

UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA



DANIELA RODRIGUEZ DE ASSIS MACHADO

Malária experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR em camundongo NOD/Uni ("Non-obese diabetic")

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Daniela Rodriguez de Assis Machado e aprovada pela Comissão Julgadora. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Parasitologia.

Orientadora: Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Campinas
Fevereiro 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M18m	<p>Machado, Daniela Rodriguez de Assis Malária experimental por Plasmodium chabaudi linhagem CR em camundongo NOD/Uni ("Non-obese diabetic") / Daniela Rodriguez de Assis Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Malária. 2. Diabetes. 3. Camundongo. 4. Plasmodium. I. Guaraldo, Ana Maria Aparecida. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------------	--

Título em inglês: Plasmodium chabaudi CR in Non-Obese Diabetic (NOD) mice.

Palavras-chave em inglês: Malaria; Diabetes; Mice; Plasmodium.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo, Ingrid Dragan Taricano, Selma Giorgio.


Data da defesa: 20/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 20 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Ana Maria Aparecida Guaraldo


Assinatura

Prof(a) Dr(a). Selma Giorgio


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Ingrid Dragan Taricano


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Francesco Langone

Assinatura

Dedico esse trabalho a Maria del Carmen, minha mãe.

Agradecimentos

Ao meu pai Tirso e à minha mãe Maria del Carmen.

Às minhas queridas irmãs Marta, Fernanda e Juliana.

Ao meu cunhado Fábio K. Andrade.

Às minhas queridas amigas-irmãs Mi e Silvia pelo apoio e amizade nesses 10 anos de UNICAMP

Aos meus “irmãos postiços” David Michael Delgado e Fábio Tozi.

À CNPq pela bolsa de estudos.

A Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo.

Aos professores e às professoras do Departamento de Parasitologia.

Às professoras Dra. Marlene Tiduko Ueta e Dra. Silmara Marques Allegretti.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal.

Aos queridos funcionários do Departamento de Parasitologia, em especial os técnicos Ivo e João pelo apoio, dedicação e amizade.

Ao biólogo Dr. Rubens Riscalá Madi (bendito entre as mulheres) pela ajuda e disponibilidade sempre.

Às meninas do L3: Tarsila, Bel, Michelle, Luciana, Tamy, Julia, Claudineide.

A Helenzinha pela amizade e apoio.

Ao meu querido amigo (e biólogo preferido) Sandro M. Nascimento.

Às queridas amigas biólogas Aida Gamal e Priscila Brígite.

Aos meus queridos e fiéis companheiros Hermeto P. Habbib e Ricota.

E, principalmente (e especialmente) ao Alexandre Natalio Ribeiro (Lelezinho meu amor!) pela ajuda e paciência sempre!

Resumo

A malária é uma parasitose que mata mais de um milhão de pessoas por ano. No Brasil, 99% dos casos ocorrem na Amazônia Legal. O *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR, não letal, representa a malária experimental de autocontrole. A hipoglicemia é uma característica comum da malária causada pelo *P. falciparum* e também está presente na malária murina. O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune órgão-específica que tem como consequência a destruição das células β produtoras de insulina, nas ilhotas de Langerhans. Alguns trabalhos observaram que a infecção de camundongos com o estágio sangüíneo de *P. chabaudi* induziu uma hipoglicemia em camundongos normais e normalizou a hiperglicemia em camundongos moderadamente diabéticos por indução pela streptozotocina (STZ). No camundongo NOD (“non-obese diabetic”), o diabetes é determinado geneticamente e simula o desenvolvimento do diabetes tipo 1. O presente trabalho se propõe avaliar a influência do diabetes mellitus tipo 1 na infecção experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi*, linhagem CR, em camundongos fêmeos NOD/Uni, com diferentes graus de diabetes (diabetes moderada e diabetes severa). Camundongos fêmeos livres de patógenos específicos (SPF) da linhagem NOD/Uni com oito a 42 semanas de idade foram infectados via intraperitoneal com 1×10^7 eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR. A glicemia foi determinada pela deposição de sangue coletado diretamente da cauda do animal em fita reativa do aparelho Roche Accu-Chek Active® em dias alternados. A parasitemia foi expressa em porcentagem de hemácias parasitadas mediante observação de esfregaço sangüíneo corado com May-Grünwald e Giemsa. Os camundongos NOD/Uni foram classificados segundo o grau de diabetes em moderada (300 a 500 mg/dL) e severa (>500 mg/dL). Foi observada redução da glicemia a partir do quinto dia de infecção nos camundongos NOD/Uni, em geral no pico da infecção. Esta redução não ocorreu nos camundongos NOD/Uni sem infecção e nos camundongos da linhagem

BALB/c/Uni infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR. As principais lesões renais observadas foram edema, necrose e infiltração glomerular, descamação e dilatação dos túbulos contorcidos e espessamento da membrana basal glomerular. Os camundongos da linhagem NOD/Uni infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR apresentaram maior sobrevida em relação aos camundongos sem infecção. A redução da glicemia parece estar relacionada a diversos fatores dentre eles, a influência das proteínas de membrana GPIs (glycosylphosphatidylinositols) e o equilíbrio entre a resposta dos linfócitos Th1/Th2.

