UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Orquiectomia e administração de dehidroepiandrosterona (DHEA)
em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi***

Marina Del Vecchio Filipin

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Orquiectomia e administração de dehidroepiandrosterona (DHEA)
em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi***

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Marina Del Vecchio Filipin

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Ribeirão Preto

2007

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.

Filipin, Marina Del Vecchio

Orquiectomia e administração de dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2007.

83p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: do Prado Júnior, José Clóvis.

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

Aluna: Marina Del Vecchio Filipin

Título: Orquiectomia e administração de dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratos
Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi*

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). Ana Amélia Carraro Abrahão

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a). Sérgio Zucoloto

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Sumário

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 Doença de Chagas e Sistema Imune	7
1.3 Hormônios Sexuais e a Resposta Imune	11
1.4 Dehidroepiandrosterona (DHEA)	14
2. OBJETIVOS	17
3. JUSTIFICATIVA	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Animais utilizados	20
4.2 Grupos Experimentais	20
4.3 Orquiectomia	21
4.4 Infecção e Parasita	21

4.5	Tratamento com DHEA	22
4.6	Dias de experimento	22
4.7	Eutanásia e Coleta de sangue	22
4.8	Contagem de parasitas	23
4.9	Contagem de macrófagos peritoniais	23
4.10	Preparação da suspensão de células peritoniais e Quantificação de Óxido Nítrico	24
4.11	Dosagens de IL-12	25
4.12	Dosagens de IFN- γ	26
4.13	Técnica histopatológica e Análise do parasitismo tecidual	27
4.14	Pesagem dos animais e órgãos	28
4.15	Análise Estatística	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	Parasitemia	29
5.2	Peso Corpóreo	31
5.3	Peso dos órgãos	32
5.3.1	Peso do coração	32
5.3.2	Peso do baço	34
5.3.3	Peso das adrenais	35
5.4	Contagem global de macrófagos peritoniais	36
5.5	Dosagem de Óxido Nítrico	38

5.5.1	Grupos Controles (sem infecção)	38
5.5.2	Grupos Infectados	39
5.6	Dosagem de IL-12	41
5.6.1	Grupos Controles	41
5.6.2	Grupos Infectados	42
5.7	Dosagem de IFN- γ	44
5.7.1	Grupos Controles	44
5.7.2	Grupos Infectados	45
5.8	Parasitismo tecidual do Coração	46
5.9	Histopatologia do Coração	47
5.9.1	Grupos Controles	47
5.9.2	Grupos Infectados	49
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Resumo

RESUMO

FILIPIN, M. D. V. **Orquiectomia e administração de dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A tripanossomíase ainda representa importante endemia nas Américas refletindo-se no sentido sócio-econômico onde é responsabilizada pelas taxas de aposentadoria precoce, como consequência direta da doença. As terapias até então utilizadas não promovem a cura total da doença além de provocarem efeitos colaterais danosos ao organismo do hospedeiro. É de conhecimento que os esteróides gonadais exercem profunda influência no curso das infecções, e no caso específico da doença de Chagas, a orquiectomia leva a um estado de maior resistência do hospedeiro a *Trypanosoma cruzi*. O DHEA através de suas ações imuno-regulatórias promove o direcionamento da resposta celular do hospedeiro, que por sua vez é efetiva no controle da replicação de distintos patógenos como vírus, bactérias e protozoários. Portanto, a proposta do trabalho é inédita, pois avaliou o sinergismo entre a administração do DHEA e a orquiectomia no direcionamento da resposta imune do hospedeiro no decurso da infecção chagásica experimental em ratos *Wistar* machos infectados com a cepa y de *T. cruzi*. A parasitemia sofreu drástica redução para os grupos orquiectomizados e sujeitos a terapia com DHEA. Da mesma forma os parâmetros imunológicos analisados apresentaram aumento significativo das concentrações de IFN- γ , IL-12 e NO bem como do número de macrófagos. A histopatologia nos revelou que a orquiectomia e o tratamento com DHEA promoveram melhor reorganização do tecido cardíaco, bem como redução do número e tamanho dos ninhos de amastigotas existentes. Todos esses dados nos levam a crer que a ação sinérgica da terapia associada à orquiectomia promoveu direcionamento da resposta imune do tipo Th1 reduzindo os processos patológicos desencadeados pela infecção chagásica.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Orquiectomia; Dehidroepiandrosterona

Abstract

ABSTRACT

FILIPIN, M. D. V. **Orchiectomy and dehydroepiandrosterone therapy in *Trypanosoma cruzi* infected Wistar rats.** 2007. 83f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The ability of the gonadal hormones to influence and induce diverse immunological functions during the course of several parasitic infections has been extensively studied in the latest decades. Dehydroepiandrosterone and its sulphate are the most abundant steroid hormones secreted by the human adrenal cortex and are considered potent immune-activators. In this experiment, it was examined the effects of orchiectomy on the course of *Trypanosoma cruzi* infection in rats, treated and untreated with DHEA, by comparing blood and cardiac parasitism, macrophages number, Nitric Oxide and IFN- γ levels. Orchiectomy led animals to enhanced resistance against infection by elevated number of macrophages, enhanced concentrations of NO and IFN- γ and reduced amastigote burdens in heart when compared to control animals. DHEA replacement exerted a synergic effect, up-modulating the immune. Certainly male sex steroids play fundamental role in determining the fate of disease, through the regulation and modulation of the activity of the immune response.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Orchiectomy; Dehydroepiandrosterone

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante os 7º, 14º e 21º dias após a infecção**29**
- Figura 2.** Peso do coração de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, no 7º dia após a infecção**32**
- Figura 3.** Peso do baço de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, no 7º dia após a infecção**34**
- Figura 4.** Peso das adrenais de ratos *Wistar* machos não infectados e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, no 7º dia após a infecção**35**
- Figura 5.** Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS, coletadas de ratos *Wistar* machos não infectados durante 7º, 14º e 21º dias de experimentos**38**
- Figura 6.** Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS, coletadas de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante 7º, 14º e 21º dias após a infecção**39**
- Figura 7.** Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados durante 7º, 14º e 21º dias**41**

Figura 8. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> durante 7º, 14º e 21º dias após a infecção	42
Figura 9. Concentrações de IFN-γ (pg/mL) determinadas no soro ratos <i>Wistar</i> machos não infectados durante 7º, 14º e 21º dias ..	44
Figura 10. Concentrações de IFN-γ (pg/mL) determinadas no soro de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> durante 7º, 14º e 21º dias após a infecção	45
Figura 11. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos não infectados colhidos no 14º dia de experimento	47
Figura 12. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos <i>Wistar</i> machos infectados i.p.com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> colhidos no 14º dia de experimento	49

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corpóreo dos ratos *Wistar* machos não infectados e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante o pico da parasitemia no 7º dia após o inóculo **31**

Tabela 2. Contagem global de macrófagos peritoneais em ratos *Wistar* machos não infectados e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* durante os 7º, 14º e 21º dias **36**

Tabela 3. Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas no coração de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi*, no 14º dia após a infecção **46**

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

DHEA - Dehidroepiandrosterona

DHEA-S - Sulfato de Dehidroepiandrosterona

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IFN- γ - Interferon Gama

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

NO - Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

LPS - Lipopolissacarídeos

RPMI - Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)

Th - T helper

C - Controle

CSH - Controle Sham

COR - Controle Orquiectomizado

CD - Controle Tratado com DHEA

CSHD - Controle Sham Tratado com DHEA

CORD - Controle Orquiectomizado Tratado com DHEA

I - Infectado

ISH - Infectado Sham

IOR - Infectado Orquiectomizado

ID - Infectado Tratado com DHEA

ISHD - Infectado Sham Tratado com DHEA

IOD - Infectado Orquiectomizado Tratado com DHEA

Introdução

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma antropozoonose que atinge, principalmente, populações pobres que residem em condições precárias sendo considerada como uma entidade nosológica de grande importância na América Latina (TEIXEIRA et al., 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem cerca 17 milhões de pessoas infectadas nas Américas, onde aproximadamente 6 milhões encontram-se no Brasil (WHO, 2002). A prevalência, a incidência e a taxa de mortalidade associadas à Doença de Chagas apresentaram consideráveis variações nas últimas décadas devido, principalmente ao impacto de programas de controle, migrações de populações rurais e urbanas além de mudanças sócio-econômicas (MONCAYO & YANINE, 2006).

Apesar das iniciativas de controle e combate à doença na América Latina, principalmente nos países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) (ANON., 1991) cerca de 100 milhões de pessoas estão sob o risco da infecção no continente, com uma incidência total estimada em 800.000 novos casos por ano (MONCAYO & YANINE, 2006).

Descrita pela primeira vez em 1909, por Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, a tripanossomíase americana é causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). A maior parte dos casos de infecção é produzida pelo contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae (subfamília Triatominae), contaminados com *T.cruzi* (CHAGAS, 1909). Os principais mecanismos de infecção são: transmissão

vetorial, congênita, amamentação e via transfusional (GASCÓN et al., 2007). Existem também formas de transmissões excepcionais como: acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (BRENER et al., 2000).

O ciclo de vida de *T.cruzi* ocorre na natureza entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O homem passou a fazer parte desse ciclo de transmissão quando invadiu o ecótopo natural compreendido pelos vetores e seus hospedeiros mamíferos. Dessa forma, os vetores passaram a co-habitar as instalações humanas colonizando os mais variados locais como buracos ou fendas em paredes. Nota-se maior incidência em casas de condições precárias como as de pau a pique, sapé, madeira ou barro, sendo mais freqüente, nas zonas rurais (RODRIGUEZ-BONFANTE et al., 2007) e entre população de baixa renda (VINHAES & DIAS, 2000).

T. cruzi possui um ciclo evolutivo complexo que inclui diferentes estágios de desenvolvimento; entre suas formas morfogenéticas estão: a forma epimastigota e tripomastigota metacíclica infectante, presentes no inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigota sangüícolas presentes no hospedeiro vertebrado (TANOWITZ et al., 1992).

