UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO
PRETO

**Avaliação do tratamento com dehidroepiandrosterona em
ratos Wistar machos e fêmeas durante a infecção chagásica
experimental**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Doutor em
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Carla Domingues dos Santos Sponchiado

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado
Júnior

Ribeirão Preto

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Carla Domingues

Avaliação do tratamento com dehidroepiandrosterona em ratos Wistar machos e fêmeas durante a infecção chagásica experimental, 2007.

109p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Prado Jr, José Clóvis.

1. Dehidroepiandrosterona. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. ratos Wistar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla Domingues dos Santos Sponchiado

Avaliação do tratamento com dehidroepiandrosterona em ratos *Wistar* machos e fêmeas durante a infecção chagásica experimental.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor 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. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

É inegável a importância da experimentação animal no desenvolvimento das ciências biomédicas, importância essa devida aos extraordinários benefícios para a saúde humana e animal . Sem o uso de animais de laboratório na experimentação, seria impossível atingir os conhecimentos obtidos nesses dois últimos séculos. Mas é muito importante salientar que ele só deve ser levado a efeito dentro de condições absolutamente definidas, com toda a segurança, rigor ético e respeito aos animais utilizados. Aos animais de laboratório que inocetentemente serviram à ciência para que eu pudesse realizar este trabalho, minha gratidão e respeito hoje e sempre...

Obrigado senhor!

Obrigada senhor por mais um dia...

Obrigada pela força e paz que me faz sentir grande...

*Obrigada por ter me confortado nas horas difíceis... e ter me dado
saúde... para que eu conseguisse cumprir minhas obrigações...!*

*Obrigada pelas compreensões que encontrei...pelos ganhos... e
perdas..., que me ensinaram o caminho da vida...!*

Obrigada senhor, jamais esquecerei de ti.

Filhos

É muito difícil descrever os sentimentos, porque são muito intensos. Muita coisa mudou em minha vida desde o dia que soube que cada um de vocês estavam fazendo parte de minha vida. Foram e são meses de espera, de ansiedade para poder ver meus queridos filhos. Conversava com vocês, cantava e canto para vocês e não via e vejo a hora de tê-los nos meus braços.

Quando essa hora chegou e chegar, foi e será uma emoção única, divina, uma felicidade infinita; poder olhar para cada um de vocês, tocar, beijar, ver

suas mãozinhas, seus pezinhos... Vocês trouxeram muita felicidade, luz, ternura, carinho, amor para mim.

Que Deus me ilumine para poder dar o melhor de mim à vocês e que Deus os iluminem, e os acompanhe pelo caminho do bem...

Enzo e Enry...

Amo vocês

Mamãe.

Dedico este trabalho....

À minha família querida,

meu pai Alfredo Magrini dos Santos

minha mãe Marilda Garcia dos Santos

minhas irmãs Kevelyn e Kivia Domingues dos Santos

Dedico à vocês mais esta conquista por tudo que vocês fazem e tem feito

por mim, a todos os momentos em que vocês estiveram, presentes,

quando eu precisei, por todos os sacrifícios pessoais que fizeram por mim

e por todo o suporte que sempre me deram dedico principalmente a

vocês, para demonstrar o quanto vocês são especiais para mim e o

quanto eu amo

e sempre tcarei todos vocês.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior.

Sete anos de amizade, confiança, muito trabalho, algumas dificuldades mas as alegrias e produtividade superaram tudo (Especialização, Mestrado e Doutorado) se puder continuar neste caminho quero continuar contando sempre com sua presença e carinho. Que Deus sempre o abençoe e te de muita saúde!

A minha maior colaboradora: Míriam Paula Alonso Toldó.

Você foi e sempre será para mim fundamental, me apoiando tanto na vida pessoal como na profissional, obrigada por tudo pelas broncas e elogios que só me fizeram crescer nestes anos de trabalho.

Aos colaboradores:

- Prof. Dr. David Peabody (University of New Mexico- Albuquerque EUA)
- Prof. Dr. Sérgio Zucoloto (Departamento de Patologia, FMRP-USP)
- Dr. Antonio Marcos Aparecido Levy (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia)
- Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura (Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP)

Aos docentes de Parasitologia da FCFRP-USP:

- Sérgio de Albuquerque
 - Ana Amélia Carraro Abrahão
-
-

Aos funcionários da Universidade de São Paulo:

- Georgius Luiz de Oliveira
- Antônia Ferreira da Cruz
- Wânia Tavares
- Fabiana Rosseto de Moraes
- Laura Midori Kawasse

A todos os colegas de pós graduação em especial:

- Adriana Monte Cassiano Canavaci
- Fabícia Helena Santello
- Leony Cristina Caetano
- Marina Del Vechio Filipin
- Vânia Brazão

Aos funcionários da pós-graduação da FCFRP-USP:

- Ana Lucia Turatti
- Rosana F. L. S. Florêncio
- Carlos Armando

*A FAPESP, pela concessão do auxílio à pesquisa (03/06332-3) e a CAPES
pela concessão da bolsa de doutorado.*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturasi

Lista de Figuras

.....ii **Lista de**

Tabelasiii

Resumo

.....iv

Abstract

.....v

1. INTRODUÇÃO

.....01

1.1. Doença de Chagas

.....

1.2. Imunologia da Doença de Chagas

.....

1.3. Citometria de fluxo

.....

1.4. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

.....

1.5. Dimorfismo sexual e infecção

.....

2. JUSTIFICATIVA

.....01

3. OBJETIVOS

.....01

4. MATERIAL E MÉTODOS

.....01

4.1. Animais utilizados

4.2. Grupos experimentais

4.3. Dias de experimento	
4.4. Pesagem de animais e órgãos	
4.5. Parasitas	
4.6. Infecção ou Simulação	
4.7. Suplementação com DHEA	
4.8. Morte dos animais	
4.9. Coleta de sangue	
4.10. Contagem celular de macrófagos	
4.11. Pesquisa de anticorpos líticos	
4.12. Análise fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo	
4.13. Quantificação de óxido nítrico	
4.14. Linfoproliferação de esplenócitos	
4.15. Ensaio Imunológico	
4.15.1. Dosagens de TGF β	
4.15.2. Dosagens de IL10	
4.15.3. Dosagens de IL4	
4.15.4. Dosagens de TNF α	
4.15.5. Dosagens de IFN γ	
4.15.6. Dosagens de IL-2 e IL12	
4.16. Dosagens bioquímicas	
4.17. Técnica histológica	
4.18. Intensidade de parasitismo tecidual	
4.19. Taxa de mortalidade dos animais	

4.20. Forma de análise dos resultados

5. RESULTADOS01

5.1. Taxa de mortalidade dos animais

5.2. Peso dos animais

5.3. Peso do coração

5.4. Peso do baço

5.5. Peso das adrenais

5.6. Parasitemia

5.7. Contagem global de leucócitos

5.8. Contagem global de macrófagos peritoniais

5.9. Anticorpo lítico

5.10. Óxido nítrico

5.11. Linfoproliferação

5.12. Citometria de fluxo

5.13. Análise de IL-2

5.14. Análise de IL-12

5.15. Análise de IL-4

5.16. Análise de IL-10

5.17. Análise de IFN- γ

5.18. Análise de TNF- α

5.19. Análise de TGF- β

5.20. Dosagens Bioquímicas

5.21. Análise histopatológica do coração macho

5.22. Análise histopatológica do coração fêmea

5.23. Parasitismo tecidual do coração

5.24. Análise histopatológica da adrenal

5.25. Parasitismo tecidual da adrenal

5.26. Análise histopatológica do baço

5.27. Parasitismo tecidual do baço

6. DISCUSSÃO01

7. CONCLUSÃO01

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....01

ANEXOS.....

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

ANEXO D

ANEXO E

ANEXO F

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Cluster of Differentiation
CONA	Concanavalina A
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDI	Fêmeas com suplementação de DHEA e infectadas
FDNI	Fêmeas com suplementação de DHEA e não infectadas
FSDI	Fêmeas sem suplementação de DHEA e infectadas
FSDNI	Fêmeas sem suplementação de DHEA e não infectadas
FITC	Fluorescein isotiocianate
IL-	Interleucina 1
IFN-γ	Interferon-Gama
LPS	Lipopolissacarídeos
MDI	Machos com suplementação de DHEA e infectados
MDNI	Machos com suplementação de DHEA e não infectados
MSDI	Machos sem suplementação de DHEA e infectados

MSDNI	Machos sem suplementação de DHEA e não infectados
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	“Natural Killer”
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato
PE	r- phicoeritrin
PerCP	Peridin Clorofil Protein
RPMI	Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)
SBF	Soro Bovino Fetal
TMB	Tetramethylbenzidine
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
Th-	T helper-
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parasitemia.....	42
Figura 2 – Contagem global de leucócitos.....	43
Figura 3 - Contagem global de macrófagos peritoniais.....	44
Figura 4 - Anticorpo lítico.....	45
Figura 5 – Óxido nítrico.....	46
Figura 6 – Óxido nítrico.....	47
Figura 8 - Linfoproliferação de esplenócitos.....	48
Figura 9 - Linfoproliferação de esplenócitos.....	49
Figura 10 – Citometria de fluxo.CD3+.....	50
Figura 11 – Citometria de fluxo CD4+.....	51
Figura 12 – Citometria de fluxo CD5+.....	52
Figura 13 – IL-2.....	53
Figura 14 – IL-12.....	54
Figura 15 – IL-4.....	55

Figura 16 – IL-10	56
Figura 17 – IFN-γ	57
Figura 18 – TNF-α	58
Figura 19 – TGF-β	59
Figura 20 - Análise histológica do coração MSDNI	61
Figura 21 - Análise histológica do coração MSDI e MDI	62
Figura 22 - Análise histológica do coração FSDI e FDI	63
Figura 23 - Análise histológica da adrenal	65
Figura 24 - Análise histológica do baço MSDI e MDI	67
Figura 25 - Análise histológica do baço FSDI e FDI	68

LISTA DE TABELAS

iii

Tabela 1 - Peso dos Animais.....	38
Tabela 2 - Peso do Coração.....	39
Tabela 3 - Peso do Baço.....	40
Tabela 4 - Peso das Adrenais.....	41
Tabela 5 - Dosagens Bioquímicas.....	60
Tabela 6 - Parasitismo do coração	64
Tabela 7 - Intensidade parasitária da adrenal.....	66

RESUMO

SANTOS, CARLA DOMINGUES. **Avaliação do tratamento com dehidroepiandrosterona em ratos Wistar machos e fêmeas durante a infecção chagásica experimental. 2007.** 109p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A dehidroepiandrosterona (DHEA) tem sido considerada como o esteróide de múltiplas ações e vem interessando pesquisadores da área médica. Trabalhos demonstram a estimulação imunológica induzida pelo DHEA em animais de laboratório e humanos, como terapia alternativa e imunomoestimuladora nas infecções virais, bacterianas e parasitárias. O presente projeto avaliou os efeitos terapêuticos da administração de DHEA em ratos *Wistar* machos e fêmeas infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção chagásica. Os parâmetros analisados foram o número de parasitas sangüíneos e teciduais, bem como produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-10, IL-4 e TGF- β) e populações celulares (CD3+, CD4+ e CD8+), análise de glicose, colesterol e triglicérides, produção de anticorpos líticos, óxido nítrico, contagem global de leucócitos e macrófagos. Através dos resultados obtidos podemos concluir que o DHEA quando utilizado como tratamento na infecção chagásica experimental é parcialmente eficaz, pois reduz o número de parasitas sangüíneos e teciduais em ratos machos e fêmeas. Os diferentes parâmetros imunológicos analisados na vigência da terapia com DHEA revelou uma ação parcialmente efetiva sobre a resposta imunológica, o que favoreceu o controle da evolução da fase aguda da infecção experimental, deve ser levado em conta que a utilização deste hormônio não assume caráter curativo, apenas propicia melhores condições ao hospedeiro de direcionar sua resposta imunológica de forma a controlar a replicação parasitária, sem causar no hospedeiro os efeitos colaterais danosos ocasionados pelas drogas tripanossomicidas disponíveis atualmente no mercado.

ABSTRACT

SANTOS, CARLA DOMINGUES. **Evaluation of the treatment with dehydroepiandrosterone in males and females Wistar rats during experimental Chagas' disease.** 2007. 109p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) has been considered for many researchers as the steroid of multiple functions. The immunologic stimulation triggered by DHEA has been demonstrated not only in animal models but also in humans. DHEA has been used as an alternative therapy to up-modulate immune response in host bearing viral, bacterial and parasitic infections. The present work evaluate the therapeutic effects of DHEA administration in male and female Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi* during the acute phase of infection. The evaluated parameters were the blood and tecidual parasitic intensity, cytokines and cellular population, glucose analysis, cholesterol and triglycerides, percentage of lytic antibodies, nitric oxide, global counting of leukocytes and macrophages. DHEA, when used as a treatment of experimental *T. cruzi* infection is efficient; reducing the number of blood and tissue parasites of both genders. The therapy with DHEA demonstrated cellular and humoral immune stimulation for the control of the evolution of the acute phase. It has to be emphasized that DHEA therapy is not curative, but improves to the host immunological response to control the parasitic burden, without the harmful collateral effects caused by the available *T. cruzi* drugs in the market.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A tripanossomíase americana é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano, tornando-se desta maneira uma enfermidade de grande importância na América Latina. Segundo a Organização Mundial de Saúde existem cerca 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas, dos quais aproximadamente 6 milhões encontram-se no Brasil e 100 milhões constituem a população de risco; dos infectados cerca de 20.000 morrem a cada ano (WHO, 2002).

Distribuída pelas Américas, desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos, a doença de Chagas atinge principalmente as populações rurais pobres. A importância dessa endemia se reflete no sentido econômico onde é responsabilizada pelas taxas de aposentadoria precoce como consequência direta da doença (WHO, 2002).

Ilustração1. Distribuição mundial da doença de Chagas

A doença de Chagas é um exemplo típico de uma injúria orgânica resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente, de más condições econômicas e sociais que influenciam fortemente a distribuição social dessa parasitose na medida em que ocorrem deficiências na qualidade de vida do homem no tocante à saúde e a educação, perpetuando os ciclos de pobreza e enfermidade (VINHAES & DIAS, 2000).

A doença de Chagas é assim denominada em homenagem ao médico e pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz, Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas que a descreveu em 1909, em Lassance, interior de Minas Gerais quando realizava uma campanha contra a malária que atingia operários que trabalhavam na construção de um trecho da Estrada de Ferro Central do Brasil.

Ilustração 2. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, *Triatoma infestans*, *Trypanosoma cruzi* e moradia da população em Lassance

Carlos Chagas descreveu uma nova doença humana, à tripanossomíase americana que posteriormente foi denominada moléstia de Chagas por sugestão de Miguel Couto na Academia Nacional de Medicina e atualmente conhecida internacionalmente por doença de Chagas (CHAGAS FILHO, 1968). A descoberta da nova "doença tropical" tem sido, desde então, reiteradamente destacada. Teria sido a primeira vez na história da ciência que um mesmo pesquisador identificava o vetor (o inseto conhecido como "barbeiro"), o agente etiológico (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e a doença causada por esse parasito (CHAGAS FILHO, 1968).

Outro aspecto ressaltado pelos comentadores para enaltecer o feito científico de Chagas é o fato de que ele, nas pesquisas que desenvolveu ao longo de sua vida, empenhou-se em abordar praticamente todos os aspectos essenciais da nova doença. A ênfase dada à originalidade científica da descoberta de Carlos Chagas expressa a importância que esta assumiu no processo de institucionalização da ciência biomédica no Brasil.