Abstract

***Plasmodium chabaudi chabaudi* CR in Non-Obese Diabetic (NOD) mice**

Malaria is a parasitic disease that kills more than one million people worldwide each year. In Brazil, the 99% of the cases occur in the northern States that encompass the Amazon Basin. *Plasmodium chabaudi chabaudi* is an important experimental model for several aspects of malaria research, including parasite biology and immunology. It is recognized as a developmental analog to human infection by *Plasmodium falciparum*. The non-lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR strain represents the experimental autocontrol disease. Hypoglycemia is a common symptom of *P. falciparum* malaria and also occurs in murine malaria. The Type 1 diabetes is an organ-specific autoimmune disease that destroys the insulin-producing β cells of the Islets of Langerhans. In non-obese diabetic (NOD) mice, diabetes is genetically determined and also develops type 1 diabetes. The present work evaluated type 1 diabetes mellitus during experimental infection by *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR strain in female NOD mice with moderate and severe diabetes. Eight to 42 week-old female specific pathogens free (SPF) NOD/Uni mice were inoculated with red blood cells parasitized sample containing the total of 1×10^7 *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR by intraperitoneal injection. Routine measurement of blood glucose in NOD/Uni mice was performed every other day for 11 days post-infection. Glycemia was quantified using Roche Accu-Chek Active kits with blood collected from the tail of each animal. The parasitemia was expressed as percent of infected erythrocytes counted by microscopy analysis of tail blood films stained with Giemsa. The animals were classified according to their degree of diabetes into two groups: moderate diabetes (300 to 500 mg/dL) and severe diabetes (>500 mg/dL). The control group was composed of animals of the BALB/c/Uni strain. The natural death of NOD/Uni mice was recorded for both infected and healthy animals. Glycemia decreased at the

height of parasitemia around the fifth day of infection. The diabetic infected animals presented higher survival after the onset of diabetes when compared with non-infected control. The main renal lesions found were glomerular edema, glomerular necrosis, cell infiltration, tubular atrophy and expansion of the glomerular basement membrane. The decrease of blood glycemia remains incompletely understood and it seems to be related to GPIs (glycosylphosphatidylinositols) proteins and the balance between Th1/Th2 responses.

Índice

1. Introdução	11
1.1. Malária	11
1.2. Modelos experimentais da malária em roedores	14
1.3. O diabetes mellitus tipo 1 na população humana	16
1.4. O diabetes em camundongo NOD (“Non-Obese Diabetic”)	18
2. Objetivo	21
2.1. Objetivos específicos	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Animais	22
3.2. Grupos experimentais	23
3.3. Determinação da glicemia	24
3.4. Infecção dos camundongos	24
3.5. Determinação da parasitemia	25
3.6. Avaliação histopatológica	26
3.7. Captura de imagens	27
3.8. Avaliação da membrana basal glomerular	27
3.9. Mortalidade	28
3.10. Análise estatística	28
4. Resultados	29
4.1. Glicemia	29
4.2. Parasitemia	34
4.3. Avaliação histopatológica	37
4.4. Mortalidade	48
5. Discussão	49
5.1. Histopatologia renal	51
5.2. Mortalidade	55
6. Conclusão	58
7. Referências	59

1. Introdução

1.1. Malária

A malária é a doença parasitária de maior prevalência mundial. Estima-se que 300-500 milhões de pessoas adoeçam por ano, principalmente na África Subsaariana (90% dos casos), Sudeste Asiático e Amazônia (SILVEIRA; RESENDE, 2001).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 40% da população mundial está sob o risco de infecção e pelo menos um milhão de pessoas morrem anualmente em decorrência da malária, especialmente crianças e mulheres grávidas (WHO, 2007).

No Brasil, a malária está concentrada nos estados da Bacia Amazônica, com mais de 99% dos casos registrados. A doença afeta principalmente populações vivendo em condições insatisfatórias de habitação e trabalho. Tais populações estão relacionadas à ocupação desordenada de terras, à exploração de minérios e aos movimentos migratórios (SILVEIRA; RESENDE, 2001). No entanto é importante ressaltar a ocorrência de casos autóctones no Estado de São Paulo. Estes, porém representam somente 2,8% do total de casos de malária no estado, e são causados majoritariamente pelo *Plasmodium vivax*. A presença destes casos é notada principalmente em duas áreas bastante distintas, na região costeira coberta pela Mata Atlântica e no Planalto Paulista (WANDERLEY et al., 2006).

O *Plasmodium*, protozoário pertencente à família Plasmodiidae, apresenta quase 100 espécies descritas. Em humanos, os agentes etiológicos da malária são: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium falciparum*.

Os transmissores de malária em mamíferos são insetos fêmeos da ordem Diptera, da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. No Brasil, as principais espécies vetoras são: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, *Anopheles (Kerteszia) cruzi* e *Anopheles (Kerteszia) bellator*.

Durante o repasto sanguíneo o inseto inocula os esporozoítos, que em questão de minutos alcançam o fígado (fase pré-eritrocítica) e, nos hepatócitos, começam a se multiplicar, transformando-se em esquizontes (ASHLEY et al., 2006).

Centenas de merozoítos (aproximadamente 32 por esquizonte) são liberadas na corrente sanguínea e rapidamente penetram nas células vermelhas (fase eritrocítica). O tempo para a liberação dos merozoítos no sangue varia geralmente de uma a duas semanas (ASHLEY et al., 2006).

Os trofozoítos se transformam em esquizontes cuja ruptura libera novos merozoítos que irão invadir outros eritrócitos causando febre. Este ciclo assexuado de invasão das células vermelhas pelos merozoítos até a ruptura do esquizonte leva 48 horas na malária causada pelos *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas no caso do *P. malariae* (ASHLEY et al., 2006).

A sintomatologia, na malária, varia de acordo com a espécie e cepa do plasmódio. A destruição das hemácias é um dos aspectos importantes da patologia malárica tendendo a levar o paciente a certo grau de anemia. Em infecções causadas pelo *Plasmodium falciparum* observa-se uma profunda e severa anemia podendo levar a óbito (MENENDEZ et al., 2000).

