UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP

Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *Trypanosoma cruzi*

Christian Collins Kuehn

- RIBEIRÃO PRETO –
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP

Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *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.

Orientado: Christian Collins Kuehn
Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

- RIBEIRÃO PRETO –
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Kuehn, Christian Collins
Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *Trypanosoma cruzi.*
99p.: Il.; 30cm
Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Prado Junior, José Clóvis

1. *Tryapanosoma cruzi*. 2. Melatonina. 3. Dehidroepiandrosterona

FOLHA DE APROVAÇÃO

Christian Collins Kuehn

Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *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: José Clóvis do Prado Junior

Orientado(a): Christian Collins Kuehn
Orientador(a): José Clóvis do Prado Junior

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____Assinatura:_____

Dedico este trabalho à meus pais Sebastião Pache Kuehn e Carmem Collins Kuehn bem como minha irmã Kelly Cristina Collins Kuehn, que estiveram ao meu lado em todos os momentos apesar da enorme distância que nos separa. Agradeço por sonharem comigo os meus sonhos e por me concederem a essência do amor e os ensinamentos que foram necessários para que eu os realizasse na trajetória de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao se refletir sobre a trajetória de uma vida relacionada aos estudos e as pesquisas, meus pensamentos se voltam ao agradecimento de nosso Deus, que por sua benevolência nos concede a sabedoria e humanização para lidarmos com nossos desafios, tanto no âmbito de uma dualidade espiritual como física, para concretizarmos os nossos objetivos e sonhos.

À minha família, iniciando-se pelo meu querido pai, pelo seu amor incondicional e por seus esforços imensos para que eu sempre conquiste os meus sonhos, não importando as adversidades.

À minha amada mãe, que me encoraja, me anima e me mostra que a vida é para aqueles que têm coragem, como ela um dia teve e tem. E que faz disso um exemplo a ser seguido.

A minha mais amada irmã, a qual me serve de inspiração e exemplo para as minhas vitórias e futuras conquistas no âmbito profissional e familiar, devido ao fato de ser a primogênita e dotada de estrema amorosidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior, por ter aberto uma porta intitulada “oportunidade”, aos meus primeiros passos a caminho da docência e pesquisa, e ensinar-me que é através dos meus feitos à porta se manterá aberta por toda uma vida.

E a todos os professores, profissionais técnicos e pós - graduandos do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela contribuição disponibilizada à minha formação acadêmica, científica e humana no decorrer de todos estes anos.

“Tudo é ousado para quem a nada se atreve”
Shigueo Watanabe

RESUMO

KUEHN, C. C. **Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *Trypanosoma cruzi.*** 2009. Dissertação**.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Estudos prévios mostram que tanto a melatonina (MEL) como a Dehidroepiandrosterona (DHEA) aumentaram a resposta imune contra distintos parasitas. O presente estudo investigou a atividade *in vitro* da MEL e DHEA associados em um período de 24 horas e *in vivo* durante o curso da infecção por *T. cruzi*. A atividade *in vitro* da MEL e DHEA sozinhos, bem como juntos foram testados sobre formas tripomastigotas (doses variando de 0.5, 8, 20, 32, 40 to 128 μM). *In vitro*, tanto MEL como DHEA sozinhos não mostraram qualquer atividade contras formas tripomastigotas, embora quando utilizadas em concentrações mais elevadas, a associação de MEL e DHEA mostrou-se ativa contra formas tripomastigotas do parasita. Entretanto, para estas altas concentrações, verificou-se alta toxicidade sobre os macrófagos peritoneais. Para avaliação *in vivo*, ratos machos Wistar foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Os animais foram oralmente tratados com 5 mg/kg peso corpóreo /dia de MEL e de forma subcutânea com 40mg/kg peso corpóreo/dia de DHEA. Tratamento com MEL, DHEA e associado mostrou uma redução significante no número de tripomastigotas sangüíneos durante a fase aguda da infecção quando comparado aos animais não trados ($P<0.05$). Um significante aumento no número de macrófagos e concentração de óxido nítrico (NO) foram

observados durante o pico da parasitemia apenas com MEL ou combinado com DHEA. Entretanto, observou-se que o DHEA sozinho aumentou a concentração de NO ($P<0.05$), bem como os níveis de TNF-α durante a infecção ($P<0.05$). Estes resultados mostram que a MEL, DHEA ou a associação de ambos reduz a parasitemia durante a fase aguda de infecção. A ação combinada de ambos os hormônios não exerceu uma ação sinérgica sobre a magnitude da resposta imune do hospedeiro, ficando o DHEA como a substância que induziu a resposta imune mais eficiente.

Palavra chave: *Trypanosoma cruzi*, Melatonina, Dehidroepiandrosterona

ABSTRACT

KUEHN, C. C. **Evaluation *in vitro* and *in vivo* of the combined action of the hormones Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Melatonin (MEL) against *Trypanosoma cruzi.*** 2009. Dissertação**.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Previous studies show that melatonin (MEL) and dehydroepiandrosterone (DHEA) enhances the immune response against parasitic pathogens. The present study investigated the *in vitro* activity of MEL and DHEA association in a period of 24 hours and *in vivo* during the course of *T. cruzi* infection. The *in vitro* activity of MEL and DHEA alone, as well as together, were tested for the trypomastigote forms (doses ranging from 0.5, 8, 20, 32, 40 to 128 μM). *In vitro*, nor MEL nor DHEA alone did not show any activity against trypomastigote forms, although when the highest concentration of MEL and DHEA association was used, it was active against the trypomastigote forms of the parasite. However, for this concentration, a quite toxicity on peritoneal macrophages was observed. For *in vivo* evaluation, male Wistar rats were infected with the Y strain of *T. cruzi.* They were orally treated with 5mg/kg body weight/day of MEL and subcutaneously with 40mg/kg body weight/day of DHEA. Treatment with MEL, DHEA and the association showed a significant reduction in the number of blood trypomastigotes during the acute phase of infection as compared to untreated animals ($P<0.05$). A significant increase in the number of macrophages and nitric oxide (NO) concentrations were observed during the peak of parasitemia with MEL alone or combined with DHEA. However, with DHEA alone, the highest concentration of NO was

observed (P<0.05). Moreover, DHEA treatment increased TNF-alpha levels during infection (P<0.05). These results show that MEL, DHEA or the association of both reduces parasitemia during the acute phase of infection. The combined action of both hormones did not exert a synergic action on the host's ability to fight infection, and it seems that among all treatments DHEA induces a more efficient immune response.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Melatonin, Dehydroepiandrosterone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Curva dose-resposta do hormônio DHEA e MEL na lise de macrófagos J774 no ensaio *in vitro*, com plotagem da curva IC_{50}. B) Ação mútua *in vitro* dos hormônios DHEA/MEL representados na curva dose-resposta, estipulando o valor de IC_{50} sobre macrófagos J774.....30

Figura 2: Contagem global de macrófagos peritoneais em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA, MEL e DHEA/MEL durante 21 dias de experimento.....32

Figura 3: A) Curva dose-resposta do hormônio DHEA e MEL na lise parasitária no ensaio *in vitro*, com plotagem de curva IC_{50}. B) Ação mútua *in vitro* dos hormônios DHEA/MEL representados na curva dose-resposta, estipulando o valor de IC_{50} sobre tirpomastigotas.....35

Figura 4: Evolução da parasitemia em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com e sem tratamento de DHEA, MEL e MEL+DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo CONTROLE (Somente Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL (Tratado e Infectado) e MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos utilizamos n =5.....38

Figura 5: Produção de óxido nítrico expresso em μM em macrófagos J774 não infectados tratados com DHEA/MEL durante 24/horas e não estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.....42

Figura 6: Produção de óxido nítrico expresso em μM em macrófagos J774 não infectados tratados com DHEA/MEL durante 24 horas e estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.....43

Figura 7: Produção de óxido nítrico expresso em µM em macrófagos J774 infectados com cepa Y de *T. cruzi* tratados com DHEA/MEL durante 24/horas não estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.....44

Figura 8: Produção de óxido nítrico expresso em µM em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA, MEL e DHEA+MEL conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dia de experimento. Grupo C ONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.....46

Figura 9: Produção de TNF-α expresso em pg/ml em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimul ado. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.....48

Figura 10: Avaliação do peso cardíaco em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento. Grupo CONTROLE (Somente In fectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Efeito citotóxico *in vitro* de diferentes concentrações de DHEA e MEL e ação mútua dos hormônios, frente à cultura de células ($5x10^5$ cél./ poço), determinado por ensaios colorimétricos.....31

Tabela 02 Atividade tripanossomicida *in vitro*, de diferentes concentrações de DHEA e MEL e ação mútua dos hormônios frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, determinado por ensaios colorimétricos.....35

LISTA DE ABREVIATURAS

DHEA - Dehidroepiandrosterona

DHEA-S – Dehidroepiandrosterona Sulfato

MEL - Melatonina

DMSO – Dimetil –sufóxido

IC_{50} – Coeficiente de inibição de 50%

NK - Natural Killer

MHC – Moléculas de Histocompatibilidade

IFNγ – Interferon Gama

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

IL-12 – Interleucina 12

LPS – Lipopolissacarídeo

NFKB – Nuclear fator-Kappa B

SUMÁRIO

Resumo.....i

Abstract.....iii

Lista de Figuras.....v

Lista de Tabelas.....vii

Lista de Abreviaturas.....viii

1.0 **INTRODUÇÃO**.....01

1.1 Doença de Chagas.....01

1.2 Mecanismo de invasão celular por *T. cruzi*.....02

1.3 Imunologia da doença de Chagas.....04

1.4 Dehidroepiandrosterona (DHEA).....05

1.5 Melatonina (MEL).....06

1.6 Macrófagos e sua interação com DHEA e MEL.....07

2.0 **OBJETIVO**.....16

3.0 **JUSTIFICATIVA**.....17

4.0 **MATERIAIS E MÉTODOS**.....18

4.1 Parasitas.....18

4.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA).....18

4.3 Melatonina (MEL).....19

4.4 Ensaios biológicos *in vitro*.....19

4.4.1 Avaliação biológica *in vitro*, sobre formas tripomastigotas (cepa Y) obtidas de cultura de células.....19

4.4.2 Macrófagos J774 utilizados para ensaios *in vitro*.....20

4.4.3 Contagem de macrófagos J774.....20

4.4.4 Avaliação biológica *in vitro*, da toxicidade do DHEA/MEL em macrófagos J774.....21

4.5 Viabilidade pelo Azul de Tripan.....21

4.6 Ensaio biológico *in vivo*.....22

4.6.1 Animais utilizados.....22

4.6.2 Suplementação com DHEA e MEL.....22

4.6.3 Grupos experimentais para ensaios *in vivo*.....23

4.6.4 Dias de experimento.....24

4.6.5 Morte dos animais.....24

4.6.6 Coleta de sangue.....24

4.6.7 Curva parasitêmica.....25

4.6.8 Contagem de macrófagos.....26

4.6.9 Quantificação de Óxido Nítirco.....26

4.6.8 Dosagem da citocina TNF-α.....27

4.6.9 Pesagem do coração.....28

4.7 Análise estatística.....28

5.0 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....29

5.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos hormônios DHEA e MEL sobre macrófagos J774.....29

5.2 Contagem global de macrófagos peritoneais *in vivo* em ratos Wistar.....32

5.3 Avaliação *in vitro* dos hormônios DHEA e MEL sobre as formas tripomastigotas (cepa Y) de *T. cruzi*.....34

5.4 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL na parasitemia de ratos Wistar macho.....37

5.5 Avaliação *in vitro* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em macrófagos J774.....40

5.6 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em ratos Wistar.....45

5.7 Fator de Necrose Tumoral (TNF-α).....48

5.4 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL na parasitemia de ratos Wistar macho.....37

5.5 Avaliação *in vitro* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em macrófagos J774.....40

5.6 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em ratos Wistar.....45

5.7 Fator de Necrose Tumoral (TNF-α).....48

5.8 Peso do Coração.....51

6.0 **CONCLUSÃO**.....53

7.0 **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**.....55

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

Em 1909, Carlos Chagas, médico e então pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), descobriu em Lassance, interior de Minas Gerais, uma nova doença humana, a tripanossomíase americana também denominada doença de Chagas. Foi à primeira vez na história da medicina que um mesmo pesquisador identificava o vetor (o inseto *Triatoma infestans* conhecido como "barbeiro"), o agente etiológico (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e a doença causada por esse parasito (KROPF e FERREIRA 2000).

T. cruzi é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e de cinetoplasto, uma organela contendo DNA localizada na mitocôndria. Suas formas evolutivas são os tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para o homem), epimastigotas (formas de multiplicação no vetor e em culturas), tripomastigotas sangüícolas e amastigotas (multiplicam-se dentro das células do hospedeiro) MORAES (1971).

A transmissão da doença pode ocorrer por diversas maneiras, como por meio de vetores (CHAGAS, 1909), transfusão de sangue (PELLEGRINO, 1949), congênita, transplante de órgãos (SHIKANAI-YASSUDA et al., 1990), via digestiva (MEDINA – LOPES, 1980), secreções (DEANE et al., 1979) e acidente laboratorial (REICHE e JANKEVICIUS, 1997).

A entrada do parasito na célula hospedeira, e a alta capacidade de *T. cruzi* evadirem-se da resposta imune por meio de seu mecanismo de escape

do fagossoma e permanência no citoplasma, altera os eventos bioquímicos da célula, interferindo na sua fisiologia bem como no alvo de ação das drogas utilizadas. Alguns autores sugerem que a suscetibilidade e/ou resistência ao parasita está associada à resposta humoral especifica, em particular pela capacidade de determinadas linhagens de camundongos produzirem anticorpos líticos capazes de destruir o parasita com o auxílio do sistema complemento, de facilitar a fagocitose e de favorecer a citotoxicidade mediada por células (LIMA-MARTINS et al., 1985).

1.2 Mecanismos de invasão celular por *T. cruzi*

As formas tripomastigotas emergem de infecções celulares, que posteriormente ganham o sistema circulatório e disseminam-se por diversos órgãos e tecidos. Seguindo-se da fase aguda, o parasito infecta múltiplas células e tecidos, sendo sua proliferação controlada pela resposta imune do hospedeiro (COURA et al., 2002).

Segundo estudos, tanto as formas tripomastigotas metacíclicas como as formas epimastigotas, invadem a corrente sangüínea no momento da contaminação, no entanto a forma epimastigota não infecta as células, devido ao fato de não induzir a sinalização de liberação de Ca2+ (TARDIEUX et al., 1994).

O processo de invasão de macrófagos e células não fagocíticas é bastante complexo, envolvendo mecanismos ativos e passivos tanto por parte do parasito quanto pelas células alvo, aliados à componentes da membrana de ambos (BURLEIGH e ANDREWS, 1995).

A invasão de células de mamíferos por *T. cruzi* tem sido exaustivamente estudada *in vitro* através do uso de tipomastigotas metacíclicos e tripomastigotas. Diferentes isolados de *T. cruzi* e uma variedade de tipos celulares, principalmente aquelas que exercem função fagocitária tem sido usadas. A penetração e interiorização celular nos hospedeiros envolvem múltiplos fatores, os quais através de uma série de eventos intracelulares levam a mobilização de cálcio (Ca+) no interior das células, propiciando assim a infecção (DOCAMPO et al., 1996; YOSHIDA 2003). A ação de tripomastigotas a receptores é restrita ao domínio da superfície celular (SCHENKMAN et al., 1991). Para invadir as células de mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sangüícolas provocam o envolvimento de distintas moléculas celulares do hospedeiro (NEIRA et al., 2003). Componentes de membrana celulares compostos de glicoproteina gp85 para tripomastigotas e gp 82 para tripomastigotas metacíclicos, têm sido demonstrados que servem de ligação extracelular da célula com os parasitas (OUAISSI et al., 1986; GIORDANO et al., 1994). Através destas glicoproteínas iniciam - se diferentes propriedades ligantes, ativando uma cascata de Ca2+ (COLLI e ALVES 1999).