O homem como outros animais, se infecta quando formas tripomastigotas metacíclicos (eliminadas juntamente com as fezes do triatomíneo, hospedeiro invertebrado, sobre a pele do hospedeiro vertebrado) penetram pela lesão da picada ou por membranas mucosas (CHAGAS, 1933). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas de *T.cruzi* invadem diferentes tipos de células, principalmente do sistema fagocitário mononuclear incluindo os macrófagos, onde irão se multiplicar sob a forma de amastigotas (COSTA et al., 2006).

Por sua vez, o triatomíneo que possui hábito geralmente noturno, se infecta ingerindo as formas tripomastigotas do sangue periférico do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. A transformação e todo desenvolvimento do flagelado no vetor estão relacionados à espécie do triatomíneo e as diferentes cepas do parasita (GARCIA & DVORAK, 1982).

Além disso, *T.cruzi* mostra uma patogenia especialmente determinada por características próprias do hospedeiro e da população infectante. Assim, o curso da infecção nos vertebrados susceptíveis é influenciado por fatores como a idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas, morfológicas e biológicas da cepa infectante e fatores externos como temperatura ambiental (BRENER et al., 2000).

Estudos pioneiros de caracterização bioquímica - molecular permitiram avanços no conhecimento sobre a composição genética de *T.cruzi*, os processos envolvidos na expressão gênica do parasita, os genes que codificam componentes estruturais, enzimas metabólicas e moléculas de adesão e penetração celular (MONCAYO & YANINE, 2006).

O emprego de marcadores moleculares no estudo da diversidade genética de *T.cruzi*, tais como perfil eletroforético de Isoenzimas (MILES et al., 1980), produtos de digestão do K-DNA do parasito por enzimas de restrição (MOREL et al., 1980), perfil eletroforético de DNA amplificado ao acaso (ZINGALES et al., 1997; ZINGALES et al., 1998), seqüência de DNA ribossomal (SOUTO et al., 1996) etc., confirmou a heterogeneidade genética do parasita, concluindo que as populações de *T.cruzi* podem ser classificadas em duas grandes subdivisões ou linhagens filogenéticas distintas: *T.cruzi* I, constituída por amostras predominantemente isoladas do ciclo silvestre (correspondentes aos Zimodemas I e

III, baseados no perfil eletroforético de Isoenzimas) e *T.cruzi* II constituído por amostras predominantemente do ciclo domiciliar (correspondente ao Zimodema II) (MILES et al., 1977; MILES et al., 1980).

O curso da doença de Chagas no homem pode apresentar as fases: aguda e crônica. O início da fase aguda acontece logo após a entrada do parasita no organismo do hospedeiro (MONCAYO & YANINE, 2006) e caracteriza-se normalmente por apresentar parasitemias abundantes (MELNIKOV et al., 2005) e pela relativa facilidade com que se evidencia o parasita tanto no sangue periférico, através de métodos diretos, como por métodos sorológicos através da presença de IgM.

As manifestações clínicas na fase aguda quando presentes, aparecem sob a forma de reações locais como chagoma de inoculação (inoculação cutânea) e o sinal de Romaña (edema bupalpebral unilateral) seguidos por febre, hepatomegalia e esplenomegalia (MONCAYO & YANINE, 2006). Alguns casos podem desenvolver complicações neurológicas, cardíacas e pulmonares durante esse período (AUGER et al., 2002; MELNIKOV et al., 2005), especialmente em crianças menores de 15 anos e pacientes imuno-comprometidos (FERREIRA & BORGES, 2002).

O início da fase crônica acontece quando as manifestações clínicas da fase aguda (se presentes) desaparecem e o número de formas tripomastigotas no sangue periférico diminui, chegando a níveis indetectáveis. A resposta imune do hospedeiro é responsável por essa queda da parasitemia sanguínea, principalmente em pacientes não tratados (CARDONI & ANTÚNEZ, 2004). Durante a fase crônica da doença de Chagas, muitos indivíduos infectados permanecem assintomáticos, sem alterações no coração, esôfago ou cólon. Esse período sem manifestações

clínicas é conhecido como a forma indeterminada da doença e cerca de 50 a 70% dos pacientes ficam nesse estágio indeterminado pelo resto da vida (DIAS, 1995).

Entretanto, uma minoria (30%) dos indivíduos que permanecem assintomáticos durante um determinado período pode, eventualmente, vir a desenvolver sintomas da doença caracterizados por distúrbios no sistema digestório, nervoso e no coração, ocasionalmente fatais (GARCIA et al., 2005; TARLETON et al., 1996).

A parasitemia sanguínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessária para o estabelecimento da correlação anátomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993). Sendo assim, o estudo da fase aguda da infecção, induzida por *T. cruzi*, pode ser de grande importância, considerando que diferentes autores sugerem que muitas lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença durante esta fase (MONCAYO & YANINE, 2006).

O perfil parasitêmico da infecção humana por *T. cruzi* pode ser avaliado pela presença do parasita no sangue e eventualmente pela detecção de IgM durante a fase aguda da doença. Nas fases indeterminada e crônica utilizam-se, preferencialmente reações sorológicas como: detecção de IgG (MONCAYO & YANINE, 2006), hemaglutinação indireta, imunofluorescência, exames de isolamento do parasita como xenodiagnóstico, hemocultura e mais recentemente através da biologia molecular com a Reação em Cadeia da Polimerase (RUSSOMANDO et al., 1998; GALVÃO et al., 2003).

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, podendo

reproduzir nos mesmos, os distintos aspectos patológicos da doença humana (BRENER & CHIARI, 1963; ANDRADE et al., 1970; BORGES et al., 1982; BORGES et al., 1992a; BORGES et al., 1992b; CARDILLO et al., 1996; BRENER & GAZZINELLI, 1997; PRADO et al., 1998; DOST et al., 2002; SANTOS et al., 2005; CAETANO et al., 2006).

A grande utilização de roedores em pesquisa permitiu detalhada descrição celular, molecular e fenomenológica disponível para o sistema imune de mamíferos. Com relação à doença de Chagas, o estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados com *T.cruzi* demonstrou a presença de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhante às causadas pela doença humana (GIRONES et al., 2007; TOLEDO et al., 2004).

Apesar de muitas pesquisas sobre a doença de Chagas, o seu tratamento ainda apresenta vários problemas; alguns medicamentos são capazes de eliminar *T.cruzi* no período inicial da doença, porém em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais têm seu uso limitado. Já as lesões cardíacas e em outros órgãos, uma vez estabelecidas são irreversíveis e não são eliminadas com a erradicação do parasita.

1.2. Doença de Chagas e o Sistema Imune

Diferentes manifestações clínicas e patológicas da Doença de Chagas no homem se devem à eficiência da resposta imune do hospedeiro dirigida ao parasita que irá controlar os níveis parasitêmicos na fase aguda da infecção e assim limitará os danos teciduais durante a fase crônica (MONCAYO & YANINE, 2006).

Hoje está bem estabelecido que a ativação de células e mecanismos efetores do sistema imune durante a infecção pode ser responsável tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelo processo inflamatório exacerbado que resultará nos sintomas característicos da fase aguda da doença, como febre, esplenomegalia e miocardites (CAMPOS & GAZZINELLI, 2004).

A resposta inflamatória e as lesões celulares, ao lado das alterações da matriz extracelular, dos fenômenos degenerativos e também de processos auto-imunes (GATTASS et al., 1988; PALOMINO et al., 2000; CUNHA-NETO et al., 2006; HYLAND & ENGMAN, 2006), constituem os processos patológicos fundamentais da doença de Chagas (KIERSENBAUM, 2005).

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T.cruzi* sensibiliza diferentes tipos de respostas imunes, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (SACKS & SHER, 2002). A mobilização do sistema imune é importante, mas não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER et al., 2000), o que contribui para o aparecimento das manifestações crônicas (BUSTAMANTE et al., 2007).

A imunidade celular é o principal mecanismo de controle do parasitismo durante as primeiras semanas de infecção causada por *T.cruzi*. A

resistência ao parasita envolve, particularmente a participação de linfócitos T CD4⁺ (Th1) e a ativação de macrófagos por citocinas, principalmente Interferon-gama (IFN- γ) (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995; CRAWFORD et al., 1994). Contrariamente, a ativação de linfócitos T CD4⁺ (Th2) resulta em sobrevivência aumentada do parasita e exacerbação das lesões causadas por ele, devido às ações supressoras das citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-10 (KUMAR & TARLETON, 2001; HOFT et al., 2000; VIVEROS-PAREDES et al., 2006).

T. cruzi inicia sua interação molecular em macrófagos, induzindo a produção de IL-12. Essa citocina além de atuar sobre as células *Natural Killers* (NK), estimula a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ (ABBAS, 2005), que age principalmente como uma citocina efetora das respostas imunes e possui papel protetor no início da infecção (TORRICO et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992; ALIBERTI et al., 1996).

Durante a infecção por *T. cruzi*, o IFN- γ é capaz de inibir *in vitro* o seu desenvolvimento (PLATA et al., 1984; REYES et al., 2006) e *in vivo* é capaz de diminuir a parasitemia e prolongar a sobrevivência de animais infectados (PLATA et al., 1987; TORRICO et al., 1991; MICHAILOWSKY et al., 2001).

O IFN- γ atua sobre macrófagos, acentuando a atividade microbicida dessas células mediante a estimulação da síntese do óxido nítrico, importante molécula efetora antimicrobicida (GAZZINELLI et al., 1992; DOST et al., 2006). O IFN- γ medeia esses efeitos ativando a transcrição dos genes que codificam a enzima óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela geração da molécula de óxido nítrico (MILLER et al., 2002; BERGERON & OLIVIER, 2006).

O óxido nítrico está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sanguínea, agregação plaquetária e neuro-transmissão (MONCADA et al., 1991; MONCADA & HIGGS, 2006).

Tem importante papel no controle de muitas infecções, principalmente contra patógenos intracelulares como *T. cruzi*, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002; AKAMINE et al., 2007; MARCACCINI et al., 2007).