A causa da anemia na malária é multifatorial, a destruição direta das hemácias e a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos não parasitados são apontadas como os principais fatores (ELASED et al., 1996). Porém, as complicações clínicas causadas pelo *Plasmodium* não estão restritas a distúrbios hematológicos. Além da anemia, a infecção pela malária pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo órgãos como cérebro, pulmões, rins e baço (CHANG; STEVENSON, 2004).

A malária tem sido uma das principais causas que leva à falência renal aguda no Sudeste Asiático, Península Indiana e África. Também é responsável por uma proporção significativa de doença glomerular crônica, principalmente em crianças africanas. Três complicações renais podem ser encontradas na malária causada pelo *P. falciparum*: necrose tubular aguda, nefrite intersticial aguda e glomerulonefrite (BARSOUM, 1998).

As mudanças patológicas nos rins de pacientes com malária por *P. falciparum* dependem do estágio da doença e da severidade da infecção. Um estudo realizado na Índia (Banaras Hindu University) entre janeiro de 1995 e dezembro de 2000 associou 93 casos de deficiência renal aguda à malária grave, sendo 79,6% provocados por *P. falciparum*, 20,4% por *P. vivax* e 3,2% infecção mista (PRAKASH et al., 2003).

O mecanismo patogênico dominante é a isquemia renal, provocada pela obstrução de capilares e vênulas pós-capilares por eritrócitos infectados e ativação de monócitos que liberam citocinas, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon-gama (INF- γ), resultando em necrose tubular aguda (DUVIC et al., 2000).

Spitz (1946) (apud NGUANSANGIAM et al., 2007), Kibukamusoke e Hutt (1967) e Bhamarapravati (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.

Outra manifestação importante da infecção pelo *Plasmodium* são os distúrbios metabólicos, mais freqüentes na malária severa (DAVIS et al., 1993). A hipoglicemia é uma característica comum da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e parece estar relacionada à mortalidade, em diversas partes do mundo, especialmente em crianças e mulheres grávidas, sua causa, porém ainda não está completamente elucidada (WHO, 1990).

1.2. Modelos experimentais da malária em roedores

Atualmente são reconhecidas quatro espécies distintas de *Plasmodium* de roedores: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi*. Cada uma, com exceção do *Plasmodium berghei*, representadas por duas ou mais subespécies (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 diferenças entre os dois grupos são avaliadas em múltiplos aspectos, incluindo a morfologia dos parasitos no estágio sangüíneo, padrão de proteção cruzada, sorologia e polimorfismo enzimático (CARTER; DIGGS, 1977).

O modelo de malária murina mais utilizado é o *Plasmodium berghei* cujas mudanças histopatológicas encontradas na maioria dos órgãos são similares às causadas pela infecção humana pelo *Plasmodium falciparum*. Entretanto, esse modelo não simula todos os aspectos da infecção causada pelo *Plasmodium falciparum* ou a infecção não letal causada por outras espécies de *Plasmodium* (ANDRADE JUNIOR et. al., 1991).

A virulência e outras características da infecção pelo *Plasmodium chabaudi* são variáveis, depende da cepa do parasito e também da constituição genética do hospedeiro (CARTER; DIGGS, 1977).

A infecção causada pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* é um importante modelo de pesquisa para diversos aspectos, tanto biológico quanto imunológico, da malária. O *P. chabaudi chabaudi* é reconhecido como um modelo que simula a infecção humana não letal causada pelo *Plasmodium falciparum* devido à ausência das complicações cerebrais (TAYLOR-ROBINSON, 1996).

A resposta imune no estágio eritrocítico da infecção pelo *Plasmodium* tem sido cada vez melhor estudada através da espécie *Plasmodium chabaudi chabaudi*. Nesta espécie a resposta inicial ocorre pela ativação de células efectoras

dependentes de CD4⁺ Th1. Esta fase é seguida por resposta Th2 em que o controle final do parasito ocorre pela estimulação de mecanismos imune dependente de anticorpos (HELMBY et. al., 2000).

A cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR, não letal representa a malária experimental de autocontrole, apropriada para estudo das lesões histopatológicas na fase crônica (MOTTA, 2003).

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

Houba (1979) confirma a importância de imunocomplexos na patogênese de nefropatia associada à malária. Ehrich et al. (1981) demonstraram que glomerulonefrite em ratos infectados com *P. berghei* é mediada por complexos imunes envolvendo antígenos plasmodiais.

Em infecção com *P. chabaudi* em rato, além do desenvolvimento da anemia e esplenomegalia, também se observou doença renal caracterizada por inchaço dos tufo glomerulares e hiper celularidade mesangial; adesão da parede da cápsula e descamação do epitélio tubular, no entanto, áreas de necrose focal raramente foram vistas (MUSOKE et al., 1977). Essas mesmas alterações foram observadas em camundongos infectados por *P. chabaudi chabaudi* AS (ANDRADE JUNIOR et al., 1991).

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*. As principais alterações descritas são: congestão, hemorragia, edema, proliferação de células mesangiais, necrose glomerular, necrose tubular, trombose glomerular, granuloma linfóide e infiltrado linfocítico. Em estudo com camundongos SCID infectados por *P.*

chabaudi chabaudi CR, Motta (2003) observou comprometimento renal, não só pelo mecanismo de deposição de imunocomplexos, mas também devido à isquemia renal, provocada pela obstrução de capilares e vênulas pós-capilares por eritrócitos infectados.

Na malária murina a hipoglicemia também é observada. Camundongos infectados com *Plasmodium vinckei* ou a cepa letal de *P. yoelii* YM exibem uma profunda hipoglicemia em alta parasitemia. Uma queda similar da glicose sangüínea ocorre na infecção por *P. chabaudi* no momento do pico parasitêmico, quando o número de parasitas é alto, retornando ao nível normal quando o camundongo se recupera (ELASED et al., 1996).

