

ANDRÉ LUIS BOMBEIRO

**ESTUDOS NEUROIMUNOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL. ANÁLISES HISTOMOLECULARES DA
MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES
E DEFICIENTES EM IL-12 E IL-23 INFECTADOS COM
TRYPANOSOMA CRUZI DA CEPA SYLVIO X10/4**

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig
Co-orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

Versão Original

São Paulo
2011

RESUMO

Bombeiro, AL. Estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental. Análises histomoleculares da medula espinal de camundongos imunocompetentes e deficientes em IL-12 e IL-23 infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio X10/4 [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O estabelecimento de uma resposta TH1 com a produção de IL-12, IFN-gama e de óxido nítrico é crucial no controle do *Trypanosoma cruzi*, o qual pode colonizar o SNC de crianças e pacientes imunossuprimidos. A inflamação exacerbada em decorrência da persistência de um estímulo antigênico gera o acúmulo de substâncias potencialmente citotóxicas, como mediadores pró-inflamatórios e radicais livres. A partir da infecção de camundongos imunodeficientes (IL-12p40KO) com *T. cruzi* Sylvio X10/4, avaliamos os danos causados à medula espinal com enfoque na inflamação e neurodegeneração. Além da desmielinização, alta reatividade glial e morte de neurônios no ponto mais tardio da doença, constatamos uma baixa produção de mediadores inflamatórios nas primeiras semanas após a infecção, acompanhada pela proliferação ascendente do parasita no tecido nervoso. Acreditamos que um atraso na produção de IFN-gama seja responsável pela ativação tardia ou ineficiente dos fagócitos da medula espinal, favorecendo a disseminação descontrolada do protozoário e subsequentes danos teciduais.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. SNC. Inflamação. IL-12. IFN-gama. Neurodegeneração.

ABSTRACT

Bombeiro, AL. Neuroimmunological studies of experimental Chagas' disease. Histomolecular analysis of the spinal cord of immunocompetent and immunodeficient mice that have been infected with parasites of Sylvio X10/4 strain of *Trypanosoma cruzi*. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The establishment of a TH1 response with IL-12, IFN-gamma and nitric oxide production is crucial for controlling the proliferation of *Trypanosoma cruzi*, which may colonize the CNS of children and immunosuppressed hosts. The exacerbated inflammation due to the persistence of an antigenic stimulus results on the accumulation of potentially cytotoxic substances, such as pro-inflammatory mediators and free radicals. By the infection of immunodeficient mice (IL-12p40KO) with *T. cruzi* Sylvio X10/4 parasites we evaluated the spinal cord damages, focusing on the inflammation and neurodegeneration. Besides demyelization, high glial reactivity and neuron death at the latest stage of the disease, we noticed low production of inflammatory mediators during the first weeks of the infection, accompanied by an ascendant parasite proliferation in the nervous tissue. We believe that a delay on IFN-gamma production is responsible for the late or inefficient phagocyte activation in the spinal cord, contributing to the uncontrolled protozoan proliferation and subsequent tissue injury.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. CNS. Inflammation. IL-12. IFN-gamma. Neurodegeneration.

I INTRODUÇÃO GERAL

1 A Doença de Chagas

1.1 Etiologia, fases, formas e manifestações clínicas

Em 1909, Carlos Chagas descreveu uma nova tripanossomíase humana (Chagas, 1909), que anos mais tarde passou a ser conhecida como a doença de Chagas. Trata-se de uma doença reconhecidamente negligenciada (Hotez et al., 2007), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Segundo dados da Organização Pan Americana de Saúde – OPAS – estima-se que cerca de 7,7 milhões de pessoas em toda a América Latina sejam portadoras da doença, sendo que 20% da população local encontram-se sob risco de infecção (OPAS, 2006, apud RASSI et al., 2010). Tal doença é transmitida ao homem, bem como a uma vasta gama de mamíferos domésticos e selvagens, através de insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo que as espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as mais relacionadas ao contágio humano (WHO, 2002).