Após a invasão de macrófagos, *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1999). Desta forma os macrófagos secretam interleucinas, que ativam as células Natural Killer (NK) a produzirem o interferon gama (INF-y) (ALIBERTI et al., 1996). Estes agem sobre os macrófagos, ativando-os para atividades antiparasitárias (GAZZINELI, et al., 1992).

1.3 Imunologia da Doença de Chagas

O papel dos macrófagos, na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecido (TALIAFERRO e PIZZI, 1955). Os macrófagos e as células T desempenham uma função importante no controle da infecção chagásica (NATHAN et al., 1979). Mesmo exercendo um papel crucial na função efetora no controle da resposta imune do hospedeiro, os macrófagos representam provavelmente, uma das primeiras células envolvidas na infecção chagásica, sendo capazes de abrigar o parasita e permitir sua multiplicação.

O mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN-γ, que tem sido considerado como uma importante citocina para a destruição de *T. cruzi* (PLATA et al.,1984; MURRAY et al., 1985). Isso ocorre porque *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12, que além de estimular a proliferação de linfócitos T, ativa as células NK a produzirem IFN-γ, cuja função é acionar os macrófagos para a atividade antiparasitária (TRINCHIERI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000).

O controle da fase aguda da infecção está relacionado com a resposta celular, onde as células T exercem um efeito antiparasitário precoce e anterior à produção de anticorpos (TRISCHMANN, 1984).

1.4 Dehidroepiandrosterona (DHEA)

O DHEA é sintetizado pelas células da zona reticular da adrenal, a partir de moléculas de colesterol, mais especificamente pela 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesterona. O DHEA pode estar conjugado ao sulfato por uma enzima específica. As formas livres e sulfatadas de DHEA são os principais andrógenos produzidos pela adrenal, embora pequenas quantidades de androstenediona sejam formadas e ainda menores quantidades de testosterona são formadas. DHEA possui reduzida atividade androgênica, mas pode ser convertido em testosterona nos tecidos periféricos (NGUYEN et al., 2008).

Participa do metabolismo da formação dos hormônios femininos estrona, estriol e estradiol, assim como do hormônio masculino, a testosterona. Este esteróide produzido também nas gônadas, mas, principalmente, pelas glândulas adrenais, além de ser precursor da testosterona e do estradiol, exerce importantes ações fisiológicas no organismo humano (BAULIEU 1996).

DHEA exibe uma variação diurna da sua secreção, menor em indivíduos mais velhos do que em jovens (LORIA et al., 1998). A dissociação entre a secreção de DHEA e cortisol é observada após administração de ACTH em indivíduos velhos e jovens, sendo que o primeiro grupo apresenta uma secreção de DHEA muito menor que o segundo (OHASHI et al., 1986). DHEA-S também é secretado em resposta ao ACTH, porém em menor proporção que o DHEA.

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T. cruzi* desencadeia a mobilização do sistema imune, importante na redução da carga parasitária,

mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas (SANTOS et al., 2005).

1.5 Melatonina (MEL)

Sintetizada a partir do triptofano, envolve várias enzimas e compostos indol. A etapa limitante para a síntese de melatonina é a atividade das enzimas N-acetiltransferase e a hidroxindol-orto-metiltransferase (HIOMT). Supõe-se que cerca de 25% da secreção de melatonina seja de origem extra-pineal, sendo impreciso o local de sua produção ectópica (LEWY, 1983). A melatonina também pode ser encontrada na retina e nas hemácias. (CARDINALLI e ROSNER, 1971)

A produção de melatonina é maior durante a noite, sendo sua concentração, no interior da pineal, inversa à de seu precursor, a serotonina. Durante o dia, os níveis de melatonina são mais baixos, começam a aumentar no inicio da noite e alcançam seu pico máximo ao redor de meia-noite, caindo a seguir independente do estado de vigília (REICHLIN, 1992). Embora, no homem, haja um aumento acentuado dos níveis de melatonina durante o período noturno (JIMERSON et al., 1977). WETTERBUR et al., (1976) observaram que a melatonina é secretada durante todo o dia, marcadamente em períodos de vigília e na presença de luz.

Os efeitos exercidos pela melatonina sobre os parâmetros imunes são distintos, e dependem de vários fatores, como: dose, via de aplicação, espécie, sexo, idade, estação do ano, ritmo circadiano da resposta celular e humoral, condições de estresse e etc. (SKWARLO, 2002).

Outros trabalhos relatam a ação deste hormônio na produção de IL-2, IFN-α, IL-6 e IL-12 em culturas de células mononucleares humanas. Como o aumento da produção de IL-6 está relacionado com a ativação de monócitos pela melatonina, o hormônio age nas células linfóides humanas, causando uma resposta do tipo Th-1, a qual está também associada ao aumento da produção de IL-12 (GARCIA-MAURINO et al., 1999).

1.6 Macrófagos e sua interação com Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL)

Macrófagos residentes no tecido podem ser chamados de macrófagos fixos e, aqueles que se apresentam subsequentemente a um estímulo exógeno e migram para sítios particulares, como a cavidade peritoneal, são denominados macrófagos livres. Estes nomes têm sido substituídos por macrófagos residentes e macrófagos ativados, respectivamente (GARTNER et al. 1997).

Macrófagos ativados são um pouco maiores que os não ativados principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático. Têm sua atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente aumentada sendo muito mais eficiente em destruir bactérias e outros patógenos (ERWIG et al., 1998).

A variabilidade de estímulos que pode ativar macrófagos é muito grande: contato direto com microorganismos ou partículas inertes, como lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e produtos do próprio tecido danificado. A ativação pode também ser induzida por certas citocinas, que são secretadas

por linfócitos que estejam ao redor. Estes estímulos fazem com que modifiquem algumas de suas propriedades como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção (GORDON et al., 1988).

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; ALIBERT et al., 1996).

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito, demonstrando ação efetiva contra as formas tripomastigotas (THOMSON et al., 1999).

Embora uma das mais simples moléculas biológicas na natureza, o óxido nítrico está envolvido em diversos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle de pressão sangüínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais (FELDMAN et al., 1993). Considerado também como uma importante molécula efetiva contra patógenos intracelulares como *T. cruzi* (GAZINELLI et al., 1992).

Diversos quadros patológicos como problemas cardiovasculares, neuronais, inflamatórios e infecciosos podem estar envolvidos com altos ou baixos níveis de óxido nítrico no organismo (QUEIROZ et al., 1999).

O óxido nítrico é biossintetizado através da oxidação da L- arginina que é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS). Essa enzima responsável pela síntese de óxido nítrico é constituída de duas isoformas: as constitutivas que estão presentes nos endotélios vasculares, no cérebro e sistema nervoso, as quais são dependentes de Ca^{2+} e um co-fator adicional a calmodulina. A

induzida é ativada por mecanismos externos, que no caso é o estímulo imunológico (NATHAN, 1992).

A forma indutiva e as formas constitutivas da enzima NO sintetase diferem não apenas pela maneira as quais elas são ativadas, mas também pela quantidade de síntese que a forma induzida produz em relação à constitutiva (LANCASTER et al., 1992).

O óxido nítrico (NO) uma vez produzido resultante das formas constitutivas ou induzidas reagem rapidamente com outros radicais livres importantes como o superóxido (O_2^-) resultando na formação de peróxinitrito ($^-$OONO), podendo em grandes concentrações se tornar oxidativo às células. Possui vida média de aproximadamente 1 segundo e após este período o NO se decompõe espontaneamente a nitrato (NO_3^-) (FUKUTO et al., 1996).

Recursos terapêuticos hormonais vêm ganhando espaço no campo das pesquisas como é o caso do Dehidroepiandrosterona (DHEA) devido a sua ação imunomoduladora na ativação das funções das células T (SOMEKH et al., 2000), aumento da citotoxicidade em células Natural Killer através de IGF-I (insuline like growth factor) (SOLERTE et al., 1999) e modulação de um importante fator de lise parasitaria, o óxido nítrico (MANABE et al., 1999).

O NO em associação com o DHEA vem sendo investigado por diversos pesquisadores na tentativa de se descobrir qual a verdadeira relação na modulação deste metabólito. Alguns trabalhos relatados na literatura demonstram uma ação potencializadora do hormônio em tecidos endoteliais. Como é o caso descrito por TOMMASO et al., (2003.), que observou um aumento significativo do NO nestes tecidos.

A relação NO tanto em células endoteliais como macrofágicas, ainda permanece com muitas controvérsias (DENIS, 1994).

Diversos estudos têm relatado que monócitos e/ou macrófagos produzem NO através da indução do NO sintetase (ESSERY et al., 1994). Entretanto MCLANCHLAN (1996) realizou pesquisas avaliando a produção em macrófagos tratados com DHEA, demonstrando que este hormônio causa diminuição na síntese deste metabólito. Estes dados corroboram com os achados de BENES e OERTEL 1971, observando que o DHEA inibiu a produção de superóxido nestas células, induzindo também a inibição do 6-GPD que induz a NADPH, componente indispensável na produção de NO (MARKS et al., 1960; MOHAN et al., 1993). A este respeito os dados encontrados na literatura são conflitantes, principalmente quando se relaciona as infecções acometidas por protozoários.

Na tentativa de desvendar esta relação de NO, DHEA e infecção por protozoário, SANTOS et al., (2005) avaliou a liberação de NO em macrófagos infectados com *T. cruzi in vivo,* observando que este hormônio estimula a sua síntese em células de ratos infectados na fase aguda da doença.

Para que ocorra a conversão do DHEA ativo nos macrófagos ou nos tecidos, a enzima DHEA-S (sulfatase) se torna necessária, fazendo com que sua concentração se eleve no sangue humano, mais do que qualquer outro esteróide (NELSON et. al. 1983; RUOFF et al. 1991).

Os macrófagos representam unicamente os que contem maior quantidade ativa significante de DHEA-S sulfatase. Até o momento não se sabe sobre o mecanismo de atividade de controle enzimático que metaboliza o esteróide, particularmente nos macrófagos (DAYNES et al., 1990).

A ativação de macrófagos por interleucinas estimula a conversão de DHEA-S sulfatase em DHEA e que o mesmo é controlado pelas citocinas produzidas, tais como TNF-α e IL-6, podendo alterar a função de vários esteróides incluindo o metabolismo de DHEA-S para DHEA, sendo desta forma um mecanismo de regulação endógena do hormônio (JON et al., 1993).

A produção endógena das interleucinas, especialmente IL-6 *in vitro* e *in vivo* depende da relação entre os níveis de DHEA administrados. Entretanto os efeitos podem depender do tipo de cultura utilizada nas pesquisas *in vitro* ou a quantidade adicionada de DHEA nos experimentos (STRAUB et al., 1998; LIU et al., 2005).

Estudos vêm sendo realizados em células mononucleares do sangue periférico de vários pacientes, estimulados com LPS e tratados com DHEA, observando uma alta capacidade de liberação de IL-6 e TNF-α (FRANTZ et al., 2005).

Recentes trabalhos sugeriram controvérsias aos resultados anteriormente mencionados, na qual diferentes concentrações de DHEA foram colocadas em contato com células macrofágicas caninas pré - estimuladas com LPS, induzindo a produção de IL-6 e TNF-α. Os resultados demonstraram que o DHEA nas concentrações até 10µM incubados por 14 horas portou-se como um inibidor de IL-6 e TNF-α. Entretanto na concentração de 20µM houve um súbito aumento destas citocinas, potencializando a reação imunológica, concluindo que o estímulo varia de acordo com a concentração de DHEA utilizado (SUN – KWON et al., 2006).

Outro hormônio imuno-estimulador que vêm sendo vastamente utilizado em diversas pesquisas é a melatonina devido ser um componente biológico

muito relevante. Secretado pela glândula pienal (REITER et al., 1991), retina, rim e trato digestivo (JAWOREK et al., 2005) na qual têm um essencial controle da função fisiológica associada com o ritmo corpóreo circadiano e sazonal. A melatonina pode ser detectada também na medula óssea e em macrófagos (CONTI et al., 2000; CONSTANTINO et al., 1998).

A possível ação de oxidação da melatonina influencia diretamente os macrófagos, com a produção de citocinas, óxido nítrico e migração celular (REITER et al., 1999; LOPES et al., 1997; KELLY et al., 1984).

Interessante que algumas investigações relatam que a melatonina poderia diminuir a ativação do sistema imune devido a baixa regulação de expressão, incluindo óxido nítrico sintetase (iNOS) (CRESPO et al., 1999).

O NO causa a formação de oxigênio endógeno reativo (ROS) incluindo peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e outros potenciais oxidantes que são requeridos na morte de patógenos sobre macrófagos, como é o caso de *T. cruzi*. Entretanto uma produção exacerbada de NO e seus derivados metabólitos tem sido implicado em processos patológicos, como: neurodegeneração (MINAGAR et al., 2002), câncer e aceleração de apoptose (XU et al., 2002).

A melatonina vem sendo utilizada como um efetivo antioxidante contra a ação dos derivados do NO, produzidos em excesso (ALEGRAL et al., 2003). Essa diminuição da concentração de NO e seus derivados oxidantes em macrófagos, se dá devido a modulação do iNOS via NF-kB realizada pela melatonina. Desta forma o hormônio poderia ser uma terapêutica potencial na geração destes mediadores, sendo efetivos no tratamento de doenças que

hiper-ativem os macrófagos infectados (SEHN et al., 2004), como no caso da infecção por *T.cruzi* em sua fase aguda.

Essa modulação que a melatonina exerce sobre macrófagos também pode induzir a uma liberação de interleucinas (MAESTRONI et al., 1995; WALDHAUSER et al., 1993), tais como IL-1, TNF-α (MORREY et al. 1994; PIOLI et al., 1993), GM-CSF, IL-4 (MAESTRONI et al., 1994), IL-2 e IL-5 *in vivo e in vitro* (LISSONI et al., 1994). Atuando em receptores de células alvos, na qual têm sido descritos em vários tecidos da espécie humana (PANG et al., 1992) como: célula T (KONAKCHIEVA et al., 1995), linfócitos TH2 da medula óssea, plaquetas, neutrófilos e granulócitos humanos (LOPES-GONZALEZ et al., 1993). Estes receptores de melatonina são encontrados na membrana plasmática, no citoplasma, mitocôndrias e membrana nuclear. (PERSENGIEV et al., 1992; COHEN et al., 1978).

Tanto os macrófagos como os neutrófilos fazem parte de um importante componente do sistema imune inato, e a ação estimulatória da melatonina reflete em um significante mecanismo imuno-protetor. A melatonina *in vivo* restaura a diminuição total da soma de leucócitos da medula óssea e do sangue periférico, aumentando consigo a produção de IL-12, IL-6, IFN-gama, TNF-alfa, consequentemente realizando uma estimulação de células T helper (GARCIA-MAURINO et al., 1999; GARCIA-MAURINO et al., 1997).

O uso da melatonina, entretanto, apresenta certas controvérsias. Alguns pesquisadores afirmam que o hormônio reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, devido suprimir a expressão regulatória do NF-kB em macrófagos ativados por LPS (MAESTRONI 1996) como também inibe a liberação de iNO nestas células (GILAD 1998).

Trabalhos *in vivo* e *in vitro* vem sendo realizados com o intuito de se desvendar qual a verdadeira relação entre o sistema imune e a melatonina. MARC et al., (1998) determinou a ativação de receptores de melatonina em cultura de monócitos humanos ativados e estimulados por três dias, observando níveis elevados de receptores e aumento de citocinas. De acordo com o autor a quantidade de receptores de melatonina é expressa em função do tempo de maturação dos monócitos ou quando se faz presente um estímulo exógeno como no caso o LPS (JANSON et al., 1990).