1.3. O diabetes mellitus tipo 1 na população humana

O diabetes mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos, que se caracterizam, bioquimicamente, por hiperglicemia crônica (ROSSINI et al., 1995). Os efeitos do diabetes incluem, a longo prazo, dano, disfunção e falência de vários órgãos (WHO, 1999).

Em 1979, o National Diabetes Data Group (NDDG), propôs uma classificação que dividiu o diabetes em duas categorias principais: diabetes mellitus insulino-dependente e diabetes mellitus não-insulino dependente (DAMIANI, 2000).

Porém, em 1997, a Academia Americana de Diabetes recomendou uma nova classificação que eliminava os termos insulino-dependente e insulino-independente, passando, então, a considerar diabetes tipo 1 e tipo 2 como as categorias de classificação. Nesta nova classificação o DM tipo 1 caracteriza-se pela destruição das células β do pâncreas mediada por um processo auto-imune após o qual os pacientes passam a depender de insulina para a sobrevivência. Já o DM tipo 2 varia de resistência à insulina com deficiência de insulina aos casos

em que prevalece o defeito na secreção de insulina com resistência à insulina, nesses casos não há destruição das células β (DAMIANI, 2000).

O DM 1 é uma das doenças crônicas mais comuns da infância, com pico de incidência entre cinco e 15 anos de idade, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária. Corresponde a aproximadamente 10% de todos os casos de diabetes (SILVA; DIB, 2001).

A incidência do diabetes tipo 1 apresenta uma grande variação entre os países. Obedecendo a um gradiente norte-sul, com alta incidência no norte europeu (1%-1,5% na Finlândia) e incidências mais baixas nos países mais ao sul e tropicais (TISH; MCDEVITT, 1996).

O DM 1 é causado pela perda da capacidade secretória de insulina devido à destruição progressiva e imune mediada das células β produtoras de insulina, nas ilhotas pancreáticas (SILVA; DIB, 2001), em indivíduos geneticamente susceptíveis (IKEGAMI; OGIHARA, 1996).

Atualmente, é considerada uma doença heterogênea e poligênica, com pelo menos 20 genes envolvidos (ADORINI et al., 2002). Entretanto, fatores ambientais podem acelerar o processo auto-imune contra as células através de toxicidade direta, formação de um novo antígeno, mímica molecular ou interferência com o sistema imune. Estudos têm demonstrado associação entre infecções por vírus da caxumba, coxsackie B, echovírus, rubéola e o início do diabetes tipo 1 (SILVA; DIB, 2001).

Quando o paciente começa a apresentar os sintomas do diabetes, supõe-se que 80% a 90% das células β já tenham sido irreversivelmente destruídas. As ilhotas, então, apresentam um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (insulite), incluindo células T $CD8^+$ e $CD4^+$, linfócitos B e macrófagos (SILVA; DIB, 2001).

O primeiro passo para o início da doença é a apresentação de auto-antígenos específicos das células por células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) aos linfócitos T helper $CD4^+$ auto-reativos, em associação com moléculas HLA de classe II e outras moléculas co-estimulatórias. Uma vez que a auto-imunidade contra as células das ilhotas tenha

começado, a velocidade para a destruição destas células pode ser variável. Em pacientes com auto-anticorpos contra múltiplos antígenos a progressão tende ser mais rápida (SILVA; DIB, 2001). Uma das principais causas de falência renal é a nefropatia diabética. Ela é clinicamente definida pelo aumento progressivo de proteinúria acompanhado pelo aumento da pressão arterial e comprometimento da filtração glomerular. Histologicamente, a nefropatia diabética é caracterizada por glomeruloesclerose difusa ou nodular, fibrose e atrofia tubulointersticial (ALSAAD; HERZENBERG, 2007).

Estima-se que entre 1995 e 2025 haja um aumento de 35% na prevalência mundial do diabetes em adultos (≥ 20 anos). Em países desenvolvidos, o aumento da prevalência será de 27%, de 6% para 7,6% da população. Em países em desenvolvimento o aumento será de 48%, de 3,3% para 4,9% da população (KING et al., 1998).

1.4. O diabetes em camundongo NOD (“Non-Obese Diabetic”)

A linhagem NOD (“Non-Obese Diabetic”) é amplamente utilizada como um modelo de auto-imunidade órgão-específica devido ao processo auto-imune de destruição das células β das ilhotas de Langerhans. Tal processo é mediado pelas células T culminando no aparecimento do diabetes mellitus (BAXTER; MANDEL, 1991).

Essa linhagem foi estabelecida em 1974 por Makino e colaboradores em Osaka no Japão. Em 1980 a linhagem original apresentava uma incidência do diabetes de 60% a 80% nas fêmeas e apenas 10% nos machos na 30ª semana de vida (HAGEMAN; BUSCHARD, 1994).

Em 2001, a colônia NOD/Uni mantida no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB) apresentou prevalência de 82% para as fêmeas e 20% para machos (ANDRADE, 2003).

Nas fêmeas, o diabetes se manifesta mais cedo, entre 16^a e 20^a semana enquanto que nos machos isso ocorre entre 21^a e 28^a semanas de idade (LEITER et al., 1987).

Atualmente existem muitas colônias de camundongos NOD pelo mundo e elas diferem significativamente na incidência do diabetes, tempo de expressão e grau de preponderância das fêmeas (HAGEMAN; BUSCHARD, 1994). Fatores ambientais como dieta, temperatura e agentes infecciosos podem influenciar na incidência e tempo de expressão do diabetes (ROSSINI et al., 1995).