É gerado pela família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos, através da catálise enzimática de aminoácido essencial L – arginina (MONCADA et al., 1991). A catálise enzimática da reação do aminoácido L – arginina e oxigênio, que resulta na formação de L – citrulina e óxido nítrico, é feita pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADA & HIGGS, 1995).

As formas de NOS diferem na sua localização celular e expressão: são elas: constitutiva, induzida e neuronal (QUEIROZ & BATISTA, 1999).

As induzidas são enzimas que estão presentes em muitas células, principalmente em macrófagos ativados e produzem maiores quantidades de NO (Nitric Oxide). Esta isoforma é predominante durante a inflamação e o controle da sua síntese acontece pela expressão do gene iNOS e depende de mediadores celulares presentes durante infecções e inflamação, como o IFN- γ , IL-2 (WONG & BILLIAR, 1995). Outras substâncias como o TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeos), também demonstraram estar envolvidos no processo de produção de NO (ALCINA & FRESNO, 1987; WALSH et al., 2007).

Já a síntese de NO pela enzima NO sintetase constitutiva (cNOS) possui dependência a um cofator adicional, a calmodulina. Na presença de elevada

concentração de cálcio, a calmodulina liga-se a cNOS, ativando-a (QUEIROZ & BATISTA, 1999). O óxido nítrico formado por esta via participa de muitos processos homeostáticos (WANG et al., 2007).

Uma terceira isoforma das enzimas que geram óxido nítrico foi descrita e está expressa em neurônios, a NO sintetase neuronal (QUEIROZ & BATISTA, 1999). E sua liberação também depende da concentração intracelular de Cálcio/Calmodulina.

A atividade dessas enzimas pode ser inibida por análogos da L-arginina e glicocorticóides. Sendo que citocinas como a IL-4 e IL-10 também inibem a sua indução, especialmente em macrófagos e, portanto reduzem a produção de óxido nítrico (NATHAN, 1992; PAOLIELLO et al., 2005; ROOK, 2007; TRUJILLO et al., 2007).

A participação dos macrófagos, na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecido (TALIAFERRO & PIZZI, 1995; SAVINO et al., 2007). Os macrófagos e as células T, juntamente com as citocinas desempenham função importante no controle da infecção chagásica (PADILLA et al., 2007; DOS REIS et al., 2005; COSTA et al., 2006).

Mas 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 (SAVINO et al., 2007)

1.3. Hormônios Sexuais e Resposta Imune

Além de desempenhar um importante papel na diferenciação sexual e na reprodução, os hormônios sexuais atuam em diversos mecanismos imunológicos (BOUMAN et al., 2005) e influenciam na suscetibilidade a doenças e infecções, especialmente infecções parasitárias (KLEIN, 2004; WHITACRE, 2001).

Há evidências clínicas e experimentais que suportam a idéia dos esteróides gonadais regularem a função imune (GROSSMAN, 1985). Tal conclusão é baseada: 1) na existência de dimorfismo sexual na resposta imune; 2) no fato da gonadectomia bem como a reposição de hormônios esteróides alterarem a resposta imune; 3) na presença de receptores específicos para hormônios esteróides nos órgãos e células responsáveis pela resposta imune; como por exemplo: linfócitos T CD4+ e T CD8+ expressam receptores para estrógenos e testosterona (JENSEN, 1996; BENTEN et al., 1999a); e macrófagos receptores para dehidroepiandrosterona (DHEA) e testosterona (BENTEN et al., 1999b; BENTEN et al., 2004).

Segundo BOUMAN et al. (2005), a influência do dimorfismo sexual sobre a resposta imune é óbvia, as fêmeas produzem resposta celular e humoral mais vigorosas que os machos; são mais resistentes a certas infecções como as causadas por bactérias e parasitas, por exemplo (SCHUSTER & SCHAUB, 2001). Porém, sofrem maior incidência de doenças auto-imunes quando comparadas com os machos.

Os hormônios sexuais podem influenciar profundamente as células da resposta imune inata, como os mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e NK (ROBERTS et al., 2001). Essas células além de formarem a

primeira linha de defesa contra muitos microorganismos possuem importante papel no direcionamento e desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

A resposta imune adaptativa envolve, por exemplo, as células T e B; e também é afetada diretamente pelos esteróides gonadais (SEIKI & SAKABE, 1997; SILVER & BRANCH, 1997; DA SILVA, 1999).

EIDINGER & GARRET (1972) relataram um nível mais elevado de imunoglobulinas IgM e IgG, nas fêmeas do que nos machos. Essa diferente resposta imunológica frente a estímulos é encontrada em várias espécies mamíferas, incluindo o homem. *In vitro*, foi mostrado que os estrogênios, em concentrações fisiológicas, induzem a ativação policlonal dos linfócitos B, aumentando os níveis de IgG e IgM (WEETMAN et al., 1981; KANDA & TAMAKI, 1999), enquanto a testosterona não causa nenhuma alteração no processo de maturação dessas células (KANDA et al., 1996).

Segundo MCMURRAY et al., 2001, os hormônios gonadais exercem efeitos distintos e cruciais sobre os órgãos linfóides e atuam tanto na proliferação quanto na apoptose celular, através da interação com mediadores como as citocinas (TANRIVERDI et al., 2003; CUTOLO et al., 2004).

WEINSTEIN et al., 1984 e FAAS et al., 2000 observaram que a porcentagem de linfócitos T nos machos é menor quando comparada com a porcentagem das fêmeas e que essa diferença ocorre porque o estradiol (E2) tem ação estimuladora sobre a resposta proliferativa de células T, ao contrário da testosterona que, em concentrações mais elevadas, apresenta atividade imunossupressora sobre os linfócitos (PAGE et al., 2006).

Dados presentes na literatura ressaltam que os hormônios sexuais exercem importante papel na evolução e diferenciação celular do timo, órgão relacionado diretamente com a resposta imune. GROSSMAN, 1985 já havia evidenciado o aumento da massa tímica induzida pela castração e alterações estruturais significantes como aumento da região cortical e medular. Além disso, os esteróides parecem influenciar também na regulação, biossíntese e secreção dos hormônios tímicos, que por sua vez afetariam o curso da resposta imune.

Como mencionado anteriormente, a produção de citocinas também é afetada pelos hormônios sexuais. O estradiol, por exemplo, possui habilidade de promover a produção de IFN- γ por células T CD4+ ativadas, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Fato que explica níveis aumentados dessa interleucina nas fêmeas, quando comparadas com os machos (GOURDY et al., 2005).

Em relação à doença de Chagas, estudos pioneiros de PRADO et al., 1998 e PRADO et al., 1999 relataram a importância dos hormônios esteróides na evolução da doença experimental e demonstraram distintas alterações fisiológicas quando submeteram *Calomys callosus* à ovariectomia e orquiectomia provocando nestes animais modificações na resposta imunológica a *T.cruzi*. A ovariectomia levou os animais a uma maior susceptibilidade à infecção enquanto que a orquiectomia proporcionou maior resistência à infecção.

Todos estes dados fazem com que os estudos relacionados ao dimorfismo sexual se tornem de extrema importância, principalmente no que se refere à doença de Chagas.

1.4. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

DHEA é um esteróide produzido no córtex das glândulas adrenais, podendo ser encontrado também nas gônadas. Antes do nascimento e na puberdade, o DHEA é produzido em elevadas concentrações, alcançando picos por volta dos 20-30 anos de idade, seguindo uma queda progressiva (BAULIEU, 1996; LABRIE et al., 2003).

É sintetizado pelas células da zona reticular da adrenal e formado a partir do colesterol via pregnenolona, principal caminho para a biosíntese dos corticosteróides, andrógenos e estrógenos, sendo sua vida plasmática média de aproximadamente 15-30 minutos (BAULIEU, 1996).

O DHEA participa do metabolismo da formação dos hormônios femininos (estrone, estriol e estradiol) e masculino (testosterona) (HAJSZAN et al., 2004). Além disso, exerce importantes funções fisiológicas no organismo humano (AOKI et al., 2004; YAMASHITA et al., 2005).

Grande parte do DHEA, cerca de 90%, antes de atingir o plasma, é convertida em DHEA-Sulfato (DHEA-S) pela enzima DHEA Sulfatase. O DHEA-S é uma das substâncias mais encontradas na circulação (PARKER et al., 2000) e seus níveis podem sofrer variações em situações de estresse ou na presença de diferentes tipos de doenças (BOUDARENE et al., 2002).

No homem, a importância do DHEA é restrita em vista da grande produção de testosterona pelos testículos; todavia na mulher, as adrenais são responsáveis por 50 a 60% da produção de andrógenos. As células da zona reticular podem ainda formar pequenas quantidades de estradiol e estrone a partir da

testosterona. Na falta dos ovários, ou após a menopausa, essa produção de estrógenos passa a ser importante (STOMATI et al., 2000).

Como citado anteriormente, os níveis de DHEA atingem um pico por volta dos 20-30 anos de idade e depois tem queda lenta e progressiva chegando a seus níveis mais inferiores em torno dos 75 a 80 anos de idade (VON BAMBERGER, 2007). O que demonstra que seu metabolismo praticamente acompanha o processo de envelhecimento (LORIA et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2007).

Por isso, a diminuição dos níveis de DHEA está associada com muitas doenças presentes na fase avançada da vida (DEBONNEUIL et al., 2006; LABRIE et al., 2007), como por exemplo, doenças cardiovasculares (WU et al., 2007) e a síndrome de Alzheimer (SUNDERLAND et al., 1989).

Os suplementos de DHEA e seu sulfato demonstraram possuir efeitos terapêuticos em diversas situações como melhoria nos distúrbios cognitivos e de memória (BÁCSI et al., 2007), disfunções sexual, osteoporose pós-menopausal (RAVEN & HINSON, 2007) e até redução dos sintomas do lúpus eritematoso (NORDMARK et al., 2005). Além de apresentarem efeito protetor em doenças psiquiátricas (BÁCSI et al., 2007), cardiovasculares e tromboembólicas (RABIJEWSK & ZGLICZYŃSKI, 2005).