O *T. cruzi* é altamente pleomórfico, exibindo formas distintas no hospedeiro humano e no inseto vetor. Durante seu ciclo de vida, as formas sanguícolas tripomastigotas, ingeridas pelo vetor, transformam-se em epimastigotas e replicam-se por fissão binária no estômago do inseto. Em seguida, migram para a porção distal do intestino onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante do protozoário. Durante o repasto alimentar noturno, o triatomíneo defeca sobre a pele do hospedeiro, depositando os tripomastigotas metacíclicos que, por sua vez, são carregados para dentro do organismo quando o indivíduo coça o local da ferida deixada pelo inseto. Os parasitas invadem as células do hospedeiro e, no citoplasma, se diferenciam em amastigotas, a forma proliferativa. Após a replicação dos amastigotas por fissão binária, ocorre a transformação deles em tripomastigotas. Sucede-se a lise celular e os parasitas se disseminam pelo tecido, podendo ganhar a corrente sanguínea e infectar novos tecidos ou mesmo serem ingeridos por outro inseto, fechando o ciclo (Chagas, 1909; Rassi et al., 2010). Além dos mecanismos vetoriais, são conhecidos outros meios de transmissão da doença de Chagas, dentre os quais a transfusão sanguínea, a transmissão congênita, a transmissão por transplante de órgãos infectados e, mais raramente, a transmissão por ingestão oral de alimentos contaminados com *T. cruzi* ou por acidentes de laboratório (Rassi et al., 2010).

No homem, os tripomastigotas são capazes de invadir diferentes células, sendo que geralmente apresentam um tropismo particular pelas células da musculatura cardíaca, esquelética e lisa (Junqueira et al., 2010). Em termos de patogenia, a doença de Chagas é dividida em duas fases: a aguda, que perdura de quatro a oito semanas; e a fase crônica, a qual persiste ao longo de toda a vida do paciente. A fase aguda, quando sintomática, caracteriza-se pela presença de um grande número de parasitas na corrente sanguínea (parasitemia) e em diversos tecidos (parasitismo tissular), infiltrados inflamatórios, ativação excessiva do sistema imune com altos níveis de citocinas, ativação intensa das células T e B, hepato, espleno e linfomegalia, febre prolongada, edemas subcutâneos e, em casos de transmissão vetorial, chagoma de inoculação, quando da entrada do *T. cruzi* pela pele, ou sinal de Romaña, via mucosa ocular (Junqueira et al., 2010; Rassi et al., 2010). Cerca de 10% dos pacientes que desenvolvem sintomas durante a fase aguda da doença morrem em consequência de miocardite severa ou meningoencefalite, ou ambas (Rassi et al., 2010). Com o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa efetiva e subsequente controle do parasita circulante e do parasitismo, cerca de 90% das manifestações clínicas apresentadas nessa fase são eliminadas, mesmo sem o tratamento com drogas antiparasitárias.

Cerca de 60-70% dos pacientes que entram na fase crônica da doença nunca apresentam quaisquer sinais clínicos aparentes da infecção, configurando, assim, a forma indeterminada crônica da doença. Os outros 30-40% dos pacientes restantes desenvolvem a forma determinada da doença, a qual pode ser cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Em linhas gerais, a forma cardíaca da doença é caracterizada por miocardite intensa, resultante em cardiomegalia, arritmias e falência cardíaca (Junqueira et al., 2010), decorrentes da presença de infiltrados inflamatórios linfomonocitários que promovem destruição e fibrose do tecido cardíaco e dilatação das câmaras (Brenner e Andrade, 1987; Tanowitz et al., 1992; Kirchhoff, 1996). Já na forma digestiva, é comum a ocorrência de megaesôfago e megacólon, observando-se a presença de infiltrados linfocitários focais e denervação entérica (Junqueira et al., 2010; Lescure et al., 2010). A combinação de ambas as formas resulta na forma cardiodigestiva da doença.

Os quadros clínicos apresentados pelos pacientes na fase aguda ou crônica da doença de Chagas são altamente variáveis e dependentes de fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasita (Andrade, 1990; Higuchi et al., 1993; Vago, Macedo et al., 1996). De maneira similar, a patogenicidade observada em camundongos infectados com *T. cruzi* é altamente dependente da cepa (Andrade, 1990; Andrade et al., 1999; Vago et al., 2000), do

inóculo (Marinho et al., 1999) e de fatores genéticos intrínsecos à linhagem de camundongo utilizada (Trischmann et al., 1978; Marinho et al., 2004), que podem operar em forma independente do sistema imune, ou refletir a ação de diversos componentes do sistema imunológico (Hontebeyrie-Joskowicz e Minoprio, 1991; Brener e Gazzinelli, 1997; Michailowsky et al., 2001).

1.2 Reativação da doença de Chagas no sistema nervoso central

As primeiras evidências do comprometimento do sistema nervoso central (SNC) durante a infecção pelo *T. cruzi* datam da descoberta da doença, quando Carlos Chagas reportou, em crianças, condições intelectuais precárias, agitação e perturbações funcionais do sistema nervoso (Chagas, 1909). Poucos anos depois, Chagas relatou a incidência de meningoencefalite em pacientes jovens que desenvolviam a fase aguda da doença (Chagas, 1911).