Algumas características clínicas do diabetes no camundongo NOD são muito similares ao diabetes mellitus tipo 1 humano, isto inclui a abrupta expressão da glicemia positiva entre 90 e 120 dias de vida (que equivale ao início do período da adolescência em humanos), hiperglicemia, glicosúria, hipercolesterolemia, cetonúria, polidipsia, poliúria e polifagia (LEITER et al., 1987).

Estudos sugerem que ambas células T CD4⁺ e CD8⁺ participam no desenvolvimento e progressão da doença. Sendo as células CD4⁺ essenciais nos estágios iniciais e tardios do desenvolvimento podendo mediar diretamente a destruição das ilhotas pancreáticas (ANDERSON; BLUESTONE, 2005).

1.5. A malária em camundongos diabéticos

Tolbert e McGhee (1960) observaram a redução do nível de açúcar sanguíneo em ratos infectados pelo *Plasmodium berghei*. Este resultado também foi observado em ratos com diabetes induzido pelo aloxano e infectados pelo *P. berghei*.

Em estudo realizado por Elased e colaboradores (1995) foi observado que a infecção de camundongos com o estágio sanguíneo de *Plasmodium yoelii* e *P. chabaudi* induziu uma hipoglicemia em camundongos normais e normalizou a

hiperglicemia em camundongos moderadamente diabéticos, induzido pela streptozotocina (STZ).

Posteriormente, Elased et. al.(2000) observaram que a infecção pela malária (*Plasmodium yoelii* e *P. chabaudi*) diminuiu a concentração de glicose sangüínea, porém somente na presença de alguma função pancreática residual. Esta diminuição da concentração de glicose sangüínea também foi observada com a administração de solução de *Plasmodium yoelii* fixado em formalina em camundongo diabético da linhagem db/db. Entretanto é importante salientar que a literatura sobre a malária associado ao diabetes é escassa.

2. Objetivo

Avaliar a influência do Diabetes Mellitus tipo 1 na infecção experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi*, linhagem CR, em camundongos fêmeos NOD (“Non-obese diabetic”).

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a influência do diabetes na parasitemia durante a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR.
- Estudar a histopatologia renal resultante da malária e diabetes.
- Registrar o efeito da associação do diabetes à malária, na sobrevivência dos animais.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeos livres de patógenos específicos (SPF), isogênicos da linhagem NOD/Uni. Os animais procederam da colônia de fundação mantida no CEMIB em isoladores de PVC flexível com pressão positiva, onde são criados dentro do sistema de barreiras que impede contaminações. Esta colônia foi importada do Hospital Necker de Paris (França) em 1994 (ANDRADE, 2003).

A idade dos camundongos foi variável dependendo da expressão do diabetes (entre 8-43 semanas) e da disponibilidade de fornecimento pelo CEMIB. Também foram utilizados camundongos fêmeos SPF da linhagem BALB/c/Uni provenientes do CEMIB. Os experimentos tiveram a aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo nº 780-1).

A escolha pela utilização de camundongos fêmeos ocorreu devido ao fato destes apresentarem maior porcentagem de expressão do diabetes na colônia.

3.2. Grupos experimentais

O grupo controle foi formado por camundongos fêmeos SPF da linhagem BALB/c/Uni, divididos em dois grupos: infectados e não infectados.

Os camundongos NOD/Uni foram divididos em dois grupos (infectados e não-infectados) sendo estes também classificados segundo o grau de diabetes (leve, moderada e severa). Os valores glicêmicos considerados foram:

- Diabetes leve (+): até 300 mg/dL;
- Diabetes moderada (+ +): 300-500 mg/dL;
- Diabetes severa (+ + +): > 500 mg/dL.

Os grupos formados pelos camundongos da linhagem NOD/Uni foram: controle sem infecção (n=12), infectado com diabetes moderada (n=3) e infectado com diabetes severa (n=17). Todos os camundongos NOD/Uni sem infecção apresentavam diabetes severa.

Os grupos experimentais foram mantidos em mini-isoladores em rack ventilada (Alesco) no biotério do Departamento de Parasitologia no Instituto de Biologia da Unicamp. Todos os animais foram mantidos em maravalha autoclavada, com ração Nuvilab autoclavável CR1 e água filtrada *ad libitum*.

3.3. Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada em dias alternados a partir do dia zero ou um após a infecção até o fim do experimento. No pico da infecção, que foi considerado o sétimo dia, foram realizadas as medidas de glicemia e parasitemia em todos os animais.

Nos animais não infectados também foi realizada a mesma rotina de determinação da glicemia.

Para a determinação da glicemia foram utilizadas fitas reativas do aparelho Accu-Chek Active® (Roche). Depositando na fita um volume de sangue aproximado de 2 µL, coletado diretamente da cauda de cada animal o resultado foi expresso em mg/dL, após 5 segundos. O monitor Accu-Chek Active® mede a glicemia em um intervalo definido de 10 a 600 mg/dL (0,6-33,3mmol/L), o resultado superior a 600 mg/dL é indicado pelo símbolo Hi (high). O registro da glicemia foi realizado sempre no período da tarde.

3.4. Infecção dos camundongos

A linhagem de *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR foi cedida pelo Prof. Dr. Heitor F. Andrade Jr do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

No decorrer dos experimentos a manutenção do *P. chabaudi chabaudi* CR foi realizada em camundongo macho SPF isogênico da linhagem BALB/c/Uni, também proveniente do CEMIB.

