

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FABIANA MARTINS BATISTA MOTTA

A malária experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi* em camundongo SCID.

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO

CAMPINAS

2003

Campinas, 11 de dezembro de 2003.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo (Orientadora) _____

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti _____

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco _____

Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro _____

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta _____

Dedico esse trabalho:
A meus pais, Hermes e Guiomar;
Meus filhos, Frederico e
Fernando,
E a meu dedicado marido, Fred.
Pelo amor incondicional e
paciência.

Agradecimentos:

Ao se alcançar objetivos é preciso sempre agradecer!

Gostaria de poder fazê-lo a todas as pessoas que estiveram no meu caminho, e que com simples gestos me deram ânimo para prosseguir... Citar nomes poderia se tornar uma prática injusta, pois correrei o risco de esquecer alguém... Porém, não poderia deixar de mencionar as pessoas que participaram de perto de todo este processo:

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudos e auxílio-pesquisa.

Minha orientadora, Dra. Ana Maria Guaraldo, obrigada por ter abraçado este projeto e colaborado para que ele se concretizasse. Obrigado pelo seu apoio, compreensão e amizade. Após todo esse convívio, posso afirmar que a estimo como uma segunda MÃE!

Ao Prof. Dr. Heitor F. Andrade que gentilmente nos cedeu a cepa de *P. chabaudi*, objeto de nosso estudo.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares por sua contribuição na análise estatística deste trabalho.

À amiga Delma Pegolo Alves... Não poderia deixar de agradecê-la! Sua ajuda foi primordial no início do meu trabalho!

Meu marido, Luiz Frederico, sem o seu incentivo e colaboração, dificilmente atingiria esta meta! Obrigado pelas inúmeras vezes que me ajudou a encontrar o caminho certo... O seu instinto visionário também é responsável pela minha vitória!

Meus filhos, Frederico e Fernando, que tantas vezes se esforçaram para não fazer barulho, pois “mamãe está estudando!”, esse trabalho não teria valor se eu não pudesse mostra-lo a vocês!

Meus queridos pais, Hermes e Guiomar, que nunca deixaram de acreditar em meu potencial e nunca mediram esforços para me ajudar... A conquista também é de vocês!

E finalmente,

Funcionários do CEMIB, em especial à Cristiane, que sempre estiveram prontos a atender às necessidades do trabalho;

Os técnicos, João, Ivo, Sr. Geraldo e Cleuza que tanto me auxiliaram nas técnicas laboratoriais;

Muito obrigado!

A malária experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi* em camundongo SCID.

Fabiana Martins Batista Motta

Orientadora: Profa. Dra. *Ana Maria Aparecida Guaraldo*

Palavras-chave: *P. chabaudi*, BALB/c, SCID, KO, NK.

Resumo

As células NK secretam as citocinas INF-gama e TNF-alfa – moléculas associadas com a resposta imune mediada por células do tipo Th1 – em resposta a infecção por *Plasmodium* e ainda respondem à indução pela IL-12, conseguindo enfim, diminuir a mortalidade por *P. chabaudi*.

Apesar de estudos comprovarem que as células NK e suas citocinas têm papel importante no controle imunológico da malária, sabe-se que fatores genéticos representam um dos maiores determinantes de resistência do hospedeiro para infecção da malária.

Para testar o papel das células NK na resposta imune contra malária, foram adotados dois modelos animais: a linhagem C.B-17 SCID/SCID, devido à ausência de células T e B, e camundongos C57BL/6 KO para interferon gama, que apresentam o gene para interferon gama bloqueado.

Nesse trabalho, a capacidade dos animais SCID e KO para interferon gama controlarem a infecção foi avaliada comparando-se a parasitemia entre eles; Foram adotadas, como controle, as linhagens imunocompetentes BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni.

Esses animais foram infectados intraperitonealmente com 10^6 eritrócitos parasitados com *P. chabaudi* da linhagem CR e tiveram sua parasitemia medida em intervalos pré-determinados por várias semanas.

Tanto os animais SCID quanto os animais KO, mantiveram altos picos de parasitemia, mesmo durante a fase crônica da infecção. Os camundongos imunocompetentes controlaram a infecção.

Os resultados indicam que as células NK colaboram no controle da infecção, diminuindo a parasitemia, porém a imunidade ao *P. chabaudi* não depende somente da produção de interferon gama, podendo estar relacionada também a fatores genéticos.

A malária compromete o rim, não só pela deposição de imunocomplexos, pois os camundongos C.B17 SCID/SCID/Uni desprovidos de imunoglobulinas também desenvolveram patologias renais: descamação das células tubulares, trombose e necrose glomerular, observadas também em camundongos C57BL/6 KO. As alterações renais em C57BL/6 foram mínimas, possivelmente em função do genótipo resistente desta linhagem.

The experimental *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in mouse SCID.

Fabiana Martins Batista Motta
Prof. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Key-words: *P. Chabaudi*, BALB/c, SCID, KO, NK.

Abstract

The NK cells secrete the citoquinas INF-gamma and TNF-alpha - molecules associated with the immune protective mediated by cells of the type Th1 - in response to infection for *Plasmodium*. Instead the induction of these cells with IL-12 helps to reduce the mortality by *P. chabaudi*.

Although studies was related the NK cells and its citoquinas play a important role in the control of the malaria, it is known that the genetic factors represent one of the largest determinant of resistance by host infected by *Plasmodium* sp.

For testing the malaria immunity by NK cells, we have used two animal models: the C.B-17 SCID/SCID because their absence of T and B cells and the C57BL/6 animals which are deprived for interferon-gamma gene.

In this research, the capacity of both to control the infection was evaluated comparing the parasitaemia among them, using the immunocompetent BALB/c/Uni like a control animal. They were infected intraperitoneally with a dose of 10^6 parasited red blood cells and the parasitaemia was determined in established intervals for several weeks.

So the animals SCID as the animals KO have maintained high parasitemia during chronic phase of the infection. The immunocompetents mice have decreased the parasitemia level , controlling the infection. It could be concluded that the NK cells collaborate to the malaria immunity reducing the parasitaemia; however the data indicating they don't act alone and the resistance against the *P. chabaudi* could be also a genetic factor.

The malaria affects the kidney, not only for the immunocomplex deposition, because the mice C.B17 SCID/SCID/Uni unprovided immunoglobulins also

developed renal pathologies: tubular cells exfoliation, thrombosis and necrosis in the glomerulus, also observed in C57BL/6 KO Interferon-gamma animals. It was not observed kidney alterations in C57BL/6 probably because resistant genotype.

SUMÁRIO

PÁGINA

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 MALÁRIA	01
1.2 <i>PLASMODIUM</i> SP EM MURINOS	03
1.3 MODELOS ANIMAIS X <i>PLASMODIUM CHABAUDI CHABAUDI</i>	06
1.4 HISTOPATOLOGIA RENAL NA MALÁRIA	09
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 CAMUNDONGOS	12
3.2 <i>PLASMODIUM CHABAUDI CHABAUDI</i> CR	12
3.3 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM UNIDADES ISOLADORAS DE PVC	13
3.4 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA	14
3.5 MONITORAMENTO IMUNOLÓGICO	14
3.6 MOUSE ANTIBODY PRODUCTION (MAP- TESTE)	14
3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR <i>P. CHABAUDI CHABAUDI</i>	15
3.8 MORTALIDADE	15
3.9 FOTOMICROGRAFIA	15
3.10 ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS	16
4.1 PARASITEMIA E MORTALIDADE	16
4.2 MONITORAMENTO IMUNOLÓGICO DA LINHAGEM SCID/SCID	19
4.3 MAP – TESTE	20
4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO RIM	20
PRANCHA DE FOTOS	22
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARASITEMIA DURANTE AS SEIS PRIMEIRAS SEMANAS DE INFECÇÃO NOS GRUPOS DE ANIMAIS BALB/c/UNI, C.B-17 SCID/SCID/UNI E KO PARA INF- γ	38
APÊNDICE B – FORMAS EVOLUTIVAS DO <i>P. CHABAUDI</i> À FRESCO	42
APÊNDICE C – PARASITEMIA INDIVIDUAL DE ANIMAIS	43

Índice de Figuras

Figura 1 – Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID e BALB/c/Uni durante 6 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	16
Figura 2 – Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID e C57BL/6 KO para INF- γ , durante 6 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	17
Figura 3 – Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID, BALB/c/Uni, C57BL/6 KO para INF- γ durante 6 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR) e durante as semanas 1, 3 e 4 nos camundongos C57BL/6/Uni	18
Figura 4 – Formas evolutivas do <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> à fresco.....	42
Figura 5 – Evolução da parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID infectados com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	43
Figura 6 – Evolução da parasitemia em camundongos BALB/c/Uni infectados com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	44
Figura 7 – Evolução da parasitemia em camundongos C57BL/6 KO para INF- γ infectados com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	45
Figura 8 – Evolução da parasitemia em camundongos C57BL/6/Uni infectados com <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> (CR).....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Média dos valores de parasitemia em camundongos C57BL/6 KO para interferon gama e C57BL/6/Uni durante 4 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).....17

Tabela 2: Distribuição das lesões histológicas renais em camundongos infectados.....21

Índice de Abreviaturas

6PGD – Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
GDH – Glutamate Dehydrogenase
GPI – Glycosyl Glutamate Inositol
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-4 – Interleucina 4
INF- γ - Interferon gama
IPA – Incidência Parasitária Anual
KO – Knockout
LCM – Vírus da coriomeningite linfocitária
LDH – Lactate Dehydrogenase
MAP-test – Mouse Antibody Production-test
MHV – Vírus da hepatite do camundongo
MVM – Vírus minuto do camundongo
NK – Natural Killer
OMS – Organização Mundial de Saúde
PVM – Vírus da pnemonia do camundongo
SCID – Severe Combined Immune Deficiency
TEMV-GDVII – Vírus da encefalomielite de Theiler
TNF – Fator de Necrose Tumoral

1. Introdução

1.1 Malária

A malária é uma doença que ocorre nas áreas tropicais e subtropicais do mundo.

Os agentes etiológicos da malária humana são: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*.

O *P. falciparum* se encontra nas regiões tropicais; *P. vivax* em zonas tropicais e subtropicais; *P. malariae* pode ser encontrado de maneira esporádica ao redor do mundo. *P. ovale* se encontra na África, mais precisamente nas regiões central e oeste, assim como em algumas ilhas do Pacífico. No Brasil ocorrem apenas as espécies *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo esta última a forma letal. Além disso, essa espécie possui linhagens resistentes aos medicamentos atuais (www.cdc.gov).

Os plasmódios são transmitidos por insetos da ordem *Diptera* da família *Culicidae* pertencentes ao gênero *Anopheles*. Este gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais apenas reduzido número tem importância para a epidemiologia da malária, em cada região. No Brasil, cinco espécies são consideradas como vetores principais: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (N.) aquasalis*, *A. (N.) albitarsis*, *A. (Kerteszia) cruzi* e *A. (Kerteszia) bellator* (www.cdc.gov).

Durante o repasto sangüíneo, o mosquito fêmeo do gênero *Anopheles* inocula esporozoítas no hospedeiro humano. Uma vez inoculados, os esporozoítas deixam rapidamente o tecido subcutâneo e entram na corrente circulatória, onde permanecem livres durante cerca de meia hora. Ao deixarem a circulação, os esporozoítas penetram nas células hepáticas, onde multiplicam-se por processo esquizogônico resultando na formação dos esquizontes, que ao se romperem, liberam esquizoítas. Os esquizoítas invadem eritrócitos e passam à forma trofozoíta, para então amadurecer e reproduzir novamente por esquizogonia: o núcleo sofre divisão e os núcleos filhos são chamados de esquizoítas; o conjunto de esquizoítas denomina-se esquizonte ou meronte. O

eritrócito se rompe deixando os esquizoítas livres. Alguns desses parasitas voltam a invadir hemácias e outros evoluem e se diferenciam na forma sexual – gametócitos (www.cdc.gov).

Os gametócitos, masculino (microgametócitos) e feminino (macrogametócitos), são ingeridos por uma fêmea *Anopheles* durante o repasto sangüíneo. A multiplicação do parasita dentro do mosquito é conhecida como ciclo esporogônico. No intestino médio do mosquito ocorre a fecundação. Os zigotos formados tornam-se móveis e alongados (ocinetos) e após invadirem a parede intestinal do mosquito desenvolvem-se em oocistos. Esporozoítas saem gradualmente dos oocistos através de pequenas perfurações e se dirigem até as glândulas salivares do inseto. A inoculação dos esporozoítas em novos hospedeiros humanos perpetua o ciclo de vida do *Plasmodium* (Sinden, 1974).

A malária é um dos maiores desafios de Saúde Pública que conturba o desenvolvimento dos países mais pobres no mundo e chega a atingir 40% da população de mais de 100 países. Segundo a OMS, são registrados no mundo aproximadamente 300-500 milhões de casos e 1 milhão de mortes por malária a cada ano. Crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas são os principais grupos de risco nas áreas endêmicas. Deste número alarmante, 90% se concentra na África e os outros 10% estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas da Oceania.(RBM – OMS)

Na América Latina, o maior número de casos (99%) é verificado na Amazônia Legal, divisão política do território nacional que engloba nove Estados: Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, dos quais 78% dos casos relatados referem-se ao *P. vivax* e 22% ao *P. falciparum*. Na Amazônia a Incidência Parasitária Anual (IPA) nos anos de 1999, 2000 e 2001 foi de 31,0, 30,3 e 18,8 casos por mil habitantes, respectivamente.(Funasa-2002)

Na região extra-amazônica são notificados apenas 1% do total de casos de malária do Brasil. Deste 1%, 92% são importados dos estados da área endêmica e países da África. Casos autóctones esporádicos ocorrem em áreas focais restritas desta região. Em 2000, o coeficiente de letalidade por malária foi de 16,45 óbitos

por 1000 casos, enquanto na região Amazônica foi de 0,37/1000. Isto significa que na região extra-amazônica este indicador é 45 vezes maior. O óbito nesta região ocorre, geralmente, em pessoas que vindo infectadas de países africanos e estados da Amazônia, não recebem o diagnóstico e tratamento precoce conforme preconizado.(Funasa-2002)

Populações de áreas endêmicas para malária são continuamente expostas a mosquitos infectados durante as estações de transmissão. Mesmo recuperados de suas infecções primárias, muitos indivíduos são susceptíveis para reinfecção e tornam-se semi-imunes durante sucessivos episódios de infecção. Pode-se levar muitos anos para estabelecer proteção hiperimune capaz de prevenir doença clínica (www.cdc.gov).