Embora possa ocorrer um quadro de meningoencefalite durante a fase aguda da doença de Chagas e tripomastigotas possam ser encontrados no fluido cerebrospinal na ausência de anormalidades neurológicas (Hoff et al., 1978b), não existem, até o momento, evidências consistentes do desenvolvimento de uma forma neurológica crônica da doença em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, pode haver a reativação da doença no SNC de indivíduos chagásicos crônicos imunodeprimidos, em decorrência da co-infecção pelo HIV ou do uso de drogas imunossupressoras (Oddo et al., 1992; Rocha et al., 1994; Rassi et al., 2010). Nesse contexto, estudos relataram em tais indivíduos o aumento da parasitemia e da replicação do parasita intracelular, a presença do *T. cruzi* no fluido cérebro-espinal, a ocorrência de meningoencefalite, hipertensão intracranial, dores de cabeça, febre, status mental alterado, déficits neurológicos focais, chagoma cerebral com amastigotas, lesões cerebrais focais e difusas, dentre outros (Leiguarda et al., 1990; Rosemberg et al., 1992; Jardim e Takayanagui, 1994; Marchiori et al., 2007; Cordova et al., 2008; Diazgranados et al., 2009; Rassi et al., 2010). Além disso, autópsias de pacientes revelaram o desenvolvimento de encefalite multifocal com nódulos gliais ou microgliais, granulomas, necrose e hemorragia (Pittella, 1993; Rocha et al., 1994). Raramente são observados neurônios infectados, sendo os astrócitos e as microglias (macrófagos residentes do SNC) as células mais frequentemente parasitadas (Pittella, 1991; Rocha et al., 1994).

É importante ressaltar que embora um número crescente de estudos tenha relatado a ocorrência da infecção pelo *T. cruzi* no SNC de indivíduos imunodeprimidos, a reativação da doença de Chagas no SNC ainda é, em muitos casos, erroneamente diagnosticada como toxoplasmose cerebral (Lescure et al., 2010; Rachid et al., 2010), o que vem a agravar o risco de morte desses pacientes.

2 A Resposta Imune na Doença de Chagas

Na infecção humana ou experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, o estabelecimento de uma resposta imune específica, coincidente com o fim da fase aguda, impõe uma limitação severa à replicação e disseminação do parasita. Para que tal processo ocorra, é fundamental a combinação de mecanismos efetores desenvolvidos por ambas as respostas imunes inata e adaptativa. Logo que invade o tecido do hospedeiro, o parasita é reconhecido por macrófagos, células dendríticas e outras populações residentes, as quais produzem citocinas (TNF- α , IL-12) e quimiocinas (RANTES) pró-inflamatórias (Lescure et al., 2010). Receptores da imunidade inata, tais como os receptores do tipo Toll (TLRs) e do tipo Nod (NLRs) são extremamente importantes para o reconhecimento do *T. cruzi* (Tarleton, 2007; Junqueira et al., 2010). As células NK, sob estímulo local de citocinas pró-inflamatórias (IL-12), liberam IFN- γ (Cardillo et al., 1996; Sardinha et al., 2006; Lescure et al., 2010), o qual induz a produção de moléculas efetoras pelos fagócitos, dentre elas as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de oxigênio (ROS) e as GTPases. Ao passo que as RNS e as ROS causam danos ao DNA cinetoplástico e nuclear do parasita (Cabrera et al., 2011), as GTPases aceleram a formação dos fagolisossomos (Santiago et al., 2005), diminuindo, assim, a susceptibilidade ao *T. cruzi*. Concomitantemente, as células dendríticas migram aos órgãos linfóides secundários, onde estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Assim, nos linfonodos e baço, as células dendríticas secretam IL-12 e apresentam, via moléculas do MHC, os antígenos do parasita às células T, estimulando a diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T CD4⁺ (T auxiliares 1, TH1) e T CD8⁺ (T citotóxicos). Subsequentemente, os linfócitos efetores são recrutados para o tecido infectado, onde reconhecem as células que apresentam peptídeos do parasita via moléculas do MHC-I (aos T CD8⁺) ou do MHC-II (aos T CD4⁺) e, então, secretam níveis elevados de IFN- γ (Tarleton et al., 1994; Sardinha et al., 2006) e outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais potencializam o recrutamento de células monocitárias. Além do mais, os linfócitos T CD8⁺ destroem as células que contém formas amastigotas do parasita. Nas células residentes e recrutadas, o