A sua função como potente hormônio imunoestimulador também é bastante estudada e já está bem esclarecida. Segundo SAKAKURA et al., 2006, o DHEA é capaz de ativar a proliferação de células B e T e suas funções, tanto *in vivo* como *in vitro*; pode aumentar a produção da interleucina 2 (IL-2) pelos linfócitos T, fator importante na mediação das respostas imunológicas deste tipo de célula (LORIA et al., 1996) e é responsável pelo aumento no título de anticorpos

(DEGELAU et al., 1997). Além disso, há estudos que mostram que o DHEA diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 (DANENBERG et al., 1992).

Devido ao seu poderoso efeito imunoregulatório, o DHEA está sendo utilizado como opção de tratamento em estudos sobre doenças virais (ZHANG et al., 1999) como a AIDS (CHRISTEFF et al., 1999; RABKIN et al., 2006), doenças bacterianas (BEN-NATHAN et al., 1999) e infecções parasitárias, como Criptosporídeo (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995) e *Schistosoma mansoni* (MORALES-MONTOR et al., 2001).

Estudos inéditos, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, avaliaram a ação do DHEA na fase aguda da doença de Chagas experimental e revelaram o efeito do hormônio na redução da carga parasitária sanguínea e tecidual (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

O DHEA apresentou atividade estimulatória sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita (SANTOS et al., 2005). A administração do hormônio durante a infecção aguda causada por *T.cruzi*, reduziu a parasitemia sanguínea e atenuou os danos teciduais causados pelo parasita (SANTOS et al., 2007), tornando os animais tratados mais resistentes a doença.

Objetivos

2. Objetivos

Estudar a influência da administração de dehidroepiandrosterona sobre a resposta imune de ratos Wistar machos orquiectomizados ou não, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, utilizando os seguintes parâmetros:

- Parasitemia
- Contagem de macrófagos peritoniais
- Dosagem de Óxido Nítrico
- Pesagem dos animais e órgãos (coração, baço e adrenais)
- Histopatologia do coração
- Dosagem de IFN- γ e IL-12.

Justificativa

3. Justificativa

A doença de Chagas, ainda hoje, constitui-se em um importante problema de saúde pública no Brasil. Segundo a OMS, atinge cerca de seis milhões de brasileiros, principalmente, populações pobres que residem em condições precárias.

Nas últimas décadas, muitos estudos científicos foram realizados com o objetivo de desvendar os processos imunes do hospedeiro e a forma de evasão do parasita. Foram desenvolvidas várias pesquisas baseadas na análise de parâmetros na evolução da infecção chagásica.

Entretanto, atualmente, há a necessidade de novos estudos direcionados à análise de fatores que podem influenciar no desenvolvimento da doença de Chagas experimental.

A influência de hormônios no desenvolvimento de doenças infecciosas constitui-se em alvo recente para novas pesquisas, onde fatores como o dimorfismo sexual e o estresse estão presentes.

Sabe-se que os hormônios têm importante ação sobre o sistema imune, podendo gerar condições ora favoráveis, ora desfavoráveis, para o estabelecimento de determinadas patologias, entre elas, a doença de Chagas. Portanto, é importante a existência de pesquisas científicas que façam a correlação entre os hormônios e certos parâmetros da resposta imune.

O objetivo desse trabalho está sendo exatamente esse: analisar a influência do hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA) em determinados parâmetros da resposta imune durante a infecção chagásica.

Por ser o DHEA considerado por inúmeros autores como hormônio imunomodulador e que reduz a parasitemia durante a fase aguda da doença de Chagas (SANTOS et al., 2005), a relevância deste trabalho é o pioneirismo em avaliar concomitantemente os efeitos da orquiectomia que normalmente leva os machos a um estado de maior resistência à infecção por *T.cruzi* (PRADO et al., 1998) juntamente à administração do hormônio imunomodulador. Por ser um andrógeno e apesar da baixa conversão a testosterona, abre-se um campo muito grande de investigações sobre as interações entre os esteróides gonadais, como a testosterona, os produzidos na adrenal como o DHEA e a infecção por *T.cruzi*.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Animais utilizados

Foram utilizados ratos jovens machos da linhagem *Wistar* com aproximadamente quatro semanas, pesando entre 90 e 100 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Os animais eram mantidos em caixas plásticas com maravalha em número de três por caixa com ração específica para roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos laboratoriais envolvendo animais foram previamente autorizados pelo comitê de ética local (protocolo nº. 06.1.811.53.7).

4.2. Grupos experimentais

Grupos Controles (sem infecção)

Controle (C) n=5

Controle Sham (CSH) n=5

Controle Orquiectomizado (COR) n=5

Controle Tratado com DHEA (CD) n=5

Controle Sham Tratado com DHEA (CSD) n=5

Controle Orquiectomizado Tratado com DHEA (CORD) n=5

Grupos Infectados

Infectado (I) n=5

Infectado Sham (ISH) n=5

Infectado Orquiectomizado (IOR) n=5

Infectado Tratado com DHEA (ID) n=5

Infectado Sham Tratado com DHEA (ISHD) n=5

Infectado Orquiectomizado Tratado com DHEA (IORD) n=5

4.3. Orquiectomia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Tribromoetanol a 2.5%, diluído em NaCl 0,9 %, sendo injetado 1 mL a cada 100g de peso corporal e posteriormente divididos em dois grupos: o primeiro foi submetido à orquiectomia que consiste em uma incisão na bolsa escrotal, com retirada dos testículos, sutura do cordão espermático na altura do canal deferente e posteriormente da bolsa. O segundo grupo foi submetido à orquiectomia fictícia (incisão na bolsa escrotal e posterior sutura), passando a ser designado de Sham ou operação simulada.

Todos os processos cirúrgicos foram feitos sob condições estéreis, sempre dentro de fluxo laminar. Com o objetivo de evitar eventuais infecções pós-operatórias, os animais foram colocados em caixas estéreis, com maravalha e ração, além da administração de amoxicilina (250 mg/mL), que foi adicionada à água contida nos bebedouros, trocada diariamente por um período de sete dias. Após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos no biotério durante quatro semanas até o início dos experimentos.

4.4. Infecção e Parasita

Aproximadamente 30 dias após a cirurgia, os animais dos grupos infectados foram inoculados intraperitonealmente com 100.000 (1×10^5) formas tripomastigotas sangüícolas. Foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), através do xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos *swiss* heterogênicos, por meio de repiques semanais.

Trata-se de uma cepa com predominância de formas delgadas, multiplicação rápida e quando inoculada em ratos *Wistar* produz curva parasitêmica atingindo o pico ao redor do 7º dia após o inóculo, com pequenas variações, dependendo do número de parasitas inoculados e da idade e sexo do animal. Após esse período há diminuição da parasitemia.

4.5. Tratamento com DHEA

Os grupos foram tratados com 0,1 mL de DHEA; dissolvido em 0,05 mL etanol e igual volume de água destilada, sendo administrados por via subcutânea na dose de 40mg/kg/dia de DHEA (SANTOS et al., 2007), durante o período de experimentação, uma vez ao dia pela manhã obedecendo rigorosamente o mesmo horário de tratamento. A administração dos grupos infectados começou concomitante à infecção.

4.6. 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.

4.7. Eutanásia e Coleta de sangue

Os animais, anteriormente anestesiados com tribromoetanol 2,5%, foram mortos por decapitação. Após a morte, foi coletado cerca de 2,0 mL de sangue em tubo plástico contendo 200µL de heparina sódica (1ml: 5.000 U.I.), para

determinação da parasitemia. Para dosagens imunológicas foi coletado em frasco sem anticoagulante um volume de 2,0 mL de sangue para obtenção de soro.

4.8. Contagem de parasitas

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

4.9. Contagem de macrófagos peritoneais

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

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

A técnica de quantificação de óxido nítrico em sobrenadante foi realizada de acordo com DOST et al., 2006. No dia do ensaio, a cavidade intraperitoneal foi lavada com 5 mL de meio RPMI 1640 a 4°C, como descrito anteriormente. O lavado foi centrifugado em tubos Falcon durante 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 1 mL de RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 10µL que foi diluída em solução de Turk (990µL), para contagem das células viáveis (macrófagos). Depois de contadas em câmara de Neubauer, as concentrações foram acertadas para 5×10^6 cel/mL.

Foram distribuídos 100 µl desta suspensão com 5×10^6 cel/mL em placa de 96 poços, onde foram adicionados 100 µL de LPS (10 µg/mL) (*E. coli*, sorotipo 026:B6, Sigma, USA) para estimulação.

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

4.11. Dosagens de IL-12

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

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

As densidades ópticas (D.O.) das placas foram lidas em leitor de microplacas (Teccan, Modelo Sunrise - µQuant) em um comprimento de onda de

450 nm. O kit utilizado foi da empresa BIOSOURCE, Califórnia, U.S.A.: BIOSOURCE Immunoassay Kit Rat IL-12.

4.12. Dosagens de IFN- γ

Placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de anticorpo de captura purificado específico para IFN- γ , previamente preparado na diluição 1:250 em tampão de sensibilização. As placas foram incubadas “overnight” (16-20 h de incubação) à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas, por três vezes, com tampão de lavagem (PBS + Tween 20 0.05%) e as ligações não específicas foram bloqueadas com a adição de tampão de diluição (PBS com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) pH 7,0), seguindo de incubação por mais 1 hora em temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem, por três vezes. Para realização da curva, foram adicionados os padrões de citocina recombinante (2000 pg/mL) na quantidade de 100 μ L/poço, em duplicata, diluídos de forma seriada com tampão de diluição Tween (PBS Tween 0.05% com SBF 10% pH 7,0) nas concentrações de 2000 pg/mL a 0 pg/mL em 7 poços da placa, sendo que no oitavo poço adicionou-se somente o tampão para determinação do branco. Nos demais poços foram adicionados 100 μ L das amostras de soro. Incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e adicionado o anticorpo de detecção (anticorpos biotinilados anti-citocina) (18 μ g/mL). As placas foram novamente incubadas por mais 2 horas e em seguida lavadas por mais três vezes. A revelação enzimática foi feita pela adição de 100 μ L/poço de estreptavidina-peroxidase diluída em tampão de diluição Tween na proporção de 1:250 e posterior incubação de 1 hora a temperatura ambiente. As

placas foram lavadas por mais três vezes, sendo adicionado o substrato revelador (15mL TMB (Tetramethylbenzidine) + 15mL H₂O₂) nos poços. Incubou-se por mais 20 minutos, protegendo da luz e parando a reação com a adição de 50µL de H₂SO₄ 1M.