VASUDEVA et al., 2000 relataram que elevadas concentrações de melatonina induziram uma liberação de TNF-alfa e NO em células macrofágicas pré-estimuladas. Entretanto frente a baixas concentrações deste hormônio, observou-se uma diminuição da secreção de TNF-alfa sem afetar a liberação de NO, sugerindo que a melatonina pode se comportar como um antagonista, dependendo de suas concentrações utilizadas.

Pouco ou quase nada se sabe sobre o possível efeito imunomodulador da melatonina *in vitro* na resposta imune em doenças parasitarias como no caso da doença de Chagas.

Em virtude das inúmeras controvérsias sobre o possível efeito imuno modulatório da melatonina sobre a produção de interleucinas e óxido nítrico tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, temos muito a investigar sobre as reais ações destes hormônios (ALEGRAL et al., 2003; VASUDEVA et al., 2000).

Alguns trabalhos já vêm sendo realizados avaliando a ação sinérgica destes dois hormônios citados neste trabalho, como é o caso da associação do DHEA e MEL na infecção murina por retrovírus, prevenindo a redução de células B e T estimulando a sínteses de interleucinas (ZHANG et al., 1999) e

também a ação mútua dos dois hormônios sobre o *Bacillus antrax*, diminuindo sua ação citolítica em células macrofágicas tratadas com os hormônios (SHIN et al., 1999).

Os dois únicos trabalhos publicados relacionando o tratamento separado com DHEA e MEL na doença de Chagas *in vivo* até o momento são das pesquisadoras DOS SANTOS et al., (2005) e SANTELLO et al., (2007), não havendo nada na literatura que se trate da ação mútua destes dois hormônios tanto *in vitro* como *in vivo* em relação a *T. cruzi*. Tornando este trabalho realmente inédito e de importância no que se refere às novas terapêuticas no combate à doença de Chagas.

2.0 OBJETIVOS

- Analisar as atividades biológicas dos hormônios Melatonina (MEL) e Dehidroepiandrosterona (DHEA) conjugados, em sistemas *in vitro:*
  - toxicidade da droga frente a células macrofágicas J774;
  - verificação da porcentagem de lise parasitária;
  - síntese de Óxido Nítrico.
- Após se ter estabelecido uma concentração adequada *in vitro* modulando a síntese de NO, lise parasitária e citotoxicidade. Avaliamos *in vivo* qual hormônio tem uma ação mais efetiva sobre a doença em uma concentração pré – estabelecida junto à administração da MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugados, com os seguintes parâmetros:
  - quantificação de parasitas sangüíneos durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi;*
  - contagem de macrófagos;
  - produção de NO;
  - TNF-α;
  - pesagem dos órgãos: coração.

3.0 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os efeitos imunomodulatórios já comprovados por diversos pesquisadores e pelo nosso grupo de pesquisa, no sentido de conter a replicação parasitária durante a infecção experimental por *T. cruzi*, esperamos que a MEL e o DHEA promova uma ação mútua e sinérgica da resposta imune, levando a um maior controle da replicação parasitária. Desta maneira, a pesquisa focaliza-se em analisar *in vitro* a dosagem que melhor promova a lise parasitária, menor citotoxicidade celular, melhor modulação de Óxido Nítrico em vista de seus efeitos deletérios as células em altas concentrações. Uma vez encontrada a melhor concentração a ser administrada *in vitro*, iniciaremos os ensaios *in vivo*, administrando DHEA, MEL e MEL + DHEA conjugados, esperando uma queda na carga parasitaria, aumento de células macrofágicas, modulação do NO, controle no peso dos órgãos devido a uma diminuição dos efeitos inflamatórios provocados pelo parasita e quantificação das interleucinas do tipo TNF-α. Para que desta maneira possamos saber qual o melhor hormônio a ser utilizado em experimento animal e qual sua concentração mais adequada frente à doença de Chagas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitas

Utilizamos à cepa Y de *T. cruzi* isolada por SILVA e NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vêm sendo mantida em camundongos Swiss não isogênicos, através de repiques semanais de sangue infectado.

Ressaltamos que o estudo da cepa Y já está bem padronizado em diferentes modelos experimentais inclusive em ratos, não variando muito de hospedeiro para hospedeiro. Em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com pico compreendido entre 12 e 14 dias, onde então, os parasitos desaparecerão da circulação iniciando-se a fase crônica (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE et al., 1974).

4.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Utilizamos o hormônio Dehidroiepiadrosterona (Sigma - Aldrich) em que as soluções estoques foram preparadas pela dissolução das substâncias em 100% de dimetilsufóxido (DMSO), de modo a obter uma concentração final de 20nM. Alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao meio, obtendo concentrações finais de: 0.5, 8.0, 20.0, 32.0, 40.0 e 128μM.

4.3 Melatonina (MEL)

Utilizamos o hormônio Melatonina (Sigma - Aldrich) em que as soluções estoques foram preparadas pela dissolução da substância em 100% de dimetilsufóxido (DMSO), de modo a obter uma concentração final de 20nM. Alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao meio, obtendo concentrações finais de: 0.5, 8.0, 20.0, 32.0, 40.0 e 128µM.

4.4 Ensaios biológicos *in vitro*

4.4.1 Avaliação biológica *in vitro*, sobre formas tripomastigotas (cepa Y) obtidas de cultura de células

As formas tripomastigotas foram cultivadas em células LLCMK2 em meio RPMI 1640 suplementado com 2nM de L-glutamina, 10nM de NaHCO3, 100/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 5% de soro bovino fetal inativado, em garrafas de cultura a 37ºC em ambiente a 5% de CO2, com umidade de 95%. As formas tripomastigotas do sobrenadante da cultura foram removidas. Em uma microplaca de 96 poços, os parasitas foram acertados para ($2.5X10^6$ parasitas/poço) e contados em câmera de Neubauer. A cada poço adicionamos 200µL da suspensão de parasitas juntamente com a adição das drogas a qual foi incubada a 37ºC em ambiente a 5% de CO2, com umidade de 95% por 24 horas. Cada concentração foi analisada em triplicata. A viabilidade dos tripomastigotas foram checadas utilizando-se 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT-ACRÓS Organics)

método colorimétrico, o qual se baseia na interação do sal tetrazolium com mitocôndrias ativas, produzindo o composto formazan. Após incubação dos parasitas com MTT, adicionamos isopropanol ácido (100µL de HCL 0,04N em isopropanol) para lisar as células e solubilizar os cristais. A amostra foi lida no leitor de microplaca Sunrise - Tecan, em filtro de 570 nm e referência 630 nm, com valores processados pelo programa Magelan 3. A soma de produção de cor foi proporcional ao número de parasitas viáveis. O resultado foi expresso com a concentração de inibição de crescimento dos parasitas por 50% (IC_{50}).

4.4.2 Macrófagos J774 utilizados para ensaios *in vitro*

Células J774 foram cultivadas em meio RPMI suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 25 UI/mL penicilina, 25 µg/mL estreptomicina e 10 µg/mL ciporfloxacina. Foi adicionado a quantidade de ($5X10^5$cel/poço) em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO2 a 37℃ p ara sua subseqüente adesão.

4.4.3 Contagem de Macrófagos J774

Utilizou-se a solução de *Turk* para a coloração das células macrofágicas J774 na diluição1/100, realizando-se em seguida a contagem manual pela câmara de Neubauer para obtenção do número total de células.

4.4.4 Avaliação biológica *in vitro,* da toxicidade do DHEA / MEL em macrófagos J774.

A toxicidade das drogas foram avaliadas sobre macrófagos J774, contados em câmera de Neubauer (LabTek Ltd) e ajustado na concentração de 5 x 10^5 cél./poço em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), 25 UI/mL penicilina, 25 µg/mL estreptomicina e 10 µg/mL ciporfloxacina. Os macrófagos foram plaqueados contendo DHEA e MEL nas seguintes concentrações: 0.5, 8, 20, 32, 40 e 128µM. Após incubação dos macrófagos com MTT, adiciona-se isopropanol ácido (100µL de HCL 0,04N em isopropanol) para lisar as células e solubilizar os cristais. A amostra foi lida no leitor de microplaca Sunrise - Tecan, em filtro de 570 nm e referência 630 nm, com valores processados pelo programa Magelan 3. A soma de produção de cor foi proporcional ao número de células viáveis. Os resultados foram expressos com a concentração de inibição de viabilidade celular por 50% (IC_{50}).

4.5 Viabilidade pelo Azul de Tripan

Após um período de 24 horas de incubação dos macrófagos J774 (5 x 10^5 cél./poço) juntamente com os hormônios, adicionamos 50µL da suspensão de célula com igual volume de azul de tripan à 0,4%, sendo o fator de diluição igual a 2. A seguir pipetou-se 15µL da suspensão de azul de tripan em câmera de Neubauer. As células viáveis, que excluíram este corante, possuem um aspecto translúcido e as células mortas apresentam coloração arroxeada. A

proporção entre o número de células viáveis e o total (vivas e mortas) fornecerá uma porcentagem da viabilidade celular, a qual deve ser superior a 90%.

$$CV\ (\%) = 100 \times (NC/NC+C)$$

Onde: CV = células viáveis, NC = células não coradas, C = células coradas pelo Azul de trypan. A viabilidade dos controles foi normalizada para 100%.

4.6 Ensaio biológico *in vivo*

4.6.1 Animais utilizados

Utilizou-se ratos machos da linhagem Wistar (n=60), jovens, pesando entre 90 e 100 gramas, provenientes de uma colônia mantida 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±2ºC, em ciclo claro e escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração. CEUA (nº 08.1.658.53.6). Para cada dia de experimento, são utilizados 5 animais por grupo, visto que uma diferença no número de amostra pode influenciar nos resultados do experimento (SOGAYAR et al., 1993).

4.6.2 Suplementação com DHEA e MEL

O tratamento do primeiro grupo infectado iniciou 48 horas após a infecção. Os animais infectados foram diariamente e oralmente tratados com 0.1 mL de MEL (Sigma Chemical Co. MO, USA) na dose de 10mg/Kg por peso

corpório, dissolvido e diluído em água e polietileno glicol 1:1.

O tratamento do segundo grupo com DHEA foi administrado subcutaneamente na dose de 40mg/Kg peso corpóreo uma vez ao dia sobre o período do experimento. Os ratos foram tratados com 0.1 mL de DHEA (Sigma Chemical Co. MO, USA) sendo dissolvido em etanos absoluto e polietileno glicol 1:1.

O tratamento do terceiro grupo com MEL+DHEA conjugados foi administrado oralmente na dose de 10mg/Kg de MEL e 40mg/Kg de DHEA com uma resultado final de 50 mg/kg dos hormônios conjugados. Sendo está concentração final igual a 20µM nos ensaios realizados *in vitro.*

4.6.3 Grupos experimentais para ensaios *in vivo*

Os animais foram divididos e identificados como:

Machos: Grupo Controle

Controle – Machos sem suplementação de DHEA e MEL não infectados (n=5)

Macho: Grupo Infectado

MEL – Machos com suplementação de MEL infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (n=5)

DHEA – Machos com suplementação de DHEA infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (n=5)

MEL+DHEA - Machos com suplementação de DHEA e MEL infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (n=5)

4.6.4 Dias de experimento

Os experimentos foram realizados em dias pré-determinados: 7º, 14º e 21º dias após o inóculo infectante. Estes dias foram escolhidos baseados na curva parasitêmica, onde o pico de parasitemia ocorre entre 12º e o 14º dia, após o inóculo das formas tripomastigotas da cepa Y. Para cada dia de experimento, foram utilizados 5 animais por grupo, para todos os grupos, visto que, uma diferença no número de amostra poderia influenciar nos resultados do experimento (SOGAYAR et al., 1993). Como os experimentos foram realizados em 3 dias pré-determinados, 7º, 14º e 21º dias, o número de animais por dia de experimento foi de 20 totalizando 60 animais nos 3 dias de experimento.

4.6.5 Morte dos animais

Os animais foram mortos por decapitação após anestesia com Tribomoetanol 2,5 mg/kg, para evitar que outras manipulações pudessem ocasionar estresse e desta maneira alterar a resposta imunológica do animal (CALDEIRA e FRANCI, 2000).

4.6.6 Coleta de Sangue

Após a morte dos animais, foram coletado cerca de 2,0ml de sangue em tubos Falcon de 15ml contendo 200µl de Heparina Sódica (1ml: 5.000U.I.-ORGANON TEKNIKA), obteve-se o plasma para a determinação da

parasitemia dos ratos infectados. Nas dosagens imunológicas o sangue foi coletado em frascos sem anticoagulante para a obtenção do soro em um volume de 2,0ml de sangue.

4.6.7 Curva parasitêmica

Decorrido os dias de ambientação, os animais do Grupo Infectado foram inoculados intraperitonealmente com $1X10^5$ tripomastigotas sangüícolas. Utilizou-se uma alta carga parasitaria (100.000 formas sangüícolas da cepa Y), de modo a provocar uma resposta mais intensa, no que diz respeito às lesões tissulares e parasitemia, de modo a proporcionar uma melhor visualização das variações patológicas produzidas pelo alto número de parasitas e desta maneira relatar as alterações ocorridas mediante a suplementação associada com e MEL, DHEA e MEL+DHEA.

A contagem dos parasitas foi feita pelo método de BRENER, (1962), que constitui em colocar uma alíquota de 5µl de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22 X 22mm. Determinou-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. Os dados obtidos foram graficamente e estatisticamente avaliados a fim de compararmos as possíveis diferenças de comportamento entre os diferentes grupos experimentais.

4.6.8 Contagem de Macrófagos

Imediatamente após a morte dos animais, injetou-se 10ml de meio RPMI estéril, processou-se massagem abdominal suave por 30 segundos e em seguida retirou-se o líquido peritoneal. Utilizou-se a solução de *Turk* para a coloração das células macrofágicas do lavado peritoneal dos ratos, realizando-se em seguida a contagem manual pela câmara de Neubauer para obtenção do número total de células.

4.6.9 Quantificação de Óxido Nítrico

Os ensaios de produção de óxido nítrico foram realizados através de células do lavado peritoneal. Os ratos tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10ml de RPMI, centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm a 4ºC e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” ressuspendido com 1ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retiramos uma alíquota de 10µl que foi diluída em Turk e azul de Tripan, para a contagem e viabilidade celular. Depois de contadas, as concentrações foram acertadas para 5 x 10^5 cel/ml; 100µl desta suspensão foram distribuída em placa de 96 poços, adicionando, 10 µg/ml poço de LPS e levado à estufa contendo 5% de CO_2 durante 24 horas a 37ºC. Após este período, submete-se a placa a centrifugação de 1500 rpm durante 4 minutos. Recolhe-se 100µL do sobrenadante e transfere – se para outra placa de 96 poços. Em seguida, adiciona-se igual volume de reagente de Griess, permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas, utilizando filtro de 540nm. A curva

padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando NO3 com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca.

4.6.8 Dosagem da citocina TNF-α

Placas de 96 poços de fundo chato serão sensibilizadas com 100µL de anticorpo de captura purificado especifico para a interleucina, conforme sugerido pelo Kit (R&D systems) incubar as placas “overnight” (16-20 horas de incubação) a temperatura ambiente. Realizar processo de lavagem de placas (1L PBS + 0,5mL Tween 20) e bloqueio com tampão de diluição (10g BSA + 1L PBS) e incubação. Reconstituir o recombinante padrão para realização da curva. Adicionar amostras de soro e curvas padrão por poço e incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Preparar anticorpo de detecção (18µg/mL). Lavagem e aplicação de anticorpo de detecção, incubação, lavagem e aplicação de estreptoavidina diluída (1:200) e incubação, lavagem e adição de substrato (15mL TMB (Tetramethylbenzidine) + 15 mL H2O2) nos poços, incubação protegida da luz, adição de solução de parada H2SO4 por poço, homogeneizar e realizar leitura a um comprimento de onda 450nm.