IFN- γ e o TNF α produzidos localmente reforçam diferentes mecanismos efetores frente ao *T. cruzi*, dentre eles a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), que determina a produção de óxido nítrico (Golden e Tarleton, 1991; Gazzinelli et al., 1992; Aliberti et al., 1999), o qual, como indicado acima, é um metabólito essencial no controle de algumas cepas do parasita (Petray et al., 1994; Vespa et al., 1994; Holscher et al., 1998; Saeftel et al., 2001; Cummings e Tarleton, 2004). Com relação à resposta humoral, os linfócitos B são induzidos pelos linfócitos T CD4⁺ a passarem por uma expansão clonal, diferenciação celular em plasmócitos (células secretoras de anticorpos) e à mudança isotípica de anticorpos (IgG2a em camundongos e IgG1 em humanos), sendo esse último processo dependente de IFN- γ . Durante a infecção pelo *T. cruzi*, os anticorpos têm papel fundamental no processo de remoção de tripomastigotas do sangue e dos tecidos pelos fagócitos (Rodriguez et al., 1981).

3 O comprometimento do sistema nervoso central de camundongos deficientes em IL-12 e IL23, infectados com *T. cruzi* da cepa SylvioX10/4

A IL-12 é uma citocina heterodimérica formada por duas cadeias, a IL-12p35 e a IL-12p40, sendo que a subunidade IL-12p40 também é comum à IL-23, na qual forma um heterodímero com a cadeia IL-23p19. O receptor para IL-12 também é formado por duas cadeias, a IL-12R β 1 e a IL-12R β 2, sendo que a cadeia IL-12R β 1 também faz parte da estrutura do receptor para IL-23, em conjunto à subunidade IL-23R. Ambas a IL-12 e a IL-23 são produzidas por células apresentadoras de antígeno (APCs) ativadas. (Oppmann et al., 2000; Bastos et al., 2004).

Como se sabe, a IL-12 é uma citocina fundamental na diferenciação das células T CD4⁺ naïve para o fenótipo funcional TH1, estimulando a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ assim como pelas células natural killer (NK). Uma vasta gama de estudos tem demonstrado a importância dessa citocina no controle da infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos geneticamente deficientes em IL-12 ou tratados com anticorpos monoclonais neutralizantes de IL-12 apresentaram altos níveis de parasitemia, alta taxa de mortalidade (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Aliberti et al., 1996; Michailowsky et al., 1998; Silva et al., 1998; Michailowsky et al., 2001) e elevado parasitismo cardíaco (Michailowsky et al., 2001). Por outro lado, a administração de IL-12 recombinante aos camundongos infectados foi capaz de lhes prolongar a sobrevivência e de promover uma redução dos níveis de parasitemia (Aliberti et al., 1996).

A IL-23 também é uma citocina pró-inflamatória, a qual atua na manutenção das células TH17 (Bettelli et al., 2006), uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Estudos emergentes têm sugerido a participação das células TH17, produtoras da citocina pró-inflamatória IL-17, em processos inflamatórios e doenças autoimunes (Damsker et al., 2010). Uma vez que receptor da IL-23 é capaz de desencadear uma série de sinais intracelulares, culminantes na fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) 1, 3, 4 e 5, não é de se surpreender que na ausência da IL-23, a produção de IFN- γ , a qual depende da fosforilação de STAT4, seja prejudicada (Oppmann et al., 2000; Tan et al., 2009). Como exemplo, um estudo realizado com camundongos deficientes em IL-12p40 (IL-12p40KO) reporta um déficit na eliminação do *Toxoplasma gondii* por esses animais, associado à queda na produção de IFN- γ (Lieberman et al., 2004). Interessantemente, a administração de IL-23 prolonga, porém não permite a sobrevivência dos animais IL-12p40KO infectados com *T. gondii*, sugerindo que a IL-23 compense parcialmente a falta da IL-12 (Lieberman et al., 2004). Até a presente data, o papel da IL-23 e da IL-17 na doença de Chagas permanece pouco compreendido. Estudos recentes demonstram que a IL-17 é necessária para a proteção do hospedeiro durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Da Matta Guedes et al., 2010; Miyazaki et al., 2010). De acordo com os dados de Da Matta Guedes e colaboradores (Da Matta Guedes et al., 2010), a administração de anticorpos neutralizantes de IL-17 a camundongos infectados com *T. cruzi* resulta em queda na sobrevivência desses animais, acompanhada por intensa miocardite. Além disso, esses autores constataram que o bloqueio da IL-17 proporciona um aumento na produção de TNF- α , IL-12 e INF- γ , responsáveis pelo grande influxo de células ao coração. Miyazaki e colaboradores (Miyazaki et al., 2010) também demonstraram aumento na taxa de mortalidade de camundongos deficientes em IL-17A infectados com *T. cruzi*, acompanhada por parasitemia elevada e falência múltipla dos órgãos. Entretanto, contrariamente ao estudo de Da Matta Guedes e colaboradores (Da Matta Guedes et al., 2010), Miyazaki *et al.* (Miyazaki et al., 2010) não constaram inflamação exacerbada no coração e nem produção elevada de TNF- α e IFN- γ na ausência de IL-17A, sugerindo que os danos causados pela infecção sejam decorrentes de ativação atenuada do sistema imune dos camundongos imunodeficientes.

