.107-124, 2007.

SCHWARTZ, A.G.; PASHKO, L.; WHITCOMB, J.M. Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. **Toxicologic Pathology**, v.14, p.357-362, 1986.

SCORZA, C.; SCORZA, J.V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth days after inoculation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.14, p.171-177, 1972.

SCOTT, B.J.; BRADWELL, A.R. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel and calcium. **Clinical Chemistry**, v.29, p.629-633, 1983.

SEYLE, H. Thymus and adrenals in response of the organism to injuries and intoxications. **British Journal of Experimental Pathology**, v.17, p. 234-248, 1936.

SHANKAR, A.H.; GENTON, B.; TAMJA, S. Zinc supplementation can reduce malaria-related morbidity in preschool children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, p.434, 1997.

SHANKAR, A.H.; PRASAD, A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.447-463, 1998.

SHARQUIE, K.E.; NAJIM, R.A.; FARJOU, I.B.; AL-TIMIMI, D.J. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.26, p.21-26, 2001.

SHARQUIE, K.E.; NAJIM, R.A. Disseminated cutaneous leishmaniasis. **Saudi Medical Journal**, v.25, p.951-954, 2004.

SHI, H.N.; SCOTT, M.E.; STEVENSON, M.M.; KOSKI, K.G. Zinc deficiency impairs T lymphocyte function in mice with primary infection of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda). **Parasite Immunology**, v.6, p.339-350, 1994.

SHIBUTA, H.; ADACHI, A.; KANDA, T.; MATUMOTO, M. Experimental parainfluenza virus infection in mice: fatal illness with atrophy of thymus and spleen in mice caused by a variant of parainfluenza 3 virus. **Infection and Immunity**, v.35, p.437-441, 1982.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clínica Biol. São Paulo**, v.20, p.191-201,1953.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, p.4862- 4867, 1995.

SINGH, K.P.; ZAIDI, S.I.; RAISUDDIN, S.; SAXENA, A.K.; MURTHY, R.C.; RAY, P.K. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.14, p.813-840, 1992.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.395-398, 1993.

ST PIERRE, B.A.; GRANGER, D.A.; WONG, J.L.; MERRILL, J.E. A study on tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors, and nitric oxide in human fetal glial cultures. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, v.34, p.415-438, 1995.

STAHL, W.; TUREK, G. Chronic murine toxoplasmosis: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.82, p.35-48, 1988.

SUNDERLAND, T.; MERRILL, C.R; HARRINGTON, M.G. Reduced plasma dehydroepiandrosterone concentrations in Alzheimer's disease. **Lancet**, v.2, p.570, 1989.

SUNDERMAN, F.W. The influence of zinc on apoptosis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.25, p.134-142, 1995.

TALIAFERRO, W.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infectious Diseases**, v.96, p.199-226, 1995.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; BARCELOS, L.S.; GOMES, Y.M.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.943-950, 2004.

TARLETON, R.L. Tumor necrosis factor (cachetin) production during experimental Chagas' disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v.73, p.186-190, 1988.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of β 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v.356, p.338-340, 1992.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **International Immunology**, v.8, p.13-22, 1996.

TASCI, S.; SENGIL, A.Z.; ALTINDIS, M.; ARISOY, K. The effect of zinc supplementation in experimentally induced *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.25, p.745-751, 1995.

TERENZI, F.; DIAZ-GUERRA, M.J.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI, S.; BOSCA, L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through nitric oxide-independent pathways in rat macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.6017-6021, 1995.

THOMSON, L.; GADELLHA, F.R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A.E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transport in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.98, p.81, 1999.

TODD, W.K.; ELVEHJEM, C.A.; HART, E.B. Zinc in the nutrition of the rat. **The American Journal of Physiology**, v.107, p.146-156, 1934.

TREVES, S.; TRENTINI, P.L.; ASCANELLI, M.; BUCCI, G.; DI VIRGILLO, F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. **Experimental Cell Research**, v.211, p.339-343, 1994.