Os parasitas da malária demonstram extensiva diversidade antigênica e ainda sofrem variação antigênica. A imunidade para malária em uma diversidade de hospedeiros, inclusive humanos, é marcadamente espécie-parasita, linhagem e variante específica, no entanto um grau de resistência-cruzada é relatado em alguns casos. Esses são fatores que podem explicar parcialmente a susceptibilidade observada para reinfecção em humanos, justificando importantes considerações na interação hospedeiro-parasita e também no desenho e aplicação de vacinas efetivas. Estudo da dinâmica e eficácia relativa de resposta imune reativa-cruzada e específica ocorrendo durante infecção primária e reinfecção é, portanto, particularmente relevante (Mota *et al* 1998).

1.2 *Plasmodium* sp em murinos

Dos plasmódios de roedores, *P. berghei* é a espécie mais amplamente estudada. Foi isolada em 1948 por Vincke e Lips na vizinhança de Elizabethville (agora Lubumbashi) em Katanga – Zaire, das glândulas salivares da espécie silvestre *Anopheles durenii millcampsi* e posteriormente do sangue do rato silvestre *Grammomys surdaster*.

Em 1952, Vincke isolou uma segunda espécie de plasmódio das glândulas de *A. d. millcampsi* morfologicamente diferente de *P. berghei*, que foi chamado de

P. vinckei por Rodhain (1952). Em 1955, Bruce – Chwatt e Gibson fizeram a primeira observação de malária de roedor fora de Katanga. Eles descreveram um parasita semelhante ao *P. vinckei* em um esfregaço de sangue de roedor identificado como *Praomys jacksoni*, capturado no oeste da Nigéria. London e Chabaudi (1965) descobriram parasitas semelhantes ao *P. berghei* e *P. vinckei* no sangue de espécimes do rato silvestre, *Thamnomys rutilans* na República Central Africana, marcando o início de um período de rápido aumento na prevalência de malária murina. Parasitas semelhantes ao *P. berghei* e *P. vinckei* foram descobertos próximos a Brazzaville por Adam e colaboradores em 1966. Em 1967, Killicki – Kendrick reconfirmaram a existência dos parasitas semelhantes a *P. vinckei* que Bruce – Chwatt's observaram na Nigéria e isolaram um parasita semelhante ao *P. berghei* na mesma região (1968) (Carter & Diggs, 1977).

Após a descoberta dos parasitas da malária murina, a taxonomia dos plamódios tornou-se confusa, até o reconhecimento de quatro espécies distintas: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi*, representadas por duas ou mais sub-espécies cada, com exceção do *P. berghei* (Carter & Diggs, 1977):

- *P. vinckei*: *P. vinckei vinckei* (Rodhain, 1952), *P. vinckei petteri* (Carter e Walliker, 1975), *P. vinckei letum* (London, Michel, Adam e Boulard, 1970), *P. vinckei brucechwatti* (Killicki – Kendrick, 1975), *P. vinckei* subsp. (Lainson, 1983).
- *P. yoelii*: *P. yoelii yoelii* (London e Killicki – Kendrick, 1966), *P. yoelii killicki* (London, Michel e Adam, 1986), *P. yoelii nigeriensis* (Killick – Kendrick, 1973)
- *P.chabaudi*: *P.chabaudi chabaudi* (London,1965), *P.chabaudi adami* (Carter e Wallicker, 1976)

O corrente sistema de classificação adota os seguintes critérios:

- a) Morfologia dos parasitas no estágio sangüíneo;
- b) Características de esporogonia incluindo temperatura de transmissão, tamanho dos oocistos maduros e tamanho do esporozoítio;
- c) Velocidade de crescimento e tamanho do estágio pré-eritrocítico;

d) Mobilidade eletroforética de enzimas dos parasitas do estágio sangüíneo (Carter & Diggs, 1977).

Os plasmódios de roedores são divididos dentro de dois grupos: o grupo *berghei* – *P. berghei* e *P. yoelii* e o grupo *vinckei* – *P. vinckei* e *P. chabaudi*. As similaridades entre os dois grupos são avaliadas em múltiplos aspectos, incluindo a morfologia dos parasitas no estágio sangüíneo, padrão de proteção cruzada, sorologia e polimorfismo enzimático (Carter & Diggs, 1977).

Na infecção por plasmódios do grupo *vinckei*, as formas trofozoítas são observadas em eritrócitos maduros e a invasão múltipla de células sangüíneas ocorre em infecções crônicas, em altas parasitemias.

Em esfregaço de sangue do *P. chabaudi chabaudi* corado com Giemsa, o trofozoíta pode apresentar massas nucleares com cromatina dupla ou simples. O número de trofozoítas aumenta durante a manhã e volta a predominar no final da tarde. A infecção em camundongos e ratos silvestres é sincrônica, com uma periodicidade de 24 h.

No estágio sangüíneo do *P. chabaudi* o trofozoíta jovem desenvolve-se após o estágio de anel; o vacúolo central é perdido e o parasita torna-se fracamente amebóide, sendo que raramente excede a metade do diâmetro da célula hospedeira. Com o progresso da esquizogonia o parasita torna-se condensado e o eritrócito escurecido. Em esfregaço sangüíneo fixado, os merozoítas muitas vezes parecem separar dos restos do esquizonte. Os esquizontes são os menores das espécies de *Plasmodium* murino, normalmente produzindo entre quatro e oito merozoítas, no entanto, grandes números (acima de 16) podem ser observados.

Ambas sub-espécies de *P. chabaudi*, *Plasmodium chabaudi chabaudi* e *Plasmodium chabaudi adami*, podem ser transmitidas em laboratório por *Anopheles stephensi* mantido a 24° - 26°C (Killick-Kendrick & Peters, 1978).

Oocistos maduros alcançam um diâmetro aproximadamente de 50 µm. O tamanho médio dos esporozoítas de *P. chabaudi* varia de 11µm a 13µm e o diâmetro médio do esquizonte maduro é de aproximadamente 37µm.

As duas subespécies de *P. chabaudi* são realmente idênticas pela maioria dos critérios, porém são consideradas distintas pelo polimorfismo enzimático no estágio sangüíneo do parasita. Ambas subespécies têm uma forma comum de Glutamate Dehydrogenase (GDH – 5), mas diferem nas formas de Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (6PGD) e, mais notavelmente, Lactate Dehydrogenase (LDH) (Carter & Diggs, 1977):

- *P. chabaudi chabaudi* : GPI – 4; 6PGD – 2, 3 e 7; LDH – 2, 3, 4 e 5.
- *P. chabaudi adami*: GPI – 8; 6PGD – 2; LDH – 8 e 10.

A enorme gama de drogas resistentes e a carência de uma vacina eficaz contra o agente letal causador da malária, *Plasmodium falciparum*, vem induzindo a pesquisa sobre os mecanismos de proteção do hospedeiro contra este protozoário.

1.3 Modelos animais x *Plasmodium chabaudi chabaudi*

A malária desenvolvida em roedores é útil na pesquisa científica, pois a cada escolha de modelo hospedeiro e linhagem de parasita pode simular modelos bem parecidos com a doença humana. O *P. chabaudi chabaudi* tem sido muito adotado pelos pesquisadores como um modelo para estudar imunidade adquirida para o estágio eritrocítico do parasita da malária, pois é um parasita de roedor equivalente ao *P. falciparum*. Deste modo, normalmente infecta eritrócitos maduros, sofre sequestro, embora os eritrócitos infectados com estágio assexuado maduro não mostra “knobs” e o parasita não fica seqüestrado no cérebro, mas predominantemente no fígado. Em seguida a recuperação da parasitemia primária aguda, existe uma ou mais recrudescência em camundongo de laboratório (Phillips *et al* 1994).

A cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR, não-letal, representa a malária experimental de auto-controle, apropriada para estudos de imunidade em estágio sangüíneo (Garnica *et al* 2002) e estudo das lesões histopatológicas na fase crônica.

Várias linhagens de camundongos têm sido adotadas na pesquisa da malária experimental. A susceptibilidade das linhagens de camundongos ao *P. chabaudi* varia de acordo com o genoma do hospedeiro. Desta forma, de acordo com Fortin *et al* (2002), as linhagens A/J, BALB/c, AKR, DBA/1, C3H/HeJ, SJL e 129/ICR são susceptíveis para *P. chabaudi*, enquanto que as linhagens C57BL/6, B10. A, CBA, DBA/2 e C57L são resistentes ao *P. chabaudi*.

A linhagem de camundongo SCID é proveniente de uma mutação recessiva que ocorre no cromossomo 16 e foi identificada por Bosma *et al*, em 1983. Esta síndrome foi observada pela primeira vez em crianças em meados de 1950, sendo posteriormente identificada também em cavalos árabes (Bosma *et al* 1983). Esta mutação faz com que os camundongos apresentem ausência de imunidade por células T e B, resultante da atividade defeituosa da recombinase VDJ. As células pró-B aparecem na medula óssea, mas não se desenvolvem em pré B e células B. No timo são encontrados precursores de linfócitos T, mas não são encontradas células CD3+ funcionais.

Estudos demonstraram que a imunidade na malária depende de células T e células B malária-específica e seus respectivos anticorpos, onde células T regulam a fase inicial da infecção e as células B e anticorpos se encarregam de finalizar a infecção (Meding & Langhorne, 1991).

Mota *et al* (1998) em seus estudos sobre infecção por *P. chabaudi* em camundongos imunodeficientes, sugeriram que o desaparecimento do parasita após o primeiro pico de parasitemia é independente de célula B. Esses autores ainda propuseram que macrófagos ativados por células T secretam mediadores que são diretamente citotóxico para parasitas intraeritrocíticos. Langhorne *et al* (1998) também demonstraram que as células B não são essenciais para a produção inicial de células T em infecções maláricas, mas que desenvolvem um papel fundamental na indução de resposta Th2 e finalização da resposta Th1.

A importância das células T CD4+ na resolução do estágio sangüíneo da infecção por *P. chabaudi* (AS) tem sido estabelecida com base na incapacidade do camundongo nude, camundongo SCID e camundongo deficiente de célula T CD4+ em controlar a infecção (Langhorne *et al* 1998). O mecanismo pelo qual as células

T CD4+ fornecem proteção imune tem sido o alvo de recentes e intensivas investigações. Com base no padrão de produção de citocinas e na habilidade em promover ajuda para as células B, foi demonstrado que células T CD4+ correspondem ao tipo inflamatório ou subconjunto Th1, que predominam durante a fase aguda ou inicial, seguida pelo aparecimento, durante a fase crônica ou tardia da infecção, das células Th2 que são capazes de induzir a produção de anticorpos *Plasmodium*-específico e citocinas como IL-4 e IL-10 (Stevenson *et al* 1995; Phillips *et al* 1998; Linke *et al* 1996). Conclusões similares foram alcançadas por Taylor-Robinson em 1993 pela demonstração de que clones de células T derivadas de camundongo infectado na fase aguda eram do tipo Th1 e clones derivados de camundongo reinfestado eram do tipo Th2.

Além dos linfócitos T CD4+, Linfócitos T CD8+ também contribuem para o desenvolvimento de imunidade adquirida para infecção com *Plasmodium chabaudi* AS. Nos estudos realizados por Podoba & Stevenson, 1991, a depleção de células T CD4+ resultou em um significativo aumento da parasitemia já no 7º dia da infecção. Em contraste, na ausência de linfócitos T CD8+ a infecção aguda com *P. chabaudi* AS foi definitivamente resolvida. No entanto, duas crises recorrentes de parasitemia foram observadas durante a fase de eliminação, que requisiu mais de 5 semanas em vez de 4 semanas característica dessa infecção em C57BL/6, demonstrando então a contribuição que o linfócito T CD8+ exerce para a imunidade adquirida desse parasita.

Camundongos deficientes para o receptor INF- γ e camundongos deficientes em IL-4 foram infectados com *P. chabaudi chabaudi* (AS) para análise do papel das respostas Th1 (INF- γ) e Th2 (IL-4); alta mortalidade e dificuldade para reduzir a parasitemia primária foram observados nos camundongos deficientes em receptor para INF- γ . Os camundongos deficientes em IL-4 controlaram a infecção primária de maneira similar ao camundongo controle e não se observou mortalidade (Favre *et al* 1997). Portanto, pode-se dizer que respostas mediadas por INF- γ (Th1) são cruciais para o desenvolvimento de proteção imune para infecção primária de *P. chabaudi* e a ausência de IL-4 (Th2) não altera a autocura da infecção (Balmer *et al* 2000).

As células NK, definidas como células citotóxicas que têm a morfologia predominante de grande linfócito granular, possuem a habilidade de secretar as citocinas INF-gama e TNF-alfa em resposta a infecção por parasitas intracelulares e ainda respondem à indução pela IL-12. As células NK são células efetoras da resistência inata contra agentes infecciosos (Scott *et al* 1995).

Várias pesquisas (Mohan *et al* 1997; Stevenson *et al* 1995; Su & Stevenson 2002) demonstraram que a linhagem de camundongo susceptível (A/J) à malária pode ser protegida contra a cepa letal de *P. chabaudi* (AS) pelo tratamento com IL-12, pois esta molécula está associada com o aumento da produção de INF-gama, TNF-alfa e NO, moléculas associadas com a resposta imune mediada por células do tipo Th1. A linhagem A/J apresenta resposta imune predominantemente Th2, enquanto que outra linhagem resistente, C57BL/6, apresenta resposta imune tipo Th1.

Seixas *et al* 2001, comprovaram a capacidade de células dendríticas produzirem TNF-alfa dentro de 30 minutos de exposição aos esquizontes de *P. chabaudi chabaudi* independentemente de células T ou NK. Portanto, o estágio eritrocítico deste parasita ativa células dendríticas diretamente, propiciando a rápida ativação de células Th1 e indução de imunidade.

Apesar de estudos comprovarem que as células NK e suas citocinas têm papel importante no controle imunológico da malária, sabe-se que fatores genéticos representam um dos maiores determinantes de resistência do hospedeiro para infecção da malária. Estudos sobre o modelo *P. chabaudi* AS usando análise genética, mostraram que a atividade da célula NK e a resistência a esse parasita segregam independentemente (Skamene *et al* 1983).

1.4 Histopatologia Renal na malária

Os aspectos clínicos da malária humana causada pelas quatro espécies de *Plasmodium* são: acessos de febre, anemia e, em casos severos, danos isquêmicos ao cérebro e rins causados pela hemólise e obstrução capilar pelas hemácias parasitadas. Citocinas como o TNF, podem promover as lesões vasculares da malária cerebral humana (Abbas *et al* 1995).