4.6.9 Pesagem do coração

Os órgãos foram imediatamente retirados após a decapitação e pesados em balança eletrônica Mettler em todos os dias de experimento.

4.7 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados deste trabalho, assim como para os cálculos matemáticos envolvidos nos estudos, foram utilizados diversos programas para computador do tipo IBM-PC, visando o processamento dos dados experimentais. Utilizamos o teste One-Way ANOVA, complementado pela análise de Turkey e Dunnett para a determinação dos níveis de significância da atividade das substâncias nos ensaios *in vitro* e para a correlação dos ensaios *in vivo*. Para a determinação de IC_{50} foi utilizado o método de curva dose-resposta sigmoidal.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos hormônios DHEA e MEL sobre macrófagos J774

As análises dos resultados obtidos indicam que DHEA e MEL apresentaram uma ação ligeiramente citotóxica sobre macrófagos J774, demonstrando valores de IC_{50} de 50.42µM e 79.24µM com uma porcentagem de lise celular de aproximadamente 68% para o DHEA e 50.6% para MEL na maior concentração (Tabela 1 / Figura 1-A).

Os dados encontrados assemelham-se aos achados de SUN-KWON K. et al., 2006, que não observou citotoxicidade sobre os macrófagos com DHEA nas concentrações utilizadas até 20µM por 14 horas.

Os testes realizados em nossos laboratórios nos levaram a comprovar que os macrófagos são viáveis não só por 14 horas mais sim por 24h em concentrações até 40µM, não atingindo 50% de lise celular até esta concentração.

Em 1998, MARC e colaboradores descreveram a expressão de receptores de melatonina em macrófagos humanos, relatando a afinidade destas células nas suas expressões e a baixa ação citotóxica apresentada pelo hormônio utilizado em pequenas concentrações, em um período de 72 horas. Comparando – se aos resultados de MARC et al., 1998 observamos em nossos experimentos, que concentrações acima de 40µM de melatonina afetam as células em 24 horas. Isso nos leva a supor que a relação hormônio e morte celular está ligada diretamente a concentração utilizada e ao tempo de

exposição.

Sabendo-se dos limiares citotóxicos do DHEA e MEL utilizados distintamente, prosseguimos para outra fase de nossas análises. Avaliando a lise celular dos hormônios em uma ação sinérgica.

Os resultados estatísticos de IC_{50} 51.39µM dos hormônios DHEA/MEL agindo mutuamente, demonstraram valores mais baixos em relação aos hormônios utilizados separadamente. Estabelecendo-se uma concentração de segurança a ser utilizada *in vivo* de 20µM, com um melhor comportamento em termos de tolerância citotóxica, sem risco de apoptose celular acima de 50% (Tabela 1/ Figura 1-B).

Com o valor de IC_{50} mais baixo, observamos uma diminuição da lise celular frente a sua ação mútua dos hormônios. Através destas análises encontramos uma concentração ideal para uma futura terapia *in vivo*.

Os resultados de viabilidade celular pelo azul de tripan mostraram-se com 97% de viabilidade, a qual se estabelece um bom percentual de macrófagos viáveis.

Tabela 1: Efeitos citotóxicos *in vitro* de diferentes concentrações de DHEA e MEL e ação mútua dos hormônios, frente à cultura de células ($5x10^5$ cél./ poço), determinado por ensaio colorimétrico.

Substância	% lise ± SD X Concentração (µM)						IC_{50} (µM)
	0,5	8	20	32	40	128	
DHEA	0,922± 0.000	16.384± 15.745SSS	30.159± 6.572	39.631± 15.444	46.851± 0.532	68.510± 10.333	50.42
MEL	0± 1.643	1.336± 1.549	22.538± 5.254	38.567± 5.002	48.006± 1.541	50.608± 1.403	79.24
DHEA/MEL	12.821 ± 6.754	25.000± 10.176	26.090± 7.562	34.231± 6.355	47.372± 5.745	72.500± 0.838	51.39

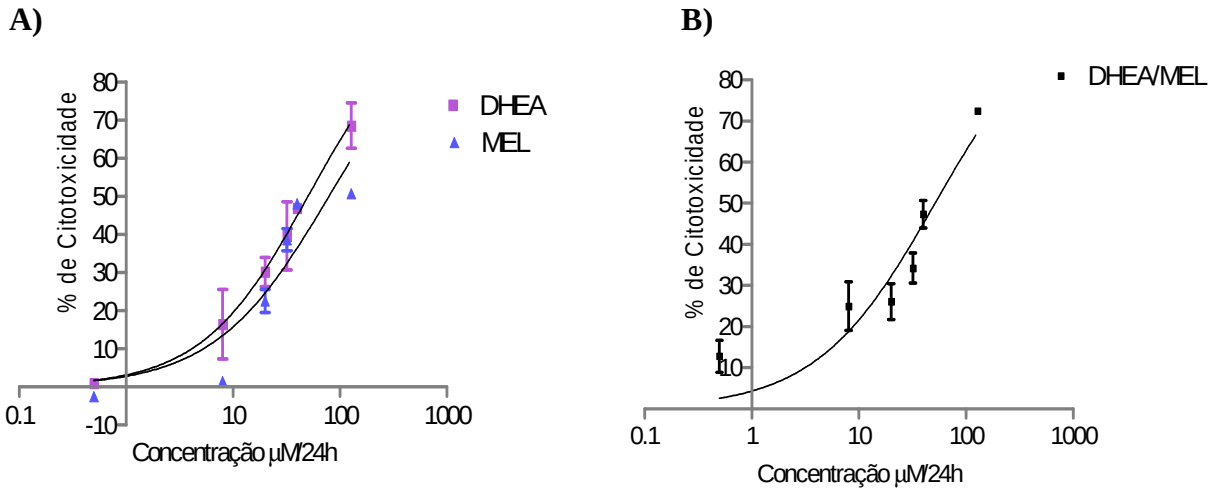

Figura 1*:* A) Curva dose-resposta do hormônio DHEA e MEL na lise de macrófagos J774 no ensaio *in vitro*, com plotagem da curva IC_{50}. B) Ação mútua *in vitro* dos hormônios DHEA/MEL representados na curva dose-resposta, estipulando o valor de IC_{50} sobre macrófagos J774.

5.2 Contagem global de macrófagos peritoneais *in vivo* em ratos Wistar

A contagem global de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos tratados com DHEA, MEL e MEL+DHEA em associação apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de macrófagos peritoneais em relação aos grupos não tratados (P<0.05) (Figura 2).

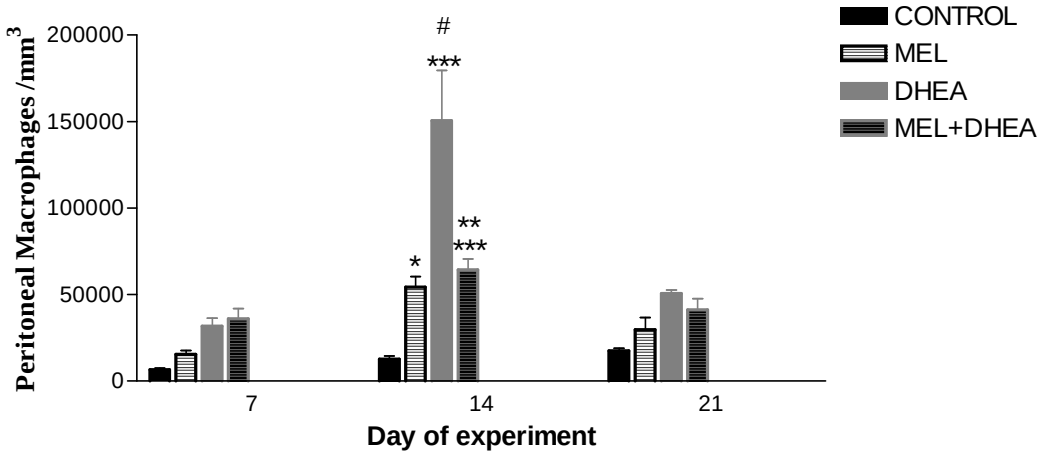

Figura 2: Contagem global de macrófagos peritoneais em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA, MEL e DHEA/MEL durante 21 dias de experimento.

CONTROL vs MEL: 14 days (P < 0.05)*.

CONTROL vs DHEA: 14 days (P < 0.001)***.

CONTROL vs MEL+DHEA: 14 days (P < 0.01)**.

MEL vs DHEA: 14 days (P < 0.001)#.

DHEA vs MEL+DHEA: 14 days (P < 0.001)***.

Devido ao fato dos macrófagos serem os primeiros elementos efetores em apresentar antígenos de superfície para as células efetoras, o aumento

destes está de acordo com o esperado nos animais infectados e tratados.

DOS SANTOS et al., 2005 e SANTELLO et al., 2007 analisando ratos infectados com *T. cruzi*, e tratados com DHEA e MEL separadamente, observaram um aumento no número de macrófagos, sugerindo um efeito modulador e paralelamente uma diminuição parasitaria sangüínea durante a infecção experimental.

Em decorrência dos resultados alcançados por estas pesquisadoras, nossa linha de pesquisa teve como objetivos avaliar a ação conjunta destes dois hormônios, na capacidade do hospedeiro combater a infecção aguda causada por *T. cruzi* através de sua primeira linha de defesa, os macrófagos.

O DHEA se manteve estatisticamente mais relevante na produção de macrófagos peritoneais em relação a MEL ou MEL+DHEA conjugadas na fase aguda da infecção. Este resultado demonstra hipoteticamente que o DHEA promoveu um processo de modulação da resposta imune no organismo do hospedeiro, mobilizando as células a sintetizar diversas interleucinas tais como IL-12 e TNF- α, provocando uma modulação migratória celular de defesa, como por exemplo os linfócitos auxiliares e ativando sítios promotores, que potencializam uma ação oxidativa sobre o parasita resultando na diminuição da morbidade e mortalidade da fase aguda da doença (DRESSER et al., 1973).

Entre as modulações imunológicas que os hormônios desencadeiam o TNF-α, IL-12 e INF-γ destacam-se por serem efetivos em induzir macrófagos a potencializar sua proliferação e inibir diversos protozoários intracelulares, incluindo *Leishmaniose* e *Toxoplasmose* (MURRAY et al., 1983; MCCABE et al., 1984). A morte de *T. cruzi* por macrófagos correlaciona-se com a atividade oxidativa que o INF-γ potencializa. Estes resultados demonstram que os

hormônios MEL, MEL+DHEA e principalmente o DHEA comportam-se como verdadeiros moduladores imunológicos em diversos níveis, induzindo uma proliferação significativa destas células na tentativa de diminuir a replicação parasitária durante a fase aguda da doença.

5.3 Avaliação *in vitro* dos hormônios DHEA e MEL sobre as formas tripomastigotas (cepa Y) de *T. cruzi*

Na tentativa de avaliar os efeitos imunológicos decorrentes da infecção da cepa Y em macrófagos, optamos também em estudar a ação da lise parasitária frente aos hormônios DHEA, MEL e MEL+DHEA nas concentrações de (0.5, 8.0, 20.0, 32.0, 40.0 e 128µM).

Em nossos experimentos utilizamos formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi,* avaliando primeiro a ação das duas drogas separadamente em seguida mutuamente.

Os resultados obtidos demonstraram não haver lise nas concentrações utilizadas com o hormônio DHEA sobre as formas tripomastigotas, com valor IC_{50} de 1064µM analisados pelo programa Prisma 4.

O mesmo se confere sobre a ação parasiticida do hormônio MEL, havendo pouca porcentagem de lise, sendo a concentração de 128µM a que melhor teve ação com 29.8%, estabelecendo valor IC_{50} de 5136µM, analisados. (Tabela 2 / Figura 3-A)

Nos resultados anteriormente obtidos, observamos que o parasita se manteve viável nas mais altas concentrações de DHEA e MEL. Entretanto, quando conjugado os dois hormônios, a porcentagem de lise parasitária foi

significativa nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente. Obtendo 72% de lise na concentração de 128µM com valor IC_{50} de 45.25µM (Tabela 2 / (Figura 3-B).

Tabela 2: Atividade tripanossomicida *in vitro*, de diferentes concentrações de DHEA e MEL e ação mútua dos hormônios frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, determinado por ensaio colorimétrico.

Substância	% lise ± SD X Concentração (µM)						IC_{50} (µM)
	0,5	8	20	32	40	128	
DHEA	4.179± 3.621	12.218± 3.008	16.252± 2.963	20.358± 2.309	23.780± 1.340	29.198± 2.295	1064
MEL	9.946± 2.608	17.300± 2.060	18.261± 2.102	20.198± 1.220	22.426± 0.897	29.838± 1.363	5136
DHEA/MEL	13.007 ± 8.247	25.128± 10.180	27.115± 8.256	44.551± 7.283	44.859± 6.554	72.756± 0.777	45.25

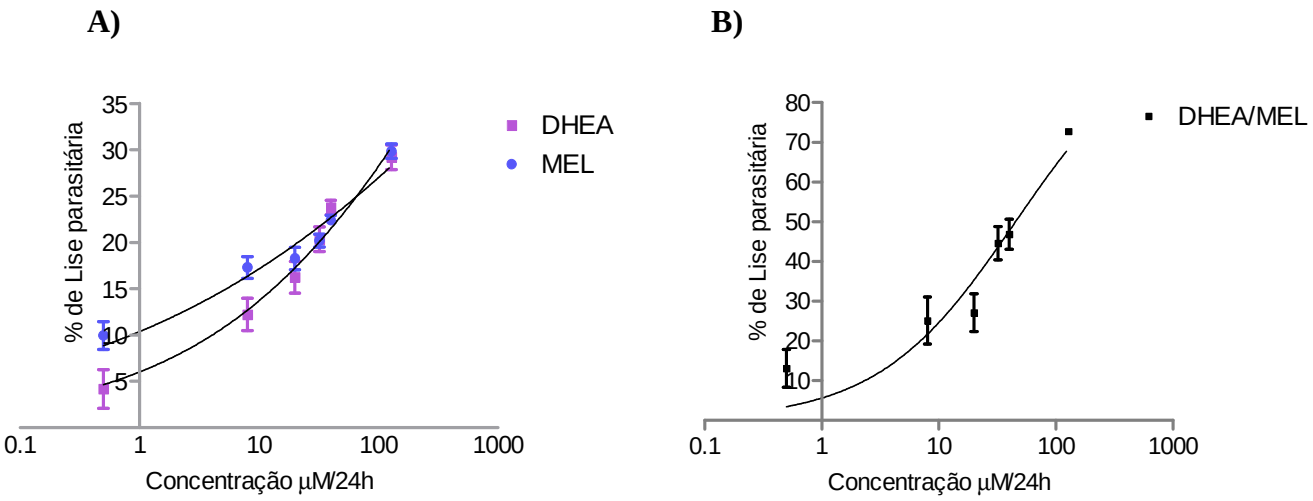

Figura 3: A) Curva dose-resposta do hormônio DHEA e MEL na lise parasitária no ensaio *in vitro*, com plotagem de curva IC_{50}. B) Ação mútua *in vitro* dos hormônios DHEA/MEL representados na curva dose-resposta, estipulando o valor de IC_{50} sobre tripomastigotas.

MARTINEZ-DIAZ et al., (2000) relata a importância de se avaliar novas substâncias com potencial tripanossomicida utilizando-se como modelo experimental, ensaios *in vitro.*

Os estudos com DHEA e MEL são novos quando se trata de doença de Chagas *in vitro*. Pouco ou quase nada se tem relatado na literatura a respeito destes hormônios exercendo uma ação separada ou sinérgica.