Estudada por Chagas e seus colaboradores e por gerações sucessivas de médicos e cientistas até o presente, a tripanossomíase americana tornou-se objeto de uma larga tradição de pesquisa que reúne grupos de especialistas em todo o país e na América Latina sendo considerada um importante problema de saúde pública neste continente.

A maior parte dos casos de infecção em seres humanos ou outros vertebrados é produzida pelo contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae contaminados com *T. cruzi* (CHAGAS, 1909).

O triatomíneo possui hábito geralmente noturno e durante o repasto sangüíneo em mamífero infectado ingere os tripomastigotas circulantes, os quais após a multiplicação e metaciclogênese no tubo digestivo do inseto vetor são eliminados em suas fezes, podendo infectar novos hospedeiros vertebrados. São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão de *T. cruzi*, intervindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica (GALVÃO et al., 2003).

Antes da migração do homem às áreas até então desabitadas, *T. cruzi* encontrava-se restrito à situação silvestre, circulando entre mamíferos do ambiente natural, através do inseto vetor ou, também, muito comumente, por predatismo (ingestão de vetores e mamíferos infectados). O homem invadiu esses ecótopos e se fez incluir no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo ao hemíptero vetor vivendas rurais de péssima qualidade, frutos de perversas relações de produção e de políticas sociais restritivas (DIAS & COURA, 1997).

Os triatomíneos hematófagos encontraram naquelas habitações condições ideais de abrigo e oferta alimentar abundante, tornando a transmissão vetorial o mecanismo primário de difusão da doença. Essa adaptação mostrou-se eficiente para cerca de uma dezena de espécies e é considerada um fator primordial na ocorrência da expansão da doença de Chagas humana (VINHAES & DIAS, 2000).

Estabelecida a transmissão vetorial da doença, podemos citar outros tipos de transmissão tais como: congênita, amamentação e via transfusional. Existem também formas excepcionais como: transmissão acidental em laboratório, por transplantes de órgãos, oral e sexual (BRENER et al., 2000).

Dentre as formas excepcionais de transmissão da doença de Chagas, a oral tem sido recentemente explorada (março de 2005) em virtude de um surto da doença detectado no Estado de Santa Catarina cuja transmissão estava relacionada ao consumo de caldo de cana por turistas. Epidemiologicamente o estado de Santa Catarina nunca se caracterizou como área endêmica da doença Chagas, pela topografia e clima (IANNI & MADY, 2005).

O episódio de Santa Catarina vem se somar aos demais já ocorridos e, muito embora se tenham óbitos a lamentar, esses não são as regras na fase aguda dessa doença que na grande maioria dos casos pode passar despercebidas. Devemos sim ter a consciência de que a doença de Chagas não está extinta e que as formas não habituais de contaminação devem ser lembradas.

Do ponto de vista clínico a infecção por *T. cruzi* se distingue em duas fases: a aguda e a crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de parasitas circulantes no sangue. Durante a fase crônica há ausência de parasitas sangüíneos, porém muitas vezes encontra-se acompanhado de dano tissular progressivo que habitualmente compromete diversos órgãos, especialmente o coração, levando ao aparecimento de cardiopatias que podem causar a morte do indivíduo infectado.

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

T. cruzi, por suas características biológicas e genéticas, constitui-se em cepas ou subespécies que podem ter comportamentos peculiares quando inoculadas em animais experimentais (BRENER, 1965).

Pesquisas relataram a existência de cepas com predominância de formas delgadas e tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula óssea, apresentando altos e precoces picos parasitêmicos (ANDRADE et al., 1970). Apesar das cepas delgadas serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, determinam na fase aguda da infecção uma elevada taxa de mortalidade na grande maioria dos animais experimentais infectados.

Entretanto existem cepas que apresentam característica morfológica larga, tropismo marcante para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (MELO & BRENER, 1978). Esse tipo de conformação morfológica confere a essas cepas uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência, os tripomastigotas permanecem por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

A parasitemia sangüínea é um parâmetro importante 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, em decorrência que muitas lesões tardias são influenciadas pelo curso da doença durante essa fase.

Por outro lado o estudo do comportamento de várias cepas de *T. cruzi* em diferentes hospedeiros experimentais parece indicar que a cepa do parasita influencia as características da infecção aguda (CASTRO & BRENER, 1985).

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. À medida que a resposta imune se estabelece, ocorre diminuição da parasitemia, levando o hospedeiro a uma fase assintomática também conhecida como fase indeterminada. Em indivíduos imunocompetentes, ocorre o desaparecimento dos tripomastigotas circulantes, levando a uma fase crônica que se caracteriza por evidenciar a doença através da positividade persistente nas reações sorológicas como: hemaglutinação indireta, imunofluorescência, técnicas de isolamento do parasita como xenodiagnóstico, hemocultura e mais recentemente através de biologia molecular com a Reação em Cadeia da Polimerase (LUQUETTI & RASSI, 2000).

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 (SANTOS et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2005; CAETANO et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SANTELLO et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2007). Como consequência, a grande utilização de roedores em pesquisa permitiu detalhadas descrições celulares, moleculares e fenomenológicas disponíveis para o sistema imune de mamíferos.

Com relação à doença de Chagas, o estudo histopatológico sistemático realizado em roedores infectados por *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, muito semelhante às causadas pela doença humana (BRENER et al., 2000).

O tratamento da doença de Chagas pressupõe uma terapêutica específica (contra o parasita, visando eliminá-lo) e uma sintomática (para atenuação dos sintomas, como pelo uso de anti-arrítmicos, para o coração). Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo da doença de Chagas, o seu tratamento apresenta, ainda hoje, muitos problemas.

Alguns medicamentos são capazes de eliminar *T. cruzi* no período inicial da doença, trazendo esperanças a muitas pessoas infectadas. Porém, em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais dos medicamentos até hoje disponíveis, compete ao médico decidir sobre a necessidade e a conveniência do tratamento de cada caso de forma individual, as lesões cardíacas e em outros órgãos, que já estiverem presentes são irreversíveis e não serão eliminadas com a erradicação do parasito. Cuidados médicos especiais deverão ser instituídos frente aos sinais mais graves da doença.

No final da década de 1960, surgiram, respectivamente, o nifurtimox e o benzonidazol, as primeiras drogas efetivas para o tratamento da fase aguda da infecção chagásica humana, porém com índices de cura muito baixo na fase crônica da doença. O seu emprego em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias), causa importantes efeitos colaterais indesejáveis (COURA & CASTRO, 2002). Mesmo o nifurtimox que foi amplamente empregado deixou de ser usado em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava, estando atualmente fora do mercado.

Transplante de órgãos colocaram ainda mais em cena a conveniência da necessidade de utilizarmos drogas mais eficazes anti-*T.cruzi*. Quando um indivíduo portador de doença de Chagas recebe um transplante, ou pacientes imunodeprimidos, espera-se quase sempre uma reativação da carga parasitária nesses indivíduos. Benzonidazol, nifurtimox e alopurinol em tais eventualidades demonstraram capacidade em conter a exacerbação, configurando outra indicação válida concernente ao uso das drogas. Outra indicação incontestável corresponde ao atendimento de vítimas de acidentes laboratoriais, exigindo início bastante precoce da administração. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana gerou nos últimos anos mais uma importante preocupação devido ao grande número de portadores, com estabelecimento de situação propícia para reativação da infecção parasitária, com conseqüente agravamento da patologia, principalmente a miocardite e acometimento do sistema nervoso central (AMATO-NETO, 1998).

Não existe vacina contra a doença de Chagas, e a melhor maneira de enfrentá-la ainda se dá por meio da prevenção e do controle, combatendo sistematicamente os vetores mediante o emprego de inseticidas eficazes, melhoria das habitações e saneamento básico, eliminação dos animais domésticos infectados, controle e descarte do sangue contaminado pelo parasita e seus derivados (BRENER et al., 2000).

1.2. Imunologia da Doença de Chagas

Sabe-se que a grande maioria das infecções que envolvem a participação de agentes infecciosos parasitários, causam no hospedeiro um estado de estresse, levando a uma imunossupressão que na realidade nada mais é que uma forma do agente etiológico evadir-se da resposta imune e estabelecer neste novo ambiente condições necessárias para sua perpetuação (SANTOS et al., 2005).

Grande parte das manifestações clínicas da doença de Chagas no homem se deve à resposta imune dirigida ao parasita. Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (ALIBERTI et al., 1996).

A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas. Em consequência, o parasita passa a ser continuamente combatido e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro.

Hoje está bem estabelecido que células e mecanismos efetores do sistema imune são responsáveis tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelas lesões locais resultantes das atividades antiparasitárias (BRENER et al., 2000).

A resposta imune gerada na fase aguda é responsável pela redução da parasitemia. Essa resposta, porém, não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro. O controle dos anticorpos sobre a infecção chagásica depende de variáveis como a idade do hospedeiro, cepa do parasita e animal utilizado (ALIBERTI et al., 1999).

Estudos em modelos experimentais demonstram que os anticorpos são componentes importantes nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *T. cruzi* (KIERZENBAUM & HOWARD, 1976; KRETTLI & BRENER, 1976).

Pesquisas relacionadas a anticorpos líticos verificaram existir uma dissociação entre os anticorpos envolvidos no diagnóstico da doença de Chagas e os que participavam da resistência contra o parasita. Esses anticorpos podem ser detectados através da lise mediada por complemento e só se ligavam às formas vivas de tripomastigotas, desta maneira a dosagem de anticorpos líticos se tornou uma excelente ferramenta para a avaliação de cura (KRETTLI & BRENER, 1982).

A invasão de diversas células do sistema imunológico, em especial de macrófagos, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERT et al., 1996). Tipicamente ocorre em macrófagos a secreção da interleucina 12 (IL-12) que ativa as células *natural killer* (NK) a produzirem interferon gama (IFN- γ) (ALIBERT et al., 1996), atuando diretamente sobre os macrófagos, ativando-os para atividade microbiciada (REED, 1995; GAZINELLI, et al., 1992).

A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1988), participa dessa interação de forma sinérgica tanto como IL-12 e IFN- γ (OSWALD et al., 1992). O IFN- γ possui um importante papel protetor no início da infecção (REED, 1995).

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* via peroxidase, óxido nítrico e produção de peroxinitrito, demonstrando alto poder citotóxico contra as formas epimastigotas desse parasita (THOMSON et al., 1999).

Quando os macrófagos são ativados liberam o óxido nítrico que está envolvido em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, como a vaso-dilatação sangüínea, agregação de plaquetas e neuro-transmissão (MONCADA et al., 1991).

O óxido nítrico tem importante papel no controle de muitas infecções, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA & ZILBERSTEIN, 2002). É considerado também como uma importante molécula efetora antimicrobica em macrófagos contra patógenos intracelulares como *T. cruzi* (GAZINELLI et al., 1992).

O óxido nítrico é gerado por uma família de isoenzimas expressas em uma grande variedade de células de mamíferos, através da catálise enzimática do 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 por enzimas que são constitutivas ou induzidas.

As constitutivas são enzimas que estão presentes em muitas células; sua liberação depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina e, uma vez liberadas, sintetizam óxido nítrico por curtos períodos. O óxido nítrico formado por esta via participa de muitos processos homeostáticos.

Por outro lado, as induzidas independem da concentração intracelular de cálcio e são liberadas por macrófagos poucas horas após sua ativação e também por outras células sob ação de citocinas. As induzidas sintetizam óxido nítrico por longos períodos (MONCADA et al., 1991).

No sistema imune e na inflamação, o óxido nítrico endógeno parece exercer efeitos pró e anti-inflamatórios (NATHAN, 1992).

Os efeitos pró-inflamatórios do óxido nítrico não são evidentes sob condições fisiológicas agudas, podendo, nestes casos, mediar funções anti-inflamatórias, como a inibição de adesão de neutrófilos (SCHIMIDT & WALTER, 1994).

Durante a resposta imune celular, a maioria das células adquire a capacidade de expressar a forma de óxido nítrico induzida (NATHAN & XIE, 1994). A capacidade da célula expressar a forma induzida de óxido nítrico depende do reconhecimento de um antígeno específico por parte das células T, embora suas ações não sejam específicas (SCHIMIDT & WALTER, 1994).

Entretanto, é atribuída ao óxido nítrico a função de participar de um mecanismo de "feedback", prevenindo a excessiva ativação das células T e produção de óxido nítrico (SICHER et al., 1994). Neste contexto, possivelmente o óxido nítrico possa ser visto como um modulador imune (SCHIMIDT & WALTER, 1994).

A fagocitose por si só não induz a síntese de óxido nítrico. A fagocitose de partículas inertes por macrófagos peritoniais, em cultura, ou por macrófagos murinos, estimulados por $\text{IFN}\gamma$, não são estímulo suficiente para a indução expressiva de induzidas. No entanto, a fagocitose de agentes biológicos, nas mesmas condições, induz altos níveis de óxido nítrico, sugerindo que a produção de óxido nítrico seja dependente de estímulo imunológico e que faça parte dos mecanismos de defesa do organismo (CUNHA et al., 1993).

$\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ e fator inibidor de macrófagos, após interagirem com seus receptores nos macrófagos, desencadeiam sinais intracelulares que culminam com a ativação da enzima óxido nítrico. Por outro lado, citocinas como a IL-4, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$, quando ocupam seus receptores, desencadeiam sinais intracelulares que resultam na inibição da síntese de óxido nítrico (CUNHA, 1995).

Entre os efeitos protetores do óxido nítrico estão a destruição de muitos agentes patógenos e de células tumorais (NATHAN, 1992). Exerce também efeito citoprotetor, mantendo a integridade da parede vascular, indicativo do potencial efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico (POLTE et al., 1997). Também foi relatado o efeito anti-trombogênico do óxido nítrico em endotélio não lesionado (FOURNET-BOURGUIGNON et al., 2002).

1.3. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia de análise aplicável em diversas áreas de pesquisa e permite o estudo da variabilidade genômica pelo perfil colorimétrico do conteúdo do DNA.

Os linfócitos são uma população de leucócitos com funções regulatórias importantes para o sistema imune. São classificados em três subpopulações: linfócitos T, os linfócitos B e os linfócitos NK. Esta classificação é baseada nas funções específicas dessas células dentro do sistema que são características de cada grupo celular.

Os linfócitos T são ainda sub-classificados em duas sub-populações funcionais: os CD4⁺ helper (auxiliares) e os CD8⁺ supressor (citotóxicos) (HOMBURGER et al., 1993).

Vários métodos foram utilizados para identificar as sub-populações de linfócitos específicos. As técnicas mais antigas incluíam a aglutinação com hemácias de carneiro e as técnicas manuais baseadas em microscopia ocular (imunoperoxidase).

A metodologia mais atual para a contagem de CD4⁺ e CD8⁺ utiliza a técnica de citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidas contra antígenos de superfície das células CD4⁺, CD8⁺ e CD3⁺.

Os níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ podem estar alterados nas imunodeficiências, em certas doenças, como infecção pelo vírus HIV (LANDAY et al., 1990). Desta maneira a quantificação destes linfócitos é de extrema importância na avaliação de certas infecções, por este motivo foi quantificado as possíveis variações das populações de linfócitos através da citometria de fluxo durante o tratamento com dehidroepiandrosterona durante da infecção chagásica experimental.

1.4. Dehidroepiandrosterona (DHEA): o esteróide de múltiplas funções

Há algum tempo o uso da dehidroepiandrosterona (DHEA) se tornou mundialmente aceita e vem interessando os pesquisadores na área médica, especialmente os neuroendocrinologistas.