Além dos danos que os parasitas causam ao hospedeiro, muitas respostas imunes têm ação patológica. Na malária, o número e a atividade aumentados dos macrófagos e linfócitos no fígado e no baço levam ao aumento de tamanho desses órgãos. A formação de imunocomplexos é comum e eles podem depositar-se nos rins, como na síndrome nefrótica da malária quartã (Roitt *et al* 1999). Histopatologicamente há uma glomerulonefropatia proliferativa com células endoteliais e mesangiais aumentadas. Ward & Kibukamusoke (1969), com técnicas de imunofluorescência, encontraram IgM, IgG, IgA, complemento, fibrina e antígenos maláricos nos glomérulos de pacientes que desenvolveram doença renal e síndrome nefrótica seguindo malária quartã. Eles notaram que IgM foi a imunoglobulina dominante (Kreier 1980).

As mudanças patológicas nos rins de pacientes com malária por *P. falciparum* dependem do estágio da doença e da severidade da infecção. Spitz (1946), Berger *et al* (1967), Hartenbower *et al* (1972) e Bhamarapavati (1973) descreveram hiper celularidade, expansão mesangial glomerular, adesão da cápsula de Bowman, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e intenso ou moderado espessamento de membrana basal glomerular. Este último autor, usando imunofluorescência, estudou dez materiais provenientes de biópsias de pacientes com *P. falciparum* e encontrou finos depósitos granulares nas áreas mesangiais e ocasionalmente ao longo do lado luminal dos capilares glomerulares. Os grânulos consistiram primariamente de IgM (9/10 casos), B1C (8/10 casos) e IgG (3/10 casos). IgA foi identificado apenas em um caso, bem como antígeno de *P. falciparum*. Com base nesses achados, pode-se afirmar que complexos imunes estão envolvidos na origem de lesões glomerular associadas com infecção por *P. falciparum* em humanos (Kreier, 1980).

Alterações tubulares renais pronunciadas foram relatadas em pacientes com malária falciparum por Boonpuckavis & Sitprija (1979). Observou-se inchaço do epitélio tubular e, em rins afetados severamente, degeneração e necrose. Mudanças são mais evidentes nos túbulos contorcidos distais do que nos proximais (Kreier 1980).

Greenwood & Voller (1970) foram os primeiros pesquisadores a discutirem a patologia renal em camundongos infectados com *P. berghei* na Nova Zelândia. Embora diversas descobertas interessantes foram relatadas por esses autores, infelizmente, devido ao desenvolvimento espontâneo de nefropatia e a possibilidade de uma infecção com vírus latente nos camundongos, eles não obtiveram sucesso nos estudos (Kreier 1980).

Geralmente os camundongos desenvolvem glomerulonefrite aguda durante infecção plasmodial, similar as glomerulonefrites falciparum aguda. Alguns desenvolvem lesões que lembram aquelas da síndrome nefrótica em *P. malariae*. Histologicamente a lesão glomerular consiste de proliferação celular mesangial, hipertrofia das células mesangiais, infiltrações de células polimorfonucleares e espessamento da membrana basal glomerular. Pigmentos de hemossiderina nas células tubulares proximais podem ser observados (Kreier 1980).

Vuong *et al* (1999) observaram patologias renais em camundongos infectados com qualquer das três espécies de *Plasmodium* murino – *P. chabaudi chabaudi*, *P. vinckei petteri* e *P. yoelii nigeriensis*, e descreveram as seguintes alterações: congestão, hemorragia, edema, proliferação de células mesangiais, necrose glomerular, necrose tubular, trombose glomerular, granuloma linfóide e infiltrado linfocítico.

Musoke *et al* (1977) observaram que infecção com *P. chabaudi* em rato além de desenvolver anemia e esplenomegalia, desenvolveu também doença renal caracterizada por inchaço dos tufo glomerulares e hiper celularidade mesangial; áreas de necrose focal foram raramente vistas; adesão da parede da cápsula e também descamação do epitélio tubular foram observados. Essas mesmas alterações foram observadas em camundongos infectados por *P. chabaudi* AS (Andrade *et al* 1991).

2. Objetivo Geral

Estudar a importância das células NK no controle do *Plasmodium chabaudi* em camundongos mediante a comparação da parasitemia, após inoculação do parasita, em 4 linhagens de camundongos: BALB/c/Uni, C.B17 SCID/SCID/Uni, C57BL/6 Knockout (KO) para interferon-gama e C57BL/6/Uni.

2.1 Objetivo específico

Estudar as lesões renais provocadas pelo *P. chabaudi chabaudi* linhagem CR em camundongos BALB/c/Uni, C.B17 SCID/SCID/Uni, C57BL/6 Knockout (KO) para interferon-gama e C57BL/6/Uni.

3. Material e Métodos

3.1 Camundongos. Camundongos machos livres de patógenos específicos, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do CEMIB/Unicamp e isogênicos das linhagens:

- BALB/c/Uni (48 animais) – imunocompetentes susceptíveis ao *Plasmodium* sp;
- C.B17 SCID/SCID/Uni (12 animais) – desprovidos de imunidade por células T e B;
- C57BL/6 knockout (KO) para interferon gama (4 animais);
- C57BL/6/Uni (3 animais) – imunocompetentes resistentes ao *Plasmodium* sp.

3.2 *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR. A linhagem de *P. chabaudi chabaudi* (CR) foi cedida pelo Prof. Dr. Heitor F. Andrade Junior do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Um camundongo de padrão sanitário desconhecido da linhagem C57BL/6 foi a fonte de *P. chabaudi*. Os parasitas foram mantidos mediante passagens semanais sucessivas no camundongo BALB/c Uni por 12 semanas antes da infecção do SCID e KO. Após este período um “pool” de células sangüíneas foi coletado da veia da cauda dos animais, para o preparo do inóculo

em solução NaCl 0,15 M. A contagem destas células foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de fase.

A manutenção do *P. chabaudi chabaudi* CR foi realizada em camundongo macho BALB/c/Uni através de repiques semanais com inóculo de 10^7 hemácias parasitadas, no interior do isolador. Amostras de esfregaços também foram coradas pelo Giemsa, para avaliação das formas de *Plasmodium*.

Os camundongos do experimento foram infectados com 10^6 parasitas (hemácias parasitadas + parasitas livres) mediante injeção intraperitoneal.

3.3 Manutenção dos animais em unidade Isoladora de PVC. Os camundongos infectados foram mantidos em unidade isoladora de plástico flexível(LNF – Ind. & Com. Ltda.), de pressão positiva, com 16 a 18 trocas de ar por hora, no Departamento de Parasitologia da UNICAMP. Nesta unidade é utilizado motor de insuflamento, de forma que se alcance no seu interior uma pressão de 2 a 4 mm de coluna de água acima da pressão atmosférica normal. Isto garante uma proteção contra a entrada de ar externo, mesmo na existência de um pequeno vazamento, possibilitando um ambiente livre de contaminação. A unidade isoladora é dotada de filtro absoluto com eficiência de 99,99% na retenção de partículas de 0,3 micron. O material necessário para a manutenção dos animais (gaiolas, tampas, ração, água, maravalha, bebedouros, pinças etc) foi devidamente submetido a processos de esterilização em autoclave, conforme normas de procedimentos adotados pelo CEMIB. A troca das gaiolas, reposição hídrica e de ração foi realizada uma vez por semana. A entrada de materiais no isolador foi sempre precedida pela nebulização, sob pressão, com ácido peracético diluído 1:3, no porto de passagem, submetendo o material a esta atmosfera durante 30 a 40 minutos. Da mesma forma, após a retirada de qualquer insumo ou animal do interior do isolador, realizou-se a desinfecção do porto de passagem. O transporte de animais retirados do CEMIB foi realizado embalando-se cada gaiola com saco plástico autoclavável. O tempo máximo de permanência dos animais durante o transporte foi de $\frac{1}{2}$ hora. Os animais recém-chegados foram alojados no porto de passagem dentro das respectivas gaiolas embaladas

em saco plástico autoclavável, previamente borrifadas com uma mistura de Amônio Quaternário, 0,5% e álcool 70%. Os animais ingressaram com as respectivas gaiolas, ração e bebedouro no interior do isolador. Após aproximadamente 10 minutos da exposição ao vapor de ácido peracético, as gaiolas foram alojadas no corpo do isolador. A infecção e a coleta de material para determinação de parasitemia foram realizadas dentro do isolador.

3.4 Determinação da Parasitemia. Amostras de 20 µl de sangue foram coletadas com micropipeta mediante secção da ponta da cauda do camundongo infectado. A coleta se deu em intervalos semanais até a 6^a semana de infecção. Após este período, os intervalos para determinação da parasitemia foram de 15 dias. Para a contagem de parasitas, o sangue foi diluído 1000 x em NaCl 0,15 M. As células vermelhas parasitadas e os parasitas livres foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia de fase (**Apêndice B**). Os valores foram expressos em número de hemácias parasitadas x 10⁸/ml.

3.5 Monitoramento imunológico da linhagem C.B-17 SCID/SCID/Uni. A classificação dos animais homozigotos C.B-17 SCID/SCID/Uni ou heterozigotos deu-se pelo teste Dot-Elisa para imunoglobulinas. (Alves *et al* 2002).

3.6 Mouse Antibody Production (MAP – teste). Considerando que a linhagem do *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR) foi proveniente de manutenção “in vivo” em animais com padrão sanitário desconhecido (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo), tornou-se necessário avaliar os patógenos associados ao parasita. Desta forma, os camundongos imunocompetentes foram avaliados quanto à presença de 11 antígenos de patógenos murinos (MHV-3, TMEV-GDVII, SENDAI, MVM, LCM, Ectromelia, Adenovirus, Rotavirus, Reovirus tipo 3, *Mycoplasma pulmonis* e *Toxoplasma gondii*). Os camundongos SPF inoculados com o *Plasmodium* foram mantidos em isoladores por mais de 60 dias e o respectivo sangue coletado após sacrifício para análise sorológica de patógenos murinos pelo Laboratório de Controle de Qualidade do CEMIB.

3.7 Avaliação histopatológica da infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Os camundongos das linhagens em estudo foram sacrificados por deslocamento cervical, em diferentes etapas da infecção. Em seguida coletou-se o sangue e procedeu-se a retirada dos rins para fixação imediata em Bouin aquoso, e após inclusão em parafina, realizou-se o processamento de cortes histológicos de 5 µm no micrótomo (AO). As lâminas foram coradas pela Hematoxilina – Eosina.

A descrição das lesões renais foi realizada principalmente na fase crônica da doença, após a décima -quinta semana de infecção.

Os parâmetros indicadores de lesões observadas no rim incluíram congestão, edema com adesão da cápsula de Bowman, hiperplasia mesangial, destruição parcial ou total do glomérulo e necrose tubular – células tubulares do tubo contorcido proximal (TCP) perdem sua borda em escova ou esfoliam no lume enquanto a membrana basal permanece intacta.

3.8 Mortalidade. No decorrer do experimento, registrou-se o número de animais mortos nos grupos de camundongos experimentais BALB/c/Uni, C.B-17 SCID/SCID/Uni, C57BL/6 KO para interferon gama.

3.9 Fotomicrografias. As lâminas coradas foram examinadas sob microscopia comum e fotografadas em Microscópio Zeiss AXIOPLAN, acoplado ao microcomputador com software AXIOPHOTO 2. Os filmes utilizados foram KODAK Prolmage 100 e Ektachrome.

3.10 Estatística. Os valores da parasitemia dos três grupos de animais (BALB/c/Uni, C.B-17 SCID/SCID/Uni, C57BL/6 KO) no intervalo das seis primeiras semanas foram submetidos a Análise de Variância de Medidas Repetidas e o teste de Duncan, executados pelo programa estatístico SAS (SAS Institute 1987).

4. Resultados

4.1 Parasitemia e Mortalidade

A maior parasitemia da linhagem C.B-17 SCID/SCID aconteceu por volta da 6^a semana e uma recrudescência foi observada na 12^a semana (**Apêndice C – Figura 5**).

A maior parasitemia de plasmódio em camundongos BALB/c/Uni aconteceu na 10^a semana (**Apêndice C – Figura 6**).

A análise estatística comparativa entre as linhagens BALB/c e SCID nas primeiras 6 semanas de infecção permitiu constatar a capacidade do animal competente em controlar a parasitemia na 6^a semana (**Figura 1**).

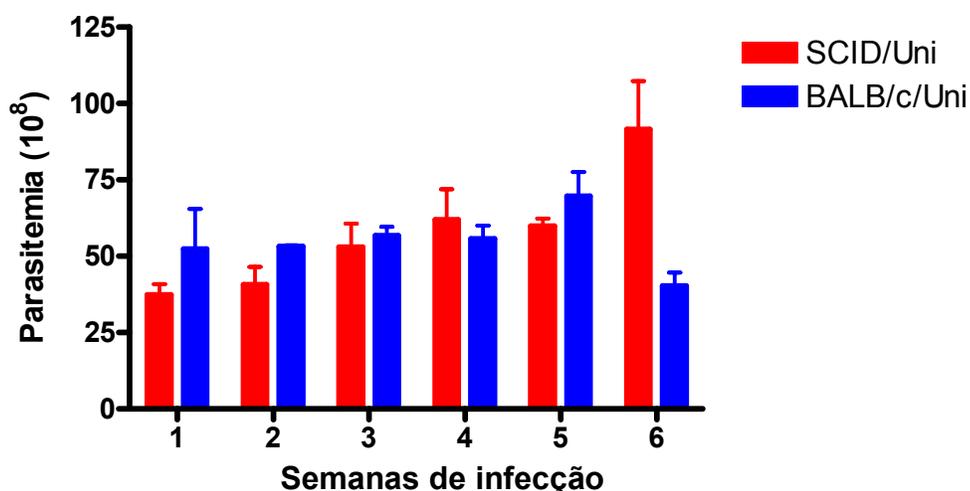


Figura 1- Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos BALB/c/Uni e C.B-17 SCID/SCID durante 6 semanas de infecção com 10⁶ hemácias parasitadas com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

Os camundongos C57BL/6 KO para INF- γ atingiram níveis mais elevados de parasitemia quando comparados com o seu controle C57BL/6 (**Tabela 1**) e também em relação ao modelo SCID (**Figura 2**). A maior parasitemia em KO ocorreu na 10^a semana (**Apêndice C – Figura 7**).

Tabela 1: Média dos valores de parasitemia em camundongos C57BL/6 KO para interferon gama e C57BL/6/Uni durante 4 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

Animais	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
C57BL/6 KO	13,73	59,28	63,80	71,00
C57BL/6	62,90	Dados não coletados	37,00	27,60

Nota: as amostras dos camundongos C57BL/6 na 2ª semana de parasitemia não puderam ser coletadas .