TRUONG-TRAN, A.Q.; CARTER, J.; RUFFIN, R.E.; ZALEWSKI, P.D. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. **Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v.14, p.315-330, 2001.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; ANGELO-BARRIOS, A.; LUCAS, R.; HEREMANS, H.; DE BAETSELIER, P.; CARLIER, Y. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti- TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. **Parasite Immunology**, v.17, p.561-568, 1995.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; LUCAS, R.; DE BAETSELIER, P.; BUURMAN, W.A.; CARLIER, Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.67, p.5579-5586, 1999.

TUDOR, R.; ZALEWSKI, P.D.; RATNAIKE, R.N. Zinc in health and chronic disease. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v.9, p.45-51, 2005.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v.79, p.1-71, 1999

UMEZAWA, K.; NAKAZAWA, K.; UCHIHATA, Y.; OTSUKA, M. Screening for inducers of apoptosis in apoptosis-resistant human carcinoma cells. **Advances in Enzyme Regulation**, v.39, p.145-156, 1999.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; D'AVILA REIS, D.; CORREIA DE OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissue of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v.348, p.891-892, 1996.

VALLEE, B.L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, v.73, p.79-118, 1993.

VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v.62, p.5177-5182, 1994.

VON BAMBERGER, C.M. Prevention and anti-aging in endocrinology. **MMW Fortschritte der Medizin**, v.149, p.33-35, 2007.

YANG, B.C.; LIU, C.W.; CHEN, Y.C.; YU, C.K. Exogenous dehydroepiandrosterone modified the expression of T helper related cytokines in NZB/NZW F1 MICE. **Immunological Investigations**, v.27, p.291-302, 1998.

YOSHIKAWA, T.T. Important infections in elderly persons. **The Western Journal of Medicine**, v.135, p.441-444, 1981.

YUZBASIYAN-GURKAN, V.A.; BREWER, G.J.; VANDER, A.J.; GUENTER, M.J.; PRASAD, A.S. Net renal tubular reabsorption of zinc in healthy man and impaired handling in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v.31, p.87-90, 1989.

WANG, S.D.; HUANG, K.J.; LIN, Y.S.; LEI, H.Y. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. **Journal of Immunology**, v.152, p.5014-5021, 1994.

WEISS, G.; WACHTER, H.; FUCHS, D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. **Immunology Today**, v.16, p.495-500, 1995.

WEISS, G.; WIDNER, B.; ZOLLER, H.; FUCHS, D. The immunobiology of zinc and the kidney. **Immunology Today**, v.19, p.193, 1998.

WELLHAUSEN, S.M.; BOROS, D.V. Atrophy of the thymic cortex in mice with granulomatous schistosomiasis mansoni. **Infection and Immunity**, v.35, p.1063-1069, 1982.

WELLINGHAUSEN, N.; KIRCHNER, H.; RINK, L. The immunobiology of zinc. **Immunology Today**, v.18, p.519-521, 1997.

WELLINGHAUSEN, N.; RINK, L. The significance of zinc for eukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology**, v.64, 571-577, 1998.

WIRTH, J.J.; FRAKER, P.J.; KIERSZENBAUM, F. Zinc requirements for macrophage function: effect of zinc deficiency on uptake and killing of a protozoan parasite. **Immunology**, v.68, p.114-119, 1989.

WORLD BANK (1993). World Development Report: Investing in Health. Washington DC: WORLD BANK.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Technical Report Series n 811. Geneva: WHO.

WU, S.; RUAN, Y.; YIN, M.; LAI, W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. **Gerontology**, v. 53, p.234-237, 2007.

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v.284, p.555-557, 1980.

ZALEWSKI, P.D.; FORBES, I.J. Intracellular zinc and the regulation of apoptosis. In: LAVIN, M.; WATTERS, D. **Programmed Cell Death: The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis** Melbourne: Harwood Academic Publishers, 1993. p.73-86.

ZHANG, Z.; ARAGHI-NIKNAM, M.; LIANG, B.; INSERRA, P.; ARDESTANI, S.K.; JIANG, S.; CHOW, S.; WATSON, R.R. Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. **Immunology**, v.96, p.291-297, 1999.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.480-486, 1999.