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

Ilustração 3. Estrutura química do hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA)

O DHEA é sintetizado pelas células da zona reticular da adrenal, a partir de moléculas de colesterol, mais especificamente pela 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesterona. O DHEA pode estar conjugado ao sulfato por uma enzima específica. As formas livres e sulfatadas de DHEA são os principais andrógenos produzidos pela adrenal, embora pequenas quantidades de androstenediona sejam formadas e ainda menores quantidades de testosterona são formadas. DHEA possui reduzida atividade androgênica, mas pode ser convertido em testosterona nos tecidos periféricos (AIRES 1999).

Na mulher as adrenais são responsáveis por 50 a 60% da produção de andrógenos. Sua importância é pequena no homem, em face da grande produção de testosterona pelos testículos. As células da zona reticular podem ainda formar pequenas quantidades de estradiol e estrona a partir da testosterona e androstenediona. Na falta dos ovários, ou após a menopausa, essa produção de estrógenos pela adrenal passa a ser importante (OLSZEWER 1996).

Noventa por cento do DHEA existente no organismo é convertido sob a forma de sulfato de DHEA (DHEA-S). O DHEA é rapidamente convertido em estrogênios e testosterona e os níveis de DHEA-S podem sofrer flutuações quando ocorrem situações de estresse ou na presença de diferentes tipos de doenças.

Muitas doenças presentes na fase avançada da vida estão relacionadas com o decréscimo da produção de DHEA. O nível deste hormônio decresce após a segunda década da vida, alcançando ao redor de 5% dos níveis originais na velhice (LORIA et al., 1998; ALVARO MORALES et al., 2000).

Os suplementos de DHEA parecem possuir efeitos terapêuticos em muitos estados crônicos. Altos níveis deste hormônio e seu sulfato sugerem uma proteção nas doenças cardiovasculares (KHAW, 1996). O DHEA diminui os níveis de insulina que pode ser pertinente tanto ao envelhecimento como a aterosclerose. Altos níveis plasmáticos de DHEA podem inibir a aterosclerose (NESTLER et al., 1992). Tem sido também relatado o efeito do DHEA sobre a agregação das plaquetas, fato muito importante para a prevenção de doenças tromboembólicas (EICH et al., 1990; JESSE et al., 1991).

Progressivas disfunções dos sistemas imune e endócrino observadas durante o envelhecimento são corrigidas após tratamento com DHEA (KROBOTH et al., 1999; MARTNEZ-TABOADA et al., 2002; SACCO et al., 2002).

A utilização do DHEA já ganhou espaço na clínica geriátrica induzindo melhorias nos distúrbios cognitivos, perda de concentração e desinteresse sexual, distúrbios da memória, osteoporose, entre outros. Outro importante fato a ser descrito é a capacidade do DHEA proteger os neurônios e de aumentar a capacidade de estabelecer contato entre os axônios; além de ocorrer uma diminuição dos níveis plasmáticos de DHEA em pacientes com síndrome de Alzheimer (SUNDERLAND et al., 1989).

O tratamento de DHEA é utilizado só ou em associação com outras substâncias como a melatonina na infecção murina por retrovírus, prevenindo a redução da proliferação de células B e T bem como aumentando a função de resposta de Th-1 e atenuando a elevada produção de interleucinas do grupo Th-2 característico nestas infecções (ZHANG et al., 1999).

O DHEA possui inúmeras funções biológicas e é considerado como antagonista do cortisol em humanos, caracterizando desta a forma as ações supressoras amplamente conhecidas dos corticóides e conseqüentemente à ação protetora do DHEA.

Pesquisas realizadas em animais indicam que o DHEA possui efeito direto como estimulador nos linfócitos T, tanto *in vivo* como *in vitro*, por aumentar a produção da IL-12, fator importante na mediação das respostas imunológicas deste tipo de célula (LORIA et al., 1996). Associado a este fenômeno, o DHEA pode superar os efeitos imunossupressivos do cortisol sobre os linfócitos T, já que este possui nítida ação supressora na produção da IL-2.

A função imunoestimuladora do DHEA já está bem esclarecida (OBERBECK et al., 2001). Trabalhos realizados em roedores mostram a ação protetora do DHEA contra diversas infecções letais causadas por vírus, bactérias e parasitas (MORFIN et al., 2000; MORALES-MONTOR et al., 2001, DOS SANTOS et al., 2005). A presença de receptor específico para DHEA foi demonstrada em células do sistema imune (OKABE et al., 1995). Tratamento com DHEA-S elimina a expressão constitutiva de IL-10, reduz a produção da sua forma induzível (SPENCER et al., 1996) e reduz a concentração de IL-4 (REGELSON et al., 1994).

Suplementação diária com DHEA aumenta o número de monócitos, de células B, T e NK, como também o número de receptores para IL-2 (KHORRAM et al., 1997). Além disso, DHEA mantém a produção de INF- γ durante o processo infeccioso (REGELSON et al., 1994).

Vários autores têm descrito o uso do DHEA no combate a diversos tipos de infecções, dentre elas a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (CLERICE et al., 1997; CHRISTEFF et al., 1999; LEE et al., 1999), infecções bacterianas (BEN-NATHAN et al., 1999) e infecções parasitárias como *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995) e *Schistosoma mansoni* (MORALES-MONTOR et al., 2001) e até mesmo contra o vírus da influenza (DANENBERG et al., 1997).

Até o momento, apenas dois trabalhos foram publicados relacionados com o administração de DHEA e doença de Chagas, que é o presente estudo (DOS SANTOS et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007), tornando desta forma este trabalho realmente inédito e de importância no que se refere a novas terapêuticas no combate à doença de Chagas.

1.5. Dimorfismo sexual e infecção

O dimorfismo sexual possui influência marcante na resposta imune. A gonadectomia bem como a reposição de hormônios sexuais desencadeia resposta imune característica dependendo da situação fisiológica. Um exemplo típico é a gravidez, onde a quantidade de esteróides encontra-se aumentada modificando o perfil normal da resposta imune inerente ao sexo feminino.

Outro fato relevante é que órgãos responsáveis pela resposta imune possuem receptores específicos para esteróides gonadais, da mesma forma que células do cérebro expressam receptores para diferentes interleucinas (GROSSMAN, 1985), comprovando a existência de uma interação entre os sistemas imune e endócrino.

O dimorfismo sexual exerce importante papel na evolução de uma infecção. Entretanto ainda hoje pouco se sabe sobre os diferentes mecanismos e interações dos hormônios sexuais com o sistema imunológico.

A resposta imune em fêmeas pode variar entre outros fatores, com o ciclo estral e também com o tipo de parasita. Estrógenos potencializam a produção de imunoglobulinas, e o estradiol parece inibir a atividade das células T supressoras, aumentando assim a maturação de células B e conseqüentemente a produção de imunoglobulinas. Essas características tornam as mulheres de uma forma geral mais resistentes às infecções por patógenos, porém em contrapartida, apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças auto-imunes, como Lúpus Eritematoso e a Artrite Reumatóide (GROSSMAN, 1985).

Pesquisas relataram importantes e distintas alterações fisiológicas quando submeteram *Calomys callosus* à ovariectomia e orquiectomia provocando nestes animais modificações na resposta imunológica à *T. cruzi*. A ovariectomia levou os animais a uma maior susceptibilidade à infecção enquanto que a orquiectomia levou os animais a uma maior resistência à infecção. Todos estes dados fazem com que os estudo relacionado ao dimorfismo sexual se torne de extrema importância, principalmente no que se refere à doença de Chagas (PRADO JR et al., 1998; PRADO JR et al., 1999; SANTOS et al., 2007) .

2- JUSTIFICATIVA

Apesar de todo o avanço científico nas últimas décadas no sentido de desvendar os processos imunes do hospedeiro e a forma de evasão do parasita, a doença de Chagas ainda se constitui em importante problema em saúde pública. Poucos são os medicamentos disponíveis para seu tratamento, dessa forma a pesquisa de uma possível ação do andrógeno DHEA produzido pelo córtex da adrenal será avaliado em nosso trabalho.

A proposta deste trabalho é inédita visto não se encontrar disponível, outros trabalhos que relatem a ação do DHEA durante a infecção chagásica, sendo apenas disponibilizado parte deste trabalho já publicado (DOS SANTOS et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007). Por ser o DHEA um hormônio antagônico às ações do cortisol, cujas ações imunossupressoras estão muitas bem conhecidas (SANTOS et al., 2005), o uso de um antagonista do cortisol será de grande valia no monitoramento da parasitemia e outros aspectos da infecção chagásica.

É de pleno conhecimento que o DHEA não pode ser considerado como uma substância destinada à cura da doença, mas sim um imunoestimulador que certamente proporcionará um aumento da resistência contra o parasita, diminuindo a severidade da sintomatologia da doença. Muitos autores já descreveram a ação imunoestimuladora do DHEA em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)(CLERICE et al., 1997; CHRISTEFF et al., 1999; LEE et al., 1999), *Schistosoma mansoni* (MORALES-MONTOR et al., 2001), *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (BEM-NATHAN et al., 1999) e *Trypanosoma cruzi* (DOS SANTOS et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2007).

Através dos parâmetros escolhidos foi avaliado a magnitude da resposta humoral e celular na vigência ou não da terapia com DHEA, a intensidade parasitária sangüínea e tecidual e até mesmo indiretamente a ação deste hormônio sobre o metabolismo através do peso dos animais e avaliações bioquímicas para relatar as possíveis alterações causadas pela terapia hormonal.

Utilizou-se uma alta dose de DHEA baseados em trabalhos previamente oferecidos pela literatura onde baixas doses desse hormônio não seriam capazes de produzir um efeito imunoestimulatório eficaz como o de uma alta dose (ARAGHI-NIKNAUM et al., 1997; GIANOTTI et al., 1996).

Desta forma, através dos resultados obtidos e dos possíveis efeitos da administração do DHEA durante a fase aguda da doença de Chagas experimental, certamente oferecerão dados importantes que servirão de base para futuros trabalhos envolvendo doenças parasitária e administração de terapias hormonais.

3- OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos imunomodulatórios da administração de DHEA durante a fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, através da quantificação de parasitas sanguíneos e teciduais;
- Detectar possíveis alterações na resposta celular através da contagem de leucócitos, macrófagos, linfoproliferação de esplenócitos, análise por citometria de fluxo das populações celulares T CD3+, CD4+ e CD8+ e dosagem de TNF α , IFN- γ , NO, IL-2, IL-12, TGF β , IL10 e IL-4;
- Analisar o perfil humoral através da pesquisa de anticorpos líticos;
- Avaliar as influências do DHEA sobre alguns parâmetros bioquímicos como glicose, colesterol e triglicérides;

Desta maneira através dos resultados obtidos será possível discutir se a utilização do hormônio DHEA durante a infecção experimental abrirá perspectivas em relação a mais uma terapia alternativa para o tratamento da doença de Chagas.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais utilizados

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, jovens (40 dias), pesando entre 90 e 100 gramas, provenientes de uma colônia mantida nos biotérios da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Esses animais foram ambientados no biotério da FCFRP-USP, sendo mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração.

Foi dada preferência à ratos em decorrência da eficiente resposta imune apresentada por este modelo experimental à infecção por *T. cruzi*.

Escolhemos ratos jovens, pois à medida que envelhecem, tornam-se mais resistentes, mudando o padrão da curva parasitêmica podendo ser a mesma inaparente ou apresentar baixo número de tripomastigotas, algumas vezes indetectáveis através dos métodos usuais de contagem de parasitas.

Apesar da maioria dos trabalhos utilizarem camundongos, experimentos com ratos não apresenta dificuldades, já que é de pleno conhecimento a evolução de sua curva parasitêmica (BRENER, 1965; BRENER & CHIARI, 1963).

O referido projeto possui a aprovação do comitê de ética para o uso de animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA) protocolo 03.1.1152.53.4.

.

4.1.1. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos e identificados como:

Machos: Grupo Controle

MSDNI - Machos sem suplementação de DHEA e não infectados

MDNI - Machos com suplementação de DHEA e não infectados

Macho: Grupo Infectado

MSDI - Machos sem suplementação de DHEA e infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

MDI - Machos com suplementação de DHEA e infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

Fêmeas: Grupo Controle

FSDNI - Fêmeas sem suplementação de DHEA e não infectados

FDNI - Fêmeas com suplementação de DHEA e não infectados

Fêmeas: Grupo Infectado

FSDI - Fêmeas sem suplementação de DHEA e infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

FDI - Fêmeas com suplementação de DHEA e infectados pela cepa Y de *T.cruzi*

Para cada dia de experimento, foi utilizado 10 animais por grupo, visto que uma diferença no número de amostra pode influenciar nos resultados do experimento (SOGAYAR et al., 1993).

4.2. Dias de Experimento

Os experimentos foram realizados nos dias: 7º, 14º e 21º após o inóculo infectante, esses dias foram escolhidos baseados na curva parasitêmica, onde o pico de parasitemia ocorre entre o 12º e 14º dias, após o inóculo.

4.3. Parasitas

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi* isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), por meio de xenodiagnóstico realizado em uma paciente na fase aguda da infecção chagásica. Desde então, vem sendo mantida em camundongos *swiss* não isogênicos, por repiques semanais de sangue infectado.

O estudo da cepa Y está bem preconizado em diferentes modelos experimentais inclusive em ratos (UYEMURA et al., 1995). A cepa Y possui morfologia fina com picos parasitêmicos precoces, altamente virulenta e patogênica, determinando alta mortalidade e lesões tissulares graves (SCORZA & SCORZA, 1972). Em ratos, o padrão da curva parasitêmica se mantém semelhante aos dos roedores de menor porte, com um pico compreendido entre o 12º e 14º dias, quando os parasitas desaparecerão da circulação iniciando-se a fase crônica (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA et al., 1995).

4.4. Infecção ou Simulação

Decorridos os dias de ambientalização, os animais do Grupo Infectado foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^5 tripomastigotas sanguícolas. A alta carga parasitária (100.000 formas sanguícolas da cepa Y) foi utilizada para que ocorra uma lesões tissulares e parasitemia mais intensas, de modo a proporcionar uma melhor visualização das variações patológicas produzidas pelo alto número de parasitas e desta maneira relatar as alterações ocorridas mediante a suplementação com DHEA.

A contagem dos parasitas foi feita pelo método de BRENER que consiste em colocar uma alíquota de 5µl de sangue infectado em uma lâmina de microscópio, cobrindo-a com lamínula 22 x 22mm. 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 microscópios existentes na área da lamínula (BRENER, 1962).

4.5. Suplementação com DHEA

Os grupos foram tratados via subcutânea com 40mg/kg/dia de DHEA (SIGMA) diluído em 10% de etanol e igual quantidade de água destilada, durante todos os dias de experimento (48 horas após a infecção até 21º dia de infecção) uma dose uma vez ao dia pela parte da manhã obedecendo rigorosamente o mesmo horário de tratamento todos os dias.

4.6. Morte dos animais

Os animais foram mortos por decapitação para evitar que outras manipulações pudessem ocasionar estresse e desta maneira alterar a resposta imunológica do animal (CALDEIRA & FRANCI, 2000; SANTOS et al., 2005).

4.7. Coleta de sangue

Após a morte dos animais, cerca de 2,0ml de sangue foi coletado em um tubo plástico contendo 200µl de Heparina Sódica (ORGANON TEKNIKA) para obtenção do plasma para determinação de glicose. Para determinação do anticorpo lítico, dosagens bioquímicas e imunológicas foram coletados 2,0ml de sangue em frasco sem anticoagulante para obtenção de soro.

4.8. Contagem celular de macrófagos peritoniais

Imediatamente após a morte dos animais, injetou-se 10ml de meio RPMI estéril na cavidade peritoneal. Foi realizada uma massagem abdominal suave e em seguida retirou-se o líquido peritoneal. A contagem de macrófagos do líquido peritoneal foi feita através da retirada de uma alíquota de 10µl do lavado peritoneal que foi diluída em solução de Turk (990 µl), para contagem das células viáveis (macrófagos) em câmara de Neubauer.