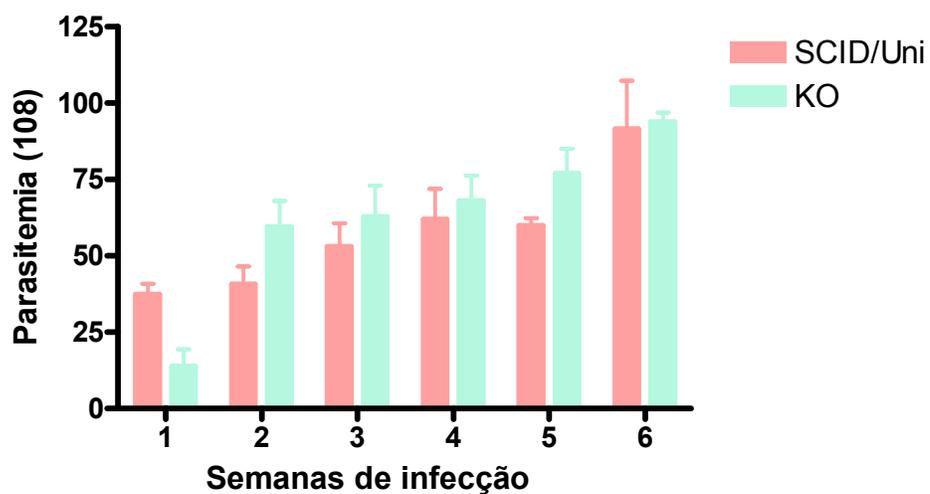


Figura 2 - Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID e C57BL/6 KO para interferon-gama durante 6 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

Foi feita a comparação estatística entre os valores médios de parasitemia durante as primeiras seis semanas no grupo de animais BALB/c/Uni, C.B-17 SCID/SCID e KO para INF- γ . Os resultados evidenciaram o aumento marcante de parasitemia em animais KO e SCID, resultando em diferença significativa entre a 1^a e 6^a semanas de infecção (**Figura 3**). Esses resultados se repetiram na análise estatística comparativa sobre as três primeiras linhagens (BALB/c/Uni, C.B-17 SCID/SCID, KO para INF- γ) no decorrer das primeiras seis semanas (**Apêndice A**).

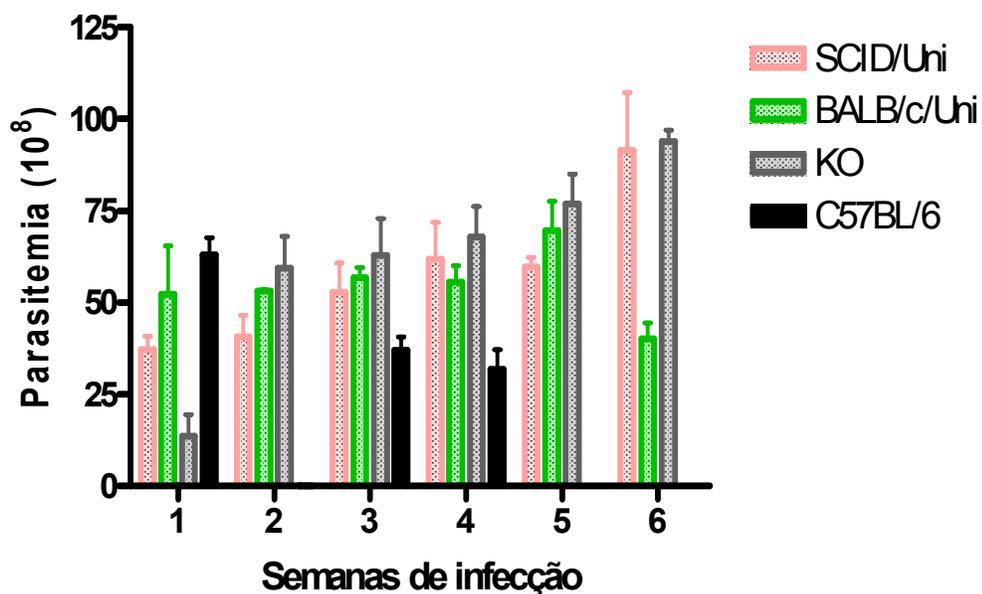


Figura 3 - Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID, BALB/c/Uni, C57BL/6 KO para interferon gama durante 6 semanas de infecção com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR) e durante as semanas 1, 3 e 4 nos camundongos C57BL/6/Uni.

Durante o período máximo de observação, correspondente a 23 semanas para as linhagens KO e SCID, não foi observada mortalidade em KO. Entretanto, do grupo de doze SCID, quatro morreram: um na segunda semana, um na décima semana, um na décima terceira semana e outro na décima sexta. No grupo

BALB/c/Uni, linhagem de manutenção do *P. chabaudi*, dos quarenta e oito animais observados além de oito semanas, dois morreram: um na décima primeira semana e outro na décima nona semana.

O **Apêndice C** mostra dados individuais de camundongos (6 da linhagem SCID, 4 da linhagem BALB/c e 4 da linhagem KO para interferon-gama) no decorrer de 12 semanas de infecção, sendo que nas seis primeiras semanas os dados foram coletados a cada 7 dias e nas demais semanas o intervalo foi de 15 dias. As semanas em que não aparecem dados de parasitemia correspondem às semanas em que não foram coletadas amostras dos animais.

Dos 6 animais da linhagem C.B-17 SCID/SCID, 5 camundongos não controlaram a infecção, sendo que o SCID 5 sucumbiu à parasitemia por *P. chabaudi* CR na 11^a semana após a infecção. Os outros 6 camundongos experimentais desta mesma linhagem tiveram sua parasitemia acompanhada, porém estes dados não foram descritos em gráfico.

De 4 camundongos do grupo controle BALB/c/Uni no decorrer de 12 semanas, 3 animais BALB/c/Uni não eliminaram o *P.chabaudi* CR e 1 animal (BALB/c 1) morreu na 11^a semana pós-infecção.

Os 4 animais KO para interferon-gama mantiveram picos altos de parasitemia sem sucumbir à infecção.

4.2 Monitoramento imunológico da linhagem SCID/SCID

Os camundongos SCID são considerados homozigotos (SCID/SCID) quando os níveis de imunoglobulina sérica forem inferiores a 5 µg/ml. O critério de seleção dos animais homozigotos SCID/SCID foi adotado para seleção das matrizes na colônia do CEMIB/Unicamp, com o objetivo de minimizar e retardar a expressão do fenótipo “leaky” (capacidade de alguns camundongos SCID desenvolver um limitado número de células T e B entre 3 e 9 meses de idade) (Bosma *et al* 1988).

Todos os animais SCID adotados nos experimentos apresentaram-se homozigotos.

4.3 MAP – test

Todos os soros testados das linhagens de camundongos imunocompetentes do experimento, assim como o soro do animal infectado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (fonte do *P. chabaudi chabaudi* linhagem CR) que foi mantido durante 65 semanas, revelaram-se negativos para os 11 antígenos de patógenos murinos avaliados (MHV-3, TMEV-GDVII, SENDAI, MVM, LCM, Ectromelia, Adenovirus, Rotavirus, Reovirus tipo 3, *Mycoplasma pulmonis* e *Toxoplasma gondii*.)

4.4 Avaliação histopatológica do rim

Foi feita a histopatologia renal de camundongos BALB/c/Uni, C.B-17 SCID/SCID, C57BL/6 KO para INF-gama e C57BL/6 infectados com *P. chabaudi chabaudi* CR.

As alterações normalmente ocorreram em focos isolados, não afetando a totalidade do parênquima renal.

A seguir é apresentado uma tabela da distribuição das lesões renais em camundongos BALB/c, SCID, C57BL/6 e C57BL/6 KO para interferon gama.

Tabela 2: Distribuição das lesões histológicas renais em camundongos infectados.

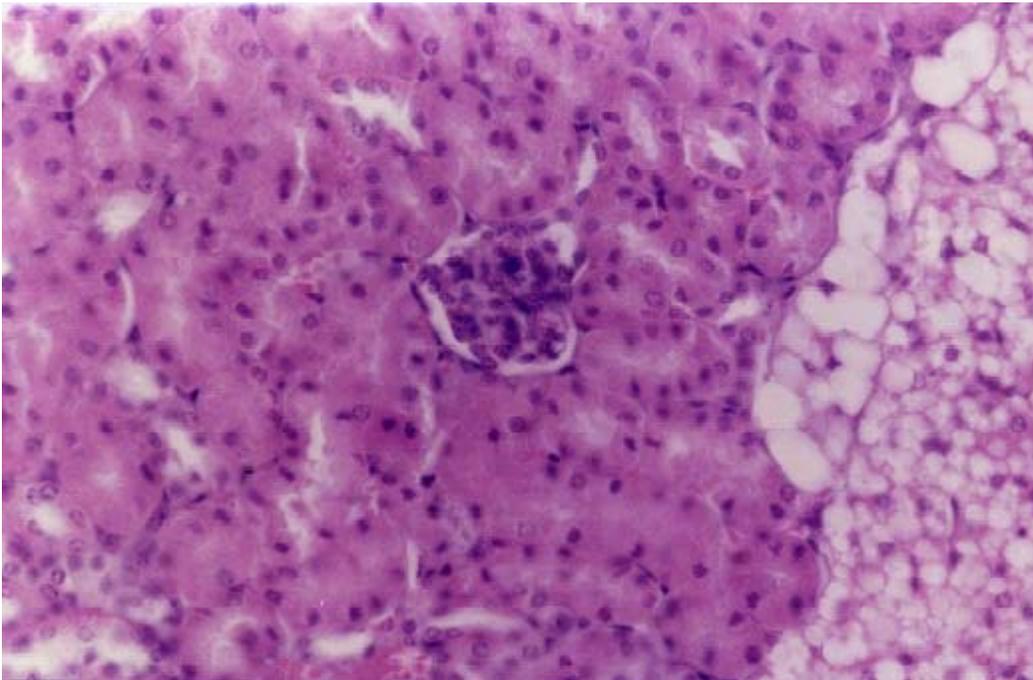
Animais	semanas	Parasitemia	Camundongos(n)	Alterações no rim		
				T	N	DCT
BALB/c						
A	5	62,60 . 10 ⁸	3		+	
B	7	42,02 . 10 ⁸	3		+	
C	21	64,00 . 10 ⁸	1			
D	46	66,70 . 10 ⁸	1			
SCID						
A	16	115,20 . 10 ⁸	1		++	++
B	20	87,70 . 10 ⁸	2	+	++	+
C	21	101,20 . 10 ⁸	2	+	+	+
D	23	80,80 . 10 ⁸	1	+		+
C57BL/6						
A	11	31,83 . 10 ⁸	3			
KO						
A	20	90,40 . 10 ⁸	1	+	++	
B	23	96,80 . 10 ⁸	2			+

Representação esquemática do curso da malária – *P. chabaudi chabaudi* com quatro linhagens de camundongos. Alterações histopatológicas no rim estão representadas por:

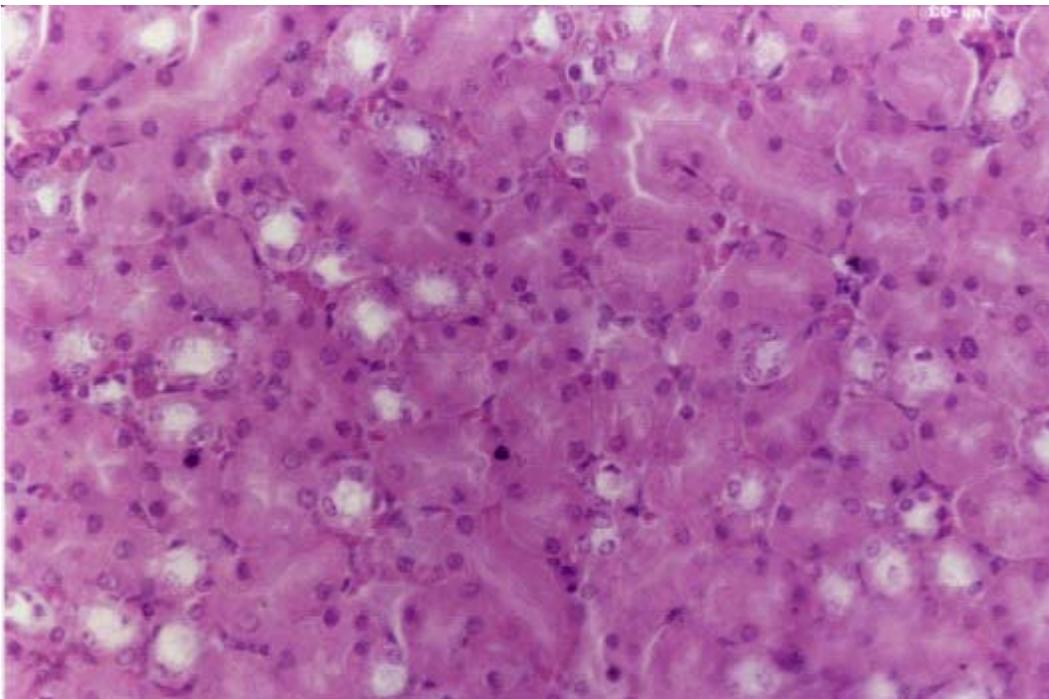
T – trombose; N – necrose e DCT – descamação das células tubulares.

Nas microfotografias M1 a M10 encontram-se descritas as lesões renais das linhagens de camundongos BALB/c, SCID e C57BL/6 KO para interferon gama.

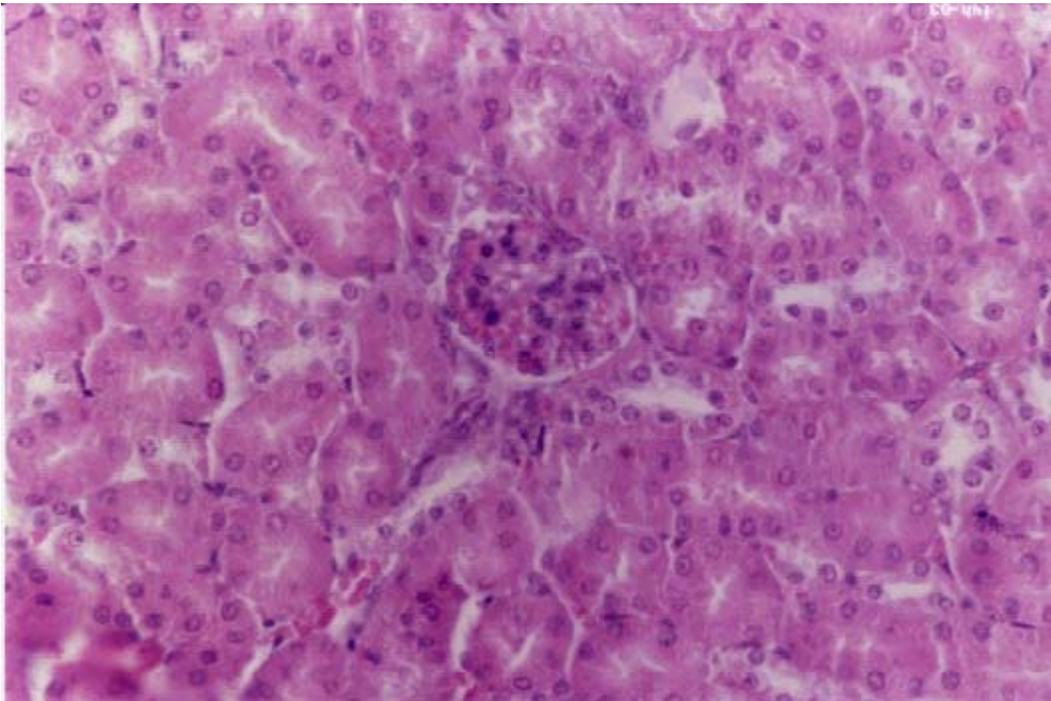
A fonte de *P. chabaudi* CR do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, um camundongo C57BL/6, foi sacrificado após 65 semanas de infecção e os achados patológicos encontram-se descritos nas microfotografias 11 e 12.