Fêmeas das linhagens BALB/c/Uni e NOD/Uni foram infectadas com células sanguíneas coletadas da veia da cauda dos camundongos machos BALB/c/Uni, mediante injeção intraperitoneal de 10^7 hemácias parasitadas diluídas em NaCl 0,15M. O dia da inoculação foi considerado o dia zero da infecção.

3.5. Determinação da parasitemia

Para contagem de parasitas, amostras de 5 μ L de sangue foram coletadas com micropipeta, mediante secção da ponta da cauda dos camundongos NOD/Uni infectados pelo *P.chabaudi chabaudi* CR. Após a diluição do sangue 200 x em NaCl 0,15M, os eritrócitos parasitados foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia de fase e os valores expressos em números de eritrócitos parasitados $\times 10^8$ /mL.

Amostras de esfregaços foram obtidas, no decorrer da infecção, para avaliação da parasitemia. A coloração foi realizada utilizando-se May-Grünwald (35 min) e Giemsa (uma hora). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (1000x). Foram escolhidos campos aleatórios para contagem de pelo menos 300 eritrócitos e os valores foram expressos em porcentagem de hemácias parasitadas. A parasitemia foi sempre realizada no final da tarde.

3.6. Avaliação histopatológica

Ao final dos experimentos, alguns camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida procedeu-se a retirada dos rins para fixação imediata em Bouin aquoso. Os tecidos foram processados para desidratação e inclusão em parafina Histosec® (Merk). Foram realizados cortes histológicos de 5 µm no micrótomo (American Optical). Foram efetuados dois protocolos diferentes de coloração:

- Coloração pela Hematoxilina–Eosina para observação das alterações estruturais dos rins;
- Coloração de PAS com diastase para avaliação do espessamento da membrana basal glomerular.

Para o processo de digestão por diastase foi utilizada solução de α -amilase (Sigma) a 0,5% durante 20 minutos (ELLIS, 2007).

Os cortes histológicos corados pelo HE foram observados em microscopia óptica comum. Aqueles processados para coloração de PAS foram observados em microscopia de luz polarizada.

3.7. Captura de imagens

As imagens digitalizadas dos rins corados pelo HE foram obtidas em Microscópio Zeiss Axioplan, acoplado ao computador com software de captura de imagens Leica Image Manager IM50® (Leica).

3.8. Avaliação da membrana basal glomerular

As lâminas coradas pelo PAS foram observadas em microscópio Olympus BX 51 com câmera acoplada Q-Color 3 Olympus América Inc, em objetiva de 40x e aumento óptico 2.

As imagens obtidas após captura foram submetidas ao filtro “Equalize” e as partes das lâminas basais a serem medidas foram segmentadas pelos histogramas de densidade óptica, após fixadas as condições de iluminação foram realizadas as medidas de absorvância pelo analisador de imagens Image-Pro Plus version 5.1 for Windows®.

As medidas obtidas foram: absorvância média (Optical Density - OD), desvio padrão das absorvâncias por área medida (em micrômetros), absorvância mínima e absorvância máxima. Foram realizadas medidas de um camundongo da linhagem BALB/c, um camundongo da linhagem NOD/Uni com diabetes severa e oito dias de infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR e um camundongo da linhagem NOD/Uni com diabetes severa sem infecção. As áreas totais medidas foram 2356,8 μm^2 , 6936,6 μm^2 e 4697 μm^2 , respectivamente.

3.9. Mortalidade

Os animais foram observados diariamente e a mortalidade natural foi registrada durante a evolução de cada experimento.

No decorrer da infecção, alguns camundongos NOD/Uni infectados e não infectados foram sacrificados para análise histológica (n=12 e n=5, respectivamente).

3.10. Análise estatística

Foram realizados testes estatísticos para análise das lâminas basais do glomérulo. Os dados obtidos de cada amostra foram comparados utilizando o software Minitab obtendo-se a média e desvio padrão (ANOVA).

4. Resultados

4.1. Glicemia

Do total de camundongos fêmeos NOD/Uni infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR (n = 20) 52,34% apresentaram redução da glicemia no período de pico da infecção. Os camundongos NOD/Uni do grupo controle não apresentaram redução da glicemia no decorrer dos experimentos (Gráfico 1A).

Os animais foram separados conforme o grau de diabetes (M: moderada, S: severa). No gráfico 1B pode ser observada a evolução da glicemia dos camundongos NOD/Uni pertencentes ao grupo com diabetes moderada infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR. Neste grupo, cujo número de animais obtidos foi baixo, o gráfico apresenta os comportamentos individuais dos animais, que foram nomeados M1, M2 e M3, a redução da glicemia foi observada a partir do quinto dia de infecção. No grupo dos camundongos NOD/Uni com diabetes severa infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, a redução da glicemia ocorreu principalmente entre o quinto e sexto dia de infecção, retornando aos valores iniciais após o pico da infecção (Gráfico 1C), foi considerada a média de todos os animais deste grupo. O comportamento glicêmico individual em uma amostra de sete camundongos fêmeos NOD/Uni com diabetes severa infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR pode ser observado nos gráficos 1D e 1E. Nesta amostra, a redução da glicemia pôde ser observada entre o quinto e sexto dia de infecção e em alguns indivíduos entre o sétimo e oitavo dia de infecção. Para melhor visualização dos dados, os camundongos foram divididos em dois gráficos (1D e 1E) conforme o dia em que ocorreu a redução da glicemia: cinco animais que apresentaram redução da glicemia entre o quinto e sexto dia de infecção (Gráfico

1D) e três que apresentaram essa redução entre o sétimo e oitavo (Gráfico 1E), os animais foram nomeados de S1 a S7. Nesta amostra, o índice de redução de glicemia foi da ordem de 16,8% (desvio padrão 7,5) considerando, no primeiro dia de infecção, o valor de registro máximo de leitura do aparelho que corresponde a 600mg/dL. É importante ressaltar que o registro “high”, ao invés dos valores numéricos de glicemia, dificulta o cálculo real da amplitude da redução dos valores glicêmicos.