4.9. Pesquisa de anticorpos líticos

Foi utilizada a técnica descrita por KRETTLI & BRENER (1976), com modificações introduzidas por LEVY et al., (1996).

$$\% \text{ de lise} = \frac{\text{número de parasitas no tempo 0} - \text{número de parasitas no tempo 60 minutos}}{\text{Número de parasitas no tempo 0}}$$

4.10. Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de fluxo

Para realização desta análise foi utilizada células esplênicas, onde o baço foi removido cirurgicamente e os esplenócitos foram obtidos por masseração do baço em peneiras de aço inox com porosidade em 4mL de meio de RPMI 1640 (GibcoBR). Em seguida as células foram lavadas por 15 minutos a 10°C, ressuspendidas em 10 mL de RPMI.

A contagem de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ foi realizada por a citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidos contra antígenos de superfície destas células. Foram utilizados no experimento os anticorpos monoclonais conjugados com PE (r-phicoeritrin), FITC (Fluorescein isotiocianate) e PERCP (Peridin Clorofil Protein) (BD-Pharmingen, CA, USA). A marcações dos esplenócitos foram ressuspendidas a uma concentração de 1×10^7 células/mL em tampão fosfato (PBS) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de azida sódica (Tampão de FACS). Em seguida alíquotas de 200 μ L de células, foram colocadas nos poços em placas de 24 poços, fundo em U, centrifugadas por 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado. O “pellet” de células foi desfeito após agitação e as células incubadas com 30 μ L de Fc-block (soro de camundongo (evita ligações inespecíficas)) em tampão de FACS, por 30 minutos a 4°C. Ao findar da incubação, as células foram centrifugadas 2000 rpm durante 15 segundos e o sobrenadante descartado.

Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais relevantes conjugados com anti CD3+PE, anti CD4+FITC e anti CD8+PERCP, diluídos em tampão de FACS (1:30), incubadas por 30 minutos a 4°C protegidos da luz e lavadas três vezes com 200 µL de tampão de FACS a 2000 rpm durante 15 segundos. As células foram lavadas três vezes em 200 µL de tampão de FACS e ressuspensas em 0,5 mL de tampão de FACS. Finalmente, as células foram submetidas a leitura no citômetro de fluxo [FACScan-Becton Dickinson, Sunnyvale, CA] onde foram analisadas 10.000 células utilizando os detectores e canais de células adequados para leitura de cada fluorocromo. As análises dos resultados foram realizados em software DIVA-BD.

4.11. Quantificação de óxido nítrico

Os ensaios de produção de óxido nítrico foram realizados com células do lavado peritonial. Os ratos tiveram a cavidade peritonial lavada com 10ml de RPMI a 4°C, que foi centrifugado por 10 minutos à 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” ressuspendido com 1ml de RPMI contendo 10% de soro bovino fetal e antibiótico. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota de 10µl que foi diluída em solução de Turk (990 µl), para contagem das células viáveis (macrófagos). Depois de contadas em câmara de Neubauer, as concentrações foram acertadas para 5×10^5 cel/ml, 100µl desta suspensão foi distribuída em placa de 96 poços, contendo 5×10^5 cel/poço, adicionando 100µg/ml poço de LPS e levado à estufa contendo 5% de CO₂, durante 24 horas a 37°C.

Após este período, submeteu-se a placa a centrifugação à 1500rpm durante 4 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, permitindo a revelação da reação por meio de leitor de microplacas utilizando filtro de 540nm. A curva padrão de 200µM a 6µM foi realizada utilizando NO₃ com diluição seriada na base 2 (TERENZI et al., 1995; HRUBY et al., 1997). A leitura da absorbância foi realizada em aparelho de ELISA (SALTZMAN, 1954).

4.12. Linfoproliferação de esplenócitos

O baço foi assepticamente removidos, masserado e ressuspendido a uma concentração de 5×10^6 /ml em RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Paisley, UK), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), l-glutamina (2 mM), e 2-mercaptoetanol (0.05 mM) em placas de 96 poços. As células foram cultivadas em triplicatas e estimuladas com concanavalina A (Con A: 4 µg/ml), diluídas no mesmo meio. A proliferação de esplenócitos foi quantificada depois de 48 horas pela adição de MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando aparelho de ELISA (SALTZMAN, 1954).

4.13. Ensaio Imunológicos

Dosagens de TNFα, TGFβ, IFNγ, IL10, IL 12, IL-2 e IL 4, foram realizadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) descritos abaixo.

4.13.1. Dosagens de TGF- β , IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ

Placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo de captura purificado específico para cada interleucina, que foram diluídos em 1mL de PBS (concentração da solução 720 μ g/mL) desta solução realizar mais diluição conforme sugerido pelo Kit (R&D systems) para chegar a uma concentração final de 4 μ g/ml desta solução aplicar 100 μ L por poço e incubar as placas “overnight” (16-20 hrs de incubação) à temperatura ambiente. Após incubação lavou-se por três vezes a placa com tampão de lavagem (1L PBS + 0,5mL Tween 20) e bloqueou-se com tampão de diluição (10g BSA + 1L PBS) e incubou por mais 1 hora em temperatura ambiente. Novamente lavou-se mais três vezes (verter e secar a placa). Reconstituiu-se a recombinante padrão para realização da curva. Adicionou-se 100 μ L das amostras de soro e curvas padrão por poço e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente. Ao mesmo tempo preparou-se o anticorpo de detecção (18 μ g/mL). Lavou-se três vezes a placa e aplicou-se o anticorpo de detecção. As placas foram incubadas por mais 2 horas. Em seguida foram lavadas por mais três vezes, aplicou-se estreptoavidina diluída (1:200) e incubou-se por 20 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas por mais três vezes, sendo adicionado o substrato (15mL TMB (Tetramethylbenzidine) + 15 mL H₂O₂) nos poços. Incubou-se por mais 20 minutos protegida da luz. Adicionou-se a solução de parada H₂SO₄ por poço, homogeneizar e realizar leitura à um comprimento de onda 450nm.

4.13.2. Dosagens de IL-2 e IL-12

Foram utilizadas placas de 96 poços já sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocinas para ratos. Adicionou-se às placas os padrões de citocinas recombinantes (IL-2- 10000pg/ml e para 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 1500pg/ml a 0pg/ml para IL-2 e 1000 pg/mL a 0 pg/mL para IL-12 para ambas as citocinas em 8 poços da placa em duplicata, para a confecção da curva padrão. Um ponto para o branco foi incluído. Nos outros poços, foram pipetados 100µL das amostras experimentais em duplicata (20µL de amostra + 80µL de tampão de diluição padrão). Nas placas para IL-2 foram adicionados 50 µl de anticorpo biotinilado anti IL-2. Após esse processo as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. 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). Às placas de IL-12 foi adicionado o anticorpo biotinilado anti-IL-12, e as mesmas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente.

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 ELISA (Teccan, Modelo Sunrise - μ Quant) em um comprimento de onda de 450 nm, os dados foram processados em programas de estatísticas e devidamente plotados e analisados. Os kits utilizados foram da empresa BIOSOURCE, Califórnia, U.S.A.: BIOSOURCE Immunoassay Kit Rat IL-2 e Kit Rat IL-12.

4.14. Dosagens bioquímicas

As dosagens bioquímicas foram realizadas a partir da obtenção do plasma para realização do teste de glicose e de soro para dosagem de colesterol e triglicérides, utilizando testes bioquímicos específicos da marca LABORLAB. A leitura dos mesmos foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm para cada parâmetro analisado.

4.15. Técnica Histológica

Em cada dia do experimento, foram coletados os seguintes órgãos: baço, adrenal e coração. Os órgãos foram pesados em balança eletrônica (Mettler H10W), lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em Formol 10% tamponado e incluídos em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 6 μ m corados por Hematoxilina-Eosina. A montagem em lâminas foi realizada com intervalo de 70 μ m, para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi* (CAMARGOS et al., 2000). Os cortes foram examinados em microscópio óptico com aumento de 1000x (imersão) (MELO & BRENER, 1978).

4.16. Intensidade do parasitismo tecidual

O grau de parasitismo foi estimado através da análise qualitativa, a partir da determinação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400X). Para esta análise foram utilizados 5 animais de cada grupo em estudos (CASTRO & BRENER, 1985; SANTOS et al., 2005). Consideramos como (+++++) os cortes em que mais de 50 a 100% dos campos apresentavam-se parasitados, (++++) cortes onde foram encontrados ninhos de amastigostas em 25% a 50% dos campos, (++) cortes que apresentaram entre 12,5% a 25% de positividade nos campos analisados, (+) quando forem encontradas menos de 12,5% dos campos parasitados e (-) ausência de ninhos de amastigotas (CASTRO & BRENER, 1985).

4.17. Pesagem dos animais e órgãos

Prévio à eutanásia, os animais foram pesados em balança eletrônica Mettler. Imediatamente após a abertura da cavidade abdominal para a realização dos outros experimentos os órgãos foram imediatamente pesados em todos os dias de experimento.

4.18. Taxa de mortalidade dos animais

Para verificação da taxa de mortalidade dos animais em estudo foram observadas as gaiolas diariamente contendo os animais dos grupos infectados tratados e não tratados com DHEA durante o decorrer do experimento.

4.19. Forma de análise dos resultados A comparação entre os grupos foi feita através do teste de two way ANOVA. Utilizando o post teste de Bonferroni para comparação de todos os grupos entre si, considerando significante estatisticamente $P < 0.05$.

5- RESULTADOS

5.1. Taxa de mortalidade dos animais

Os animais de todos os grupos em estudo mantiveram-se vivos durante todo experimento.

5.2. Peso dos Animais

Alterações estatisticamente significativas não foram observadas no peso dos animais em estudo ($P > 0.05$).

Tabela 1. Peso expresso em gramas de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o pico da parasitemia ao 14º dia de experimento.

Grupos Experimentais	Número de animais	Peso dos animais (g)
FSDNI	5	152 ± 8.5
FDNI	5	159 ± 13.5
FSDI	5	162 ± 13.7
FDI	5	162 ± 14.7
MSDNI	5	170 ± 10.4
MDNI	5	159 ± 6.3
MSDI	5	175 ± 8.9
MDI	5	160 ± 14.9

Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). $P > 0.05$.

5.3. Peso do Coração

A fêmeas não apresentaram alterações estatisticamente significativas quanto a esta análise. O grupo macho apresentou redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) do peso do coração nos grupos tratados com DHEA em relação ao grupo não tratado para ambos os grupos infectados e não infectados.

Tabela 2. Peso expresso em miligramas do coração de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o pico da parasitemia ao 14º dia de experimento.

Grupos Experimentais	Número de animais	Peso do coração (mg)
FSDNI	5	912 ± 95
FDNI	5	852 ± 114
FSDI	5	967 ± 98
FDI	5	790 ± 49
MSDNI	5	1004 ± 41
MDNI	5	833 ± 41*
MSDI	5	1203 ± 102
MDI	5	940 ± 103*

Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados).

MSDNI vs. MDNI *P < 0.05
MSDI vs. MDI *P < 0.05

5.4. Peso do Baço

O tratamento ocasionou uma redução do peso do baço ($P < 0.05$) no grupo de fêmeas sem infecção, nas fêmeas infectadas sem tratamento observamos uma diminuição no peso do baço quando comparada ao grupo tratado ($P < 0.05$). Avaliando o peso do baço nos grupos machos foi observado que tanto o tratamento quanto a infecção ocasionaram uma atrofia nesse órgão com valores significativos ($P < 0.05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Peso expresso em miligramas do baço de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o pico da parasitemia ao 14º dia de experimento.

Grupos Experimentais	Número de animais	Peso do baço (mg)
FSDNI	5	1452 ± 235
FDNI	5	784 ± 51*
FSDI	5	688 ± 23*
FDI	5	1360 ± 167*
MSDNI	5	1594 ± 335
MDNI	5	902 ± 91*
MSDI	5	700 ± 31*
MDI	5	902 ± 91*

Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados).

FSDNI vs. FDNI	*P < 0.05
FSDI vs. FDI	*P < 0.05
FSDNI vs. FSDI	*P < 0.05
MSDNI vs. MDNI	*P < 0.05
MSDNI vs. MSDI	*P < 0.05
MSDNI vs. MDI	*P < 0.05

5.5. Peso das Adrenais

As glândulas adrenais nos grupos de fêmeas não apresentaram alterações estatisticamente significantes ($P < 0.05$). O grupo macho apresentou atrofia relacionada ao tratamento ($P < 0.05$).

Tabela 4. Peso expresso em gramas das adrenais de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o pico da parasitemia ao 14 dia de experimento.

Grupos Experimentais	Número de animais	Peso do adrenais (mg)
FSDNI	5	92 ± 10
FDNI	5	97 ± 17
FSDI	5	70 ± 7.8
FDI	5	74 ± 7.7
MSDNI	5	174 ± 22
MDNI	5	80 ± 9.8*
MSDI	5	183 ± 12
MDI	5	80 ± 9.1*

Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados).

MSDNI vs. MDNI *P < 0.05
MSDI vs. MDI *P < 0.05

5.6. Parasitemia

A parasitemia em ratos Wistar machos e fêmeas infectados, tratados e não tratados com DHEA demonstra que o pico da parasitemia ocorreu em todos os grupos no 14º dia após o inóculo infectante e no 21º dia após a infecção ocorreu a negatização de parasitas. As fêmeas apresentaram menor número de parasitas quando comparadas ao grupo de machos. Os animais machos e fêmeas submetidos ao tratamento com DHEA apresentaram uma redução no número de parasitas circulantes estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado.

Figura 1. Evolução da parasitemia em ratos Wistar machos e fêmeas infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com e sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas), MSDI (Machos Sem DHEA Infectado) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI

14 dia * $P < 0.05$

MSDI vs. MDI

14 dia ** $P < 0.001$

5.7. Contagem global de leucócitos

O tratamento com DHEA provocou uma elevação dos leucócitos, para os grupos infectados e não infectados dos grupos de fêmeas e elevação no grupo macho apenas para os animais infectados.

Figura 2. Contagem global de leucócitos expressos pelo número de células/mm³ em ratos Wistar fêmeas e machos não infectadas e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas), MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectado) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados), Grupo de fêmeas e machos com e sem infecção e sem tratamento com DHEA, Grupos machos e fêmeas com e sem infecção tratados com DHEA. Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDNI vs. FDNI
7 dia * $P < 0.001$
FSDI vs. FDI
14 dia ** $P < 0.01$
MSDI vs. MDI
7 dia * $P < 0.001$

5.8. Contagem global de macrófagos peritoneais

A contagem global de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos tratados com DHEA apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de macrófagos peritoneais em relação aos grupos não tratados. Em relação às fêmeas observa-se um aumento no grupo tratado, porém sem relevância estatística.

Figura 3. Contagem global de macrófagos peritoneais expresso pelo número de células/mm³ em ratos Wistar fêmeas e machos não infectadas e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectada), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas), MSDNI (Macho Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

FSDNI vs. FDNI

7 dia *P<0.001

14 dia ** P < 0.05

FSDI vs. FDI

14 dia ***P<0.01

MSDNI vs. MDNI

21 dia * P<0.001

MSDI vs. MDI

7 dia **P < 0.05

14 dia *P<0.001

21 dia *P<0.001

5.9. Anticorpos líticos

A cinética de anticorpos líticos revelou que o tratamento alterou a produção de anticorpos líticos, onde os animais infectados e tratados apresentaram um aumento estatisticamente significativo em comparação aos animais infectados e não tratados nos grupos de machos e fêmeas durante o 14º dia de infecção. Foi observado também aumento significativo desses anticorpos para o grupo de fêmeas infectadas e tratadas com DHEA em relação ao grupo de machos correspondente.