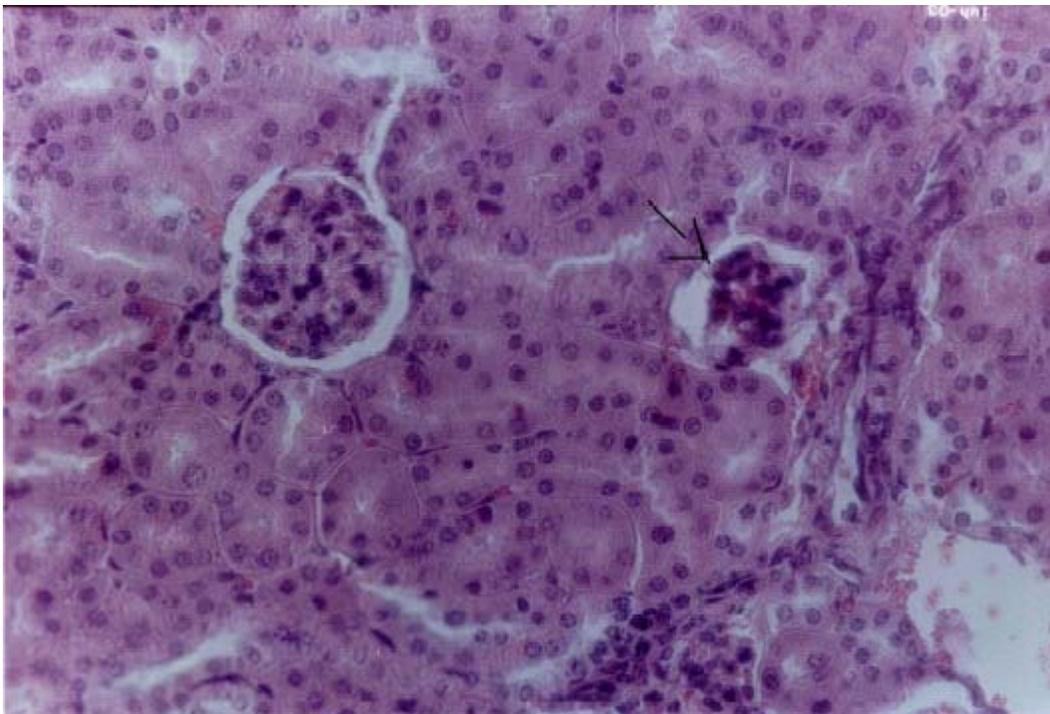
M1 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo BALB/c/Uni não infectado. Observar glomérulo renal normal. Coloração Hematoxilina-eosina (40x).



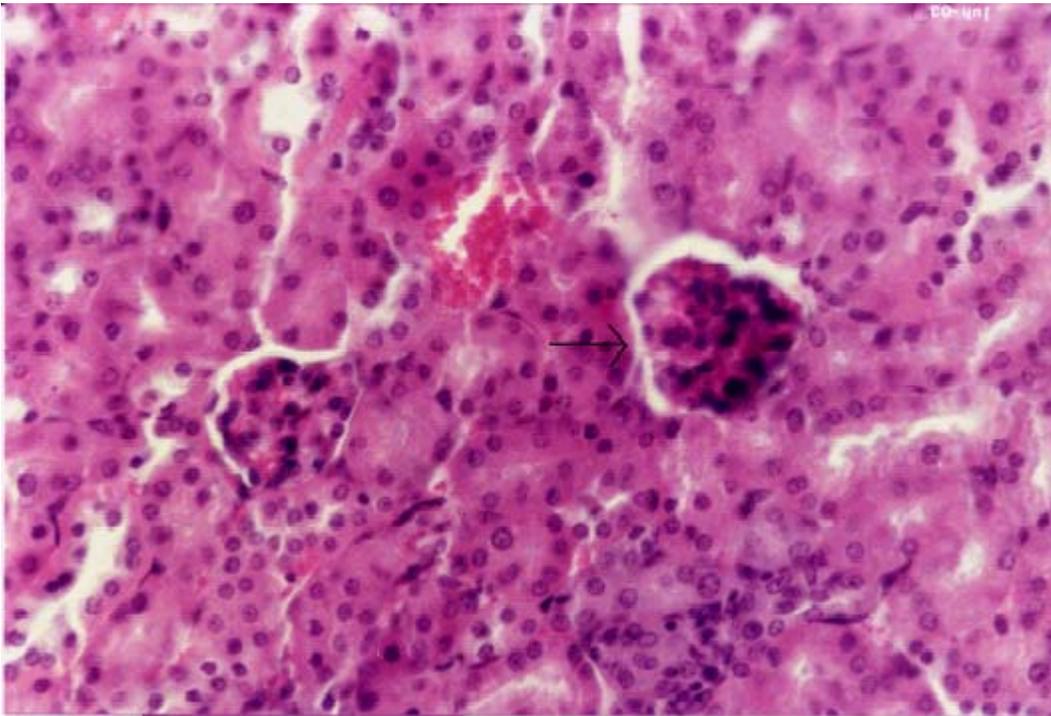
M2 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo BALB/c/Uni não infectado. Observar túbulos contorcidos proximais e distais normais. Coloração Hematoxilina-eosina (40x).



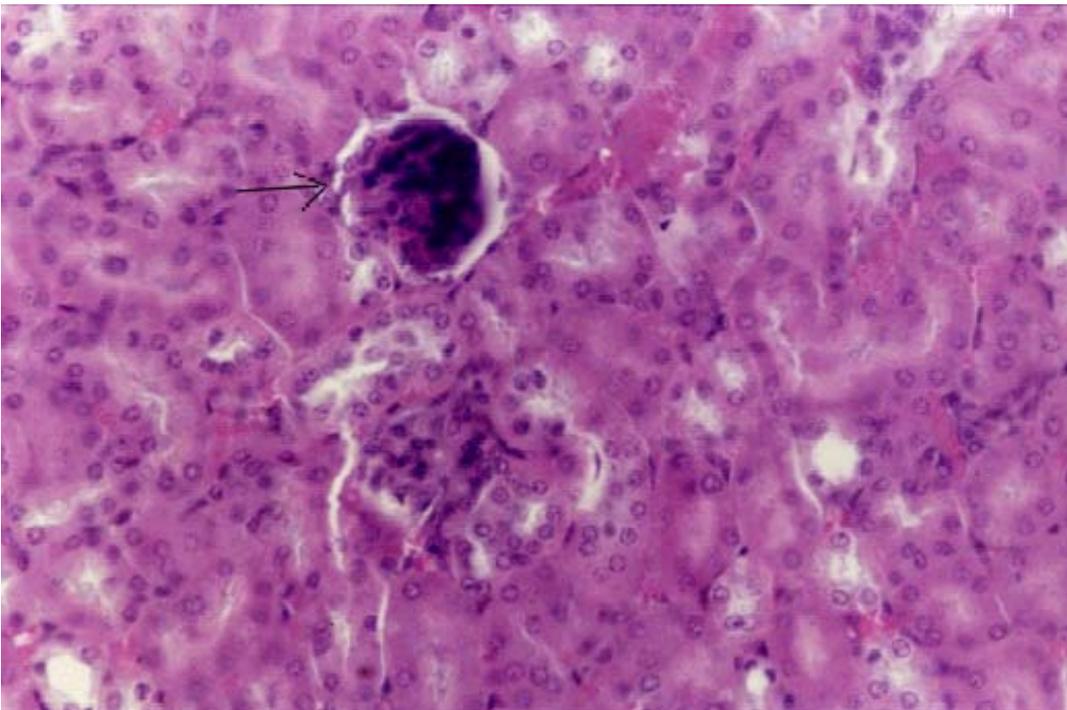
M3 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo C57BL/6/Uni não infectado. Observar glomérulo renal e túbulos contorcidos proximais e distais normais. Coloração Hematoxilina-eosina (40x).



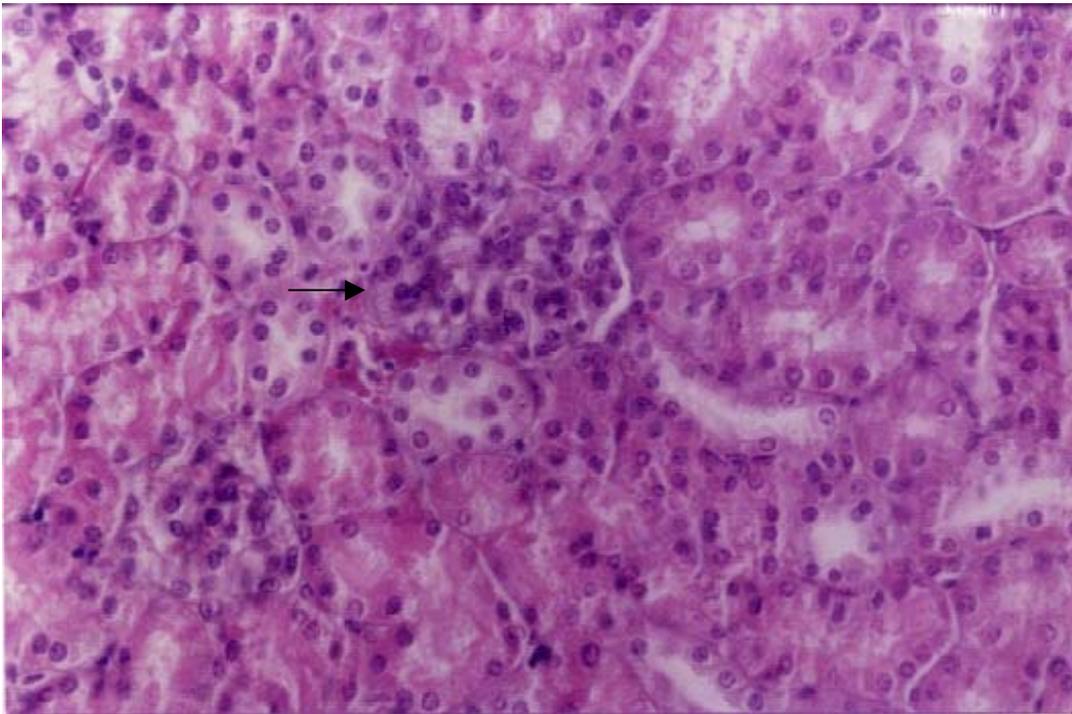
M4 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo SCID/Uni com 23 semanas de infecção. Observar glomérulo renal normal e necrose glomerular (seta). Coloração Hematoxilina-eosina (40x).



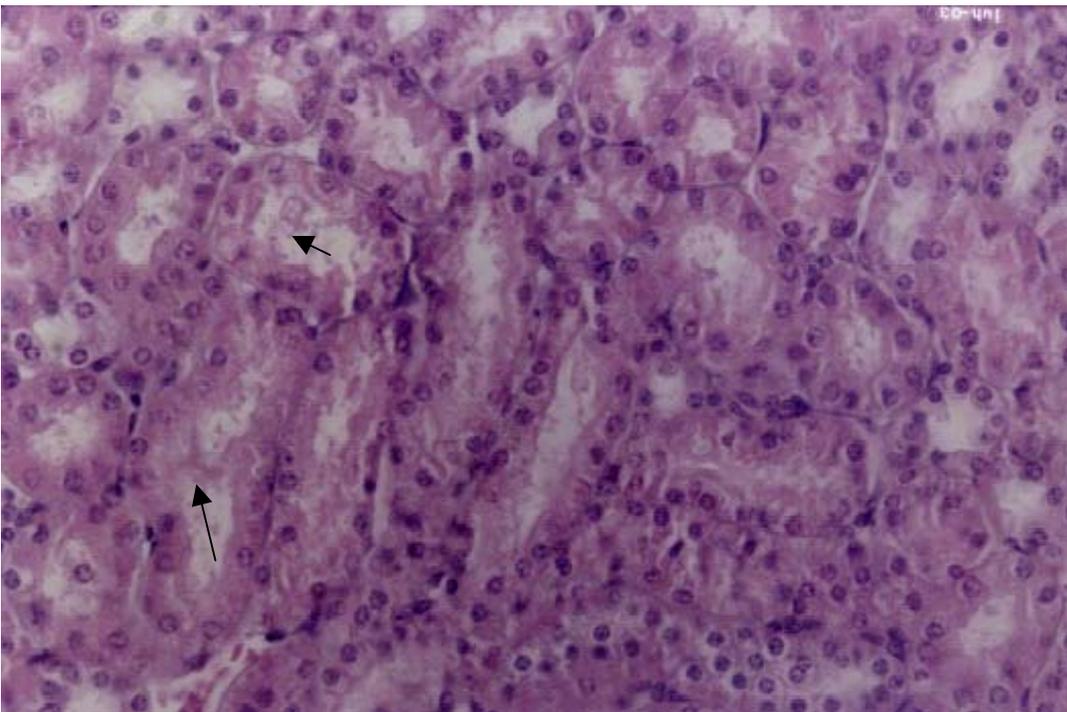
M5 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo SCID/Uni com 20 semanas de infecção. Observar glomérulo renal com trombose/necrose (seta). Coloração Hematoxilina-eosina (40x).