Entretanto, pesquisas vêm sendo realizadas com outras patologias envolvendo protozoários, como é o caso do *Plasmodium falciparum* da Malária, avaliando a ação parasiticida *in vitro* do hormônio DHEA e seus percussores 16-α-bromoepiandrosterona, sendo observada uma ação eficaz contra formas resistentes a cloroquina (FREILICH et al., 2000).

CARRERO et al., 2005 relatou que o uso de DHEA em diversas concentrações chegou a inibir a proliferação, aderência, mobilidade e até mesmo lisou os trofozoitos de *Entaboeba histolytica* em experimentos realizados *in vitro.*

O DHEA entre suas inúmeras funções também vem sendo estudada *in vivo* em infecções por *Crypitosporidium parvum,* aumentando células B e T e imunoglobulinas IgG de CD4 e CD8 (RASMUSSEN et al., 1995). Como também em ratos infectados experimentalmente pelo retrovírus (HIV), tratados com o hormônio DHEA, e sendo observada uma diminuição da carga viral e aumento exponencial de citocinas Th1 (CHRISTEFF et al., 1999).

Com relação à Melatonina, não ha nada na literatura que se trate sobre sua ação *in vitro* contra o *T. cruzi*. Somente a estudos que avaliam seu efeito nas formas invasivas do protozoário *Plasmodium falciparum,* analisando a estimulação do hormônio na via de cálcio que vem a potencializar seu

processo de invasão celular (BERALDO et al., 2007).

Sabendo-se dos efeitos imuno-moduladores destas drogas, algumas pesquisas já vêm sendo realizadas associando-os a uma possível ação sinérgica contra alguns patógenos como é o caso do *Bacillo antrax* e o retrovirus (ZHANG et al., 1999; SHIN et al., 1999).

São poucos os trabalhos que relacionam *in vitro* a ação mútua destes dois hormônios, principalmente relacionados à parasitoses, quando mais se tratando de *T. cruzi*. Frente à escassez de resultados comprovando a real ação sinérgica dos hormônios na lise deste parasita, encontramos em nossos ensaios *in vitro* uma concentração de 20µM, com uma ação parasiticida relevante sobre formas tripomastigotas tratados com MEL+DHEA conjugado e não citotóxico a macrófagos como já visto anteriormente na tabela 1. Estes resultados são extremamente importantes, quando se pretende prosseguir aos experimentos *in vivo.*

5.4 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL na parasitemia de ratos Wistar macho.

Como descrito anteriormente, a associação de DHEA e MEL na concentração de 20µM proporcionaram uma ação parasiticida satisfatória e não citotóxica nas células de defesa primária, contra *T. cruzi in vitro.*

Na análise dos resultados *in vivo* ratos Wistar machos foram tratados com 50mg/Kg/dia de DHEA e MEL que corresponde a uma concentração de 20µM *in vitro e* 40mg/Kg de DHEA e 10mg/Kg de MEL. Na análise *in vivo* da parasitemia dos animais tratados com DHEA, MEL e MEL+DHEA observou-se

uma redução no número de parasitas estatisticamente significante P<0.001 quando tratados com DHEA em relação aos outros hormônios no 14º dia após o inóculo infectante (Figura 4).

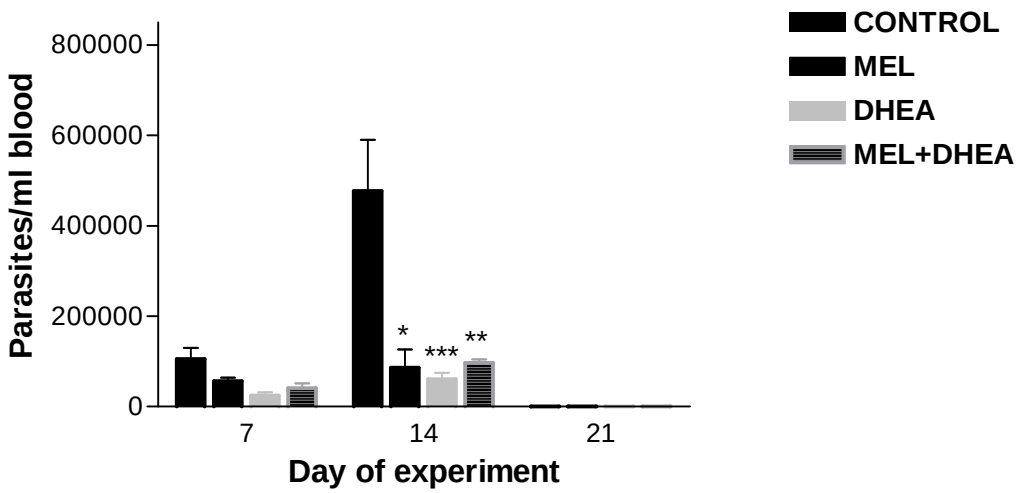

Figura 4: Evolução da parasitemia em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com e sem tratamento de DHEA, MEL e MEL+DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo CONTROLE (Somente Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL (Tratado e Infectado) e MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos utilizamos n =5. *P<0.05.
CONTROL vs MEL: 14 dia (P < 0.05)*
CONTROL vs DHEA: 14 dia (P < 0.001)***
CONTROL vs MEL+DHEA: 14 dia (P < 0.01)**

Considerando as doenças como estímulos estressores, a infecção por *T. cruzi*, tanto em humanos como em diferentes modelos experimentais ocasionam um desequilíbrio da resposta imune (CARDILLO et al., 1996; HAYES & KIERZENBAUM, 1981). De forma genérica podemos dizer que durante a fase aguda das tripanossomíase, tanto africana como americana, ocorre uma diminuição das funções das células T-helper, Lin. T–CD8, bem como das células B (SZTEIN & KIERZEBAUM, 1993).

Tendo conhecimento das ações adversas que uma infecção por *T.*

cruzi acarreta em seu hospedeiro, pesquisas vêm sendo constantemente descritas relatando resultados favoráveis de possíveis tratamentos alternativos contra a doença, sem apresentar os efeitos tóxicos característicos da droga de escolha como o Benzonidazol.

Segundo BRAZÃO et al., 2008, a administração de oligoelementos como o Zinco, substância essa já bem conhecida por inúmeros pesquisadores por sua ação imunomoduladora, avaliou em concentrações pré-estabelecidas a ação deste, em ratos infectados com *T. cruzi*, demonstrando uma significativa redução da parasitemia nos animais tratados, devido a um aumento na produção de óxido nítrico nestes animais.

Diversos pesquisadores vêm promovendo testes *in vivo* para avaliar a ação imunomoduladora e antioxidante do DHEA e MEL sobre parasitoses, como formas paliativas de medicamentos, por exemplo: reação antioxidante da melatonina em *Schistosoma mansoni* (SOLIMAN et al., 2008), imunoestimulação de células CD4 e CD8 em ratos tratados e infectados com *Toxoplasma gondii* (ABDÜLKERIM et al., 2003). Recentemente estes hormônios também vêm sendo analisados *in vivo,* sobre ratos Wistar infectados com *T. cruzi,* observando-se uma redução da parasitemia na fase aguda da doença e aumento da concentração de interleucinas pró-inflamatórias nos animais infectados e tratados (SANTOS et al., 2005 e SANTELLO et al., 2007).

SANTOS et al., 2005 demonstrou que a utilização de DHEA na fase aguda da doença de Chagas acarreta uma queda na carga parasitária sangüínea nos animais tratados diariamente com este hormônio e aumento de diversas interleucinas. O mesmo também é observado pelo trabalho de

SANTELLO et al., 2005, comprovando uma diminuição estatisticamente significante dos níveis de parasitas no sangue de animais tratados com MEL na fase aguda da doença e aumento de TNF-α circulante, fato este promovido pelo efeito do hormônio sobre sítios promotores do NFkB.

Os hormônios utilizados nos nossos ensaios *in vivo* são bem conhecidos em diversas linhas de pesquisa tanto nas áreas de microbiologia, virologia e parasitologia. Entretanto, trabalhos que utilizam estes dois esteróides conjugados são desconhecidos na doença de Chagas. Resultados anteriormente publicados por alguns pesquisadores na linha de pesquisa voltada à *T. cruzi* com estes hormônios, vem a corroborar aos nossos resultados, com seus efeitos na parasitemia de animais infectados. (SANTOS et al., 2005 e SANTELLO et al., 2008).

5.5 Avaliação *in vitro* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em macrófagos J774.

Importantes funções fisiológicas desempenhadas pelo óxido nítrico mostram estar ligados a um grande número de doenças na qual estão relacionadas com o seu alto ou baixo nível de produção no organismo.

A regulação óxido nítrico pelas suas enzimas específicas podem ser moduladas por drogas inibidoras destas moléculas. Estas estratégias vêm sendo usadas na tentativa de solucionar os problemas gerados por alguns patógenos que estimulam excessivamente a síntese de óxido nítrico. Infelizmente as drogas empregadas atualmente provocam uma série de efeitos colaterais, afetando a circulação sangüínea dentro dos órgãos

(PETROS et al., 1991). Isso ocorre provavelmente porque além de inibir a produção excessiva de óxido nítrico pelas iNO elas também inibem a produção de óxido nítrico pelas eNO.

A constatação deste fato nos conduziu a um grande interesse no conhecimento da ação dos efeitos imunomoduladores de dois hormônios o DHEA e a MEL.

Desta maneira procuramos avaliar mutuamente em diversas concentrações dos hormônios qual melhor se portaria em estabelecer um valor adequado a estudos *in vitro.* Avaliando macrófagos tratados com as duas drogas, estimulados com LPS e tratados com os hormônios, e células infectadas com tripomastigotas tratadas com os hormônios.

Primeiramente analisamos os macrófagos na presença de diversas concentrações dos hormônios (0.5, 8.0, 20.0, 32.0, 40.0, 128µM), agindo mutuamente.

A produção de óxido nítrico no controle (cél./poço $5X10^5$) se manteve em concentrações basais. Entretanto observamos um aumento de 60µM de iNO significativo, quando as células são tratadas com 0.5µM de DHEA/MEL, diminuindo o potencial de síntese de óxido nítrico quando se eleva as concentrações até 128µM em um período de 24 horas. Estipulando desta maneira que a ação mútua dos dois hormônios se portam como antagonistas a produção de NO em concentrações elevadas (dose-dependente) *in vitro*. (Figura 5)

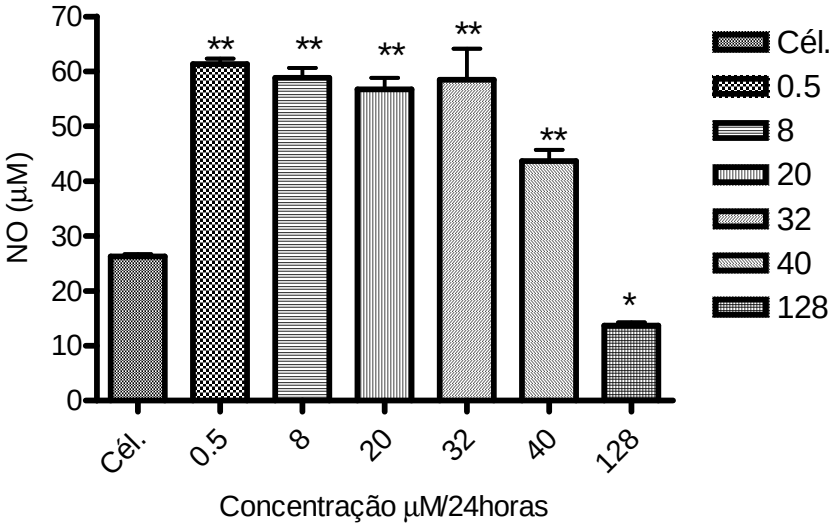

Figura 5: Produção de óxido nítrico expresso em µM em macrófagos J774 não infectados tratados com DHEA/MEL durante 24/horas e não estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

<u>Célula/concentraçãoµM-24h</u>

Cél. vs 0.5	P < 0.01	**
Cél. vs 8	P < 0.01	
Cél. vs 20	P < 0.01	
Cél. vs 32	P < 0.01	
Cél. vs 40	P < 0.01	
Cél. vs 128	P < 0.05	*

As células J774 foram estimuladas com 10 µg/ml de LPS por 24 horas, com tratamento de DHEA/MEL em diversas concentrações. Observamos que células apenas estimuladas com LPS aumentaram significativamente a produção de NO, e quando administradas com os hormônios diminuiu. Baseados nestes resultados observaram que o DHEA e a MEL causam inibição de NO por dose-dependente em macrófagos estimulados, em que 128µM corresponde a concentração que mais inibiu NO com valores significativos (P<0.05). (Figura 6)

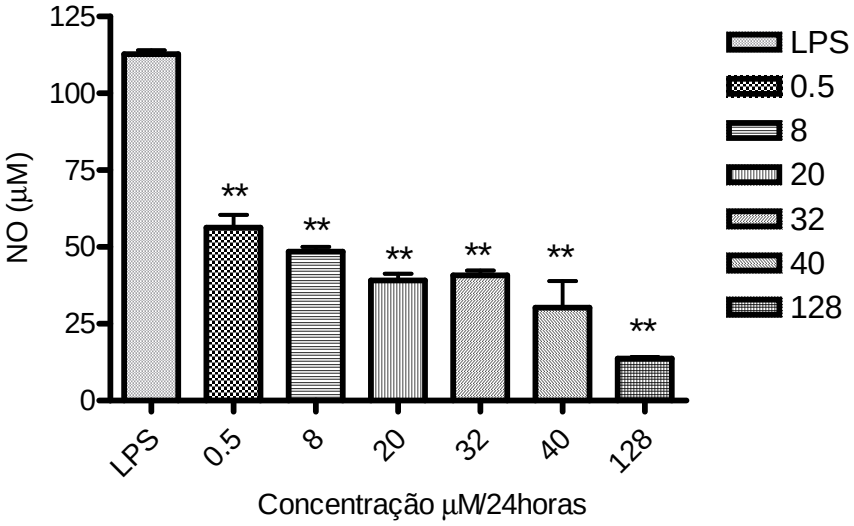

Figura 6: Produção de óxido nítrico expresso em µM em macrófagos J774 não infectados tratados com DHEA/MEL durante 24 horas e estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

<u>LPS / concentração µM-24h</u>

LPS vs 0.5	P < 0.01 **
LPS vs 8	P < 0.01
LPS vs 20	P < 0.01
LPS vs 32	P < 0.01
LPS vs 40	P < 0.01
LPS vs 128	P < 0.01

Demonstrado os efeitos dos hormônios DHEA/MEL sobre macrófagos não estimulados e estimulados com LPS e que apresentam inibição de NO. Avaliamos os efeitos da produção deste metabólito sobre as células macrofágicas infectadas com *T. cruzi* e tratadas com diversas concentrações dos hormônios utilizados mutuamente. Os resultados demonstraram efeito similar aos apresentados no figura 5, com efeito antagonista a produção de NO em células infectadas, inibindo o parasita de expressar excessivamente o óxido nítrico pela dose-dependente dos hormônios nas células com valores significativos (P<0.05) (Figura 7).