O fato da doença de Chagas evoluir na maior parte dos indivíduos sem quaisquer manifestações clínicas de injúrias do SNC nos indica que, ora a colonização do SNC pelo *T. cruzi* é muito escassa, resultado de um baixo tropismo do protozoário pelo tecido nervoso, ou que os mecanismos de resistência local ao parasita no SNC são altamente eficientes.

Apoiando a última possibilidade, temos observado que camundongos IL-12p40KO, quando infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, apresentam sinais clínicos de danos do SNC, evidenciados por paralisia progressiva ascendente, da cauda aos membros anteriores. Destaca-se o fato dos animais IL-12p40-KO, assim como os animais imunocompetentes, não apresentam parasitemias patentes no decurso da infecção pelo parasita Sylvio X10/4 (Marinho et al., 2009), um clone de *T. cruzi* isolado por Miles (Miles, 1974) a partir de um inseto *Rhodnius prolixus*, utilizado no xenodiagnóstico de um paciente com infecção aguda, oriundo da região norte do Brasil (Silveira et al., 1979). Diferentemente dos animais IL-12p40KO, camundongos IFN- γ KO são extremamente susceptíveis à infecção por parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e morrem antes mesmo de apresentarem quaisquer sinais de danos neurológicos, com altos níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco (Marinho et al., 2007). Contudo, o mesmo não se observa quanto aos camundongos deficientes em iNOS quando infectados por parasitas da cepa Sylvio X10/4. Assim, esses animais apresentam comportamento similar àquele dos camundongos imunocompetentes, isto é, alta sobrevivência acompanhada de níveis baixos ou até mesmo inexistentes de parasitemia e de parasitismo cardíaco (Marinho et al., 2007).

VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há mais de um século, Carlos Chagas deu início a uma série de estudos pioneiros na história da medicina tropical brasileira, com a descoberta de uma nova tripanossomíase americana. Em pouco tempo, Chagas descreveu a etiologia, a epidemiologia, os sintomas e os sinais clínicos e, até mesmo, o impacto social dessa nova moléstia. Mesmo muitos anos após a descoberta e a descrição da doença de Chagas, acompanhados dos grandes progressos alcançados ao longo das últimas décadas, vários aspectos da doença ainda permanecem obscuros, principalmente no que se refere à patogênese e aos eventos imunológicos desencadeados durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Neste sentido, a forma nervosa da doença de Chagas, cujos danos ao hospedeiro humano podem ser irreversíveis, também permanece muito pouco explorada sob vários aspectos clínicos e experimentais.

Considerando tais fatos, iniciamos estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental, a partir de análises histomoleculares da medula espinal de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes (IL-12p40KO) infectados com parasitas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. Assim sendo, trabalhamos na caracterização do processo patogênico no ponto mais tardio da infecção, no qual destacamos a elevada presença do parasita no tecido do animal deficiente, acompanhada por um processo inflamatório proeminente, pela produção exacerbada de substâncias potencialmente citotóxicas e morte neuronal. Outro ponto importante a ser destacado é o estudo da cinética de infecção e de inflamação na medula espinal, no qual sugerimos que a produção local tardia de IFN- γ pelos animais IL-12p40KO seja o principal fator responsável pela ineficiência do controle da disseminação do parasita.

Levando-se em conta que ainda há poucos estudos relacionados à forma nervosa da doença de Chagas, acreditamos que o presente trabalho possa oferecer novas perspectivas quanto ao entendimento de como as desordens neurológicas são desencadeadas durante a infecção pelo *T. cruzi*. Contudo, cabe ressaltar que é indispensável a realização de novos estudos com metodologias cada vez mais avançadas afim de se aumentar o grau de conhecimento sobre essa forma da doença.