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

4.13. Técnica histopatológica e Análise do parasitismo tecidual

Em cada dia de experimento, 5 animais de cada grupo foram mortos, colhendo-se o coração. O órgão foi lavado em solução fisiológica, pesado em balança eletrônica (Mettler H10W), fixado em formaldeído a 10% tamponado e conservado em álcool 80%, sendo posteriormente, incluído em parafina.

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

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

4.14. Pesagem dos animais e órgãos

Antes da decapitação, os animais foram pesados e os órgãos imediatamente retirados após a morte e pesados em balança eletrônica (Mettler H10W) em todos os dias de experimento. Peso expresso em gramas.

4.15. Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância: One Way ANOVA e post-test de Bonferroni.

Resultados

5. Resultados

5.1. Parasitemia

Figura 1. Evolução da parasitemia em ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º e 21º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para todos os grupos de animais em cada dia de experimento n = 5.

** $p < 0.01$

ISHD vs I e ISH (7º dia após a infecção)

* $p < 0.05$

IOR vs I e ISH (7º dia após a infecção)

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

IORD vs I, ISH, IOR, ID e ISHD (7º dia após a infecção)

IORD vs I e ISH (14º dia após a infecção)

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

Durante o pico da parasitemia, o grupo orquiectomizado apresentou queda significativa no número de parasitas quando comparado aos grupos Controle e Sham.

Os grupos tratados com DHEA também apresentaram níveis parasitêmicos reduzidos quando comparados com os grupos não submetidos ao tratamento.

A administração de DHEA além de promover diminuição na parasitemia, também exerceu papel sinérgico a orquiectomia, tornando os animais castrados e submetidos ao tratamento mais resistentes à infecção apresentando o menor número de parasitas.

5.2. Peso Corpóreo

Tabela 1. Peso corpóreo de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante o pico de parasitemia (7º dia após o inoculo).

Grupos Experimentais	Número de animais	Peso corpóreo dos
		animais (g) (Média / CV¹)
C	05	502,2 / 10,2%
CSH	05	518,0 / 5,4%
COR	05	406,8 / 12,2%
CD	05	489,7 / 13,0%
CSHD	05	449,8 / 6,9%
CORD	05	399,7 / 12,8%
I	05	404,2 / 8,7%
ISH	05	476,8 / 4,7%
IOR	05	416,5 / 12,9%
ID	05	387,9 / 7,6%
ISHD	05	471,5 / 11,3%
IORD	05	406,2 / 11,8%

¹CV: Coeficiente de variação

Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD), $p > 0.05$.

Não houve alterações significativas no peso corpóreo dos animais de todos os grupos.

5.3. Peso dos Órgãos

5.3.1. Peso do Coração

Figura 2. Peso do coração de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção (pico da parasitemia para grupos infectados), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo experimental n = 5.

*** $p < 0.001$

I vs C, IOR e ID

ISH vs CSH, IOR, ID e ISHD

** $p < 0.01$

IOR vs COR e IORD

O peso cardíaco foi estatisticamente maior nos grupos infectados (I, ISH e IOR) em relação aos seus respectivos grupos controles (sem infecção). Entre os animais infectados, o grupo Orquiectomizado (IOR) e o grupo tratado com DHEA (ID) apresentaram peso cardíaco reduzido quando comparado aos grupos Infectado sem a cirurgia (I) e Sham (ISH).

Já a administração de DHEA em animais infectados e orquiectomizados induziu maior diminuição do peso cardíaco quando comparados aos animais orquiectomizados sem administração de DHEA.

5.3.2. Peso do Baço

Figura 3. Peso do baço de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia (pico da parasitemia para os grupos infectados), nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo experimental n = 5.

*** $p < 0.001$

ISH vs C e CSH

* $p < 0.05$

I vs C e CSH

IOR vs COR

O peso esplênico sofreu aumento significativo nos grupos infectados: I, ISH e IOR, em relação aos seus respectivos grupos controles. Entre os diferentes grupos de animais infectados não houve diferenças significativas.

5.3.3. Peso das Adrenais

Figura 4. Peso das adrenais de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, no 7º dia após a infecção (pico da parasitemia nos grupos infectados). Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD), Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo experimental $n = 5$, $p > 0.05$.

A orquiectomia não exerceu efeito significativo sobre o peso das adrenais.

5.4. Contagem global de macrófagos peritoneais

Tabela 2. Contagem global de macrófagos peritoneais em ratos *Wistar* machos controles (não infectados) e infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante os 7º, 14º e 21º dias de experimento.

Grupos Experimentais (n=5)	Macrófagos peritoneais/mm³ (Média ± DP¹)		
	7º dia	14º dia	21º dia
C	8200 ± 482	9300 ± 1575	8950 ± 4192
CSH	9750 ± 538	6850 ± 3955	6200 ± 818
COR	13250 ± 2208	13250 ± 5208	9650 ± 962
CD	11900 ± 3494	8000 ± 5181	7800 ± 4021
CSHD	9813 ± 427	10200 ± 837	9500 ± 1075
CORD	11800 ± 3518	14250 ± 3571	10650 ± 2309
I	22550 ± 2292	21000 ± 4991	17750 ± 2646
ISH	18350 ± 1653	20563 ± 6943	14500 ± 2332
IOR	33050 ± 3106 ^{**}	26563 ± 4602	21700 ± 4781
ID	27400 ± 3786 [*]	21250 ± 3742	21400 ± 2529
ISHD	22550 ± 4144	18300 ± 4672	20200 ± 3919
IORD	40700 ± 2136 ^{***}	28850 ± 4285	24800 ± 5152

¹DP: Desvio Padrão

Grupo Controle (**C**), Controle Sham (**CSH**), Controle Orquiectomizado (**COR**), Controle tratado com DHEA (**CD**), Controle Sham tratado com DHEA (**CSHD**), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (**CORD**), Infectado (**I**), Infectado Sham (**ISH**), Infectado Orquiectomizado (**IOR**), Infectado tratado com DHEA (**ID**), Infectado Sham tratado com DHEA (**ISHD**), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (**IORD**).

****p<0.001*

IORD vs I, ISH, ID e ISHD (7º dia após a infecção)

***p<0.01*

IOR vs I e ISH (7º dia após a infecção)

**p<0.05*

ID vs ISH (7º dia após a infecção)

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

Já entre os animais infectados, o grupo orquiectomizado apresentou valores estatisticamente mais elevados que os animais do grupo Controle Intacto e Sham, no sétimo dia após a infecção (pico da parasitemia).

Nos animais orquiectomizados, a administração de DHEA exerceu papel sinérgico à castração, pois o número de macrófagos foi estatisticamente mais elevado no grupo orquiectomizado e submetido ao tratamento com DHEA.

5.5. Dosagem de Óxido Nítrico

5.5.1. Grupos Controles (sem infecção)

Figura 5. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante 7º, 14º e 21º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

** $p < 0.01$

CORD vs C, CSH, COR e CD (com LPS / 21º dia)

Nos grupos controles (sem infecção), a orquiectomia e a administração concomitante de DHEA elevaram a produção de óxido nítrico por células estimuladas com LPS, em relação aos demais grupos, no 21º dia de experimento.

5.5.2. Grupos Infectados

Figura 6. Concentrações de NO (μM) a partir de células peritoniais estimuladas ou não com LPS ($10\mu\text{g/mL}$), coletadas de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante 7º, 14º e 21º dias após a infecção, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectados Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento $n = 5$.

*** $p < 0.001$

IOR vs I e ISH (sem LPS / 7º dia após a infecção)

IOR vs I e ISH (sem LPS / 14º dia após a infecção)

IORD vs I, ISH e IOR (sem LPS / 21º dia após a infecção)

** $p < 0.01$

IORD vs I e ISH (sem LPS / 14º dia após a infecção)

IORD vs I, ISH, IOR e ID (com LPS / 14º dia após a infecção)

IORD vs I, ISH, IOR, ID e ISHD (com LPS / 21º dia após a infecção)

* $p < 0.05$

IORD vs I e ISH (sem LPS / 7º dia após a infecção)

IORD vs I, ISH, IOR, ID e ISHD (com LPS / 7º dia após a infecção)

ID vs I (com LPS / 21º dia após a infecção)

Sem LPS: O grupo orquiectomizado apresentou concentrações de NO estatisticamente mais elevadas que os animais dos grupos Intacto e Sham, no 7º e 14º dia após o inóculo. A administração de DHEA exerceu papel sinérgico a orquiectomia provocando um aumento significativo na produção de óxido nítrico durante toda a fase aguda da infecção.

Com LPS: O grupo orquiectomizado e também submetido ao tratamento com DHEA apresentou níveis de NO estatisticamente mais elevados que os demais grupos, em todos os dias de experimentos.

5.6. Dosagem de IL-12

5.6.1. Grupos Controles

Figura 7. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante 7º, 14º e 21º dias de experimentos, nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção $n = 5$.

* $p < 0.05$

CORD vs C (14º dia)

No 14º dia de experimento, apenas o grupo controle orquiectomizado e tratado com DHEA (CORD) apresentou aumento nos níveis de IL-12, em relação ao grupo sem cirurgia e sem tratamento. Nos demais grupos não houve alterações significativas na produção de IL-12.

5.6.2. Grupos Infectados

Figura 8. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas no soro de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante 7º, 14º e 21º dias, nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção n = 5.