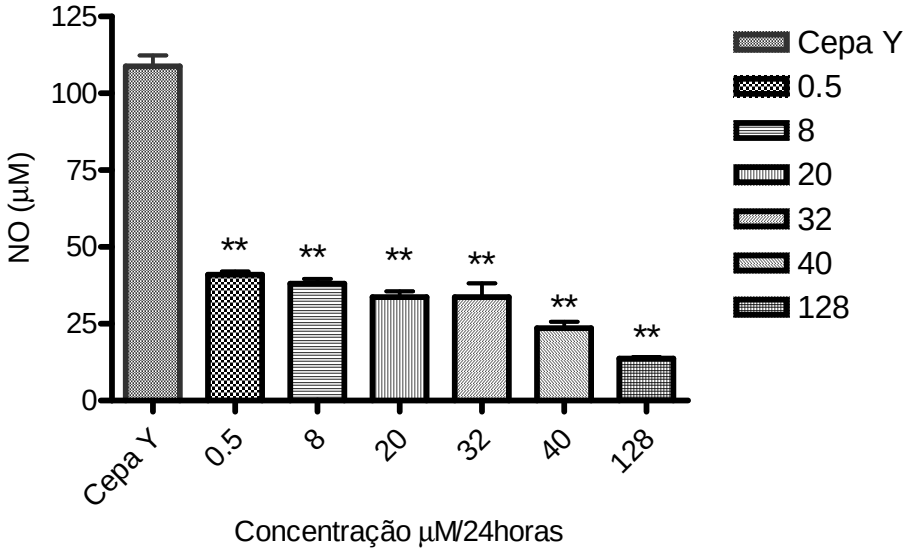

Figura 7: Produção de óxido nítrico expresso em µM em macrófagos J774 infectados com cepa Y de *T. cruzi* tratados com DHEA/MEL durante 24/horas não estimuladas por LPS. Todos os grupos foram realizados em triplicata. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

<u>Y / concentração µM-24h Y</u>
Cepa Y vs 0.5 P < 0.01**
Cepa Y vs 8 P < 0.01
Cepa Y vs 20 P < 0.01
Cepa Y vs 32 P < 0.01
Cepa Y vs 40 P < 0.01
Cepa Y vs 128 P < 0.01

Os dados apresentados na literatura relatam que o DHEA apresenta-se como um hormônio que estimula a produção de NO em células endoteliais (TOMMASO et al., 2003). Entretanto controvérsias são mantidas. Para os resultados do pesquisador MCLANCHLAN et al., (1996) o DHEA promove a inibição deste metabólito em macrófagos estimulados com LPS. Esses resultados corroboram com os apresentados por BENES e OERTEL (1971) que afirmam que o hormônio se porta como um antagonista a produção de oxido nítrico. Este fato também pode ser comprovado em células da microglia tratados com DHEA, que também demonstraram inibir sua síntese (MEI-JEN et

al., 2001).

A produção de NO em macrófagos estimulados e tratados com MEL também vem sendo foco de estudos.

A MEL demonstrou em diversas pesquisas *in vitro* agir diretamente sobre o gene NFkB inibindo a expressão de iNO nas células macrofágicas estimuladas com LPS (SHEN et al., 2004). Resultados semelhantes são também apresentados por ELI et al., (1997) que avaliou macrófagos estimulados e tratados com diferentes concentrações de MEL, observando uma diminuição na produção do óxido nítrico e conseqüentemente promovendo uma proteção contra as injúrias causadas pelo peroxinitrito nas células. Desta forma o hormônio exerce um efeito anti-oxidante *in vitro*, agindo diretamente na expressão do gene NFkB e se tornando um possível agente anti-inflamartório.

Até o momento não se tem relatos na literatura sobre trabalhos envolvendo experimentos *in vitro* avaliando a expressão de NO em macrófagos infectados com *T.cruzi* e tratados com DHEA e MEL mutuamente.

5.6 Avaliação *in vivo* dos hormônios DHEA e MEL sobre a produção de Óxido Nítrico em ratos Wistar

A priori, o DHEA e a MEL quando utilizados conjuntamente provocaram uma inibição do NOi *in vitro* diretamente proporcional ao aumento da concentração dos hormônios. Após a padronização da concentração ideal para se obter uma ação parasiticida e não citotóxica, realizamos ensaios *in vivo* avaliando a produção do NOi em ratos infectados com *T. cruzi.*

A figura abaixo representa os resultados da avaliação de óxido nítrico

(iNO), das células do peritônio, realizada nos animais não infectados e infectados com *T. cruzi* tratados com DHEA, MEL e DHEA+MEL conjugadamente no 7º, 14º e 21º dia de experimento (Figura 8).

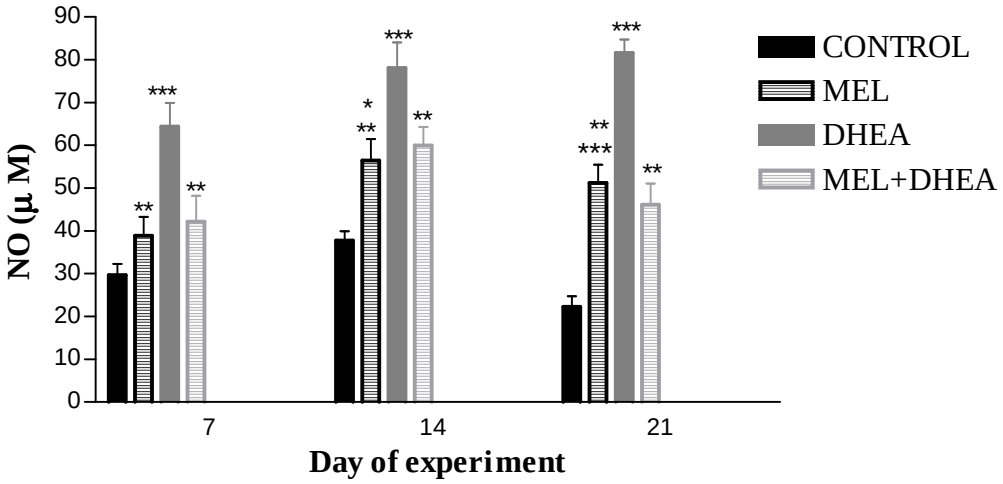

Figura 8: Produção de óxido nítrico expresso em µM em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA, MEL e DHEA+MEL conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dia de experimento. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

CONTROL vs MEL: 14 (P < 0.05)*, 21 days (P < 0.001)***.

CONTROL vs DHEA: 7, 14 and 21 days (P < 0.001).

CONTROL vs MEL+DHEA: 14 and 21 days (P < 0.01)

DHEA vs MEL: 7, 14 and 21 days (P < 0.01)**

DHEA vs MEL+DHEA: 7, 14 and 21 days (P < 0.01)#.

Os resultados apresentados acima demonstraram que o DHEA apresentou um aumento significativo na concentração de NO em relação aos outros hormônios utilizados, nos animais infectados e infectados tratados no

pico de parasitemia (14º dia após o inóculo).

Diversos pesquisadores descrevem que na infecção por *T. cruzi*, a produção de NO pode ter várias conseqüências, entre elas, a avaliação indireta da atividade tripanocida, a indução de apoptose em leucócitos presentes no foco inflamatório e a alteração da função contrátil do miocárdio. Altas concentrações de NO são também danosas as células, desta forma o NO vem sendo considerado uma via de mão dupla (COLASANTI E SUZUKI, 2000).

Poucos são os trabalhos com hormônios na tentativa de minimizar os efeitos deletérios da doença de Chagas, tanto em sua fase aguda como crônica. Entretanto, SANTOS et al., 2008 corrobora o nosso trabalho, demonstrando que o uso de DHEA durante a fase aguda da infecção chagásica acarreta uma produção acentuada de NO por macrófagos, sendo um dos fatores que contribuem para a lise parasitária. FILIPIN et al., 2008 utilizando também o hormônio DHEA, verificou que ratos orquiectomizados e infectados com *T. cruzi,* apresentaram um relativo aumento de NO neste animais na fase aguda de infecção da doença. Em relação a MEL, SANTELLO et al., 2008 estudaram a ação deste hormônio em animais infectados com *T. cruzi* antes e após o inóculo, observando um processo de aumento nas concentrações de NO, principalmente quando o mesmo é administrado anteriormente ao inóculo. Os dados apresentados anteriormente na utilização de MEL e DHEA corroboraram com os resultados *in vivo* apresentados neste trabalho, entretanto fica claro que o DHEA se porta como o hormônio mais atenuante de NO em uma infecção por *T. cruzi.*

5.7 Fator de Necrose Tumoral (TNF-α)

A figura abaixo representa os resultados da avaliação da concentração de Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), realizada nos animais não infectados e infectados com *T. cruzi* tratados conjugadamente com DHEA e MEL no 14º dia de experimento (Figura 9). O gráfico demonstra somente o pico parasitemico da doença, pelo fato de ser estatisticamente mais relevante ao trabalho.

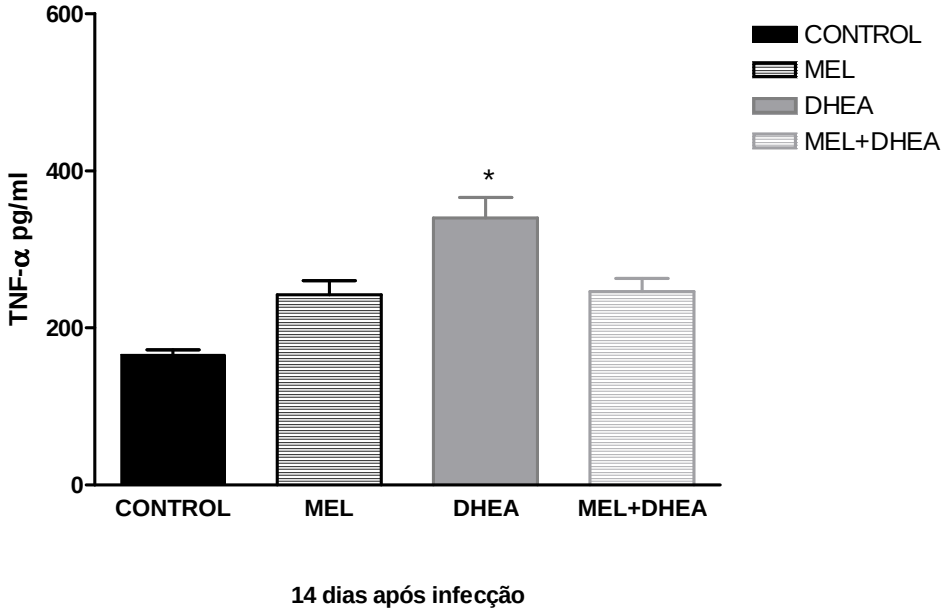

Figura 9: Produção de TNF-α expresso em pg/ml em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimulado. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.

CONTROLE vs DHEA: $P < 0.05$

Os macrófagos tem papel essencial no controle das infecções. Secretam uma variedade muito ampla de mediadores químicos e citocinas que regulam

diferentes compartimentos do sistema imunológico. Eles capturam, processam e apresentam antígenos para as células T e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação destas células. Uma vez ativadas por antígenos provenientes de formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, os macrófagos podem atuar como um parasiticida com atividades citotóxicas, através da produção de metabólitos reativos de nitrogênio e oxigênio e principalmente citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α (CAMARGO et al., 1997; CHANDRASEKAR et al., 1998).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados com macrófagos tratados com hormônios imunoestimuladores como a Melatonina que potencializa a produção de citocinas, entre elas o TNF-α, aumentado com sigo a proliferação de células T (PIOLI et al., 1993). Estes hormônios têm a capacidade de aumentar a imunidade natural *in vivo*, referente à atividade do sistema imune inato e adquirido, principalmente em macrófagos (MORREY et al., 1994; POON et al., 1994). Estes dados podem ser corroborados com pesquisas realizadas por SANTELLO et al., 2007, que demonstram está ação em ratos machos Wistar infectados com *T. cruzi* e tratados com melatonina. Observando um efeito agonista na proliferação do TNF-α frente ao parasita.

Outro hormônio muito utilizado em diversas pesquisas é o DHEA. Este também é considerado como um imunomodulador e apresenta receptores em diferentes tipos celulares de mamíferos (YAMADA 1994). A suplementação de DHEA em humanos tem demonstrado efeitos benéficos (VANVDLENHOVEN 1985) bem como em modelos experimentais (LUCAS 1985), como por exemplo, coelhos com arterosclerose, vírus (GORODN et al., 1998; RASMUSSEN et al., 1998), camundongos infectados com tuberculose

(HERMANDEZ-PANDO et al.,1998) e infecções por parasitas (LORIA et al., 1998) com elevada produção no fator de necrose tumoral (TNF- α) através das células macrofágicas (KIMURA et al.,1998).

Ao se correlacionar trabalhos envolvendo produção de TNF-α em macrófagos infectados com *T. cruzi,* não encontramos muitos relatos na literatura científica. Entretanto alguns pesquisadores já vêm trabalhando nesta linha de pesquisa, avaliando ratos suplementados com DHEA e infectados com *T. cruzi*, demonstrando que o DHEA tem uma ação estimuladora na produção de TNF-α em macrófagos infectados (SANTOS et al., 2008).

Em virtude da ação imunoestimuladora conhecida dos dois hormônios MEL e DHEA, inúmeros trabalhos analisam uma possível ação protetora frente a patógenos, como por exemplo infecções por retrovírus, quando da utilização destes dois hormônios conjugadamente (ZANG et al.,2004). Entretanto outros trabalhos contradizem a expectativa de um possível aumento na produção de citocinas pelo sistema imune, principalmente o TNF-α. Algumas pesquisas demonstram uma ação antagonista na produção de TNF-α em macrófagos infectados pelo vírus *Bacilo Antrax* tratados com os dois hormônios separadamente ou conjugadamente (SHIM et al., 2000).

Confrontando diversos resultados sobre uma verdadeira ação dos hormônios, nossos resultados demonstraram que tanto o DHEA, MEL e MEL+DHEA apresentam uma ação potencializadora na produção de TNF-α em ratos infectados com *T. cruzi* em relação ao controle. Entretanto o DHEA portou-se estatisticamente mais elevado que a MEL no pico na infecção com $P>0.05$.

5.8 Peso do Coração

Os grupos tratados com DHEA apresentaram redução significativa do peso cardíaco infectado e tratado com MEL, DHEA e MEL+DHEA (P<0.05) em ralação aos grupos que não receberam tratamento (Figura 10).

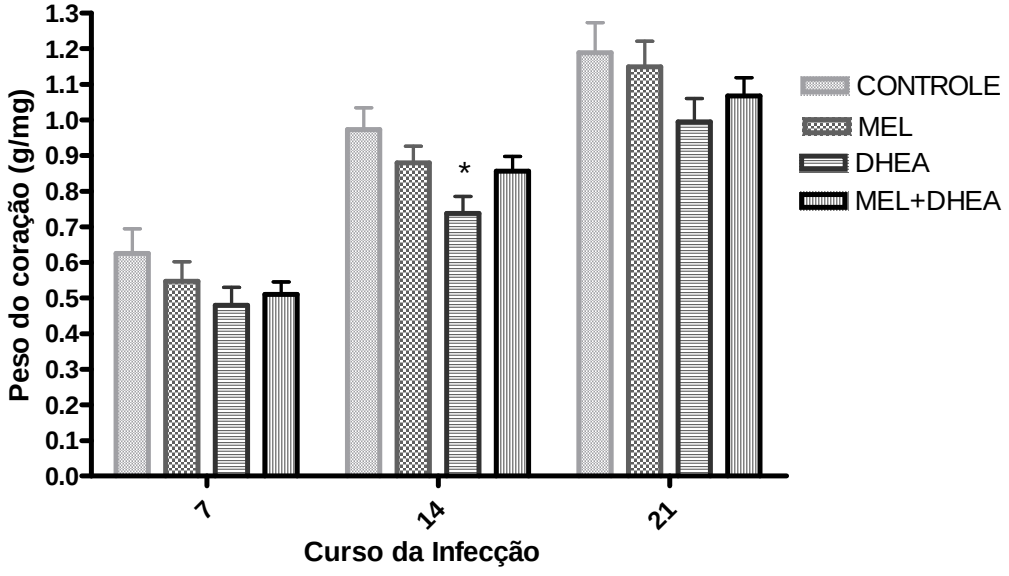

Figura 10: Produção de TNF-α expresso em pg/ml em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de T. cruzi com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimulado. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

CONTROLE vs. DHEA: 14º dia (P<0.05) *

O peso cardíaco de ratos Wistar infectados e tratados com DHEA apresentaram uma redução estatisticamente significante ($P<0.05$), ao contrário do que observamos nos animais infectados e tratados com MEL e MEL+DHEA. Este fato ocorre devido à diminuição da carga parasitária provocada pela administração do DHEA. Acreditamos que devido à redução do infiltrado inflamatório bem como menor desorganização das fibras cardíacas levou a uma diminuição da massa cardíaca. Estes resultados corroboram com os que são apresentados nos trabalhos de SANTOS et al., 2007 e SANTELLO et al., 2007, que analisando ratos infectados e tratados com DHEA e MEL separadamente, observaram uma diminuição de processos inflamatórios nas fibras cardíacas, promovendo conseqüentemente uma diminuição de peso cardíaco.