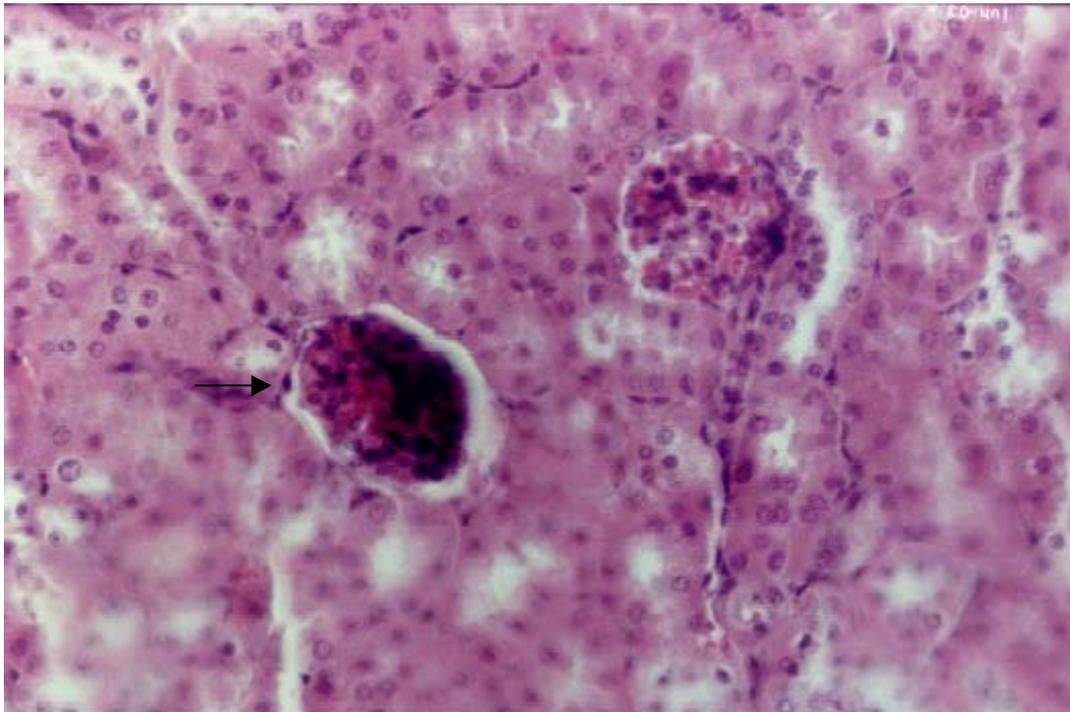
M6 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo SCID/Uni com 21 semanas de infecção. Observar necrose glomerular (seta). Coloração hematoxilina-eosina (40x).



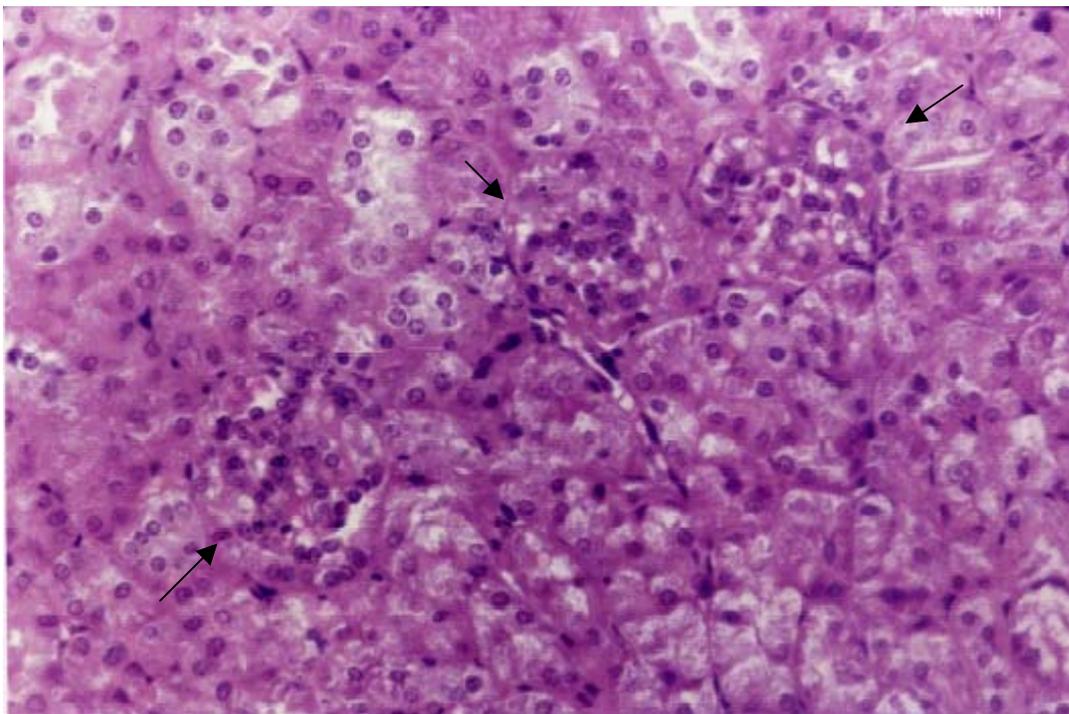
M7 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo SCID/Uni com 16 semanas de infecção. Observar edema glomerular (seta). Coloração hematoxilina-eosina (40x).



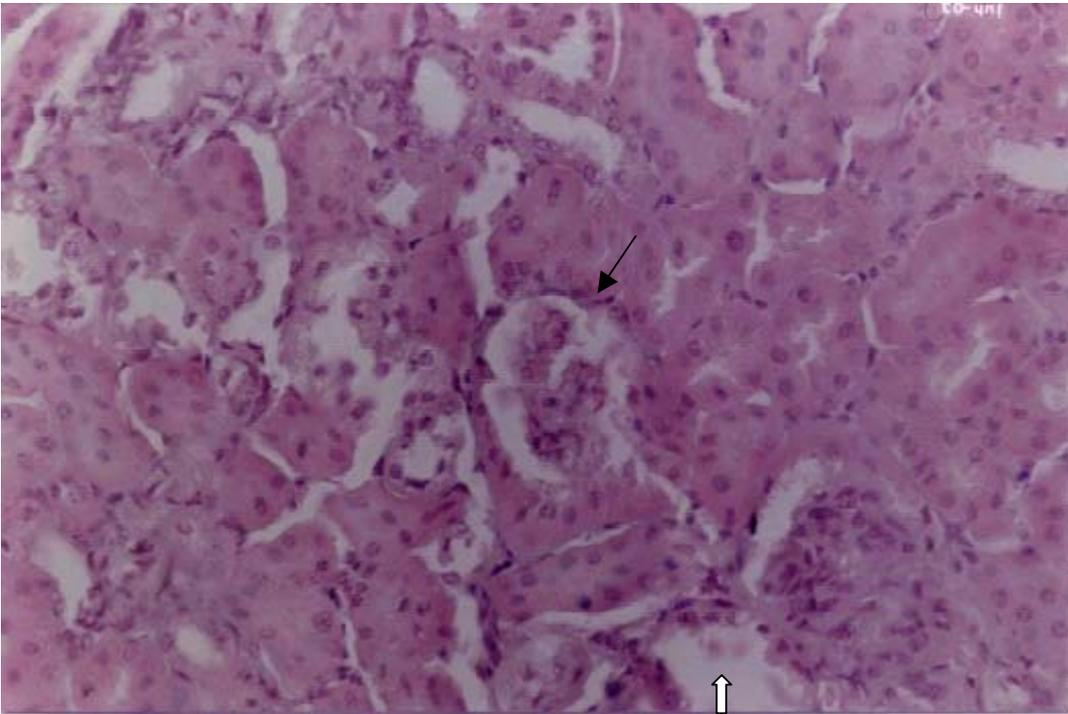
M8 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo SCID/Uni com 16 semanas de infecção. Observar edema de túbulos contorcidos proximais e distais e descamação de células tubulares (setas); as células tubulares apresentam vacuolizações. Coloração hematoxilina-eosina (40x).



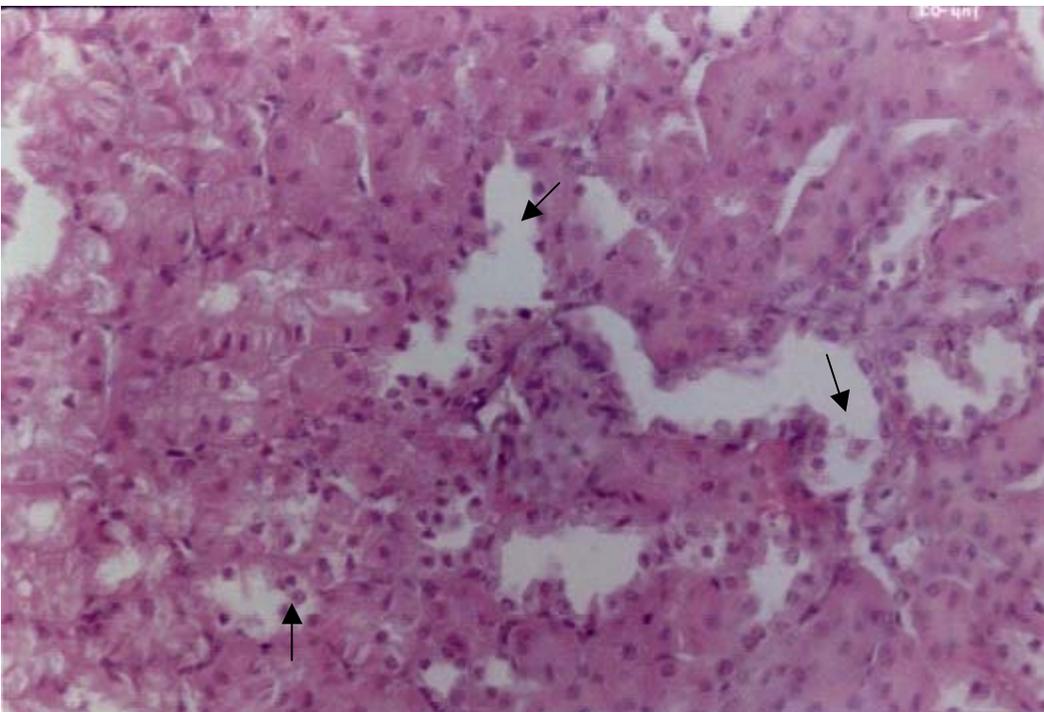
M9 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo C57BL/6 KO para interferon gama com 20 semanas de infecção. Observar trombose glomerular e trombose/necrose glomerular (seta). Coloração hematoxilina-eosina (40x).



M10 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo C57BL/6 KO para interferon gama com 23 semanas de infecção. Observar edema generalizado e desorganização tecidual: glomerulos (setas) se misturam com os túbulos renais; as células tubulares apresentam-se vacuolizadas. Coloração hematoxilina-eosina (40x).



M11 – Fotomicrografia de corte de rim de camundongo C57BL/6 com 65 semanas de infecção. Observar necrose glomerular (seta) e necrose tubular com descamação de células tubulares (seta branca). Coloração hematoxilina-eosina (40x).



M12 - Fotomicrografia de corte de rim de camundongo C57BL/6 com 65 semanas de infecção. Observar descamação de células tubulares (setas). Coloração hematoxilina-eosina (40x).

5. Discussão

O ambiente controlado – isoladores – onde são mantidos os animais SPF (Specific Pathogen Free) nos permitiu controlar os fatores externos evitando riscos de contaminação dos animais experimentais o que poderia influenciar e comprometer os resultados da pesquisa. Em se tratando de camundongos da linhagem C.B-17 SCID/SCID, o fato da colônia ser mantida em condições ambiente e sanitária controladas colabora para o nível baixo de animais com o fenótipo “leaky”. Os últimos levantamentos sorológicos detectaram o fenótipo “leaky” em 9% da colônia com idade de 40 semanas (Alves *et al* 2002). Camundongos SCID são desprovidos de resposta imune dependentes de linfócitos T e B. Desta maneira, são muito susceptíveis a patógenos oportunistas que podem ser bactérias: (*Proteus mirabilis*, *Streptococcus viridans* e *Escherichia coli*) e vírus (vírus da hepatite murina (MHV), vírus Sendai e vírus respiratório murino), e ainda o *Pneumocystis carinii*. (Percy & Barta 1993).

Um exemplo de co-infecção com *P. chabaudi* e a respectiva interferência no desempenho de resposta imune foi estudado por Yoshida *et al* (2000) onde constataram que camundongos A/J susceptíveis à malária, infectados com *P. chabaudi* e coinfectados com *Schistosoma mansoni* desenvolveram resistência ao *Plasmodium*. Os resultados desse estudo mostraram que, apesar de o *S. mansoni* na fase de oviposição induzir resposta Th2, dentro de certas circunstâncias, a coinfecção *Schistosoma/Plasmodium* promoveu resposta imune tipo Th1 no camundongo A/J, tornando-o resistente ao *Plasmodium*.

Células tipo Th1 são responsáveis por mediar o controle da parasitemia aguda através da ativação de mecanismos imune mediados por célula, enquanto que as células tipo Th2 mediam o crescimento e diferenciação de células B para controlar a infecção através de mecanismos dependentes de anticorpos (Yap *et al* 1994).

Zhang *et al* (2000) sugeriram em suas pesquisas que o hormônio sexual masculino modula a função das células Th1/Th2 na proteção imunológica contra infecção por *P. chabaudi* AS. Eles observaram que em dois grupos de

camundongos: machos deficientes de receptor para INF- γ e machos deficientes de receptor para IL-4, apresentaram alta mortalidade, sendo que estes resultados não foram observados em fêmeas. Esta diferença entre machos e fêmeas não foi observada quando camundongos machos foram castrados.

De acordo com a revisão de Fortin *et al* (2002), no modelo de infecção malárica com *P. chabaudi* AS, ocorre uma rápida proliferação do parasita durante os primeiros 6-8 dias, seguida por uma fase curativa, com respostas inflamatória, imune e eritropoiética, resultando na eliminação dos parasitas em 21-28 dias em animais resistentes (CBA, C57BL/6J, C57L, B10.A e DBA/2). Em camundongos susceptíveis (A/J, BALB/c, AKR, DBA/1, C3H/HeJ, SJL e 129/ICR), a replicação do parasita continua, conduzindo para morte do grupo em 10-13 dias.

Os modelos animais utilizados em nosso trabalho, SCID, KO para IFN- γ e BALB/c são considerados susceptíveis por Fortin *et al* (2002). Porém a cepa de *Plasmodium* utilizada, *P. chabaudi* CR, não é letal. Não foi possível observar o *clearance* do parasita mesmo observando a linhagem C57BL/6 com 65 semanas de infecção.

Meding & Langhorne (1991) reconstituíram camundongo SCID infectado com *P. chabaudi* com células T CD4⁺, mas sem células B e demonstrou a primeira fase da infecção prorrogada apenas com uma pequena redução na parasitemia, enquanto que camundongo SCID reconstituído com células T CD4⁺ juntamente com células B estabeleceu a imunidade máxima comparado com um camundongo normal. Neste experimento puderam comprovar que a imunidade em camundongo normal infectado por *P. chabaudi* acontece em duas etapas. Na primeira etapa ocorre um rápido aumento do número de parasitas seguido pelo rápido decréscimo da parasitemia nos primeiros 10 dias da infecção, e é constituída pela resposta imune predominante de células CD4⁺ tipo Th1. Na segunda etapa, que ocorre aproximadamente 18 dias após a infecção, a parasitemia é baixa e normalmente chega ao final com índice zero de parasitas após algumas semanas. Neste período há a predominância de células T CD4⁺ tipo Th2 e anticorpos IgG específicos estão presentes.