Figura 4. Cinética de anticorpos líticos expressa em porcentagem de lise, em ratos Wistar fêmeas e machos não infectadas e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado $n = 10$ animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
 14 dia * $P < 0.05$
 MSDI vs. MDI
 14 dia ** $P < 0.01$
 21 dia ** $P < 0.01$

5.10. Óxido nítrico

O tratamento alterou a produção de óxido nítrico em fêmeas, onde os animais infectados e não infectados apresentaram um aumento da liberação de NO porém este aumento não foi estatisticamente significativo ($P>0.05$). Apenas os grupos estimulados por LPS apresentaram alteração estatisticamente significativa ($P<0.05$) frente ao tratamento com DHEA que aumentou a produção de NO.

Figura 5. Produção de óxido nítrico expresso em μM em ratos Wistar fêmeas não infectadas e infectadas com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimuladas e não estimuladas por LPS. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). Para todos os grupos foi utilizado $n = 10$ animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.

FSDNI vs. FDNI

7 dia * $P<0.05$

FSDNI LPS vs. FDNI LPS

14 dia ** $P<0.001$

21 dia ** $P<0.001$

MSDI LPS vs. MDI LPS

7 dia *** $P<0.01$

O tratamento alterou a produção de óxido nítrico em machos, onde os animais infectados e não infectados apresentaram um aumento, porém esta elevação não foi estatisticamente significativa ($P>0.05$) em comparação aos animais tratados infectados e não infectados estimulados por LPS ($P<0.05$).

Figura 6. Produção de óxido nítrico expresso em μM em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7°, 14° e 21° dias de experimento estimuladas e não estimuladas por LPS. Grupo MSDNI (Machos Sem DHEA e Não Infectados), MDNI (Machos com DHEA Não Infectados), Grupo MSDI (Machos Sem DHEA e Infectados), MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado $n = 10$ animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.

MSDNI LPS vs. MDNI LPS

21 dia * $P < 0.05$

MSDI LPS vs. MDI LPS

7 dia * $P < 0.05$

14 dia ** $P < 0.001$

5.11. Linfoproliferação de esplenócitos

O tratamento com DHEA alterou a linfoproliferação de esplenócitos, onde os animais não infectados e tratados apresentaram um aumento estatisticamente significativo em comparação aos animais não tratados nos grupos de fêmeas.

Figura 7. Linfoproliferação de esplenócitos em ratos Wistar fêmeas não infectadas e infectadas com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento estimuladas e não estimuladas por concavalina A. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDNI vs. FDNI
 7 dia * $P < 0.001$
 14 dia * $P < 0.001$
 21 dia * $P < 0.001$

FSDNI CONA vs. FDNI CONA
 7 dia * $P < 0.001$
 14 dia ** $P < 0.01$
 21 dia * $P < 0.001$

O tratamento alterou a linfoproliferação de esplenócitos em machos, onde os animais não infectados estimulados e não estimulados por concavalina A apresentaram um aumento estatisticamente significativo em comparação aos animais não tratados. Observamos uma reação inversa nos grupos infectados que apresentaram decréscimo na proliferação celular porem sem valor estatisticamente significativo.

Figura 8. Linfoproliferação de esplenócitos em ratos Wistar machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento estimulados e não estimulados por concanavalina A. Grupo MSDNI (Machos Sem DHEA e Não Infectados), MDNI (Machos com DHEA Não Infectados), Grupo MSDI (Machos Sem DHEA e Infectados), MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativo valores onde $P < 0.05$.

MSDNI vs. MDNI

7 dia * $P < 0.01$

14 dia ** $P < 0.001$

MSDI vs. MDI

14 dia ** $P < 0.001$

MSDNI CONA vs. MDNI CONA

7 dia * $P < 0.01$

14 dia ** $P < 0.001$

5.12. População celular TCD3+

Análise fenotípica das populações celulares dos esplenócitos por citofluorimetria de fluxo revelou que o tratamento alterou a produção de linfócitos T CD3+, onde os animais infectados e tratados apresentaram uma redução estatisticamente significativa em comparação aos animais infectados e não tratados nos grupos fêmeas. Observamos também uma reação inversa nos animais não infectados e tratados que apresentaram um aumento significativo desta população celular para os grupos de machos e fêmeas.

Figura 9. Análise da população de linfócitos T CD3+ do baço de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDNI vs. FDNI

14 dia * $P < 0.001$ e 21 dia ** $P < 0.01$

FSDI vs. FDI

7, 14 e 21 dia ** $P < 0.01$

MSDNI vs. MDNI

14 dia * $P < 0.001$ e 21 dia ** $P < 0.01$

5.13. População celular TCD4+

Análise fenotípica das populações celulares dos esplenócitos por citofluorimetria de fluxo revelou que o tratamento alterou a produção de linfócitos T CD4+, onde os animais infectados e tratados apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) em comparação aos animais infectados e não tratados nos grupos fêmeas. Observou-se também uma reação inversa nos animais não infectados e tratados que apresentaram um aumento significativo desta população celular para os grupos de machos e fêmeas ($P < 0.05$).

Figura 10. Análise da população de linfócitos T CD4+ do baço de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDNI vs. FDNI

14 e 21 dia * $P < 0.001$

FSDI vs. FDI

7 dia ** $P < 0.01$

MSDNI vs. MDNI

14 dia *** $P < 0.05$ e 21 dia * $P < 0.001$

5.14. População celular TCD8+

Análise fenotípica das populações celulares dos esplenócitos por citofluorimetria de fluxo revelou que o tratamento alterou a produção de linfócitos T CD8+, onde os animais infectados e não infectados tratados apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) desta população em comparação aos animais não tratados.

Figura 11. Análise da população de linfócitos T CD8+ do baço de ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 7º, 14º e 21º dias de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado $n = 10$ animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDNI vs. FDNI
 14 dia * $P < 0.001$
 21 dia * $P < 0.001$
 FSDI vs. FDI
 7 dia * $P < 0.001$
 MSDNI vs. MDNI
 14 dia * $P < 0.001$
 21 dia * $P < 0.001$

5.15. Dosagem sérica de IL-2

A análise de IL-2 durante o pico parasitêmico (14º dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção desta interleucina apenas nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 12. Dosagem sérica de IL-2 expressa em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
14 dia * $P < 0.001$
MSDI vs. MDI
14 dia * $P < 0.001$

5.16. Dosagem sérica de IL-12

A análise de IL-12 durante o pico parasitêmico (14º dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção desta interleucina apenas nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 13. Dosagem sérica de IL-12 expressa em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
14 dia * $P < 0.01$
MSDI vs. MDI
14 dia * $P < 0.01$

5.17. Dosagem sérica de IL-4

A análise de IL-4 durante o pico parasitêmico (14º dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção desta interleucina apenas nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 14. Dosagem sérica de IL-4 expressa em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
14 dia * $P < 0.001$
MSDI vs. MDI
14 dia * $P < 0.001$

5.18. Dosagem sérica de IL-10

A análise de IL-10 durante o pico parasitêmico (14° dia de infecção), em todos os grupos experimentais, não revelou alterações estatisticamente significativas para produção desta interleucina ($P>0.05$).

Figura 15. Dosagem sérica de IL-10 expressa em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14° dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizada $n = 10$ animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P<0.05$.

5.19. Dosagem sérica de IFN- gama

A análise de IFN- gama durante o pico parasitêmico (14 dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção de interferon apenas nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 16. Dosagem sérica de IFN- gama expresso em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
14 dia * $P < 0.01$
MSDI vs. MDI
14 dia * $P < 0.01$

5.20. Dosagem sérica de TNF- alfa

A análise de TNF-alfa durante o pico parasitêmico (14º dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção de TNF apenas nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 17. Dosagem sérica de TNF- alfa expresso em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14º dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde $P < 0.05$.

FSDI vs. FDI
14 dia * $P < 0.05$
MSDI vs. MDI
14 dia * $P < 0.05$

5.21. Dosagem sérica de TGF-beta

A análise de TGF-beta durante o pico parasitêmico (14° dia de infecção), em todos os grupos experimentais, revelou que o tratamento com DHEA elevou a produção de TGF-beta nos grupos infectados de ambos os sexos.

Figura 18. Dosagem sérica de TGF-beta expresso em pg/ml em ratos Wistar fêmeas e machos não infectados e infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* com ou sem tratamento de DHEA durante o 14° dia de experimento. Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não Infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados). Para todos os grupos foi utilizado n = 10 animais. Considerando estatisticamente significativos valores onde P<0.05.

FSDI vs. FDI
14 dia *P<0.05
MSDI vs. MDI
14 dia *P<0.05

5.22. Dosagens Bioquímicas

O tratamento com DHEA provocou uma diminuição dos níveis de glicose plasmática nos grupos tratados infectados e não infectados machos e fêmeas com valores estatisticamente significantes ($P < 0.05$). Os níveis de colesterol sérico e triglicérides não apresentaram valores estatisticamente significativos ($P > 0.05$).

Tabela 5. Glicemia, colesterol e triglicérides de ratos *Wistar* machos e fêmeas tratados e não tratados com DHEA, infectados e não infectados intraperitonealmente com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante a evolução da infecção chagásica experimental.

	Glicose (mg/dl)	Colesterol (md/dl)	Triglicérides (mg/dl)
FSDNI	61 ± 9.7	76 ± 22.7	193 ± 76.2
FDNI	$26 \pm 11.3^*$	71 ± 28.3	191 ± 75.3
FSDI	58 ± 9.7	72 ± 13.9	189 ± 64.4
FDI	$22 \pm 9.3^*$	66 ± 15.9	185 ± 64.3
MSDNI	48 ± 7.1	82 ± 22.5	216 ± 49.2
MDNI	$11 \pm 5.6^*$	73 ± 33.5	203 ± 63.9
MSDI	72 ± 6.2	72 ± 23.5	179 ± 40.7
MDI	$31 \pm 5.4^*$	59 ± 12.5	180 ± 40.5

Grupo FSDNI (Fêmeas Sem DHEA e Não Infectadas), FDNI (Fêmeas com DHEA Não Infectadas), Grupo FSDI (Fêmeas Sem DHEA e Infectadas), FDI (Fêmeas com DHEA Infectadas). MSDNI (Machos Sem DHEA Não Infectados) e MDNI (Machos com DHEA Não infectados) MSDI (Machos Sem DHEA Infectados) e MDI (Machos com DHEA Infectados).

FSDNI vs. FDNI $*P < 0.05$
 FSDI vs. FDI $*P < 0.05$
 MSDNI vs. MDNI $*P < 0.05$
 MSDI vs. MDI $*P < 0.05$

5.23. Análise histológica do coração.

5.23.1. Macho Sem DHEA Não Infectado (MSDNI)

Aspecto histológico normal de fibras cardíacas dos animais não infectados e não tratados.

Figura 19. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) dos corações de ratos *Wistar* do grupo: Controle Machos, colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (A- 400X e B-1000X).

5.23.2. Macho Sem DHEA Infectado (MSDI) e Macho DHEA Infectado (MDI)

Sem tratamento: Presença de grandes e numerosos ninhos de amastigota nas fibras cardíacas de animais sem tratamento e infectados por *T. cruzi*.

Tratamento: Presença de pequenos e poucos ninhos de amastigota nas fibras cardíacas de animais tratados com DHEA e infectados por *T. cruzi*.

Figura 20. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) dos corações de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* dos grupos: não tratados (A) e tratados com DHEA (B) , colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X).

Seta: Presença de ninho de amastigota.

5.23.3. Fêmea Sem DHEA Infectada (FSDI) e Fêmea DHEA Infectado (FDI)

Sem tratamento: Presença de ninhos de amastigota nas fibras cardíacas de animais sem tratamento e infectados por *T. cruzi*.

Tratamento: Presença de pequenos e poucos ninhos de amastigota nas fibras cardíacas de animais tratados com DHEA e infectados por *T. cruzi*.

Figura 21. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) dos corações de ratos *Wistar* fêmeas infectadas com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* dos grupos: não tratados (A) e tratados com DHEA (B) , colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X).

Seta: Presença de ninho de amastigota.

5.24. Intensidade parasitária do coração

A análise da intensidade parasitária do coração mostrou um menor parasitismo nos animais submetidos ao tratamento com DHEA em ambos os grupos machos e fêmeas quando comparados aos animais não tratados.

Tabela 6. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual no coração de ratos *Wistar* machos infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi* nos diferentes dias de experimento

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento		
		7º	14º	21º
MSDI	5	+	++++	+
MDI	5	-	++	+
FSDI	5	+	++	-
FDI	5	-	+	-

(Macho Sem DHEA Infectado (MSDI), Macho DHEA Infectado (MDI), Fêmea Sem DHEA Infectada (FSDI), Fêmea DHEA Infectada (FDI)).

(++++) 50 a 100% dos campos parasitados

(+++) 25% a 50% dos campos parasitados

(++) 12,5% a 25% dos campos parasitados

(+) menos de 12,5% dos campos parasitados

(-) ausência de ninhos de amastigotas

5.25. Análise Histopatológica da Adrenal

5.25.1. Grupo Macho Sem DHEA Não Infectado (MSDNI) e Grupo Macho Sem DHEA Infectado (MSDI)

Sem tratamento: Aspecto histológico normal da glândula.

Tratamento: Presença de ninho de amastigota na região na região cortical da glândula.

Figura 22. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) das adrenais de ratos *Wistar* machos do grupo: Controle colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X). (A- Panorâmica, B- 400X Região Cortical zonas: glomerulosa fasciculada e reticular e C- 1000X Região Medular). Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) das adrenais de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* do grupo não tratado (D) colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X). Seta: Presença de ninho de amastigota.

5.26. Intensidade parasitária da adrenal

A análise da intensidade parasitária da glândula adrenal mostrou a presença de parasitas em ratos Wistar machos não tratado com DHEA quando comparados aos animais tratados que não apresentaram parasitas nesta glândula. Em relação às fêmeas não observamos parasitas nos grupos em estudos.

Tabela 7. Análise qualitativa da intensidade do parasitismo tecidual da adrenal de ratos *Wistar* machos e fêmeas infectados com 100.000 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* nos diferentes dias de experimento.

Grupo experimental	nº de animais	Dias de experimento		
		7º	14º	21º
MSDI	5	+	+	-
MDI	5	-	-	-
FSDI****	5	-	-	-
FDI*****	5	-	-	-

(Macho Sem DHEA Infectado (MSDI), Macho DHEA Infectado (MDI), Fêmea Sem DHEA Infectada (FSDI), Fêmea DHEA Infectada (FDI)).

(+++++) 50 a 100% dos campos parasitados

(+++) 25% a 50% dos campos parasitados

(++) 12,5% a 25% dos campos parasitados

(+) menos de 12,5% dos campos parasitados

(-) ausência de ninhos de amastigotas

5.27. Análise Histopatológica do Baço

5.27.1. Macho Sem DHEA Infectado (MSDI) e Macho DHEA Infectado (MDI)

Sem tratamento: Desorganização dos folículos linfóides e ausência de ninhos de amastigota.

Tratamento: Ausência de ninhos de amastigota e maior ativação de folículos linfóides.

Figura 23. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) do baço de ratos *Wistar* machos infectados com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. dos grupos: não tratados (A) e tratados com DHEA (B), colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X).

Seta: (A) Ausência de ativação de folículo linfóide (B) Ativação de folículo linfóide.