6.0 CONCLUSÃO

Analisando os dados apresentados, observamos a ação da tolerância de células macrofágicas frente aos hormônios DHEA/MEL em ensaios de citotoxicidade, não apresentando lise celular na concentração até 20µM, estabelecendo-se menor que o IC_{50}. A viabilidade celular manteve-se em porcentagens extremamente favoráveis com valores de 97%. Nesta concentração ocorreu ação tripanossomicida dos hormônios DHEA/MEL *in vitro* observando uma inibição da replicação parasitária e uma diminuição na produção de NO em células estimuladas tanto com LPS como infectadas com o parasita *in vitro*. Neste último caso observamos uma ação antioxidante dos hormônios *in vitro,* o mesmo não sendo observado *in vivo.* Com a determinação das concentrações adequadas de DHEA e MEL através de trabalhos já realizados por SANTOS et al., 2005 e SANTELLO et al., 2007, juntamente com os nosso resultados de MEL+DHEA obtidas nos estudos *in vitro*, foi possível avaliar os efeitos destes hormônios *in vivo*.

No tocante aos ensaios *in vivo* observamos que a administração de DHEA exerceu um potente efeito imunomodulatório sobre os diferentes parâmetros analisados, quando comparados com MEL e MEL+DHEA. A suplementação atuou de forma expressiva sobre a diminuição da parasitemia, aumento de macrófagos peritoneais, elevação do óxido nítrico, produção aumentada do TNF-α e diminuição do peso cardíaco.

Podemos concluir que devido ao fato dos hormônios atuarem em alguns sítios específicos nos macrófagos, diferentes resultados foram obtidos, como por exemplo, nos ensaios *in vivo* onde observamos a presença de estímulos

imunológicos naturais adversos em relação ao *in vitro* que somente é ativado frente a estímulos programados.

A utilização concomitante de DHEA e MEL proporcionou uma ação sinérgica sobre a resposta imune. Entretanto, nos resultados demonstraram que o DHEA teve um efeito estatisticamente mais relevante sobre os outros hormônios. Devemos enfatizar que esse tipo de terapia não tem por objetivos a cura da doença, mas sim potencializar e modulador o sistema imune controlando a carga parasitária sem, entretanto acarretar os efeitos colaterais danosos no hospedeiro como os medicamentos disponíveis no mercado.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDÜLKERIM K. B.; CEM S. B.; RASIM M.; ERDAL K.; AYSEL P. Effect of zinc and melatonin supplementation on cellular immunity in rats with toxoplasmosis. **Biol. Trace. Elem. Res.,** United States, v. 96, p. 237-45, 2007.

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

ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T. Beta - chemokines enhance parasite uptake and promete nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Imun.,** United States p. 4819-4826, 1999.

ALLEGRAL, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILEL, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A.; The chemistry of melatonin`s interaction with reactive species. **J. Pienal Res.,** United States, v. 34, p. 1-10, 2003

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas no recôncavo baiano. **Ver. Patol. Trop.,** Brasil, v. 3, p. 65-121, 1974.

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

BAULIEU, E. E. Dehidroepiandrosterona (DHEA): a fountain of Youth? **J. Endocrinology Metabolism.** United States, v. 81, p. 3147-51, 1996.

BENES, P., E OERTEL, G. W.. Steroid structure and inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **J. Steroid Biochem.,** England, v. 2, p. 289, 1971.

BERALDO; F. H.; ALMEIDA, F. M.; DA SILVA A. M.; GARCIA, C. R. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. **J. Cell Biol.,** United States, v.15, p. 551-7. 2005.

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

BRAZÃO, V.; CAETANO, L. C.; FILIPIN, M. D. V.; TOLDO, M. P. A.; CETANO, L. N.; PRADO, J. C. Zinc supplementation increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Vet. Parasitology**, v. 154, p. 32-37, 2008.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi.* **Rev. Inst. Med. Trop.,** Brasil, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi.* **Ann. Trop. Parasitol.,** Brasil, v. 59, p. 19-26, 1965.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Rev. Microbiol.,** United States, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER Z. CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi.* **Rev. Inst. Méd. Trop.,** Brasil, v. 5, p. 220-224, 1963.

BURLEIGH, B.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.,** United States, v. 49, p. 175-200, 1995.

CALDEIRA, J. C.; FRANCI, C. R. Prolactin and Corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. **Brain Research Bulletin,** United States, v. 52, p. 483-489, 2000.

CAMARGO M. M.; ALMEIDA I. C; PEREIRA M. E; FERGUSON M. A.; TRAVASSOS L. R.; GAZZINELLI R. T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol**., United States, v. 158, p. 5890-901, 1997.

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**, United States, v. 64, p. 128-134, 1996.

CARDINALLI, D. P.; ROSNER, J. M. Retinal Localization of HIOMT in the rat. **Endocrinology,** United State, v. 89, p. 301-307, 1971.

CARRERO, J. C.; CERVANTES, C.; MORENO-MENDOZA, N.; SAAVEDRA, E.; MORALES-MONTOR, J; LACLETTE, J. P. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. **Microbes Infect.,** France, v. 8, p. 323-31, 2006.

CHAGAS, C. “Nova tripanozomiaze humana”. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Brasil, v.1, n.2, p.9-80, 1909.

CHANDRASEKAR B, MELBY P. C.; TROYER D. A.; COLSTON J. T.; FREEMAN G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.,** United States, v.152, p. 925-34, 1998.

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. **Mem. Nutrition.,** United States, v. 15, p. 4-9, 1999.

COHEN, M.; ROSELLE, D.; CHABNER, B.; SCHMIDT, T. J.; LIPPMAN, M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. **Nature,** England, p. 274-894, 1978.

COLASANTI, M., SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends Pharmacol. Sci.,** v. 21, p. 249-252, 2000.

COLLI, W. AND ALVES, M. J. M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswald Cruz,** Brasil, v. 94, p. 37-49, 1999.

CONSTANTINO, G.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E. Protective effects of melatonin in zymosan – activated plasma-induced paw inflammation. **Eur. J. Pharmacol.,** Netherlands, v. 363, p.57-63, 1998.

CONTI, A.; CONCONI, S.; HERTENS, E.; Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J. Pienal Res.,** United States, v. 28, p. 193-202; 2000.

COURA, J. R; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE S. A. S. AND MILES M. A. S. Emerging Chagas disease in Amazonian Brasil. **Trends Parasitol.,** England, v. 18, p. 171-176, 2002.

CRESPO, E.; MACIAS, M.; POZO, D.; ESCAMES, G.; MARTIN, M.; VIVES, F., GUERRERO, J. M. ACUNA- CASTROVIEJO, D.; Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiples organ dysfunction syndrome in rats. **FASEB J.,** United States, v. 13, p. 1537-1546; 1999.

DAYNES. R. A.; DUDLEY, D. J.; ARANEO, B. A. Regulation of murine lymphokine production *in vivo*. II. Dehydroepiandrosterona is a natural enhancer of interleukin 3 synthesis by helper T cells. **Eur. J. Immunol.,** Germany, v. 20, p. 793-802, 1990.

DEANE, M. P. Significance of polymorphismo in *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DONEÇA DE CHAGAS. **Fundação Oswaldo Cruz,** Brasil, Anais/Abstracts, p. A6-A7, 1979.

DENIS, M. NO or no NO? **J. Leukocyte. Biol.,** United States, v. 55, p. 682, 1994.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E. AND MORENO, S. N. J. The role of Ca2+ in the processo of cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol. Today,** England, v. 12 p. 61-65, 1996.

DRESSER, D. W.; E GREAVES M. F. Assays for antibody producing cells. In **Handbook of Experimental immunology**. D. M. Weir, ed. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford. p. 271, 1973.

ELI, G.; SALVATORE, C.; BRASILIA, Z.; ANDREW, L. S.; CSABA, S. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. **Life Sciences,** United States, v. 60, p. 169-174, 1997.

ESSERY, S. D., A. T. SAADI, S. J. TWITE, D. M. WEIR, C. C. BLACKWELL, AND A. BUSUTTIL. Lewis antigen expression on human nonocytes and binding of pyrogenic toxins. **Inflamation Research,** United States, v. 41 p. 108, 1994.

ERWIG, L. P.; KLUTH, D. C.; WALSH, G. M.; REES. A. J. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.,** England, v. 15, p. 1983-8, 1998.

FELDMAN, P. L,; GRIFFITH, O. W.; HONG, H.; STUEHR, D , J. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **J. Med. Chem.,** United States, v. 36, p. 491-6, 1993.

FILIPIN, M. D. V.; BRAZÃO, V.; CAETANO, L. C.; SANTELLO, F. H.; TOLDO, M. P. A.; CAETANO, L. N.; PRADO, J. C. *Trypanosoma cruzi:* Orchiectomy and dehydroepiandrosterone therapy in infected rats. **Exp. Parasitology**, United States, v. 120, p. 249-254, 2008.

FRANTZ, M. C.; WICHMANN, N. J.; ENGEL, M. W.; HERNANDEZ-RICHTER, N. K.; FAIST, T.; CHAUDRY, E.; JAUCH, I. H.; ANGELE, K. W. Dehydroepiandrosterone restores depressed peripheral blood mononuclearcell function following major abdominal surgery via the estrogen receptors. **Crit. Care Med.,** United States, v. 33, p. 1779 -1786, 2005.

FREILICH, D.; FERRIS,S.; WALLACE, M.; LEACH, L.; KALLEN, A.; FRINCKE, J.; AHLEM, C.; HACKER, M.; NELSON D.; HEBERT. J. 16α-bromoepiandrosterone, a Dehydroepiandrosterone (DHEA) analoge, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. **Am. J. Trop. Med.,** United States, v. 63, p. 280-283, 2000.

FUKUTO, J. M. Chemistry of N-hydroxy-L-arginine. **Methods,** United States, v. 75, p.268:365, 1996.

GARCIA-MAURINO, S.; GONZALES-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFFI-EL-LDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gama production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type I lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.,** United Estates, v. 159, p. 574-581, 1997.

GARCIA-MAURINO, S.; POZO, D.; CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sci.,** England, v. 65, p. 2143-2150, 1999.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Color Textbook of Histology,** United Estates, p. 58-69, 1997.

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. **Eur. J. Immnol.,** Germany v.22, p. 2501-2506, 1992.

GIANOTTI, L.; ALEXANDER, J. W.; FUKUSHIMA, R.; PYLES, T. Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense, survival in thermally injuried mice. **Jorn. Surg. Res.,** United States, v. 62, p. 53 – 58, 1996.

GILAD, E.; WONG, H. R.; ZINGARELLI, B. Melatonin inhibits ezpression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophage: role of inhibition of NF-Kappa B. **FASEB J.,** United States, v.12, p.685-693, 1998.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA S. S.; COLLI, W. AND ALVES, M. J. M; An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol,** German, v. 65, p. 85-94, 1994.

GORDON, G. B.; BUSH, D. E.; WEISMAN, H. F. Reduction of atherosclerosis by administration of dehudroepiandrosterone. A study in the hypercholesterolemic New Zealand white rabbit with aortic intimal injury. **Journal of Clinical Investigation,** United States, v. 82, p. 712-720, 1998.

HAEYS, M. M.; KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: Kinetics of lynphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, United States, v. 31, p. 1117-1124, 1981.

HERMANDEZ-PANDO, R.; DE LA CRUZ, S.; OROZCO, H.; ARRIAGA, K.; PAVON, L.; AL-NAKHLI S. A.; ROOK, G. A.; The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/ c mice. **Immunology,** England, v. 95, p. 234-241, 1998.

JANSON, R. W.; JOSLIN, F. G.; AREND, W. P. The effects of differentiating agents on IL-1 beta production in cultured human monocytes. **J. Immunol.,** United States, v. 145, p.2161, 1990.

JAWOREK, J.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J Melatonin as an arganoprotector in the stomach and the pancreas **J. Pienal Res.,** United States, v. 83, p.38-73; 2005.

JIMERSON, D. C.; LYNCH, H.J; POST, R. M.; WURTMAN, R. J. BUNNEY Jr., W. E. Urinary melatonin rhythms during sleep deprivation in depressed patients and normals. **Life Sci.,** England, v. 20, p. 1501-1505, 1977.

JON, D. H. AND RAYMOND, A. D. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterona sulfatase metabolism by inflammatory cytokines. **J. Imunol.,** United States, vol.135, p. 67-75, 1994.

KELLY, R. W.; AMATO, F.; SEAMARK, R. F. N-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. **Biochem. Bioph. Res. Commun.,** United States, v. 121, p. 372-379, 1984.

KIMURA M.; TANAKA, S.; YAMADA Y.; KIUCHI, Y.; YAMAKAWA, T.; SEKIHARA, H. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent affect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. **Endocrinology,** United States, v. 139, p. 3249-3253, 1998.

KONAKCHIEVA, R.; KYURKECHIEV, S.; KEHAYOV, I.; TAUSHANOVA, P.; KANCHEV, L. Selective affect of methoxyindoles on the lymphocytes proliferation an melatonin binding to activated human lymphoid cell. **J. Neuroimmunol.,** United States, v.63, p.125, 1995.

KROPF, S. P.; FERREIRA, N. A. L. O. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva,** Brasil, v.5, p. 347-365, 2000.

LANCASTER, JR. J. R.; LANGREHR, J. M.; BERGONIA, H. A.; MURASE, N.; SIMMONS, R. L.; HOFFMAN, R. A. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. **J. Biol. Chem.,** United States, v.267, p. 10994-8, 1992.

LEWY, A. J. Biochemistry and regulation of mammalian melatonin production. The pineal gland. **Elsevier Biomedical,** United States, p. 77- 128, 1983.

LOPES, C.; DELYRA, J. L.; MARKUS, R. P. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **J. Pienal Res.,** Denmark, v. 23, p.72-78, 1997.

LORIA, R. M.; INGE, T. H.; COOK, S. S.; SZAKAL, A. K.; REGELSON, W. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandroserone (DHEA). **Journal of Medical Virology,** United States, v. 26, p. 301-314, 1988.

LIMA – MARTINS, M. V. C.; SANCHEZ, G. A.; KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytoxicity against *Trypanosoma cruzi* is anly mediated by proctetive antibodies. **Parasit. Immunol.,** United States, v. 7, p. 367-76, 1985.

LISSONI, P.; BARNI, S.; TANCINI, G.; BRIVIOF,T. E.; ZUBELEWIEZ, B.; BRACZKOWSKI, R. Role of the pienal gland in the control of macrophage function and possible implication in cancer: a study of interaction between tumor necrosis factor-alpha and pienal hormone melatonin. **J. Biol. Regul. Homeostatic Agents,** Italy, v. 8, p.126, 1994.