Skamene *et al* (1983) descreveram a inexistência de relação entre resistência na infecção com *Plasmodium chabaudi* e atividade de células NK. Em seu experimento mostraram que camundongo C57BL/6 bg/bg deficiente de célula NK obteve a resolução da infecção por *P. chabaudi* da mesma forma que o seu camundongo parental +/+.

Kitaguchi *et al* (1996) injetaram células NK de camundongo C57BL/6 infectado com *P. chabaudi* em outro camundongo que também seria infectado. Essa transferência não conferiu proteção, pois o curso desta infecção foi similar ao do camundongo controle. Entretanto, tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais anti-NK resultou no aumento da mortalidade. Concluíram então, que células NK podem não impedir o aumento da parasitemia, mas elas podem exibir um papel importante na recuperação da parasitemia, provavelmente por secretar INF- γ , e conseqüentemente diminuir a mortalidade em infecções por *P. chabaudi*.

Em nossos estudos, camundongo SCID contando como recurso de resposta imune apenas células NK, resistiram à infecção por *P. chabaudi* CR e sua parasitemia, apesar do alto pico alcançado, permaneceu estabilizada, sem eliminação do parasita. O camundongo KO para INF- γ atingiu níveis mais elevados de parasitemia quando comparado com seu controle C57BL/6 e também em relação ao modelo SCID. Não se observou mortalidade em KO e da mesma forma que ocorreu em SCID, a infecção permaneceu estabilizada, sem resolução.

O tratamento de camundongo susceptível A/J com IL-12 murina reduziu muito a parasitemia e melhorou a sobrevivência do hospedeiro. Essa proteção induzida por IL-12 é mediada por INF- γ e TNF- α secretados por células NK durante infecção inicial (Stevenson *et al* 1995; Mohan *et al* 1997). Além disso, foi observado que em camundongos deficientes de receptor para INF- γ (Balmer *et al* 2000; Favre *et al* 1997) e camundongo KO para INF- γ (Su & Stevenson 2000), infectados com *P. chabaudi* AS, ocorreu incapacidade para reduzir a parasitemia primária e alta mortalidade.

Camundongos KO para IL-12 (gene p 40) infectado com *P. chabaudi* AS, tiveram os níveis de INF- γ diminuídos bem como IgG2a e IgG3 Th1-dependente. Com esses resultados concluiu-se que a citocina IL-12 produzida na fase inicial do

estágio sangüíneo da infecção por *P. chabaudi* AS é importante para indução de resposta imune INF- γ -dependente tipo Th1 responsável pelo controle da fase aguda da infecção e sobrevivência do hospedeiro, influenciando fortemente a imunidade tipo Th2 mediada por anticorpo necessária para resolução da fase crônica (Su & Stevenson 2002).

Os resultados obtidos em animais KO para INF- γ corroboram os de Su & Stevenson (2000) no que se refere a incapacidade de reduzir a parasitemia. Por se tratar de linhagem distinta de *P. chabaudi*, a mortalidade observada em nossos animais KO foi zero.

Os dados de parasitemia foram coletados a cada sete dias até a 6^a semana. Após este período, devido ao estresse que os animais estavam sendo submetidos, optou-se por fazer as coletas para acompanhamento da parasitemia a cada 15 dias. Ainda assim, houveram determinadas semanas que tornou-se impossível a coleta de amostras. Portanto, nos gráficos de parasitemia individual (Apêndice C), as semanas que aparecem sem valores de parasitemia, são semanas em que não foram coletadas amostras.

Apesar da impossibilidade de visualização das lesões que podem ocorrer no período que antecede a morte dos camundongos BALB/c, foi possível constatar a precocidade das lesões (necrose) renais na quinta e sétima semana pós infecção.

A linhagem SCID, cuja única fonte de resposta imune é a célula NK, revelou-se extremamente susceptível ao *P. chabaudi* CR, com 25% de morte em 12 animais. Estes dados são compatíveis com a maior freqüência de lesões. Em consequência desta susceptibilidade, pôde-se observar em um camundongo SCID, grande edema macroscópico abdominal. Este animal foi sacrificado antes que sucumbisse à infecção, permitindo então, a evidência de hemorragia na cavidade peritoneal concomitante a hepatoesplenomegalia. Diante deste quadro, não se observou congestão ou trombose na histologia renal analisada (microfotografias M7 e M8).

As lesões apresentadas pela linhagem de camundongo KO para INF- γ revelam menor severidade do que as observadas em SCID.

Em C57BL/6 não se observou a parasitemia além das quatro semanas porquê trata-se de linhagem resistente ao *Plasmodium*. As alterações renais visualizadas nesta linhagem foram mínimas, provavelmente em função do genótipo resistente desses camundongos.

6. Conclusões

A avaliação da importância das células NK no controle de *Plasmodium chabaudi* CR nas linhagens imunocompetentes (BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni) e imunodeficientes (C.B17-SCID/SCID/Uni e C57BL/6 Knockout (KO) para interferon gama) evidenciou:

1. As células NK contribuem para a redução da parasitemia, possivelmente pela produção de interferon gama.

2. A linhagem do camundongo C. B17-SCID/SCID/Uni revelou-se extremamente susceptível ao *P. chabaudi* CR, induzindo 25% de mortalidade.

3. A infecção por *P. chabaudi* provocou alterações renais nas quatro linhagens de camundongos estudadas. Foram observadas as seguintes alterações histopatológicas: descamação das células tubulares, trombose e necrose glomerular.

4. As lesões renais foram mais frequentes em camundongos da linhagem SCID.

5. Camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6/Uni infectados pelo *P. chabaudi* apresentaram poucas alterações histopatológicas.

6. As lesões renais apresentadas pela linhagem KO para INF- γ revelaram menor severidade do que aquelas observadas em camundongos da linhagem SCID.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A K; LICHTMAN, A H; POBER, JORDANS. **Imunologia Celular e Molecular**. BJ: Revinter, p. 241-554, 1995.
- ALVES, D P; SAKURADA, J K; ZANFOLIN, M; SCARELLI, C A A; EDIVANIA, V; PASSOS, L A C; GIGLIOLI, R; GUARALDO, A M A. Leaky phenotype frequency among CB-17 SCID/Uni mice reared in plastic isolator. **Abstract P137 on 53 rd. AALAS National Meeting**. October 27-31, San Antônio – Texas (USA), p. 135, 2002.
- ANDRADE JR, H F; CORBETT, C E P; LAURENTI, M D; DUARTE, M I S. Comparative and sequential histopathology of *Plasmodium chabaudi*-infected BALB/c mice. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**. n. 24, p. 1209-1218, 1991.
- BALMER, P; ALEXANDER, J; PHILLIPS, R S. Protective immunity to erythrocytic *Plasmodium chabaudi* AS infection involves INF γ -mediated responses and a celular infiltrate to the liver. **Parasitology**,v. 121, p. 473-482, 2000.
- BOSMA, C G; CUSTER, R; BOSMA, M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**. v. 301, p. 527-530. 1983.
- BOSMA, G C; FRIED, M; CUSTER, R P; CARROL, A; GIBSON, D M; BOSMA, M J. Evidence of funcional lymphocytes in some (leaky) SCID mice. **Journal Exp Med**. v. 167, n.3, p. 1016-1033. Março, 1988.
- CARTER, R & DIGGS, C L. **Plasmodia of Rodents**. Parasitic Protozoa; v. 3, Academic Press, p. 359-465, 1977.
- FAVRE, N; RYFFEL, B; BORDMANN, G; RUDIN, W. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection interferon-gamma receptor deficient mice. **Parasite Immunology**, v.19, n. 8, p. 375-383, Agosto 1997.
- FORTIN, A; STEVENSON, M M; GROS, P. Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. **Genes and Immunity**. n. 3, p. 177-186, 2002.
- GARNICA, M R; SOUTO, J T; SILVA, J S; JR, H F A. Stromaal cell deved factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1 α and CXCR4 receptor blocker. **Immunology Letters**, v. 83, n.1, p. 47-53, Agosto 2002.
- KILLICK-KENDRICK, R & PETERS, W. **Rodent Malaria**. Academic Press, 1978.

- KITAGUSHE, T; NAGOYA, M; AMANO, T; SUZUKI, M; MINAMI, M. Analysis of roles of natural killer cells in defense against *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. **Parasitology Research**. n. 82, p. 352-357, 1996.
- KREIER, J P. **Malaria, Pathology, Vector studies and Culture**. v. 2, Academic Press, 1980.
- LANGHORNE, J; CROSS, C; SEIXAS, E; LI, C; VON DER WEID, T. A role for cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Immunology**, v.95, p.1730-1734, 1998.
- LINKE, A; KÜHN, R; MÜLLER, W; HONARVAR, N; LI, C; LANGHORNE, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi*: differential susceptibility of gene-targeted deficient in IL-10 to anaerythrocytic-stage infection. **Experimental Parasitology**, v.84, n.0111, p. 253-263, 1996.
- MEDING, S J & LANGHORNE, J. CD4⁺ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Europe Journal Immunology**. n. 21, p. 1433-1438, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE: GOVERNO DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em 24 junho 2003.
- MOHAN, K; MOULIN, P; STEVENSON, M M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **The Journal of Immunology**, v.159, n. 10, p. 4990-4998, Novembro 1997.
- MOHAN, K; SAM, H; STEVENSON, M M. Therapy with a combination of low doses of Interleukin 12 and chloroquine completely cures blood-stage malaria, prevents severe anemia, and induces immunity to reinfection. **Infection and Immunity**, v.67, n.2, p. 513-519, Fevereiro. 1999.
- MOTA, M M; BROWN, K N; HOLDER, A A; JARRA, W. Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies wich bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4080-4086. Setembro 1998.
- MUSOKE, A J ; COX, H W; WILLIAMS, J F. Experimental infection with *Plasmodium chabaudi* in rats: antigen and antibody associated with anemia and glomerulonephritis of acute infection. **The Journal of Parasitology**. v. 63, n. 6, p. 1081-1088, Dezembro, 1977.

- PERCY, D H & BATA, J R. Spontaneous and experimental infections in SCID and SCID/beige mice. **Laboratory Animal Science**. v. 43, n. 2, p. 127-132, Abril, 1993.
- PHILLIPS, R S; BRANNAN, L R; BALMER, P; NEUVILLE, P. Antigenic variation during malaria infection – the contribution from the murine parasite *Plasmodium chabaudi*. **Parasite Immunology**, v. 19, p. 427-434, 1997.
- PHILLIPS, R S; MATHERS, K E; TAYLOR-ROBINSON, A W. T cells in immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*: operation and regulation of different pathways of protection. **Resource Immunology**. v. 145, n. 6, p. 406-412, 1994.
- PODOBA, J E; STEVENSON, M M. CD4+ and CD8+ T Lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Infection and Immunity**, v. 59, n.1, p. 51-58, Janeiro 1991.
- SAS INSTITUTE, INC. 1987. S. A. S. User's Guide: Statistics, 6^a ed., Cary, N. C.
- ROLL BACK MALARIA, WORLD HEALTH ORGANIZATION. (RBM – OMS). Disponível em: http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1.htm. Acesso em 24 de junho de 2003.
- SCOTT, P. TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current opinion in Immunology**, v. 7, p. 34-40, 1995.
- SEIXAS, E; CROSS, C; QUIN, S; LANGHORNE, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Europe Journal Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2970-2978, Outubro 2001.
- SINDEN, RE. Excystment by sporozoites of malaria parasites. *Nature*, v. 252, p. 314, 1974.
- SKAMENE, E; STEVENSON, M M; LEMIEUX, S. Murine malaria: dissociation of natural killer (NK) cell activity and resistance to *Plasmodium chabaudi*. **Parasite Immunology**, v. 5, p. 557-565, Abril 1983.
- STEVENSON, M M; TAM, M; WOLF, S F; SHER, A. IL-12-Induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires INF- γ and INF- α and occurs via a Nitric Oxide-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, n. 155, p. 2545-2556, 1995.
- SU, Z & STEVENSON, MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4399-4406, Agosto, 2000.

- SU, Z; STEVENSON, M M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 168, n.3, p. 1348-1355, Fevereiro 2002.
- U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Centers of Disease Control and Prevention**. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dpdx/HTML/Malaria.htm>. Acesso em 19 setembro 2002.
- VUONG, P N; RICHARD, F; SNOUNOU, G; COQUELIN, F; RÉNIA, L; GONNET, F; CHABAUD, A G; LANDAU, I. Development of irreversible lesions in the brain, heart and kidney following acute and chronic murine malaria infection. **Parasitology**, n. 119, p. 543-553, 1999.
- YAP, G S; JACOBS, P; STEVENSON, M M. Th cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Resource Immunology**, v.145, n.6, p. 419-422, 1994.
- YOSHIDA, A; MARUYAMA, H; KUMAGAL, T; AMANO, T; KOBAYASHI, F; ZHANG, M; HIMENO, K; OHTA, N. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. **International Immunology**, v. 12, n. 8, p. 117-1125, 2000.
- ZHANG, Z; CHEN, L; SAITO, S; KANAGAWA, O; SENDO, F. Possible modulation by male Sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. **Experimental Parasitology**, n. 96, p. 121-129, 2000.

APÊNDICE A

ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PARASITEMIA DURANTE AS SEIS PRIMEIRAS SEMANAS DE INFECÇÃO NOS GRUPOS DE ANIMAIS BALB/c/UNI, C.B-17 SCID/SCID/UNI E KO PARA INF- γ

The GLM Procedure

Class	Level	Information
Class	Levels	Values
grupo	3	BALB KO SCID

Number of observations 12

The GLM Procedure

Repeated Measures Analysis of Variance

Repeated Measures Level Information

Dependent Variable	X1	X2	X3	X4	X5
Level of time	1	2	3	4	5

Repeated Measures
Level Information

Dependent Variable	X6
Level of time	6

Manova Test Criteria and Exact F Statistics for the Hypothesis of no time Effect

H = Type III SSCP Matrix for time

E = Error SSCP Matrix

S=1 M=1.5 N=1.5

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.06451770	14.50	5	5	0.0054
Pillai's Trace	0.93548230	14.50	5	5	0.0054
Hotelling-Lawley Trace	14.49962327	14.50	5	5	0.0054
Roy's Greatest Root	14.49962327	14.50	5	5	0.0054

Manova Test Criteria and F Approximations for the Hypothesis of no time*grupo Effect

H = Type III SSCP Matrix for time*grupo

E = Error SSCP Matrix

S=2 M=1 N=1.5

Statistic	Value	F Value	Num DF	Den DF	Pr > F
Wilks' Lambda	0.05613679	3.22	10	10	0.0394
Pillai's Trace	1.51105690	3.71	10	12	0.0177
Hotelling-Lawley Trace	6.70985105	3.22	10	5.3333	0.0963
Roy's Greatest Root	4.42812041	5.31	5	6	0.0328

NOTE: F Statistic for Roy's Greatest Root is an upper bound.