5.27.2. Fêmea Sem DHEA Infectada (FSDI) e Fêmea DHEA Infectado (FDI)

Sem tratamento: Desorganização dos folículos linfóides na zona vermelha do baço e ausência de parasitismo tecidual.

Tratamento: Ativação dos folículos linfóides e ausência de parasitismo tecidual.

Figura 24. Fotomicrografia de cortes histológicos (6 μ m) do baço de ratos *Wistar* fêmeas infectadas com 1×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. dos grupos: não tratados (A) e tratados com DHEA (B), colhidos no 14^o dia experimental e corados por hematoxilina-eosina (400X).

Seta: (A) Ausência de ativação de folículo linfóide (B) Ativação de folículo linfóide.

5.28. Intensidade parasitária do baço

O baço não apresentou parasitas em ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ou não ao tratamento com DHEA.

6- DISCUSSÃO

Para o tratamento de doença infecciosa ou parasitária é muito importante poder contar com um medicamento eficiente, no sentido de opor-se ao agente causador. Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo da doença de Chagas o seu tratamento ainda continua apresentando muitos problemas.

Quase uma centena de drogas já foram testadas contra *T. cruzi* em infecções com animais experimentais com resultados freqüentemente desanimadores. Poucas foram testadas no homem até o momento, e com resultados de baixa eficácia.

O interesse para o tratamento da doença de Chagas sempre foi muito grande e hoje se mostra como prioridade, especialmente depois que foram equacionados os principais problemas de prevenção da transmissão da doença, restando como desafio tratar milhões de indivíduos já infectados.

Sabemos que as drogas tripanossomicidas são supressoras de parasitemia e que, para agir na forma intracelular do parasita, seria necessário recorrer a altas doses quase sempre tóxicas nessas concentrações, inviabilizando sua ampla utilização na clínica. Dessa maneira a ciência necessita buscar novas substâncias que possam ajudar no combate à doença com mínimos efeitos colaterais.

O intuito deste trabalho foi estudar uma terapêutica imunomoduladora, capaz de abrandar a evolução da doença de Chagas experimental e possivelmente tentar utilizá-la em humanos.

Há algum tempo a dehidroepiandrosterona (DHEA) é considerada por muitos como o esteróide de múltiplas ações e vem interessando os pesquisadores da área médica.

Diversos autores já descreveram a ação imunoestimuladora do DHEA em pacientes portadores de HIV (CLERICE et al., 1997; CHRISTEFF et al., 1999; LEE et al., 1999), *Schistosoma mansoni* (MORALES et al., 2001), *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1993; RASMUSSEN et al., 1995), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (BEM-NATHAN et al., 1999) e *Trypanosoma cruzi* (DOS SANTOS et al., 2005).

Para os estudos das distintas ações do DHEA, diferentes modelos vem sendo utilizados, desde o homem até animais de laboratório. Este fato muitas vezes dificulta a avaliação dos verdadeiros efeitos desse hormônio em decorrência da diversidade de concentrações e vias de administração, além de diferentes respostas exibidas pelos vários modelos des estudo.

Adotamos como modelo experimental rato da linhagem Wistar, já que o mesmo tem sido amplamente empregado para investigações sobre aspectos gerais da doença de Chagas experimental (MORENO et al., 2003; MORILLA et al., 2005; SANTOS et al., 2005; SANTELLO et al., 2007). A infecção nesse animal progride até a terceira semana, quando normalmente ocorre o óbito, ou então os animais passam por uma fase crônica, dependendo da patogenicidade da cepa. Em nosso estudo não ocorreu mortalidade dos animais devido aos mesmos serem resistentes a cepa Y de *T. cruzi*.

De acordo com VICHÍ (1964), a cepa Y determinou uma infecção grave em ratos Wistar de peso entre 25 a 50g, com alta mortalidade entre o 10º e o 25º dia, lesões irregulares no miocárdio e intensa miocardite.

Em ratos Wistar de 40 dias inoculados com a mesma cepa (Y), SCORZA & SCORZA (1972) observaram miocardite de grande intensidade, porém os animais não morreram, cronificando desta maneira a doença. Cabe salientar que adotamos como modelo experimental ratos machos Wistar devido às seguintes razões:

- por apresentarem porte maior facilitando a manipulação,
- por terem a resposta de ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal bem estabelecido (DE SOUZA et al., 1984; DE SOUZA et al., 1985).

O primeiro parâmetro verificado foi a variação do peso corpóreo nos animais tratados ou não com DHEA juntamente com o efeito da infecção. O que pudemos observar foi que não houve variações significantes de peso desses animais durante o processo evolutivo da infecção (Tabela 1). A atividade do DHEA em relação à massa corpórea é contraditória. Os dados apresentados pela literatura relatam que o tratamento com DHEA pode promover um aumento da massa muscular traduzido por um aumento do peso corpóreo em camundongos (RASMUSSEN et al., 1995). Por outro lado, YEN et al., 1977, trabalhando com camundongos relataram uma redução da massa corpórea.

Em relação ao peso do coração de ratos Wistar machos tratados com DHEA, observou-se uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) (Tabela 2). Este fato ocorre devido à diminuição da carga parasitária provocada pela administração do DHEA. Como apresentado nos cortes histológicos, houve redução do infiltrado inflamatório com menor desorganização das fibras cardíacas e uma marcante diminuição do número de ninhos de amastigotas bem como seu tamanho, o que leva a uma menor hipertrofia cardíaca, com conseqüente diminuição do peso.

Quanto a histopatologia do coração, evidenciou-se que o tratamento com DHEA provocou uma redução do número e tamanho dos ninhos parasitários, bem como uma diminuição da migração de células inflamatórias, com conseqüente diminuição da desorganização das fibras cardíacas (Figura 20 e Figura 21) para os grupos machos e fêmeas. A análise da intensidade parasitária confirma os dados apresentados pela histopatologia, (Tabela 6) fato que certamente está correlacionada à baixa carga parasitária sanguínea observada na fase aguda dos animais submetidos à administração com DHEA.

Nos animais infectados e tratados com DHEA observamos a efetividade do tratamento na redução da intensidade parasitária da adrenal para machos. Esse fato está intimamente correlacionado ao efeito desse hormônio na fase aguda da doença no sentido de conter a replicação parasitária revelado por uma parasitemia reduzida estatisticamente significativa para os grupos tratados (Figura 22 e Tabela 7).

Da mesma forma que o DHEA produzido pela zona reticular da adrenal influencia de modo positivo o estímulo da imunidade do hospedeiro, outros hormônios também produzidos pelo córtex da adrenal exercem efeitos antagônicos. Dessa forma alguns autores consideram a veia central da glândula adrenal como sítio preferencial na instalação de *T. cruzi* na fase crônica da doença, devido às altas concentrações de corticosterona ali presentes, que por sua ação imunossupressora, protegeria o parasita das defesas naturais do organismo (TEIXEIRA et al., 1986).

Os mesmos autores observaram intenso parasitismo na veia central da adrenal em humanos que se encontravam na fase crônica, concluindo que nestes indivíduos, esta glândula representa um local de escape para o parasita.

Posteriormente demonstraram existir uma correlação entre o número de ninhos na veia central da adrenal e a intensidade de infiltrado inflamatório nas fibras cardíacas dos animais parasitados (TEIXEIRA et al., 1993). Contraditoriamente estudos utilizando roedores infectados com *T. cruzi* relatam a ausência de parasitismo tecidual na glândula supra-renal (MACHADO et al., 1990). Essas diferenças podem ser explicadas não apenas em decorrência das ações hormonais, mas também devido às diferenças no tropismo do parasita dependendo da cepa estudada. Estudos avaliando o tratamento com DHEA-S na infecção murina por retrovírus não detectou alteração no peso do baço nos animais submetidos ao tratamento (ARAGHI-NIKNAM et al., 1997). Avaliando os efeitos anti-estresse do DHEA em ratos, pesquisadores observaram que o mesmo tinha efeito antagônico em relação ao estresse, onde os animais submetidos ao tratamento apresentaram redução do peso do baço em relação ao animais não tratados (HU et al., 2000). Durante a realização desta pesquisa foi observado que os animais tratados apresentaram uma redução do peso do baço (Tabela 3).

Outro importante dado é a redução do peso da glândula adrenal nos animais submetidos ao tratamento com DHEA. Este fato provavelmente está associado a dose suprafisiológica a que foram submetidos os animais (Tabela 4) fato este também encontrado em estudos onde o tratamento com DHEA ocasionou redução do peso da adrenal (HU et al., 2000) .

Hoje está bem fundamentado que a grande maioria das doenças causadas por agentes patológicos leva a um desequilíbrio da resposta imune, onde um estado de imunossupressão normalmente se instala, de modo a proporcionar ao parasita, condições de evasão da resposta imune do hospedeiro.

Esse estado de supressão da resposta imune pode se agravar por diferentes situações de estresse, tanto agudo como crônico (BOHUS et al., 1991; CHROUSOS & GOLD, 1992; HARBUZ & LIGHTMAN, 1992).

Considerando as doenças como estímulos estressores, a infecção por *T. cruzi* tanto em humanos como em diferentes modelos experimentais ocasiona um desequilíbrio da resposta imune (CARDILLO et al., 1996; HAYES & KIERZENBAUM, 1981).

De forma genérica, podemos dizer que durante a fase aguda das tripanossomíases, tanto africana como americana, ocorre uma diminuição das funções das células T-helper, citotóxicas, bem como das células B (SZTEIN & KIERZENBAUM, 1993).

O principal resultado relatado nesta pesquisa é a relação parasitas circulantes e tratamento com DHEA. Os animais infectados com *T. cruzi* e tratados com DHEA apresentaram uma redução significativa do número de parasitas quando comparados aos animais do grupo infectado não tratados para ambos os sexos (Figura 1).

Esses dados apesar de serem inéditos em relação ao tratamento com DHEA e infecção por *T. cruzi*, confirmam a ação imunomoduladora deste hormônio já verificada por outros autores com diferentes parasitas já que é sabido que o DHEA tem ação protetora contra certos tipos de infecção tais como: por bactérias (BEN-NATHAN et al., 1999), e parasitas como: *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN et al., 1995), *Toxoplasma gondii* (KHALIFA et al., 2000) *Plasmodium falciparum* (LEENSTRA et al., 2003), *Schistosoma mansoni* (MORALES-MONTOR et al., 2001).

A avaliação do efeito do tratamento com DHEA em hamsters infectados com *Cryptosporidium parvum* (RASMUSSEN & HEALY, 1992) mostra uma significativa redução da infecção devido a um aumento na produção de IL-2 e possível modificação da flora intestinal levando a uma inabilidade de colonização do parasita no trato gastro-intestinal.

Posteriormente o mesmo autor estudou o efeito do DHEA em camundongos C57BL/6N imunossuprimidos onde ocorreu um aumento na resistência frente à infecção (RASMUSSEN et al., 1995). Avaliando a produção IL-2 e IL-12 foi observado um aumento dessas citocinas nos grupos machos e fêmeas infectados e tratados com DHEA (Figura 12 e Figura 13). Esse aumento pode estar relacionado à diminuição da parasitemia encontrada nos grupos infectados e tratados (Figura 1).

A esquistossomose mansônica também tem sido estudada, observando-se não apenas a redução do número de larvas, mas também o efeito do DHEA sobre o dimorfismo sexual. Camundongos fêmeas são naturalmente menos resistentes à infecção por *S. mansoni*. O tratamento com DHEA tornou as fêmeas mais resistentes devido a uma elevação dos níveis de testosterona, visto que o DHEA é um precursor deste hormônio (FALLON et al., 1997).

Levando-se em consideração o dimorfismo sexual como um fator importante no direcionamento da evolução de uma parasitose, verificamos que as fêmeas apresentaram menor número de parasitas em comparação aos machos para ambos os grupos tratados e não tratados com DHEA (Figura 1). Os dados do presente projeto corroboram aos apresentados na literatura onde foi verificado que as fêmeas infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* apresentaram parasitemia menor quando comparadas aos machos (PRADO et al., 1998; PRADO et al., 1999).

Inúmeros trabalhos demonstram a existência de comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino (BESEDOVSKY et al., 1986; GROSSMAN, 1985; MASTORAKOS et al., 1999; MURGO & GOOD, 1999).

Dessa maneira é de conhecimento que os hormônios exercem uma importante ação sobre o sistema imune, podendo gerar condições ora favoráveis, ora desfavoráveis para o estabelecimento de determinadas patologias. Dentro deste cenário podemos destacar a importante influência dos esteróides da glândula adrenal sobre a parasitemia da doença de Chagas tanto em humanos (ALMEIDA et al. 1981) quanto em roedores (MACHADO et al., 1990; SANTOS et al., 2005).

Foi avaliado o efeito do tratamento com DHEA sobre a população de leucócitos periféricos e este mostrou uma discreta elevação para os grupos infectados e não infectados de ambos os sexos (Figura 2). Este fato pode estar relacionado a uma estimulação na blastogênese dessas células, mas não podemos esquecer também os efeitos antagônicos do cortisol que, como anti-inflamatório, inibe a migração de células ao local do desafio imunológico, aumentando o número de leucócitos circulantes.

Talvez o discreto aumento dos linfócitos por nós observados seja a consequência dos efeitos antagônicos do DHEA e dos glicorticóides presentes durante a fase aguda da infecção. Quanto à ação do DHEA sobre a blastogênese de células, LORIA et al. (1996) descrevem que o DHEA e seus metabólitos possuem efeitos distintos *in vitro* e *in vivo*, porém tanto o DHEA e principalmente seu metabólito androstenediona provocam uma ativação na proliferação de linfócitos.

Os efeitos imunoestimulatórios da administração de DHEA também foi observada sobre a contagem global de macrófagos peritoniais de ratos Wistar machos e fêmeas, os quais apresentaram aumento significativo do número dessas células em relação aos grupos não tratados (Figura 3).

Inúmeros outros autores já demonstraram a ação imunoestimuladora do DHEA. DAYNES et al. (1990) relatam a habilidade do DHEA em ativar linfócitos a produzirem IL-2.

A resposta humoral possui papel extremamente importante na resistência à infecção por *T. cruzi* (BRENER e KRETTLI, 1990). Sabemos que a infecção experimental aguda por *T. cruzi* causa uma ativação intensa e diversificada de linfócitos B com alta produção de imunoglobulina e nesta fase uma pequena fração da imunoglobulina total produzida, que por sua vez é dependente da atividade de linfócitos T CD4 auxiliares (MINOPRIO et al., 1989).

O aparecimento de anticorpos específicos está relacionado com a queda da parasitemia. Alguns mecanismos inatos, como a produção de IFN- γ , exercem efeitos protetor que antecede o aparecimento de anticorpos. Posteriormente, ao longo da fase aguda da infecção, os dois mecanismos, IFN- γ e anticorpos cooperam entre si para determinar a proteção do hospedeiro (PLATA et al., 1987). Esses dados demonstram a importância da resposta humoral e celular no controle da parasitemia e mortalidade durante a infecção por *T. cruzi*.

Vários estudos no modelo murino da infecção, contribuíram para demonstrar o papel de anticorpos específicos na proteção do hospedeiro (LEVY et al., 1996; SANTOS et al., 2005).

Um estudo até hoje fundamental para esta área, mostra que somente anticorpos capazes de reagir com formas tripomastigotas vivas do parasita, e de induzir a lise mediada por complemento estavam associados a um estado de proteção do hospedeiro (KRETTLI & BRENER, 1982).

Esses anticorpos foram denominados de anticorpos líticos e seu nível decaiu rapidamente no soro de animais cronicamente infectados, após tratamento eficaz contra o parasita, enquanto anticorpos convencionais (não líticos) permanecem presentes.