REFERÊNCIAS*

- Abrahamsohn, IA, Coffman, RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*, 1996; 84:231-44.
- Aliberti, JC et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*, 1996; 64:1961-7.
- Aliberti, JC et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. *Infect Immun*, 1999; 67:4819-26.
- Almeida-Leite, CM et al. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. *Neurobiol Dis*, 2007; 25: 170-8.
- Almeida, EA et al. Chagas' disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2010; 104:447-52.
- Aloisi, F. Immune function of microglia. *Glia*, 2001; 36:165-79.
- Andrade, LO et al. Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, 1999; 100: 163-72.
- Andrade, MS et al. Contuse lesion of the rat spinal cord of moderate intensity leads to a higher time-dependent secondary neurodegeneration than severe one. An open-window for experimental neuroprotective interventions. *Tissue Cell*, 2008; 40:143-56
- Andrade, MS et al. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. *Brain Res*, 2010 (CHECAR); 1346:266-78.
- Andrade, SG. Influence of Trypanosoma cruzi strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1990; 85:17-27.
- Arantes, RM et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. *Am J Pathol*, 2004; 164:1361-8.
- Araujo, FG. Development of resistance to Trypanosoma cruzi in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun*, 1989; 57:2246-8.
- Bal-Price et al. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia*, 2002; 40:312-23.
- Bao, F, Liu, D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience*, 2002; 115:839-49.

* De acordo com International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

Barkhuizen, M, Magez, S, et al. Interleukin-12p70-dependent interferon- gamma production is crucial for resistance in African trypanosomiasis. *J Infect Dis*, 2007; 196:1253-60.

_____. Interleukin-12p70 deficiency increases survival and diminishes pathology in *Trypanosoma congolense* infection. *J Infect Dis*, 2008; 198:1284-91.

Bastos, KR et al. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol*, 2002; 71:271-8. 2002.

Bastos, KR et al. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect*, 2004; 6:630-6

Becher, B et al. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest*, 2002; 110:493-7.

Benitez-Hernandez, I et al. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology*, 2010; 215:413-26.

Bettelli, E et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441:235-8.

Bishop, A, Anderson, JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, 2005; 208:193-205.

Bombeiro, AL et al. Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN-gamma and S100beta protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Neuroimmunomodulation*, 2010; 17:67-78.

Brask, J et al. Exposure to interferon-gamma during synaptogenesis increases inhibitory activity after a latent period in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 2004; 19:3193-201.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1962; 4:389-96.

Brener, Z, Andrade, ZA. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 6-10.

Brener, Z, Gazzinelli, RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 114:103-10.

Brown, GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35:1119-21.

Bsibsi, M et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002; 61:1013-21.

Cabrera, G et al. DNA repair pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem*, in press.

Cardillo, F et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, 1996; 64:128-34.

Cardoso, RAA. Lesões do sistema nervoso central em 4 casos infantis agudos de doença de Chagas. *Bol Inst Puer Univ Brasil*, 1960; 17:101-10.

Carpentier, PA et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, 2005; 49:360-74.

Chadi, G et al., Experimental models of partial lesion of rat spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int J Neurosci*, 2001; 111:137-65.

Chadi, G, Gomide, VC. FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell Biol Int*, 2004; 28:849-61.

Chadi, G et al. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*, 1993; 97:145-58.

Chadi, G et al. Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport*, 1993b, 4:783-6.

Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1909; 1:159-218.

_____. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1911; 3: 219-275.

Chan, SH et al. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol*, 1992; 148:92-8.

Chan, SH et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*, 1991; 173:869-79.

Chao, CC, Hu, S. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev Neurosci*, 1994; 16:172-9.

Cobb, D et al. T-bet-dependent regulation of CD8+ T-cell expansion during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 2009; 128:589-99.

Conti, B et al. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999; 67:46-52.