*** $p < 0.001$

I vs IOR, ID, ISHD e IORD (7º dia após a infecção)

IOR vs IORD (7º dia após a infecção)

IORD vs I e ISH (14º dia após a infecção)

** $p < 0.01$

IORD vs I, ISH e ISHD (21º dia após a infecção)

* $p < 0.05$

IOR vs I (14º dia após a infecção)

A orquiectomia por si provocou aumento das concentrações de IL-12 nos grupos submetidos à cirurgia, no 7º e 14º dia após o inóculo. A adição de DHEA promoveu uma ação sinérgica, onde níveis significativamente mais elevados de IL-12 puderam ser observados no grupo orquiectomizado e submetido à terapia com DHEA, em todos os dias de experimentos.

5.7. Dosagem de IFN- γ

5.7.1. Grupos Controles

Figura 9. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro ratos *Wistar* machos não infectados (controles) durante 7º, 14º e 21º dias nos seguintes grupos: Grupo Controle (C), Controle Sham (CSH), Controle Orquiectomizado (COR), Controle tratado com DHEA (CD), Controle Sham tratado com DHEA (CSHD), Controle Orquiectomizado tratado com DHEA (CORD). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção $n = 5$.

5.7.2. Grupos Infectados

Figura 10. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas no soro de ratos *Wistar* machos infectados i.p. com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante 7º, 14º e 21º dias após a infecção nos seguintes grupos: Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Sham tratado com DHEA (ISHD), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção n = 5.

* $p < 0.05$

IORD vs I e ISH (7º, 14º, 21º dias após a infecção)

Em todos os dias de experimentos, as concentrações mais elevadas de IFN- γ foram observadas nos animais orquiectomizados e tratados com DHEA (IORD), em relação aos animais intactos e Sham.

5.8. Parasitismo tecidual do Coração

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

<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Número de animais</i>	<i>Número de ninhos amastigotas (Média ± DP¹)</i>
I	05	37,0 ± 10,4
ISH	05	31,00 ± 9,1
IOR	05	26,00 ± 6,2*
ID	05	18,0 ± 8,2*
ISHD	05	14,00 ± 5,7*
IORD	05	9,00 ± 4,5

¹DP: Desvio Padrão

Infectado (I), Infectado Sham (ISH), Infectado Orquiectomizado (IOR), Infectado tratado com DHEA (ID), Infectado Orquiectomizado tratado com DHEA (IORD), Infectados Sham tratado com DHEA (ISHD). Para cada grupo experimental em cada dia de infecção n = 5.

* $p < 0.05$

IOR vs I, ISH e IORD

ID vs I

ISHD vs ISH

A administração de DHEA foi efetiva e reduziu o número de ninhos de amastigotas em todos os grupos. Além disso, a orquiectomia exerceu ação sinérgica ao tratamento com DHEA diminuindo, drasticamente, o parasitismo tecidual no grupo tratado e também submetido à cirurgia.

5.9. Histopatologia do Coração

5.9.1. Grupos Controles

Figura 11. Cortes histológicos (6μm) de corações de ratos *Wistar* machos não infectados (controles) colhidos no 14º dia de experimento, nos seguintes grupos: **A:** Grupo Controle, **B:** Controle Sham, **C:** Controle Orquiectomizado, **D:** Controle Tratado com DHEA, **E:** Controle Sham Tratado com DHEA, **F:** Controle Orquiectomizado Tratado com DHEA. Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

As fibras cardíacas dos animais pertencentes aos grupos controles apresentaram aspecto histológico normal, sem alterações teciduais.

5.9.2. Grupos Infectados

Figura 12. Cortes histológicos (6µm) de corações de ratos *Wistar* machos infectados i.p.com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* colhidos no 14º dia de experimento, nos seguintes grupos: **A:** Infectado, **B:** Infectado Sham, **C:** Infectado Orquiectomizado, **D:** Infectado Tratado com DHEA, **E:** Infectado Sham Tratado com DHEA, **F:** Infectado Orquiectomizado Tratado com DHEA. Coloração: hematoxilina-eosina (1000x).

Presença de grandes ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas de animais pertencentes aos grupos Infectado e Infectado Sham.

Porém, no grupo Infectado Orquiectomizado observou-se diminuição no tamanho dos ninhos de amastigotas presentes nas fibras cardíacas. Mesmo fato observado nos animais tratados com DHEA.

Os animais infectados submetidos à orquiectomia e também ao tratamento com DHEA apresentaram redução do número e tamanho dos ninhos de amastigotas em relação aos demais grupos.

Discussão

6. Discussão

O dimorfismo sexual representa um papel importante no direcionamento e evolução de distintas patogenias. Cada vez mais, surgem trabalhos científicos que comprovam a importância dos hormônios sexuais como testosterona e estrógenos no desenvolvimento e regulação da resposta imune, atuando diretamente sobre as células de defesa e seus mediadores como as citocinas (KLEIN, 2004).

De forma genérica as mulheres produzem resposta imune celular e humoral mais vigorosas do que os homens (BOUMAN, 2005), sendo mais resistentes às infecções causadas por diversos patógenos, como por exemplo, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania mexicana* e *Gardia lamblia*, apresentando porém algumas exceções, como *Toxoplasma gondii* e *Trichomonas vaginalis*, onde os homens são menos susceptíveis do que as mulheres (ROBERTS et al., 2001).

Em humanos, outro fator que deve ser considerado imprescindível na incidência e evolução da doença é o grau de exposição do hospedeiro ao parasita (BRABIN & BRABIN, 1992). Porém, sob condições laboratoriais, variações na suscetibilidade podem estar ligadas ao dimorfismo sexual (GROSSMAN, 1985; ROBERTS et al., 2001).

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes tipos de respostas imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (DUTRA et al., 1994).

A imunidade mediada por células é responsável pelo controle da fase aguda da infecção (TRISCHMANN, 1984), sendo a ativação de macrófagos por

citocinas derivadas dos linfócitos Th1 considerada o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasita (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

Alguns trabalhos já ressaltaram a importância dos hormônios sexuais na evolução da doença de Chagas. PRADO et al., 1998 observou que fêmeas de *Calomys callosus* infectadas com diferentes cepas de *T. cruzi* sempre mostraram menor parasitemia, quando comparadas aos perfis apresentados pelos machos.

Estudos pioneiros de PRADO et al., 1999 demonstraram que a gonadectomia em *C. callosus* machos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* causou drástica redução da parasitemia em comparação aos animais não castrados.

Essa diminuição no número de parasitas sanguíneos em animais orquiectomizados também foi observada em nossos experimentos. No sétimo dia após a infecção, ou seja, no pico parasitêmico, o grupo de animais castrados mostrou-se mais resistente, apresentando redução significativa na parasitemia quando comparado com os grupos não orquiectomizados (I) e Sham (ISH) (Figura 1).

Inúmeras pesquisas a respeito da relação entre sistema endócrino e imune demonstram que enquanto a testosterona exerce efeito imunossupressor (GROSSMAN, 1985; ALEXANDER & STIMSON, 1988; OLSEN & KOVACS, 1996; LINDSTROM et al., 2001), os estrógenos além de possuírem efeito positivo sobre a resposta imune específica e inespecífica, apresentam também propriedades antiinflamatórias e poderosa ação anti-oxidante, protegendo os tecidos de danos causados pelos radicais livres (SENER et al., 2005).

A análise de nossos dados confirma a ação supressora da testosterona sobre células de defesa do organismo. Os resultados obtidos na contagem global de

macrófagos peritoniais sugerem que a ausência do hormônio masculino, através da orquiectomia, proporcionou aumento no número dessas células quando comparados aos animais intactos e Sham (Tabela 2).

ST PIERRE et al., 1995 e ALIBERTI et al., 1999 afirmam que a resistência às infecções causadas por parasitas intracelulares está fortemente associada à ativação de macrófagos e posterior produção de óxido nítrico por essas células. Após a apresentação do antígeno por células específicas, os linfócitos Th (CD4+) e *natural killers* proliferam-se, liberando citocinas como o IFN- γ que agirá sobre os macrófagos ativando-os e resultando na expressão de enzimas óxido nítrico sintetase e conseqüente produção de óxido nítrico.

Nossos resultados comprovam essa afirmativa, pois os animais orquiectomizados, que demonstraram maior resistência à infecção por *T. cruzi* através da redução na parasitemia em relação aos animais intactos e sham, apresentaram também elevados níveis de IFN- γ e forte indução na produção de NO por macrófagos estimulados (Figura 6 e Figura 10).

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

Na avaliação das alterações cardíacas dos nossos grupos experimentais através da análise histopatológica e peso dos órgãos, observamos que os animais infectados e orquiectomizados além de apresentarem peso cardíaco reduzido (Figura 2), mostraram diminuição no número de ninhos amastigotas, que

também eram menores em tamanho quando comparados aos dos animais infectados não submetidos cirurgia e sham (Tabela 3 e Figura 12).

Os estudos sobre os efeitos imunológicos das doenças infecciosas, já deixaram bem evidenciado que durante a evolução dessas patologias, ocorrem várias mudanças tanto nas células sanguíneas como nos órgãos linfóides (SAVINO, 2006).

ABBAS et al. (2005), relataram que após infecção por um determinado agente, ocorre o processo de reconhecimento do antígeno pelas células imuno-competentes. Ocorre migração de linfócitos B ativados para as diferentes partes do baço, além da ativação de células plasmocitárias, induzindo a produção de anticorpos, resultando na hipertrofia do órgão devido a hiper-proliferação celular.

Nossos resultados referentes ao peso esplênico comprovam essa hiperplasia celular com conseqüente hipertrofia do órgão típica da fase aguda da doença de Chagas (PEREIRA et al., 2002). Todos os grupos infectados apresentaram um aumento significativo no peso esplênico quando comparados aos grupos não infectados (Figura 3).

O desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* envolve interações complexas entre o microorganismo e o hospedeiro e ocasiona um desequilíbrio da resposta imune. Trabalhos pioneiros no nosso laboratório já comprovaram que a administração de uma substância imunoestimulatória, como o DHEA, durante a fase aguda da doença aprimora as funções imunes do hospedeiro e resulta em maior resistência contra o parasita, diminuindo o desequilíbrio causado pela infecção.

SANTOS et al., 2005 e SANTOS et al., 2007, relataram que o tratamento de ratos *Wistar* com doses diárias de DHEA durante a infecção aguda

por *T. cruzi* ocasiona redução do parasitismo sanguíneo e tecidual, além estimular alguns parâmetros da resposta imune.

Durante os nossos experimentos, além da ação da orquiectomia, analisamos também os efeitos imunoestimulatórios do DHEA (dehidroepiandrosterona) na evolução da doença de Chagas experimental. E os resultados obtidos foram compatíveis com os trabalhos anteriores. Nos animais infectados tratados com DHEA houve redução da carga parasitária sanguínea e cardíaca, quando comparados aos animais não tratados, o que resultou em diminuição das lesões teciduais e menor hipertrofia do órgão (Figura 1, Tabela 3 e Figura 12).

Além disso, observamos que nos animais submetidos ao tratamento com DHEA houve exacerbação de alguns fatores ligados a resposta imune do hospedeiro, como a produção de citocinas, entre elas a IL-12 (Figura 8), principal indutora de células Th1 (ABBAS et al, 2005) e o IFN- γ (Figura 10), responsável pela ativação de macrófagos. O número de macrófagos peritoneais (Tabela 2) e a produção de óxido nítrico (Figura 6) também foram maiores nos animais submetidos ao tratamento em relação aos animais não tratados.

A ação sinérgica observada entre a orquiectomia e a adição de DHEA é um dado inédito e pela primeira vez pode ser comprovada em todos os parâmetros analisados tais como redução da parasitemia sanguínea e tecidual, além de fatores imunológicos como aumento nas concentrações de NO, IFN- γ , IL-12 e número de macrófagos.

Dessa forma, a ausência de testosterona foi marcante no destino da infecção, afinal a orquiectomia levou os animais a um estado de maior resistência a

T. cruzi, ficando a cargo do DHEA a exacerbação dos fenômenos imuno-estimulatórios, que também colaboraram com o controle da replicação parasitária.

Conclusão

7. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as ações inerentes à orquiectomia acrescidas à associação da administração de DHEA promoveram um direcionamento efetivo na resposta imune do hospedeiro, através da indução de uma resposta Th1 que resultou em significativa redução da parasitemia sanguínea, consequentemente minimizando as alterações patológicas teciduais reveladas pela presença de número reduzido de ninhos de amastigotas.

Além disso, os dados nos revelaram que o tratamento com DHEA em ratos orquiectomizados causou modificações da resposta imune durante o curso da infecção por *T. cruzi*, avaliadas através do aumento significativo das concentrações de óxido nítrico, IL-12 e IFN- γ . Esses fatores ocasionaram a efetividade da resposta imune do hospedeiro contra as manifestações patológicas da fase aguda da infecção experimental.

Através da análise dos resultados pode-se inferir que a modulação da resposta imune do hospedeiro está diretamente envolvida com a ação do sistema endócrino e nesse caso, a testosterona exerceu papel decisivo na evolução da fase aguda da doença de Chagas experimental.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

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

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

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

ALCINA, A.; FRESNO, M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 9, p.175-186, 1987.

ALEXANDER, J.; STIMSON, W.H. Sex hormones and the course of parasitic infection. **Parasitology Today**, v. 4, p. 189-193, 1988.

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

ALIBERTI, J.C.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. beta-Chemokines enhance parasite uptake

and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4819-4826, 1999.

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

ANON. (1991). Reunião de Ministros da Saúde do MERCOSUL, Brasília, Junho 1991, Resolução 04-3-CS. Montevideu: Mercado Comum do Sul.

AOKI, K.; TANIGUCHI, H.; ITO, Y.; SATOH, S.; NAKAMURA, S.; MURAMATSU, K.; YAMASHITA, R.; ITO, S.; MORI, Y.; SEKIHARA, H. Dehydroepiandrosterone decreases elevated hepatic glucose production in C57BL/KsJ-db/db mice. **Life Sciences**, v. 74, p. 3075-3084, 2004.

AUGER, S.; STORINO, R.; IGLESIAS ORDOÑEZ, O.; URRUTIA, M.I.; SANMARTINO, M.; ROMERO, D.; JÖRG, M. Emergencies in patients with Chagas' disease in Buenos Aires city, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 609-616, 2002.

BÁCSI, K.; KÓSA, J.; LAZÁRY, A.; HORVÁTH, H.; BALLA, B.; LAKATOS, P.; SPEER, G. Significance of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in different diseases. **Orvosi Hetilap**, v. 148, p.651-657, 2007.

BAULIEU, E.E. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.81, p.3147-3151, 1996.

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

BENTEN, W.P.; LIEBERHERR, M.; GIESE, G.; WREHLKE, C.; STAMM, O.; SEKERIS, C.E.; MOSSMANN, H.; WUNDERLICH, F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 123-133, 1999a.

BENTEN, W.P.; LIEBERHERR, M.; STAMM, O.; WREHLKE, C.; GUO, Z.; WUNDERLICH, F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 3113-3123, 1999b.

BENTEN, W.P.; GUO, Z.; KRÜCKEN, J.; WUNDERLICH, F. Rapid effects of androgens in macrophages. **Steroids**, v. 69, p. 585-590, 2004.

BERGERON, M.; OLIVIER, M. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. **Journal of Immunology**, v. 177, p.6271-6280, 2006.

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

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

BORGES, M.M.; CURI, P.R.; KLOETZEL, J.K. Modulation of parasitemia and antibody response to *Trypanosoma cruzi* by cyclophosphamide in *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 1-8, 1992b.

BOUDARENE, M.; LEGROS, J.J.; TIMSIT-BERTHIER, M. Study of the stress response: role of anxiety, cortisol and DHEAs. **L'Encéphale**, v. 28, p.139-146, 2002.

BOUMAN, A.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v.11, p. 411-423, 2005.

BRABIN, L.; BRABIN, B.J. Parasitic infections in women and their consequences. **Advances in Parasitology**, v.31, p.1-81, 1992.

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

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p. 220-224, 1963.

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

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

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

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

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

CAMPOS, M.A.; GAZZINELLI, R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. **Mediators of Inflammation**, v. 13, p. 139-143, 2004.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p.128-374, 1996.

CARDONI, R.L.; ANTÚNEZ, M.I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Mediators of Inflammation**, v. 13. p. 235-240, 2004.

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

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

CHAGAS, E. Infection expérimental de l'home par le *Trypanosoma cruzi*. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v.115, p.1339-1341, 1933.

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

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

CRAWFORD, R.M.; LEIBY, D.A.; GREEN, S.J.; NACY, C.A.; FORTIER, A.H.; MELTZER, M.S. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. **Immunology Series**, v. 60, p. 29-46, 1994.

CUNHA-NETO, E.; BILATE, A.M.; HYLAND, K.V.; FONSECA, S.G.; KALIL, J.; ENGMAN, D.M. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, v. 39, p. 41-54, 2006.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; CAPELLINO, S.; VILLAGGIO, B.; MONTAGNA, P.; SERIOLO, B.; STRAUB, R.H. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. **Lupus**, v.13, p.635-638, 2004.

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

DA SILVA, J.A.P. Sex hormones and glucocorticoids: Interactions with the immune system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, p.102-118, 1999.

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

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

DIAS, J.C.P. Natural history of Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 65, p. 359-366, 1995.

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

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

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

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JÚNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; PARRA, J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **International Immunology**, v. 6, p.499-506, 1994.

EIDINGER, D.; GARRETT, T.J. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.136, p.1098-1116, 1972.

FAAS, M.; BOUMAN, A.; MOES, H.; HEINEMAN, M.J.; DE LEIJ, L. & SCHUILING, G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? **Fertility and Sterility**, v.74, p.1008-1013, 2000.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 443-457, 2002.

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

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

GARCIA E.S.; DVORAK, J.A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, p.259-262, 1982.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Treatment with

Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1521-1528, 2005.

GASCÓN, J.; ALBAJAR, P.; CAÑAS, E.; FLORES, M.; GÓMEZ I PRAT, J.; HERRERA, R.N.; LAFUENTE, C.A.; LUCIARDI, H.L.; MONCAYO, A.; MOLINA, L.; MUÑOZ, J.; PUENTE, S.; SANZ, G.; TREVIÑO, B.; SERGIO-SALLES, X. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Revista Española de Cardiología**, v.60, p. 285-293, 2007.

GATTASS, C.R.; LIMA, M.T.; NOBREGA, A.F.; BARCINSKI, M.A.; DOS REIS, G.A. Do Self-Heart-Reactive T Cells Expand in *Trypanosoma cruzi*-Immune Hosts? **Infection and Immunity**, v. 56. p. 1402-1405, 1998.

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 growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v.22, p. 2501-2506, 1992.

GIRONÈS, N.; CARRASCO-MARIN, E.; CUERVO, H.; GUERRERO, N.A.; SANOJA, C.; JOHN, S.; FLORES-HERRÁEZ, R.; FERNÁNDEZ-PRIETO, L.; CHICO-CALERO, I.; SALGADO, H.; CARRIÓN, J.; FRESNO, M. Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1107, p. 434-444, 2007.

GROSSMAN, C.J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. **Science**, v.227, p.257-261, 1985.

GOURDY, P.; ARAUJO, L.M.; ZHU, R.; GARMY-SUSINI, B.; DIEM, S.; LAURELL, H.; LEITE-DE-MORAES, M.; DY, M.; ARNAL, J.F.; BAYARD, F.; HERBELIN, A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. **Blood**, v. 105, p. 2415-2420, 2005.

HAJSZAN, T.; MACLUSKY N.J.; LERANTH, C. Dehydroepiandrosterone increases Hippocampal Spine Synapse Density in ovariectomized female rats. **Endocrinology**, v.145, p. 1042-1045, 2004.

HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 197-204, 2000.

HRUBY, Z.; BECK K.F. Cytotoxic effect of autocrine and macrophages – derived nitrite oxide on cultured rat mesangial cell. **Clinical and Experimental Immunology**, v.107, p.79-82, 1997.

HYLAND, K.V.; ENGMAN, D.M. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 101-102, 2006.

JENSEN, E.V. Steroid hormones, receptors, and antagonists. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 748, p. 1-17, 1996.

KANDA, N.; TSUCHIDA, T.; TAMAKI, K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.106, p. 410-415, 1996.

KANDA, N.; TAMAKI, K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.103, p.282-288, 1999.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 513-516, 2005.

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

KUMAR, S.; TARLETON, R.L. Antigen-Specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 4596-4603, 2001.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; LABRIE, C.; BÉLANGER, A.; SIMARD, J.; LIN, S.X.; PELLETIER, G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. **Endocrine Reviews**, v. 24, p. 152-182, 2003.

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

LINDSTRÖM, K.M.; KRAKOWER, D.; LUNDSTRÖM, J.O.; SILVERIN, B. The effects of testosterone on a viral infection in greenfinches (*Carduelis chloris*): an experimental test of the immunocompetence-handicap hypothesis. **Proceedings. Biological sciences (The Royal Society)**, v. 268, p. 207-211, 2001.

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

MARCACCINI, A.; LÓPEZ-PEÑA, M.; BERMÚDEZ, R.; QUIROGA, M.I.; GUERRERO, F.H.; NIETO, J.M.; ALEMAÑ, N. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. **Veterinary Microbiology**, Jun 13, 2007.

MCMURRAY, R.W.; SUWANNARO. S.; NDEBELE, K.; JENKINS, J.K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. **Pathobiology**, v. 69, p. 44-58, 2001.

MELNIKOV, V.G.; VELASCO, F.F.; ESPINOZA GÓMEZ, F.; RODRÍGUEZ, F.G.; DOBROVINSKAYA, O.R. Pathologic changes in lungs caused by Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, p. 301-306, 2005.

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

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N.M.; ROCHA, C.D.; VIEIRA, L.Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R.T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Journal of Pathology**, v. 159, p. 1723-1733, 2001.

MILES, A.M.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 217-225, 1977.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 74, p.221-237, 1980.

MILLER, G.E.; COHEN, S.; RITCHEY, A.K. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. **Health Psychology**, v. 21, p.531-541, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology of Nitric Oxide. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p.109-242, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **The FASEB Journal**, v. 9, p.1319, 1995.

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

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

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

MOREL, C.M.; CHIARI, E.; PLESSMANN CAMARGO, E.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal**. v. 6, p.3051-3064, 1992.

NORDMARK, G.; BENGTSSON, C.; LARSSON, A.; KARLSSON, F.A.; STURFELT, G.; RÖNNBLUM, L. Effects of dehydroepiandrosterone supplement on health-related quality of life in glucocorticoid treated female patients with systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 38, p.531-540, 2005.

OLSEN, N.J.; KOVACS, W.J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrine reviews**, v. 17, p. 369-384, 1996.

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

PAGE, S.T.; PLYMATE, S.R.; BREMNER, W.J.; MATSUMOTO, A.M.; HESS, D.L.; LIN, D.W.; AMORY, J.K.; NELSON, P.S.; WU, J.D. Effect of medical castration on CD4+CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN- γ expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 290, p. 856-863, 2006.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A.B.; OLIVEIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Interleukin 4 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in eosinophils. **Cytokine**, v. 30, p. 116-124, 2005.

PALOMINO, S.A.; AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 94, p.571-579, 2000.

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

PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, D.B.; CASTRO, E.C.; DOS REIS, M.A.; TEIXEIRA VDE, P. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas'disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 401-403, 2002.

PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA-PONS, F. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. **European Journal of Immunology**, v. 14, p.903-905, 1984.

PLATA, F.; GARCIA-PONS, WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Annales de l'Institut Pasteur. Immunology**, v. 138, p.397-415, 1987.

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

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

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

RABKIN, J.G.; MCELHINEY, M.C.; RABKIN, R.; MCGRATH, P.J.; FERRANDO, S.J. Placebo-controlled trial of dehydroepiandrosterone (DHEA) for treatment of nonmajor

depression in patients with HIV/AIDS. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, p.59-66, 2006.

RABIJEWSKI, M.; ZGLICZYŃSKI, W. Positive effects of DHEA therapy on insulin resistance and lipids in men with angiographically verified coronary heart disease--preliminary study. **Endokrynologia Polska**, v. 56, p.904-910, 2005.

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

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

RAVEN, P.W.; HINSON, J.P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and the menopause: an update. **Menopause International**, v.13, p. 75-78, 2007.

REYES, J.L.; TERRAZAS, L.I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMEZ-GARCÍA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A.R.; RODRÍGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3170-3179, 2006.

ROBERTS, W.C.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p.476-488, 2001.

RODRIGUEZ, A.; MULLER, D.C.; METTER, E.J.; MAGGIO, M.; HARMAN, S.M.; BLACKMAN, M.R.; ANDRES, R. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, jun 26, 2007.

RODRÍGUEZ-BONFANTE, C.; AMARO, A.; GARCÍA, M.; MEJÍAS WOHLERT, L.E.; GUILLEN, P.; ANTONIO GARCÍA, R.; ALVAREZ, N.; DÍAZ, M.; CÁRDENAS, E.; CASTILLO, S.; BONFANTE-GARRIDO, R.; BONFANTE-CABARCAS, R. Epidemiology of Chagas disease in Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: triatomine infestation and human seroprevalence. **Cadernos de saúde pública**, v.23, p. 1133-1140, 2007.

ROOK, G.A. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. **Current molecular medicine**, v. 7, p. 327-337, 2007.

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

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SAKAKURA, Y.; NAKAGAWA, Y.; OHZEKI, T. Differential effect of DHEA on mitogen-induced proliferation of T and B lymphocytes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, p.115-120, 2006.

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

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

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PLoS pathogens**, v.2, p.e62, 2006.

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

SCHUSTER, J.P.; SCHAUB, G.A. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. **Parasitology Research**, v. 87, p. 994-1000, 2001.

SEIKI, K.; SAKABE, K. Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. **Archives of Histology and Cytology**, v. 60, p. 29-38, 1997.

SENER, G.; ARBAK, S.; KURTARAN, P.; GEDIK, N.; YEGENS, B.C. Estrogen protects the liver and intestines against sepsis-induced injury in rats. **The Journal of Surgical Research**, v. 128, p. 70-78. 2005.

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

SILVER, R.M.; BRANCH, D.W. Autoimmune disease in pregnancy-Systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. **Clinics in Perinatology**, v. 24, p. 291-322, 1997.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p.395-398, 1993.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p.141-152, 1996.

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

STOMATI, M.; MONTELEONE, P.; CASAROSA, E.; QUIRICI, B.; PUC CETTI, S.; BERNARDI, F.; GENAZZANI, A.D.; ROVATI, L.; LUISI, M.; GENAZZANI, A.R. Six-

month oral dehydroepiandrosterone supplementation in early and late postmenopause. **Gynecological Endocrinology**, v. 14, p. 342-363, 2000.

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

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

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 400-419, 1992.

TANRIVERDI, F.; SILVEIRA, L.F.; MACCOLL, G.S.; BOULOUX, P.M. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. **The Journal of Endocrinology**, v. 176, p.293-304, 2003.

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

TEIXEIRA, A.R.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TERENZI, F.; DIAZ-GUERRA, M.J.M.; CASADO, M.; HORTERLANO, S.; LEONI, S.; BOSCA, L. Bacterial Lipopeptides Induce Nitric Oxide Synthase and promote apoptosis through Nitric Oxide-independent pathways in rat macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.6017-6021, 1995.

TOLEDO, M.J.O.; BAHIA, M.T.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ALVES, C.F.; MARTINS, H.R.; CRUZ, R.E.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1045-1053, 2004.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIBERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Immunology**, v. 146, p.3626-3632, 1991.

TRISCHMANN, T.M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Parasite Immunology**, v. 6, p.561-570, 1984.

TRUJILLO J.A.; RIVERA I.M.; RODRÍGUEZ, M.S.; TERRAZAS, L.I. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1341-1350, 2007.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C. Chagas disease in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p.7-12, 2000.

VIVEROS-PAREDES, J.M.; PUEBLA-PÉREZ, A.M.; GUTIÉRREZ-CORONADO, O.; SANDOVAL-RAMÍREZ, L.; VILLASEÑOR-GARCÍA, M.M. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 774-781, 2006.

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

YAMASHITA, R.; SAITO, T.; SATOH, S.; AOKI, K.; KABURAGI, Y.; SEKIHARA, H. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. **Endocrine Journal**, v. 52, p.727-733, 2005.

WALSH, C.J.; STUCKEY, J.E.; COX, H.; SMITH, B.; FUNKE, C.; STOTT, J.; COLLE, C.; GASPARD, J.; MANIRE, C.A. Production of nitric oxide by peripheral blood mononuclear cells from the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 199-209, 2007.

WANG, H.; WANG, Z.; CHEN, J.; WU, J. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1027-1035, 2007.

WEETMAN, A.P.; MCGREGOR, A.M.; SMITH, B.R.; HALL, R. Sex hormones enhance immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 3, p.343-346, 1981.

WEINSTEIN, Y.; RAN, S.; SEGAL, S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 656-661, 1984.

WHITACRE, C.C. Sex differences in autoimmune disease. **Nature Immunology**, v. 2, p. 777-780, 2001.

WONG, J.M.; BILLIAR, T.R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p.155-170, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Technical Report Series No. 905. Geneva: WHO.

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

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

ZINGALES, B.; PEREIRA, M.E.; ALMEIDA, K.A.; UMEZAWA, E.S.; NEHME, N.S.; OLIVEIRA, R.P.; MACEDO, A.; SOUTO, R.P. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener-the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 811-814, 1997.

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.105-112, 1998.