Nos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c não foi observada redução da glicemia no pico da infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR. Também não houve diferença na evolução da glicemia entre os camundongos BALB/c infectados e sem infecção (Gráfico 2).

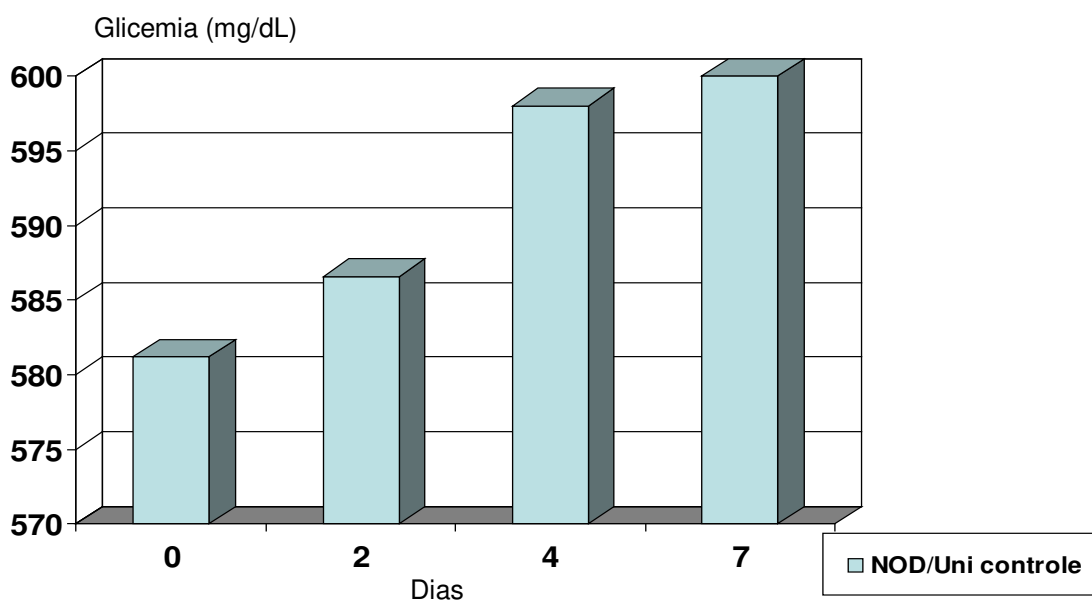


Gráfico 1A – Evolução da glicemia em camundongos fêmeas NOD/Uni com diabetes severa (n=5).

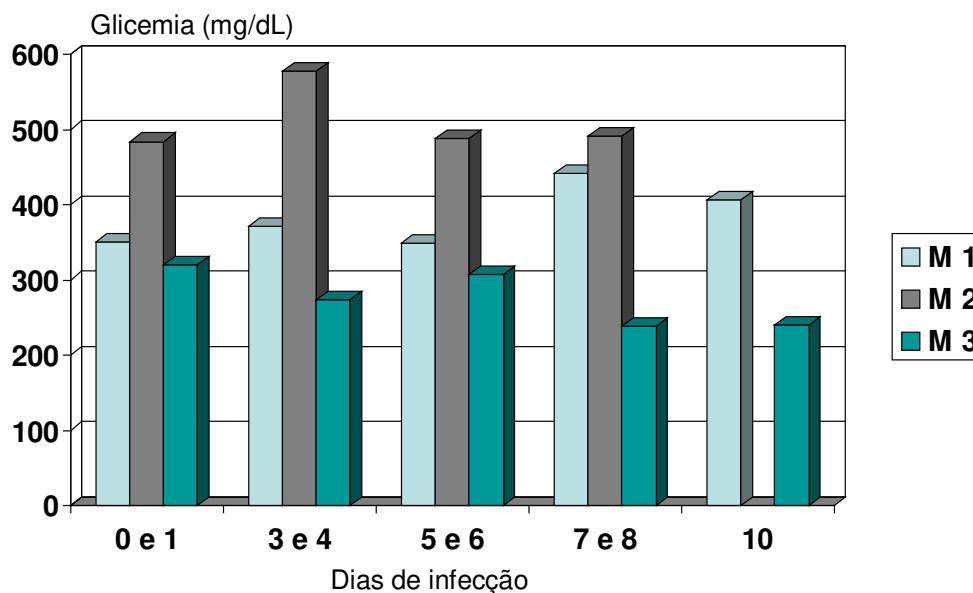


Gráfico 1B - Evolução individual da glicemia em camundongos fêmeos NOD/Uni com diabetes moderada (M1,M2,M3) nos períodos 0-1, 3-4, 5-6, 7-8 e 10 dias após a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR.