- Cordova, E et al. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. *Int J Infect Dis*, 2008; 12:587-92.
- Cummings, KL, Tarleton, RL. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*, 2004; 72: 4081-9.
- Da Matta Guedes, PM et al., IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 4:e604.
- Damsker, JM et al. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1183:211-21.
- De Oliveira, L et al. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. *Parasitol Res*, 1997; 83:762-70.
- Dewar, D et al. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003; 23:263-74.
- Diazgranados, CA et al., Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis*, 2009; 9: 324-30.
- Dimmeler, S, Zeiher, AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ*, 1999; 6: 964-8.
- Dinarello, CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103:11-24.
- Domercq, M et al. System xc⁻ and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol*, 2007; 178:6549-56.
- Dong, Y, Benveniste, EN. Immune function of astrocytes. *Glia*, 2001; 36:180-90.
- Eizenberg, O et al. Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. *Embo J*, 1995; 14:1136-44.
- Erdmann, H et al. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell Microbiol*, 2009; 11:1600-1611.
- Foran, E, Trotti, D. Glutamate Transporters and the Excitotoxic Path to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 2009; 11:1-16.
- Franklin, BS et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106:5789-94.
- Galvao Da Silva, AP et al. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology*, 2003; 108: 230-7.

Garcia, SB et al. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*, 1999; 93:191-7.

Gazzinelli, RT et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 1992; 22:2501-6.

Giulietti, A et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001; 25:386-401.

Golden, JM, Tarleton, RL. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol*, 1991; 72:391-402.

Good, PF et al. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998; 57:338-42.

Gundersen, HJ et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 1988; 96:379-94.

Hendriks, JJ et al. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005; 48:185-95.

Higuchi, M et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol*, 1993; 2:101-106.

Hisahara, S et al. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem*, 1997; 69:10-20.

Hoff, R et al. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med*, 1978a; 298:604-6.

_____. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med*, 1978b; 298:604-6.

Holscher, C et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*, 1998; 66 :1208-15.

Hontebeyrie-Joskowicz, M, Minoprio, P. Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* vs. the host immune system. *Res Immunol*, 1991; 142:125-6.

Hotez, PJ et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, 2007; 357:1018-27.

Hu, J, Castets, F, et al. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem*, 1996; 271:2543-7.

Hu, J et al., S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 1997; 69:2294-301.

Huang, W et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 2004; 190:624-31.

Hyun, DH et al. Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem*, 2002, 277:28572-7. 2002.

Ischiropoulos, H, Beckman, JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest*, 2003; 111:163-9.

Jardim, E, Takayanagui, OM. Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *J Trop Med Hyg*, 1994; 97:367-70.

Junqueira, C et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*, 2010; 12:e29.

Kim, IJ et al. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. *J Neurosci*, 2002, 22:4530-9.

Kim, PK et al. Regulation of caspases by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 962:42-52.

Kirchhoff, LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am*, 1996; 25:517-33.

Korn, T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol*, 2008; 255:2-6.

Kramer, JM, Gaffen, SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*, 2007; 78:1083-93.

Langrish, CL et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2005; 201:233-40.

Leiguarda, R et al. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. *Neurology*, 1990; 40:850-1.

Lescure, FX et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*, 2010; 10:556-70.

Lieberman, LA et al. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J Immunol*, 2004; 173:1887-93.

Linares, D et al. Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *J Neurosci*, 2006; 26:12672-81.

Lovchik, JA et al. A role for gamma interferon-induced nitric oxide in pulmonary clearance of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995; 13:116-24.

- Machado, FS et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 2000; 102:3003-8.
- Mantovani, A et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004; 25:677-86.
- Marchiori, PE et al. Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic myocardopathy. *J Heart Lung Transplant*, 2007; 26:1091-6.
- Marinho, CR et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a Trypanosoma cruzi clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun*, 2004; 72:2350-7.
- Marinho, CR et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*, 1999; 67:308-18.
- Marinho, CR et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of Trypanosoma cruzi: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes Infect*, 2009; 11:1037-45.
- _____. IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 Trypanosoma cruzi parasites. *Scand J Immunol*, 2007; 66:297-308.
- Matute, C et al. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:8830-5.
- Mctigue, DM, Tripathi, RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*, 2008; 107:1-19.
- Merrill, JE, Scolding, NJ. Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999; 25:435-58.
- Meyer Zum Buschenfelde, C et al. Trypanosoma cruzi induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin Exp Immunol*, 1997; 110:378-85.
- Michailowsky, V et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of Trypanosoma cruzi. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998; 42:2549-56.
- Michailowsky, V et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. *Am J Pathol*, 2001; 159:1723-33.
- Miles, MA. Letter: Cloning Trypanosoma cruzi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1974; 68:256.

Miyazaki, Y et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 2010; 185:1150-7.

Mizuno, T et al. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *Faseb J*, 2008; 22:1797-806.

Morel, CM, Lazdins, J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol*, 2003; 1:14-5.

Muller, U et al. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol*, 2001; 167:3346-53.

Nakanishi, K et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, 2001; 19:423-74.