Desta maneira a análise de anticorpos líticos é uma prova utilizada como monitoramento da presença de anticorpos circulantes ligados a reagudização da doença.

O presente estudo avaliou a porcentagem da produção de anticorpos líticos e foi observado que a porcentagem de lise é maior no grupo tratado durante o 14º dia, para ambos os sexos (Figura 4). Deve-se ressaltar que a porcentagem de lise nas fêmeas foi maior que a dos machos, fato que está em acordo com a análise de parasitas sangüíneos onde as mesmas apresentaram quantidades inferiores de parasitas em relação aos machos menores (Figura 1), comprovando a ação estimuladora do DHEA na otimização da resposta humoral.

A produção de NO apresentou valores mais elevados no 14º dia, os grupos tratados com DHEA apresentaram aparentemente um aumento na produção de óxido nítrico em relação ao grupo não tratado, porém este aumento foi estatisticamente não significativo ($P < 0,05$) para machos e fêmeas.

Apenas os grupos submetidos a estimulação por LPS apresentaram valores estatisticamente significantes em relação ao aumento de NO frente ao tratamento para grupos infectados e não infectados de ambos os sexos (Figuras 5 e 6). A resistência à infecção por *T. cruzi* é dependente em parte da expressão de NO sintase produzida pelos macrófagos (GARCIA et al., 1999). IFN- γ e TNF- α possuem um papel importante na indução da produção de NO pelos macrófagos (MACMICKING, et al., 1997).

O óxido nítrico produzido é considerado como um importante mediador da atividade microbida não apenas destas células, mas de outras com atividade fagocítica (FIERRO et al., 1999).

Os resultado obtidos nesta pesquisa corroboram com os anteriormente observados e aponta o DHEA como um imuno-modulador da resposta imune, aumentando a produção de NO por parte dos animais infectados e submetidos à terapia hormonal, refletindo por meio dos diversos parâmetros apresentados neste trabalho uma maior resistência à infecção por *T. cruzi*.

Foi avaliada a linfoproliferação de esplenócitos frente ao tratamento com DHEA e observou-se que os animais de ambos os sexos tratados e não infectados apresentaram um aumento estatisticamente significante durante todos os dias de experimento na proliferação celular em relação aos não tratados, porém no grupo infectado durante o tratamento não foram observadas alterações estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Em relação ao grupo estimulado por concavalina observou-se aumento celular para os grupos não infectados e tratados, e para o grupo infectado fêmea no sétimo dia (Figura 7 e 8).

O presente resultado contradiz os encontrados em estudo onde o tratamento com DHEA diminui a proliferação de esplenócitos estimulados por LPS e para concanavalina A onde nenhum efeito na proliferação foi observado (POWELL & SONNENFELD, 2006).

Além da ativação de macrófagos e células NK, a infecção pelo *T. cruzi* também mobiliza outros elementos celulares envolvidos na resposta inata do hospedeiro. Algumas subpopulações linfocitárias são intensamente estimuladas no modelo murino de infecção. Duas principais subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ são importantes no controle à infecção causada por *T. cruzi*.

Animais geneticamente deficientes destas subpopulações são mais susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, apresentando alta mortalidade e parasitemia frente a inóculos facilmente controlados por animais normais (ROTTENBERG et al., 1993).

A necessidade de células T CD4+ foi atribuída tanto à sua capacidade de auxiliar na produção de anticorpos líticos quanto em produzir citocinas como o INF- γ que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasita em células infectadas (TARLETON et al., 1996).

Durante a avaliação do tratamento com DHEA em camundongos imunossuprimidos e infectados com *Cryptosporidium parvum* detectou-se um aumento das populações de células esplênicas T CD4+ e T CD8+ em relação ao animais não tratados (RASMUSSEN et al., 1995). Em contrapartida esses resultados são contraditórios aos observados em animais não infectados onde o tratamento não alterou a produção dessas populações celulares (DAYNES et al., 1990).

Tais diferenças podem ser explicadas através da dose administrada nos diferentes trabalhos onde DAYNES et al. (1990) administrou 100 µg por animal e RASMUSSEN et al. (1995) administrou 10 mg por animal por dia.

Análise fenotípica das populações celulares por citofluorimetria de fluxo revelou que o tratamento com DHEA reduziu a produção de linfócitos T CD4⁺ nos animais infectados o mesmo não ocorreu nos animais sem infecção onde o grupo tratado apresentou um aumento desta população em relação ao grupo não tratado (Figura 11).

Em relação a produção linfócitos T CD8⁺, ambos os grupos infectados e não infectados tratados apresentaram uma redução desta população em comparação aos animais não tratados (Figura 12).

A replicação do parasita nos macrófagos é aparentemente regulada por citocinas, que afetam, não apenas o desenvolvimento da infecção, mas também a morbidade da doença. Dentre as citocinas estudadas, o IFN-gama tem sido associado a resistência do hospedeiro à infecção durante a fase aguda (SILVA et al., 1992; SAMUDIO et al., 1998). Em modelos experimentais, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a administração de IFN-gama tem efeito protetor; já sua neutralização resulta em aumento da susceptibilidade.

A produção dessa citocina, no início da infecção, diminui a mortalidade dos animais infectados apesar de não eliminar a infecção (SILVA et al., 1992; MINOPRIO et al., 1993; CARDILLO et al., 1996). Nessa fase, a principal fonte de produção de IFN-gama é a célula NK; a produção de IFN-gama por linfócitos T ocorre só tardiamente.

Outras citocinas, como IL-10 e TGF-beta, estão associadas a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992), devido, provavelmente, a seu papel inibidor da atividade de IFN-gama. REED et al. (1988) e CARDILLO et al. (1996) mostraram que a produção de IFN-gama por células mononucleares, induzida pelo *T. cruzi* *in vitro* ou *in vivo*, seria regulada pela IL-10, sugerindo que a maior ou menor resistência observada na fase inicial da infecção (fase aguda) poderia ser uma consequência do balanço IFN-gama / IL-10 (SILVA et al., 1998).

O controle da progressão da tripanosomíase no hospedeiro é dependente dos níveis de TNF- α e IFN- γ durante a fase aguda da infecção (SILVA et al., 1995).

Alguns trabalhos demonstram que o padrão de produção de citocinas determina o direcionamento da infecção por *T. cruzi*. Relatam ainda que a inibição gênica em animais knockout, ou a neutralização de não produtores de IFN- γ , TNF- α , e IL-12 agrava a infecção por *T. cruzi* (GALVÃO DA SILVA et al., 2003, SILVA et al., 1995).

Diversos trabalhos relatam que tanto IFN- γ quanto TNF- α são potentes mediadores da resposta imune do hospedeiro contra o parasita (SILVA et al., 1995; MICHELIN et al., 2005). Sabe-se também que o DHEA exerce uma ação potencializadora sobre a resposta imune (DAYNES et al., 1990).

Os dados encontrados na literatura referentes à participação do IFN- γ no controle da doença de Chagas experimental, bem como a ação imuno-moduladora do DHEA, corroboram com os resultados desta pesquisa.

A terapia com DHEA induziu uma otimização na produção de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α (Figuras 12, 13, 16 e 17) nos grupos infectados, que no 14º dia experimental apresentaram uma concentração significativamente mais elevada que o grupo não tratado para ambos o sexo, assim, o aumento que obtivemos vem a confirmar os dados previamente apresentados na literatura comprovando uma ação estimuladora do DHEA na produção de citocinas (DAYNES et al., 1990).

É sabido que o DHEA apresenta múltiplas funções em relação a produção de células T e macrófagos. Estudos sugerem que altas concentrações de DHEA favorecem uma elevação na resposta Th-2 elevando a concentração de IL-4 e TGF- β (DU et al., 2001).

Todavia esses resultados são contraditórios com os achados in vivo onde a administração de DHEA estimula a resposta Th-1 (INSERRA et al., 1998; ZHANG et al., 1999). Esta discrepância pode ser em parte explicada devido ao fato do DHEA ser rapidamente convertido em outros esteróides (LONGCOPE, 1995).

Em relação a resposta Th-2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) também observamos uma estimulação do DHEA neste parâmetro avaliado nos animais infectados submetidos ao tratamento (Figuras 14, 15 e 18).

Desta forma, a administração hormonal parece agir de maneira sinérgica com as outras interleucinas avaliadas neste experimento no sentido de reduzir as alterações patológicas da infecção ao hospedeiro, demonstrando a capacidade imunomoduladora deste hormônio, direcionando positivamente a resposta imunológica do tipo Th-1 no combate ao parasita, e também de atuar na resposta Th-2 com conseqüente diminuição das agressões patológicas em conseqüência da parasitose.

BRICENO e MOSCA (1996) avaliaram a produção de IL-2 em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e observaram que pacientes chagásicos assintomáticos apresentavam níveis mais altos de IL-2 que os com cardiopatia.

Artigos relatam as atividades biológicas do DHEA incluindo: redução da massa corpórea (YEN et al., 1977; SCHWARTZ et al., 1981), inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase (TSUTSUI et al., 1962), efeito anti-tumoral (SCHWARTZ et al., 1981), e redução da glicose sanguínea (COLEMAN et al., 1982).

Alguns parâmetros bioquímicos foram também avaliados, dentre eles a dosagem de glicose. Observamos um potente efeito hipoglicemiante na vigência do tratamento com DHEA nos grupos tratados infectados e não infectados (Tabela 5). Os resultados obtidos corroboram os já existentes na literatura, evidenciando a capacidade do DHEA em reduzir a glicose (COLEMAN et al., 1982).

Sabe-se que durante a fase inicial de uma infecção ocorre elevação dos níveis de cortisol propiciando condições para o agente patogêncio evadir-se da resposta imune. A cortisolemia também está relacionada com o aumento de glicose no sangue, demonstrando desta maneira que o cortisol afeta diretamente a gliconeogênese (KHANI & TAYEK, 2001).

Outro trabalho demonstrou que ratos submetidos a adrenalectomia apresentaram redução nas concentrações de glicose (CIPRES et al., 1995). Dessa forma podemos aventar a hipótese que o tratamento com DHEA na infecção por *T. cruzi* sobrepôs os efeitos antagônicos do cortisol que aqui é revelado por uma contenção da evolução parasitária em decorrência do estímulo da resposta imune induzida pela administração de DHEA.

A avaliação dos níveis de colesterol e triglicérides não apresentaram alterações significativas em decorrência da administração do DHEA (Tabela 5). Apesar desse hormônio exercer ação inibidora sobre a enzima glicose-6-fosfato, enzima esta necessária para produzir NADPH que por sua vez participa da síntese de ácidos graxos, também conhecidos por seus efeitos antiobesidade, não foram estimuladas o suficiente para produzirem um efeito redutor para os níveis de colesterol e triglicérides.

Os resultados apresentados nesse trabalho comprovam a importante influência que o tratamento com DHEA tem no desenvolvimento da fase aguda da infecção chagásica. A suplementação com DHEA exerce uma importante ação sobre o sistema imune, gerando condições desfavoráveis para o estabelecimento do parasita.

O encontro de novas drogas eficazes no tratamento da doença de Chagas ainda requer inúmeros esforços. Desta maneira os dados até o momento obtidos com a utilização do DHEA revelam seu potencial efeito imunoestimulador, minimizando as consequências patológicas que normalmente ocorrem na fase tardia da doença.

Certamente não estamos satisfeitos com os poucos recursos terapêuticos para o tratamento da doença. É imperioso buscar novos medicamentos eficientes. Desta maneira, este trabalho já publicado vem a se somar em mais uma terapia para o tratamento da infecção chagásica.

7- CONCLUSÃO

A terapia com DHEA exerceu uma ação parcialmente efetiva sobre a resposta imune celular e humoral, que pode ser resumida por uma redução significativa da parasitemia sanguínea e tecidual, minimizando as lesões e conseqüências patogênicas características da fase crônica.

Desta maneira conclui-se que o DHEA quando administrado durante a infecção chagásica experimental pode ser considerado como uma ferramenta parcialmente eficaz para o controle da evolução da fase aguda da infecção experimental para ambos os sexos. Deve ser levando em conta que a utilização deste hormônio não assume caráter curativo, apenas propicia melhores condições ao hospedeiro de direcionar sua resposta imunológica, de forma a controlar a replicação parasitária, sem ocasionar no hospedeiro os efeitos colaterais danosos procados pelas drogas tripanossomicidas disponíveis atualmente no mercado.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. Fisiologia. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1999.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, 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*. **Infect. Immun.**, v.67, p.4819-4826, 1999.

ALMEIDA, H.O.; TEIXEIRA, V.P.A.; OLIVEIRA, A.C.F. Flebite com parasitismo em supra-renais de chagásicos crônicos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.36, p.341-344, 1981

ALVARO-MORALES.; JEREMY, P.W.; CULLEY, C. CARSON, III. Andropause: A misnomer for a true clinical entity. **J. Urol.**, v.163, p.705-712, 2000.

AMATO-NETO, V. Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas. Tratamento Específico da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Arq. Bras. Cardiol.** v.70, doi: 10.1590/S0066-782X1998000100013, 1998.

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

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

ARAGHI-NIKNAM, M.; LIANG, B.; ZHANG Z.; ARDESTANI, S.K.; WATSON, R.R.; Modulation of immune dysfunction during murine leukaemia retrovirus infection of old mice by dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS). **Immunology**, v.90, :344-349, 1997

ARAGHI-NIKNAUM, M.; ZHANG, Z.; JIANG, S.; CALL, O. ESKELSON, C.D.; WATSON, R.R. Cytokine dysregulation and increase oxidation is prevent by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retrovirus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.216, p.386-391, 1997.

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

BESEDOVSKY, H.; REY, A.D.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory Feedback Between Interleukin-1 and Glucocorticoid Hormones. **Science.**, v.233, p.652-654, 1986.

BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; DE RUITER, A.J.H.; HEIJNEN, C.J. Stress and differential alterations in immune system functions: conclusions from social stress studies in animals. **Neth. J. Med.**, v.39, p.306-315, 1991.

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

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

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

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

BRICENO, L.; MOSCA, W. Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.91, p.601-607, 1996.

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*. **Dig Dis Sci**. v.51, p.1796-1800, 2006.

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

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infect. Immunity**, v.64, p128-134, 1996.

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 do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CHAGAS FILHO, C. Histórico sobre doença de Chagas. In: Cançado JR (ed) Doença de Chagas. Imprensa Oficial, Belo Horizonte, p. 5-21, 1968.

CHROUSOS, G. P. & GOLD P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, **JAMA**, v.267, p.1244, 1992.

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.4-9, 1999.

CIPRES, G.; BUTTA, N.; URCELAY, E.; PARRILLA, R.; MARTIN-REQUERO, A. Impaired protein kinase C activation is associated with decreased hepatic alpha-adrenoreceptor responsiveness in adrenalectomized rats. **Endocrinology**, v.136, p.468-475, 1995.

CLERICI, M.; TRABATTONI, D.; PICONI, S.; FUSI, M.L.; RUZZANTE, S.; CLERICI, C.; VILLA, M.L. A possible role for the cortisol/anticortisol imbalance in the progression of human immunodeficiency. **Psychoneuroendocrinology**, Suppl. 1:S, p.27-31, 1997.

COLEMAN, D.L, LEITER, E.A.; SCHWIZER, R.W. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. **Diabetes**, p. 830, 1982.

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

CUNHA, F.Q. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrofages. **Immunology.**, v.79, p.408-411, 1993.

CUNHA, D.F.; VIEIRA, SILVA, G.P.; ERÉDIA, G.R.; TEIXEIRA, V.P.A. Reação da fase aguda do parasitismo na veia central da supra renal de chagásicos crônicos. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v.27, p. 83-86, 1995.