LIU, S.; ISHIKAWA, H.; LI, F. J.; Ma, Z.; OTSUYAMA, K.; ASAOKU, H.; ABROUN, S.; ZHENG, X.; TSUYAMA, N.; OBATA. M.; KAWANO, M. M. Dehydroepiandrosterone can inhibit the proliferation of myeloma cells and the interleukin – 6 production of bone marrow mononuclear cells from patients with myeloma. **Cancer Res.,** Philadelphia, v. 65, p. 2269-2276, 2005.

LOPES-GONZALES, M. A.; COLVO, J. R.; SEGURA, J. J.; GUERRERO, J. M.; Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnol. Ther.,** United States, v. 4, p. 253-62, 1993.

LORIA, R. M.; PADGETT, D. A.; HUYNH, P. N. Relation of the immune response by dehydroepiandrosterona and its metabolites. Journal of **Endocrinology,** United States, v. 150, p. 209-220, 1996.

LUCAS, J. A.; AHMED, S. A. CASEY, M. L.; MACDONALD, P. C. Prevention of autoantibody formation and prolonged survival in New Zeland black/ New Zeland white F1 mice fed dehydroepiandrosterone. **Journal of Clinical Investigation,** United States, v. 75, p. 2091-2093, 1985.

MAESTRONI, G. J. T–helper–2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. **J. Pienal Res.,** Denmark, v. 18, p. 84-9, 1995.

MAESTRONI, G. J. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotxic shock. **J. Pienal Res.,** Denmark, v. 20, p.84-89, 1996.

MAESTRONI, G. J.; COVACCI, V.; CONTI, A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-simulating factor induced by the pienal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. **Cancer Res.,** United States, v. 54, p.2429, 1994.

MANABE, A.; HATA, T.; YANAGIHARA, T.; HASHIMOTO, M.; YAMADA, Y.; IRIKOMO, S. Nitric oxide synthesis is increased after dehydroepiandrosterone sulfate administration in term human pregnancy. **Hum. Reprod.,** United States, v. 8, p.2116-2119, 1999.

MARC, J. B.; ZAHRA, M.; NADJIBE, R.; OUAHID, B. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **J. Immunol.,** United States v.160, p.1191-1197, 1998.

MARKS, P. H. BANKS, J. Inhibition of mammalian glucose-6-phos-phatase dehydrogenase by steroids. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** United States, v. 46, p.447, 1960.

MARTINEZ-DIAS, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMES-BARRIO, A. Evaluation of drug activity against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* employing enzyme immunoassay. **J. Clin. Pharm. Ther.,** England, v. 25, p. 43-47, 2000.

MOHAN, P. F.; E JACOBSON, M. S. Inhibition of macrophage superoxide generation by dehydroepiandrosterone. **Am. J. Med. Sci.,** United States, p. 306:l0, 1993.s

MORREY, K. M.; MCLANCHLAN, J. A.; SERKIN, C. D.; BAKOUCHE, O. Activation of human monocytes by the pienal hormone melatonin. **J. immunol.,** United States, v. 153, p. 2671, 1994.

MCCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON J. S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. **J. infect. Dis**., United States, v. 150, p. 961, 1984.

MCLACHLAN, J. A.; CARLA, D. S.; OUAHID, B. Dehydroepiandrosterone modulation of lipopolysaccharide-stimulated monocyte cytotoxicity. **J. Immunology,** United States v.156, p. 328-335, 1996.

MEDINA-LOPES, M. D. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em áreas não endêmica. **Rev. Soc. Bras. Trop. Méd.,** Brasil, v. 74, p. 221-237, 1980.

MEI-JEN, W.; HSUEH-MEEI, H.; HUAN-LIAN, C. JON-SON, K.; KEE-CHING, J. Dehydroepiandrosterona inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV-2 microglia. **J. Neurochem.,** United States, v. 77, p. 830-838, 2001.

MINAGAR A.; SHAPSHAK, P.; FUJIMURA, R.; OWNBY, R.; HEYES, M.; EISDORFER, C. The role macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.,** United States, v. 202, p. 13-23, 2002.

MORAES, R. G.; Parasitologia médica. **Atheneu,** Brasil, v. 11, p.104-107, 1971.

MORREY, K. M.; McLACHLAN, J. A.; SERKIN, C. D.; BAKOUCHE, O. Activation of human monocytes by the pienal hormone malatonin. **J. Immunol.,** United States, v.153, p.2671, 1994.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular Leishmania donovani by lymphokine stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-y is the activating lymphokine. **J. Cline. Invest.,** United States, v. 72, p. 1506, 1983.

MURRAY, H. W.; SPITATALNY, G. L. & NATHAN, C. T. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-gamma. **J. Immunol.,** United States, v.134, p.1619-22, 1985.

NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.,** United States, v. 6, p.3051-64, 1992.

NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGBHANICH, C.; ELLIS, J. & COHN, Z. Activation of macrophages in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.,** United States, v.149, p.1056-1068, 1979.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M. AND YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.,** United States, v. 71, p. 557-561, 2003.

NELSON, K.; KEINANEN, B.; DANIEL, W. L. Murine arylsulfatase and 17β-hydroxysteroid axidoreductase activities in mouse tissues. **J. Steroid Biochem.,** England, v. 21, p. 529-538, 1983.

NGUYEN, A. D.; CONLEY, A. J. Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. **Endocr. Dev.,** Switzerland, v. 13, p. 33-54, 2008.

OLIVEIRA, M. A.; SANTIAGO, H. C.; LISBOA, C. R. *Leishmania sp*: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. **Exp. Parasitol.,** United Status, v. 95, p. 96-105, 2000.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Indentification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protrein with properties expected of a fibronectin receptor . **Mol. Biochem. Parasitol.,** Genrman, v.19 p. 201-211, 1986

PANG, C. S.; PANG, S. F. High affinity specific binding sites of 2-[^{125} I] iodomelatonin by spleen membrane preparation of chicken. **J. Pienal Res.,** Denmark, v. 12, p. 167-73, 1992.

PELLEGRINO, J. Transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e candidatos a doadores. **Rev. Bras. Med. Trop.,** Brasil, v.6, p.297-301, 1949.

PERSENGIEV, P. S. 2-(^{125}I) iodomelatonin binding sites in rat adrenals: pharmacological characteristics and subcellular distribution. **Life Sci.,** England, v. 51, p. 647-51, 1992.

PETROS, A.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet.,** England, v. 21, p. 8782-8783, 1991.

PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA-PONS, F. Synergistic protection by specific antibodies and interferon aganist infection by *Trypanosoma cruzi in vitro*. **Eur. J. Immunol.,** German, v. 14, p. 903-905, 1984.

PIOLI, C.; CAROLEO, M. C.; NISTICO, G.; DORIA, G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. **Int. J. Immunopharmacol.** Netherlands, v. 15, p.463-8, 1993.

POON, A. M.; LIU, Z. M.; PANG, C. S.; BROWN, G. M.; PANG, S. F. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Biol. Signals**, Switzerland, v. 3, p. 107, 1994.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova** , Brasil, v. 22, n. 4, 1999.

RASMUSSEN K. R.; HEALEY, M. C.; CHENG, L.; YANG, S. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with Cryptosporidium parvum. **J. Parasitol.,** United States, v .81 p. 429–43, 1995.

REED, S. G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology,** United States, p. 443-445, 1995.

REICCHILIN, S. The pineal gland. In: WILSON, J. D. & FOSTER, D. W. (Eds.). **Williams textbook of endocrinology,** United States, v.8, p. 240-253, 1992.

REICHE, E. M. V.; JANKEVICIUS, J. V. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. **Rev. Bras. Anal. Clín.,** Brasil, v.29, p. 29-40, 1997.

REITER, R. J. Pienal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interaction. **Endocrinology,** United States, v. 12, p.151-180, 1991.

RUOFF, B. M.; DANIEL, W. L.; Comparative biochemistry of mamalian arylsulfatase C and steroid sulfatase. **Comp. Biochem. Physiol.,** England, v. 96, p.313-322, 1991.

SANTELLO, F. H.; FRARE, E. O.; CAETANO, L. C.; TOLDO, M. P. A.; PRADO, J. C. Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. **J. Pienal Research**, Denmark, v. 45, p. 79-85, 2008.

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

SANTOS, C. D.; CALDEIRA, J. C.; TOLDO, M. P. A.; PRADO, J. C. *Trypanosoma cruzi*: Effectes of repetitive stress during the development of experimental infection. **Exp. Prasitol.,** United States, v. 110, p. 96-101, 2005.

SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P. A.; SANTELLO, F. H.; FILIPIN, M. D. V.; BRAZÃO V.; PRADO, J. C. Dehydroepiandrosterone increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi.* **Vet. Parasitology**, United States, v. 153, p. 238-243, 2008.

SCHENKMAN, S D.; NUSSENZWEIG, C. V. A Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restrict cell surface domains*.* **Exp. Parasitol.,** United States, v. 72, p.76-86, 1991.

SHEN, Z.; WEI, L.; QIUHUA, G.; TAOTAO, W. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. **Europ. J. Pharmac.,** Netherlands, v. 501, p. 25-30; 2004.

SHIKANAI-YASSUDA, M. A.; LOPES, M. H.; TOLEZANO, J. E.; UMEZAWA, E.; AMATO NETO, V.; BERRETO, A. C. P.; HIGAKI, Y.; MOREIRA, A. A. B.; FUNAYAMA, G.; BARONE, A. A.; DUARTE, A.; ODONE, V.; CERRI, G. C.; SATO, M.; POSI, D.; SHIMORA, M. Doença de chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e respostas à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. **Rev. Inst. Med. Trop.,** Brasil, v.35, p.16-27, 1990.

SHIN, S.; HUR, G. H.; KIM Y. B.; YEON G. B.; PARK K. J.; PARK Y. M; LEE W. S. Dehydroepiandrosterone and melatonin prevent Bacillus antracis lethal toxin-induced TNF production in macrophages. **Cell Biol. Toxicol.,** Netherlands, v. 16, p. 165-174, 2000.

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

SKWARLO, S.K. Melatonin in immunity: comparative aspects. **Neuroendocrinol Lett.,** Sweden, v. 23, p. 61-66, 2002.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. Acritical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop.,** Brasil, v.35, p.395-398, 1993.

SOLERTE, S.B.; FIORAVENTI, M.; VIGNATI, G.; GIUSTINA, A.; CRAVELLO, L.; FERRARI, E. Dehydroepiandrosterone sulfate enhances natural killer cell cytotoxicity in humans via locally generated immunoreactive insulin-like growth factor I. **J. Clin. Endocr. Metab.,** United States, v.84, p. 3260-3267, 1999.

SOLIMAN, M. F. ; NAHLA. S. E. S.; SHIMAA E. E. A. *Schistosoma mansoni*: Melatonin enhances efficacy of cercarial and soluble worm antigens in the induction of protective immunity against infection in the hamster. **Exp. Parasitol.,** United States, v. 119, p.291-295, 2008.

STRAUB, R. H.; KONEENA, L.; HRACH, S.; ROTHE, G.; KREUTZ, M.; SCHOLMERICH, J.; FALK, W.; LANG, B. Serum dehydroepiandrosterona (DHEA) and DHEA sulfatase are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL - 6), and DHEA inhibits IL – 6 secretion from mononuclear cells in man *in vitro*: possible link between endocrinose-nescence and immunosenescence. **J. Clin. Endocr. Metab.,** United States. v. 83, p. 2012-2017, 1998.

SUN-KWON, K.; MYUN G-SHIN, S.; BOK-KYUNG, J.; JAE-YOON, S.; HYE-SUNG, W.; PIL, R. L.; AHM, K. Effect of dehydroepiandrosterona on lipopolysaccharide-induced interleukin – 6 production in DH82 cultured canine macrophage cells. **Jorn. Reprod. immunol.,** Ireland, v. 70, p. 71-81, 2006.

SZTEIN, M. B.; KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, United States, v. 9, p. 424-428, 1993.

TALIAFERRO, W. & PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. **J. Infect. Dis.,** United States, v. 96, p.199-26, 1955.

TARDIEUX, I.; NATHASON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi* – induced cytosolic free Ca+ transients. **J. Exp. Med.,** United States, v. 179, p. 1017-1022, 1994.

TERENZI, F.; DIAZ-GUERRA, M. J. M.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI, S.; BOSCÁ, L. Bacterial Lipopetides Induce Nitric Oxide Syntetase and promote apoptosis throught Nitric Óxide – Independent pathways in rats macrophages. **J. Biol. Chemistry.,** United States, v. 270, p.6017-6021, 1995.

THOMSON, L.; GADILHA, F. R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A. E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca_2^+ transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.,** German, v. 98, p. 81-94, 1998.

TOMMASO, S.; PAOLO, M.; LETIZIA, F.; GAETANO, V.; ANTONELLA, C.; ANDREA, R. G. Dehydroepiandrosterona modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanismo. **Endocrinology,** United States, v. 144, p. 3449-3455, 2003.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflamation and immunity. **Adv. Immunol.,** United States, v.70, p. 83-243, 1998.

TRISCHANN, T. M. Role of cellular immunity in protection aganist Trypanosoma cruzi in mice. **J. Immunol**., United States, v. 6, p. 561-570, 1984.

VANVOLLENHOVEN, R. F.; MORABITO, L. M.; ENGLEMAN E. G.; MCGUIRE, J. L. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 month. **Journal of Rheumatology,** Canada, v. 25, p. 85-289, 1998.

VASUDEVA, R.; JAVED, N. A.; SHRINIVAS, K. K. Melatonin reversal of lipopolysacharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. **Eur J Pharmacol.,** Netherlands, v. 21, p.15-21, 2000.

WETTERBURG, L.; ARENDT, J.; PAUNIER, L.; SIGONENKO, P. C.; VANDONSELAAR, W.; HEYDEN, T. Human serum melatonin changes during the menstrual cycles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** United States, v. 42, p. 185-188, 1976.

XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. **Exper. Cell Res.**, United States. v. 12, p. 311-320, 2002.

YAMADA, J.; SUGIYAMA, H.; SAKUMA, M.; SUGA, T. Specific binding of dehydroepiandrosterone sulfate to rat liver cytosol: a possible association with peroxisomal enzyme induction. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 1224, p. 139-146, 1994.

YOSHIDA, N.; TYLER, K. M.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* cell invasion mechanisms. In. World Class Parasites: American Tryapanosomiasis. **Academic Publishers.,** United States, v. 7, p. 69-79. 2003.

ZHANG, A. N.; LIANG, I.; ARDESTANI, J.; CHOW, W. Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. **Immunology,** London, v. 96, p. 291–297, 1999.

ZHANG, S.; LIB, W.; GAOB, Q.; Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. **Eur. J. Pharmacol,** Netherlands, v. 501, p. 25-30, 2004.

ERRATA

KUEHN, C.C. **Análise *in vitro* e *in vivo* da ação conjunta dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Melatonina (MEL) contra *Trypanosoma cruzi***. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

Folha	Parágrafo/linha	Onde se lê	Leia-se
vi	4º linha	**Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0**	**Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05**
31	Tabela 1	**16.384± 15.745SSS**	**16.384± 15.745**
32	Figura 2	**Peritoneal Macrophages - Day of experiment**	**Macrófago Peritoneal - Dia de experimento**
38	Figura 4	**Parasites/ml blood - Day of experiment**	**Parasitas/ml sangue - Dia de experimento**
46	Figura 8	**Day of experiment**	**Dia de experimento**
51	Figura 10	**Produção de TNF-α expresso em pg/ml em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimulado. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.**	**Avaliação do peso cardíaco em ratos Wistar machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de MEL, DHEA e MEL+DHEA conjugadamente, durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento. Grupo CONTROLE (Somente Infectados), MEL (Tratado e Infectado), DHEA (Tratado e Infectado), MEL+DHEA (Tratado e Infectado). Para todos os grupos foi utilizado n = 5 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.**