Neumann, H et al. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95:5779-84.

Nimmerjahn, A, Kirchhoff, F, et al. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 2005; 308:1314-8.

Oddo, D et al. Acute Chagas' disease (*Trypanosomiasis americana*) in acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. *Hum Pathol*, 1992; 23:41-4.

Opal, SM, Depalo, VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000; 117:1162-72.

Oppmann, B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 2000; 13: 715-25.

Petryay, P et al. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett*, 1995; 47:121-6.

Petryay, P et al. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*, 1994; 16:193-9.

Peudenier, S et al. HIV receptors within the brain: a study of CD4 and MHC-II on human neurons, astrocytes and microglial cells. *Res Virol*, 1991; 142:145-9.

Pittella, JE. Central nervous system involvement in experimental *Trypanosomiasis cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991; 86:141-5.

_____. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1993; 35:111-6.

Postan, M et al. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg*, 1983; 32:497-506.

- Postan, M, et al. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987; 81:415-9.
- Prinz, M, Hanisch, UK. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem*, 1999; 72:2215-8.
- Rachid, MA et al. Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Neuroimmunol*, 2010, 220: 64-68.
- Rassi, A,Jr et al. Chagas disease. *Lancet*, 2010; 375:1388-402.
- Rivlin, AS, Tator, CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*, 1977; 47:577-81.
- Rocha, A et al. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 50:261-8.
- Rodriguez, AM et al. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect Immun*, 1981; 31:524-9.
- Rosemberg, S et al. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*, 1992; 42:640-2.
- Rothwell, N et al. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest*, 1997; 100:2648-52.
- Rottenberg, ME et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 1993; 61:5129-33.
- Rottenberg, ME et al. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*, 1995; 41:164-70.
- Russo, M et al. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann Inst Pasteur Immunol*, 1988; 139:225-36.
- Saeftef, M et al. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, 2001; 69:2252-9.
- Santiago, HC et al. Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J Immunol*, 2005; 175:8165-72.
- Sardinha, LR et al. Contribution of NK, NK T, gammadelta T, and alphabeta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 2006; 74:2031-42.

Sartori, AM et al. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 2002a; 67:521-3.

Sartori, AM et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*, 2002b; 186:872-5.

Shibata, N, Kobayashi, M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, 2008; 60:157-70.

Silva, JS et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31:111-5.

Silva, TP et al. Effects of ethanol consumption on vasopressin and neuropeptide Y immunoreactivity and mRNA expression in peripheral and central areas related to cardiovascular regulation. *Alcohol*, 2004; 32:213-22.

Silveira, F et al. Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil (Nota prévia). *Hileia Medica*, 1979; 1: 61-62.

Tabner, BJ et al. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A(beta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32:1076-83.

Tan, ZY et al. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009; 41:733-5.

Tanowitz, HB et al. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 1992; 5:400-19..

Tarleton, RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 1990; 144: 717-24.

_____. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*, 2007; 19:430-4.

Tarleton, RL et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*, 1994; 62:1820-9.

Tessema, TS et al. Dynamics of gut mucosal and systemic Th1/Th2 cytokine responses in interferon-gamma and interleukin-12p40 knock out mice during primary and challenge *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology*, 2009; 214:454-66.

They, C et al. Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *Eur J Neurosci*, 1991; 3:1155-1164.

Tilleux, S, Hermans, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res*, 2007; 85:2059-70.

Trischmann, T et al. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol*, 1978; 45:160-8.

- Umemura, M et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*, 2007; 178:3786-96.
- Vago, AR et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*, 2000; 156:1805-9.
- Vago, AR et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 1996; 348:891-2.
- Veldhoen, M et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006; 24:179-89.
- Vespa, GN et al. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*, 1994; 11:5177-82.
- Vikman, KS et al. Interferon-gamma-induced changes in synaptic activity and AMPA receptor clustering in hippocampal cultures. *Brain Res*, 2001; 896:18-29.
- Villalta, F et al. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun*, 1998; 66:4690-5.
- Way, SS et al. IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2007; 178:4498-505.
- West, MJ, Gundersen, HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*, 1990; 296:1-22.
- WHO. Control of Chagas disease, 2002; 905: i-vi, 1-109, back cover p. (World Health Organ Tech Rep Ser)
- Wong, G et al. Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol*, 2004; 187:171-7.
- Xie, QW, Nathan, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Trans Assoc Am Physicians*, 1993; 106:1-12.
- Xiong, H et al. Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons. *Eur J Neurosci*, 1999; 11:1567-76.