CUNHA, F.Q. **Mecanismos de indução e ou inibição no sistema óxido nítrico.** 1995. p.79. Tese (livre docência) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

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

DAYNES R.A.; DUDLEY, D.J.; ARANEO, B. Regulation of murine lymphokine production *in vivo* II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.20, p.793-802, 1990.

De SOUZA, E.; PERRIN, M.; RIVIER, J.; VALE, W.; KUHAR, M.J. Corticotropin-release factor receptors in rat pituitary gland: autoradiografic localization. **Brain Res.**, v.296, p.202-207, 1984.

De SOUZA, E. B.; INSEL, T. R.; PERRIN, M. H.; RIVIER, J.; VALE, W. W.; KUHAR, M. J. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: An autoradiography study. **J. Neurosci.**, v. 5, p.3189-3203, 1985.

DIAS, J.C.P & COURA, J.R. Epidemiologia. In: **Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral** (J.C.P. Dias & J.R. Coura, org.), p.33-66, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

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

DOS SANTOS, C.D.; TOLDO, M.P.A.; JUNIOR, J.C. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. **Acta Tropica**, 10.1016/j.actatropica.2007.04.010, 2007

DU, C.; GUAN, Q.; KHALIL, M.W.; SRIRAM, S. Stimulation of Th2 response by high doses of dehydroepiandrosterone in KLH-primed splenocytes. **Exp Biol Med.**, v.226, p.1051-1060, 2001

EICH, D.M.; JOHNSON, D.E.; NESTLER, J.E et al. Inhibition of cardiac allograft atherosclerosis by dehydroepiandrosterone. **Clin. Res.**, v.38, 1990.

FALLON, P.G.; RICHARDSON, E.J.; JONES, F.M.; DUNNE, D.W. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.5, 251-253, 1998.

FIERRO, I.M.; NASCIMENTO-DASILVA, V.; ARRUDA, M.A.; FREITAS, M.S.; PLOTKOWSKI, M.C.; CUNHA, F.Q.; BARJA-FIDALGO, C. Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. **J. Leukoc. Biol.**, v.65, p.508-514, 1999.

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

FOURNET-BOURGUIGNON, M.P.; VANHOUTTE, P.M.; VILAINE, J.P. Dysfunction of the nitric oxide pathway during coronary endothelium regeneration. **Bull Acad Natl Med.**, v.186, p.1525-1539, 2002.

GALVAO DA SILVA, A.P.; JACYSYN, J.F.; DE ALMEIDA .; ABRAHAMSOHN I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology**, v.108, p. 230-237, 2003.

GARCIA, S.B.; PAULA, J.S.; GIOVANNETTI, G.S.; ZENHA, F.; RAMALHO, E.M.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.**, v.93, p.191-197, 1999.

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

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

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

HAEYS, M.M &; KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' Disease: Kinetics of Lymphocyte Responses and Immunological Control of the Transition from Acute to Chronic *Trypanossoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity.** v.31, n.3, p.1117-1124, 1981

HARBUZ, M.S & LIGHTMAN, S.L. Stress and hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **J. Endocrinol.** v.134, p.327-329, 1992.

HOMBURGER, H.; ROSENSTOCK, W.; PAXTO, H. Assessment of Interlaboratory variability on immunophenotyping. Results of the College of American Pathologists Flow Citometry Survey. **Ann. NY Aca. Sci.**, p. 43-49, 1993.

HU, Y.; CARDOUNEL, A.; GURSOY, E.; ANDERSON, P.; KALIMI, M. Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v.59, p.753-762, 2000

IANNI, B. M.; MADY, C. Como era gostoso o meu caldo de cana...doi: 10.1590/S0066-782X2005001900001. **Arq. Bras. Cardiol.**, vol.85, São Paulo. 2005

INSERRA, P., ZHANG, Z.; ARDESTANI, S.K.; ARAGHI-NIKNAM, M.; LIANG, B.; JIANG, S.; SHAW, D.; MOLITOR, M.; ELLIOTT, K.; WATSON, R.R. Modulation of cytokine production by dehydroepiandrosterone (DHEA) plus melatonin (MLT) supplementation of old mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.218, p. 76-82, 1998.

JESSE, R., J. NESTLER, D. EICH et al. Dehydroepiandrosterone *in vivo* and *in vitro* inhibits platelets aggregation. **J Am. Coll. Cardiol.**, v.17, p.376, 1991.

KHALIFA, A.M.; IBRAHIM, I.R.; EL-KERDANY, E.D. Coccidial infection in immunosuppressed mice: prophylaxis and treatment with dehydroepiandrosterone. **East Mediterr. Health J.**, v.6, p.908-918, 2000.

KHANI, S & TAYEK, A.J. Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome. **Clin. Sci.**, v.101, p.739-747, 2001.

KHAW, K.T. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and cardiovascular disease. **Journal of Endocrinology.**, p, S149-S153, 1996.

KHORRAM, O.; VU, L.; YEN, S.S. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced men. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.52, p.1-7, 1997.

KIERSZENBAUM, F & HOWARD, J.D. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection; the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.**, v.116, p.755-766, 1976.

KNOWLES, R.G. & MONCADA, S. Nitric oxide synthesis in mammals. **Biochem. J.**, v.298, p.249-258, 1994.

KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, v.116, p.755-60, 1976.

KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.**, v.128, p.2009-2012, 1982.

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

LANDAY, A.; OHISSON, W.B.; GEORGI, J. Applications of flow cytometry to the study of HIV infection, **AIDS.**, v.4, p.449-79, 1990.

LEE, J.; SEPULVEDA, R.T.; JIANG, S.; ZHANG, Z.; INSERRA, P.; ZHANG, Y.; HOSSEINI, S.; WATSON, R.R. Immune dysfunction during alcohol consumption and murine AIDS: the protective role of dehydroepiandrosterone sulfate. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.23, p.856-862, 1999.

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

LEVY, A.M. DE APARECIDA.; BOAINAIN, E. & KLOETZEL, J.K. In Situ Indirect Fluorescent Antibody: A New Specific Test to Detect Ongoing Chagasic Infections. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.10, p. 98-103, 1996.

LONGCOPE, C. Metabolism of dehydroepiandrosterone. In: Bellino FL, Daynes RA, Hornsby PJ, Lavrin DH, Nestle JE, Eds. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Aging. New York: New York Academy of Science, v.774, p.143-148, 1995.

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.

LORIA, R.M. & PADGETT, D. A. Control of the immune response by DHEA and its metabolites. **Rinsho Byori.**, v.46, p.505-17, 1998.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas (2a. Edição).** BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. & BARRA-NETTO, M. Capítulo 17, p.345-378, 2000.

MACHADO, L.R.; MACHADO, C.R.S.; CARDOSO, J.E.; BARBOSA, A.J.A. Rat adrenal in experimental american trypanosomiasis: immunocytochemical study of tissue parasitism. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, p.126-130, 1990.

MACMICKING J, XIE QW, NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol. Rev.**, v.15, p. 323-350, 1997.

MARTINEZ-TABOADA, V.; BARTOLOME, M.J.; AMADO, J.A.; BLANCO, R.; GARCIA-UNZUETA, M.T.; RODRIGUEZ-VALVERDE, V.; LOPEZ-HOYOS, M. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Mech. Ageing Dev.**, v.123, p.1477-1486, 2002.

MASTORAKOS, G.; BAMBERGER, C and CHROUSOS, P. G. **Neuroendocrine Regulation of the Immune Process.** In: PLOTNIKOFF, N. P. FAITH, R. E,

MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, v.64, p.475-482, 1978.

MICHELIN MA, SILVA JS, CUNHA FQ. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.**, v.111, p.71-79, 2005.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J. Immunol.**, v.151, p.4200-4208, 1993.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.L.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. Quantitation of both T and B-cell responses. **Scand. J. Immunol.**, v.24, 661-668, 1989.

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

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*. **J. infect. Dis.**, v.15; 183, p.313-320, 2001.

MORENO, E.A.; RIVERA, I.M.; MORENO, S.C.; ALARCON, M.E.; LUGO-YARBUH, A. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection. **Invest. Clin.**, v.44, p.241-254, 2003.

MORFIN, R.; LAFAYE, P.; COTILLON, A.C.; NATO, F.; CHMIELEWSKI, V.; POMPON, D. 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.917, p.971-982. 2000.

MORILLA, M.J.; PRIETO, M.J.; ROMERO, E.L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components?

Mem Inst Oswaldo Cruz., v.100, p. 213-219, 2005.

MURGO, A. J. & GOOD, R.A. Cytokines Stress and Immunity, CRC Press LLC USA, p.17-37, 1999. MURGO, A. J. & GOOD, R.A. **Cytokines Stress and Immunity**, CRC Press LLC USA, p.17-37, 1999.

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

NATHAN, N.C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v.78, p.915-918, 1994.

NESTLER, J. E.; CLORE, J.N.; BLACKARD, W.G. Dehydroepiandrosterone: the “missing link” between hyperinsulinemia and atherosclerosis. **FASEB J.**, p.3073-3075, 1992.

OBERBECK, R.; DAHLWEID, M.; KOCH, R.; VAN GRIENSVEN, M.; EMMENDORFER, A.; TSCHERNE, H.; PAPE, H.C. Dehydroepiandrosterone decreases mortality rate and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis. **Crit. Care. Med.**, v.29, p.380-384, 2001.

OKABE, T.; HAJI, M.; TAKAYANAGI, R.; ADACHI, M.; IMASAKI, K.; KURIMOTO, F.; WATANABE, T.; NAWATA, H. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.80, p.2993-2996, 1995.

OLSZEWER, E. **DHEA o hormônio marcador biológico**. Editora Tecnopress. São Paulo, 1996.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a co stimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p.8676-8680, 1992.

PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v.138, p. 397-415, 1987.

POLTE, T.; OBERLE, S.; SCHRODER, H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. **FEBS Lett.**, v.409, p. 46-48, 1997.

POWELL, J.M.; SONNENFELD, G. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.26, p. 34-39, 2006.

PRADO, J.C.J.; LEAL, M.P.; FRANCI, J.A.A.; ANDRADE, H.F.J. & KLOETZEL, J.K. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v.84, p. 100-105, 1998.

PRADO, J.C.J.; LEVY, A.M.A., 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*. **Parasitol. Res.**, v.85, p. 826-829, 1999.

RASMUSSEN, K.R.; HEALEY, M.C. Dehydroepiandrosterone-induced reduction of *Cryptosporidium parvum* infections in aged Syrian golden hamsters. **J. Parasitol.**, v.78, p. 554-557, 1992.

RAMUSSEN, K.R.; MARTIN, E.G.; HEALEY, M.C.. Effects of dehydroepiandrosterone in immunossupressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Parasitol.**, v.79, p. 364-370, 1993.

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

REED, S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune supression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.140, p. 4342-4347, 1988.

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

REGELSON, W.; LORIA, R.; KALIMI, M. Dehydroepiandrosterone (DHEA)--the "mother steroid". I. Immunologic action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.31, p.553-563, 1994.

REGELSON, W & COLMAN, C. **Super hormônio. O antidoto natural contra o envelhecimento**. Editora record Rio de Janeiro, 1996.

ROTTENBERG, M.E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, 1993 v.61, p. 5129-5133.

SAMUDIO, M.; MOTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M.; MARTINEZ, J.; ROJAS DE ARIAS, A. & JAMES, M.A. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 119-121. 1998

SACCO, M.; VALENTI, G.; CORVI-MORA, P.; WU, F.C.; RAY, D.W. DHEA, a selective glucocorticoid receptor antagonist: its role in immune system regulation and metabolism. **J Endocrinol Invest.**, v.25, 81-92, 2002.

SALTZMAN, B.E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in the atmosphere. **Anal. Chemis.**, v.26, p.1949-55, 1954.

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

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

SANTOS, C.D.; LEVY, A.M.; TOLDO, M.P.; AZEVEDO, A.P.; PRADO JUNIOR, J.C. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Vet. Parasitol.**, v.143, p.222-228, 2007.

SCHMIDT, H.H.H.W & WALTER, U. NO at work. **Cell.**, v.78, p.919-925, 1994.

SCHWARTZ, A.G.; HARD, G.C.; PASHKO, L.L.; ABOU-GHARBIA, M.; SWERN, D. Dehydroepiandrosterone: an anti-obesity and anti-carcinogenic agent. **Nutr Cancer.**, v.3, p. 46-53, 1981.

SCORZA, C. & SCORZA, J.V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty - ninth day after inoculation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.14, p.171-177, 1972.

SICHER, S.C.; VAZQUEZ, M.A.; LU, C.Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. **J. Immunol.**, v.153, p.1293-1300, 1994. Erratum in: **J Immunol.**, v.154, p.4223,1995.

SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.; REED, S.D. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforing growth factor-beta. **J. Exp. Med.**, v.174, p.539-545, 1992

SILVA, J.S.; MORRIESSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v.175, 169-174, 1992

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.S.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T. & PÁDUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J .Med. Biol. Res.**, v.31, p.111, 1998.

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

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

SPENCER, N.F.; NORTON, S.D.; HARRISON, L.L.; LI, G.Z.; DAYNES, R.A. Dysregulation of IL-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative. **Exp. Gerontol.**, v.31, p. 393-408. 1996

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

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

TARLETON, R.L. Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.73, p. 186-190, 1988.

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. **Int Immunol.**, v.8, p.13-22, 1996.

TEIXEIRA, V.P.A.; ARAÚJO, M.B.M.A.; REIS, M.A.; REIS, L.; SILVEIRA, A.S.; RODRIGUES, M.L.P.; FRANQUINI JR, J. Possible role of an adrenal parasite reservoir in the pathogenesis of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med and Hyg.**, v.87, p.552-554, 1993.

TEIXEIRA, V.P.A.; FERNANDES, M P.A.; BRANDÃO, M.C.; GORBI, H.; REIS, M.A.; ALMEIDA, H.O. Parasitismo incomum na veia central da supra renal em chagásicos crônicos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.47, p.425-428, 1986.

TERENZI, F.; DIAZ-GUERRA, M.JM.; CASADO, M.; HORTELANO, S.; LEONI, S.; BOSCA, L. Bacterial Lipopeptides Induce Nitric Oxide Synthetase and promote apoptosis through Nitric Oxide – independent pathways in rats macrophages. **J. Biol. Chemistry**, v.270, p. 6017-6021, 1995.

THOMSON, L.; GADILLHA, F.R.; PELUFFO, G.;VERCESI, A.E.;, RADI, R. Peroxynitrite affects Ca²⁺ transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v.98, p.81-941, 1999.

TSUTSUI, E.A.; MARKS, P.A.; REICH, P. Effect of dehydroepiandrosterone on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity and reduced triphosphopyridine nucleotide formation in adrenal tissue. **J. Biol. Chem.**, v.237, p. 3009-3013, 1962.

UYEMURA, S.A.; ALBUQUERQUE, S.; CURTI, C. Energetics of Heart Mitochondria during Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection in Rats. **Inst. J. Biochem. Cell Biol.**, v.27, p.1183-1189, 1995.

VICHI, F.L. Avaliação quantitativa do parasitismo de coração, vasos da base e coronária do rato na fase aguda da moléstia de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.6, p.292-296, 1964.

VINHAES, M. C. & DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.16, p. 7-12, 2000.

YEN, T.T.; ALLAN, J.A.; PEARSON, D.V.; ACTON, J.M.; GREENBERG, M.M. Prevention of obesity in Avy/a mice by dehydroepiandrosterone. **Lipids**, v.12, p. 409-13, 1977.

WHO Technical Report Series. **Control of Chagas'disease**. Geneve, WHO, p.23, 2002.

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.