NOTE: F Statistic for Wilks' Lambda is exact.

The GLM Procedure

Repeated Measures Analysis of Variance

Tests of Hypotheses for Between Subjects Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
grupo	2	746.001169	373.000585	0.66
Error	9	5068.289579	563.143287	

Source	Pr > F
grupo	0.5391
Error	

The GLM Procedure

Repeated Measures Analysis of Variance

Univariate Tests of Hypotheses for Within Subject Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
time	5	11932.80972	2386.56194	13.03
time*grupo	10	11530.70591	1153.07059	6.29
Error(time)	45	8244.30345	183.20674	

Source	Pr > F	G - G	H - F
time	<.0001	0.0001	<.0001
time*grupo	<.0001	0.0014	<.0001
Error(time)			

Greenhouse-Geisser Epsilon	0.4533
Huynh-Feldt Epsilon	0.7485

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for X1

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	303.815

Number of Means	2	3
Critical Range	27.88	29.10

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	52.39	4	BALB
A			
B A	39.45	4	SCID
B			
B	13.73	4	KO

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for X2

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	148.4731

Number of Means	2	3
Critical Range	19.49	20.34

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	59.280	4	KO
A			
A	53.040	4	BALB
A			
A	40.540	4	SCID

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for X3

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	226.2497

Number of Means	2	3
Critical Range	24.06	25.11

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	62.80	4	KO
A			
A	56.72	4	BALB
A			
A	52.91	4	SCID

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for X4

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	251.6805

Number of Means	2	3
Critical Range	25.38	26.49

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	67.84	4	KO
A			
A	61.85	4	SCID
A			
A	55.56	4	BALB

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for X5

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	178.4449

Number of Means	2	3
Critical Range	21.37	22.30

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	76.960	4	KO
A			
A	69.640	4	BALB
A			
A	59.773	4	SCID

The GLM Procedure
Duncan's Multiple Range Test for X6

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

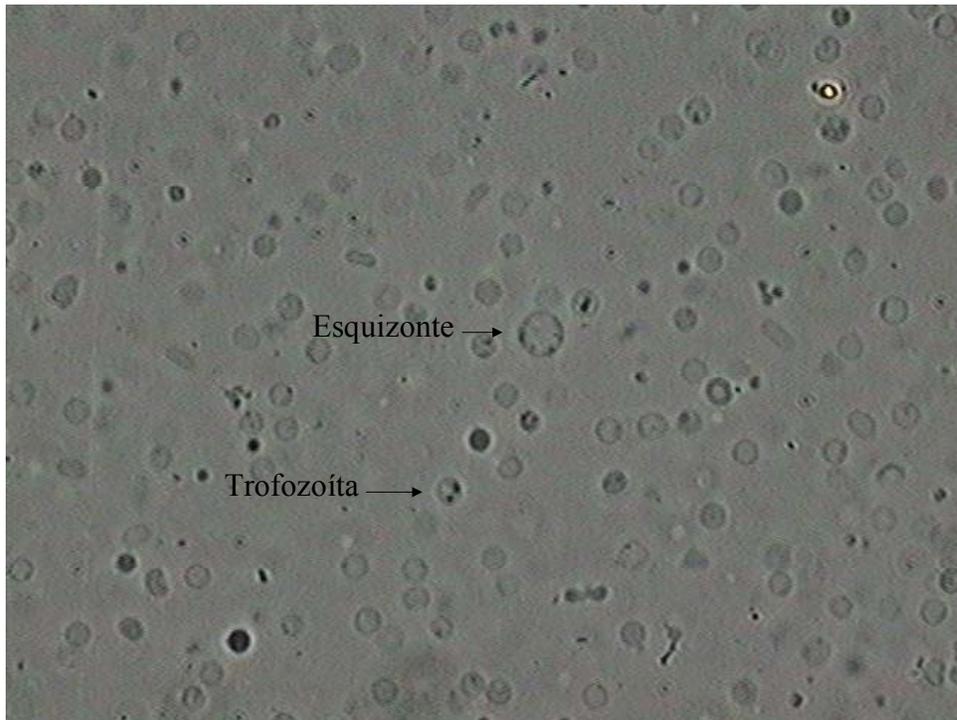
Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	370.5139

Number of Means	2	3
Critical Range	30.79	32.14

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	grupo
A	93.84	4	KO
A			
A	91.43	4	SCID
B	40.16	4	BALB

APÊNDICE B

Figura 4 – Formas evolutivas do *Plasmodium chabaudi chabaudi* à frescoTrofozoítas e esquizontes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* em microscopia de fase.

APÊNDICE C

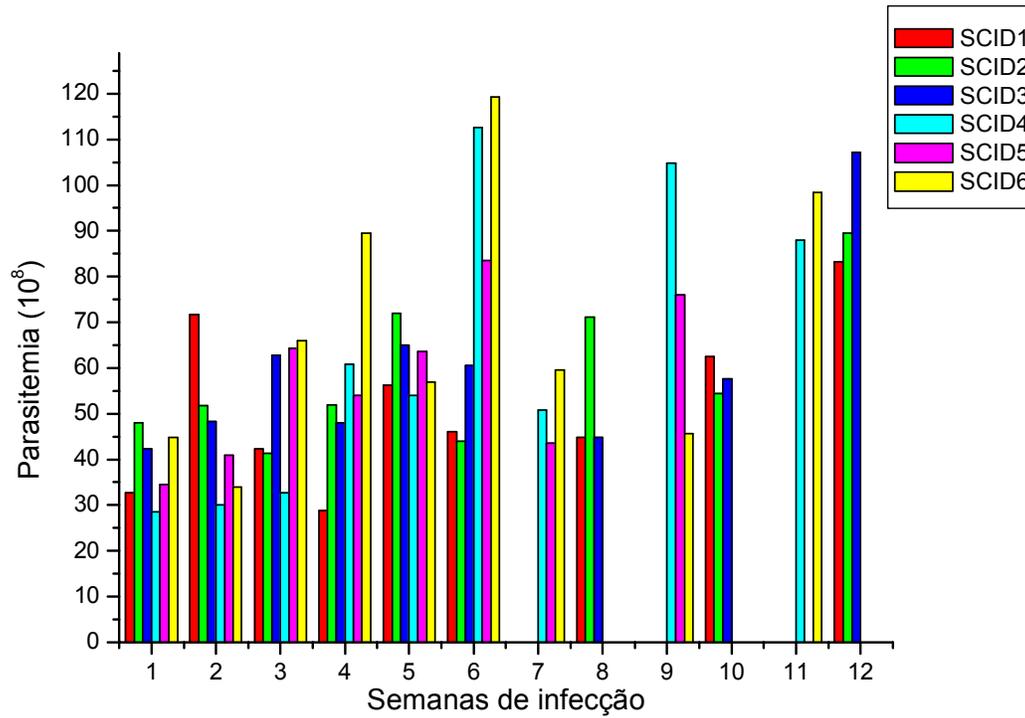


Figura 5 – Evolução da parasitemia em camundongos C.B-17 SCID/SCID infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

Obs.: SCID 5 – morte na 10^a semana;

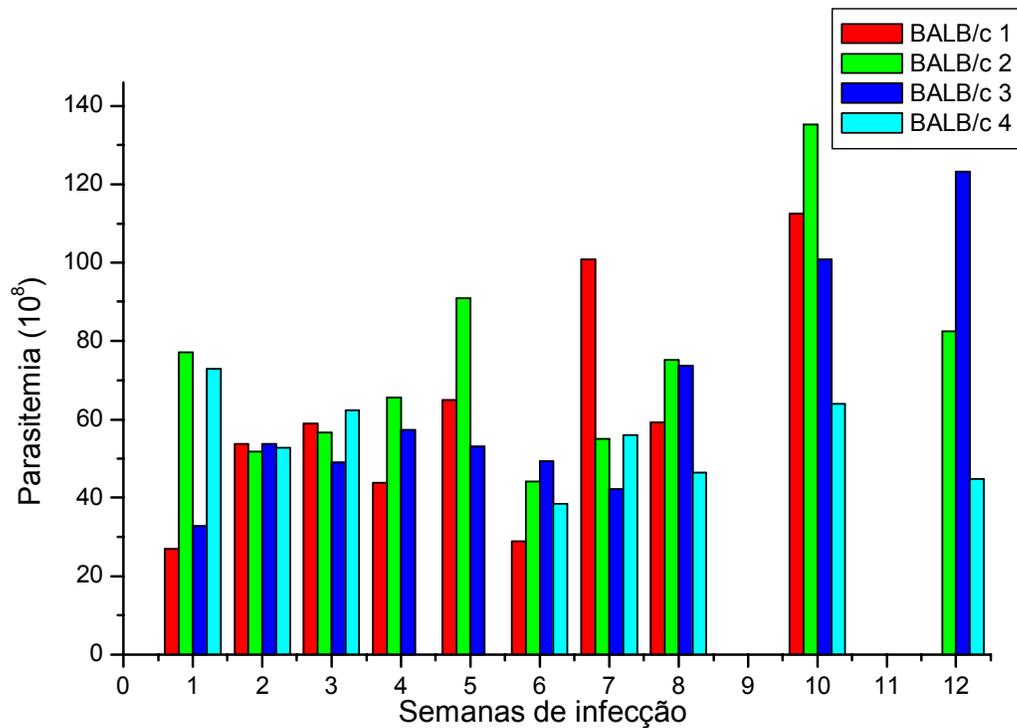


Figura 6 – Evolução da parasitemia em camundongos BALB/c/Uni infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

Obs.: BALB/c 1 – morte na 11^a semana;

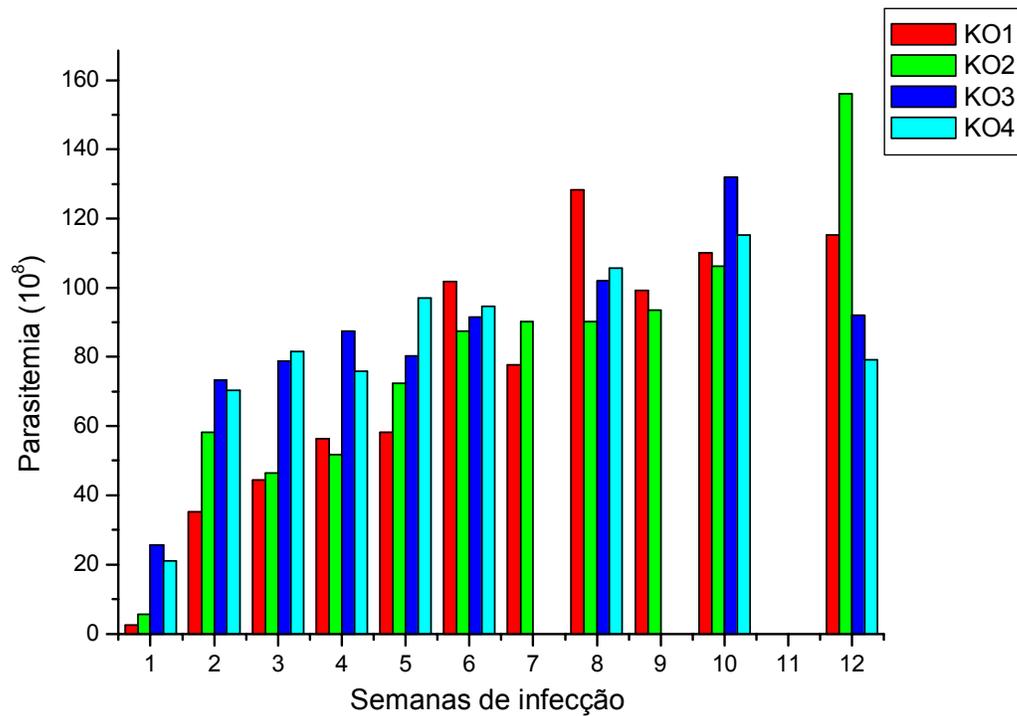


Figura 7 – Evolução da parasitemia em camundongos C57BL/6 KO para interferon gama infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

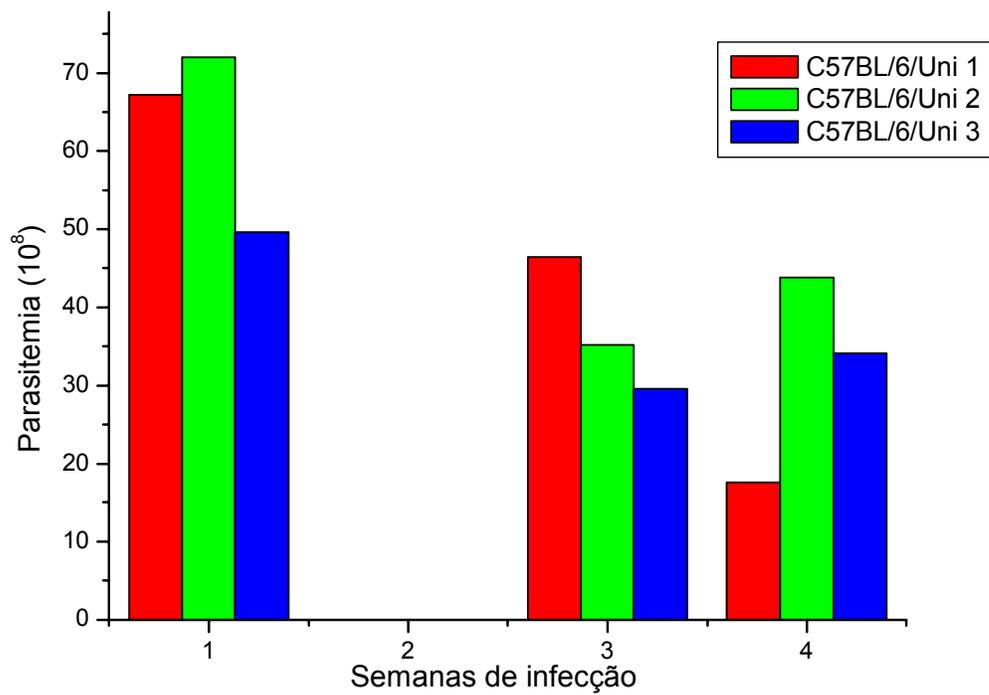


Figura 8 – Evolução da parasitemia em camundongos C57BL/6/Uni infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR).