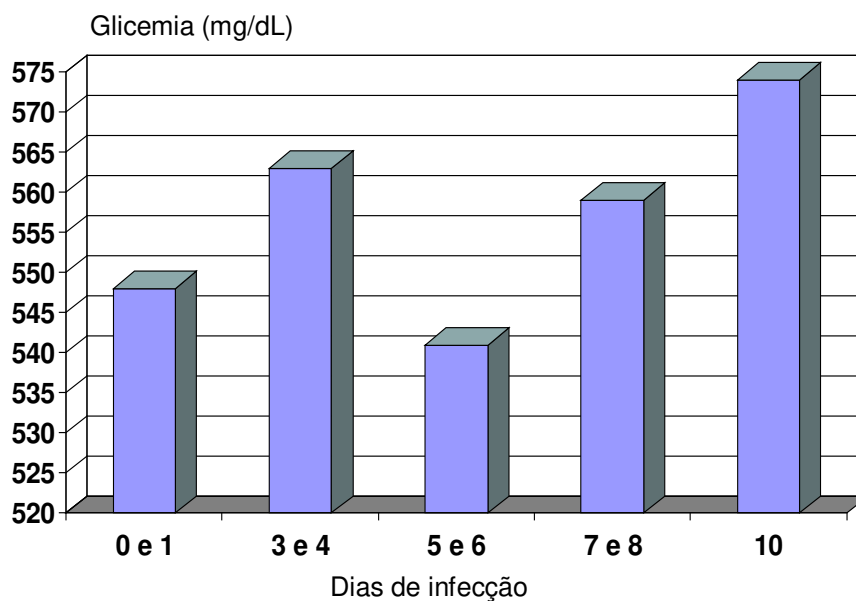


Gráfico 1C – Evolução da glicemia em camundongos fêmeos NOD/Uni com diabetes severa nos períodos 0-1, 3-4, 5-6, 7-8 e 10 dias após a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR (n=17).

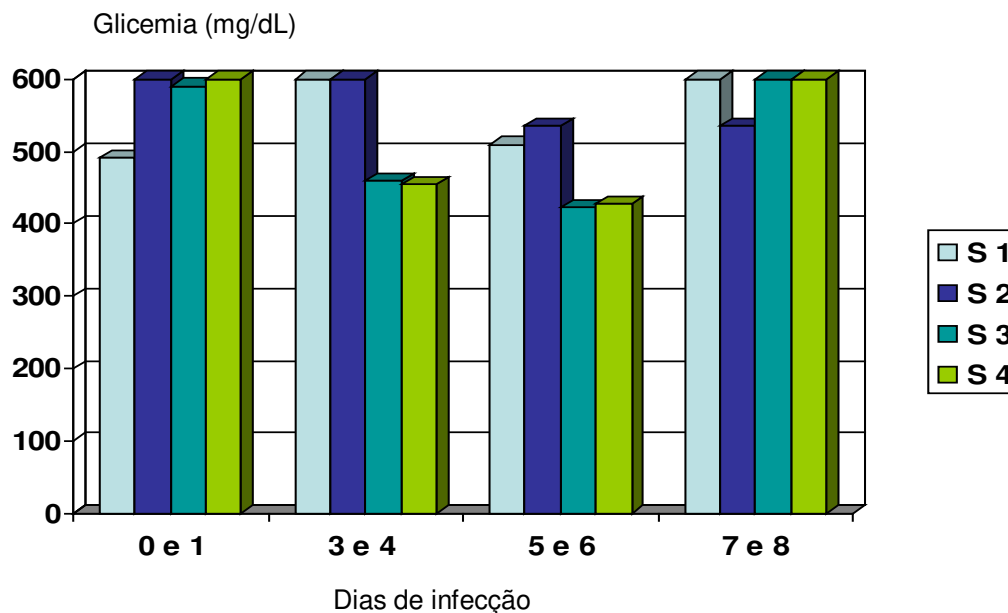


Gráfico 1D - Evolução individual da glicemia em camundongos fêmeos NOD/Uni com diabetes severa (S1,S2,S3,S4) nos períodos 0-1, 3-4, 5-6 e 7-8 dias após a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR.

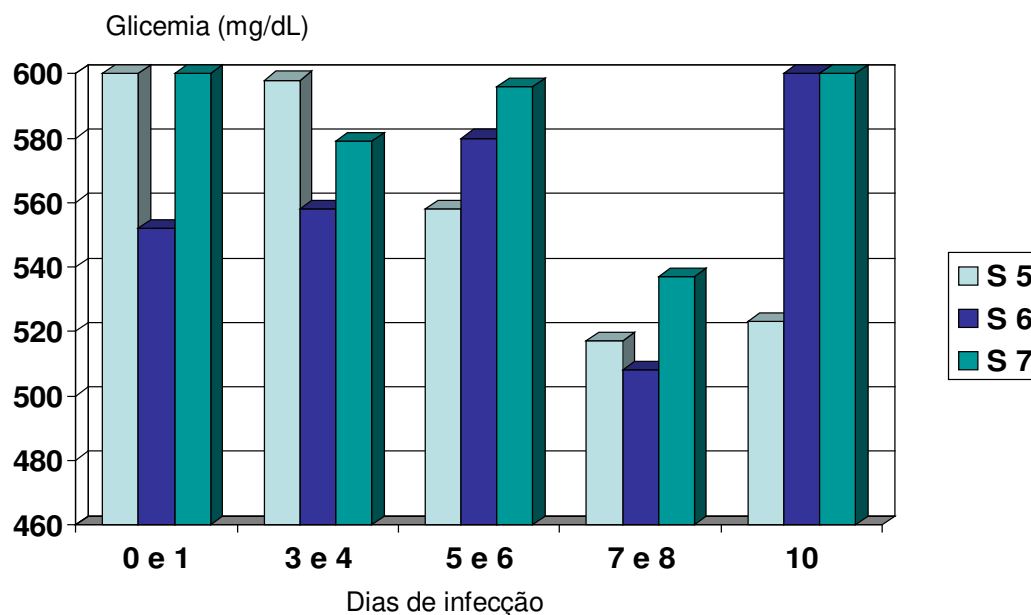


Gráfico 1E - Evolução individual da glicemia em camundongos fêmeos NOD/Uni com diabetes severa (S5, S6 e S7) nos períodos 0-1, 3-4, 5-6, 7-8 e 10 dias após a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR.

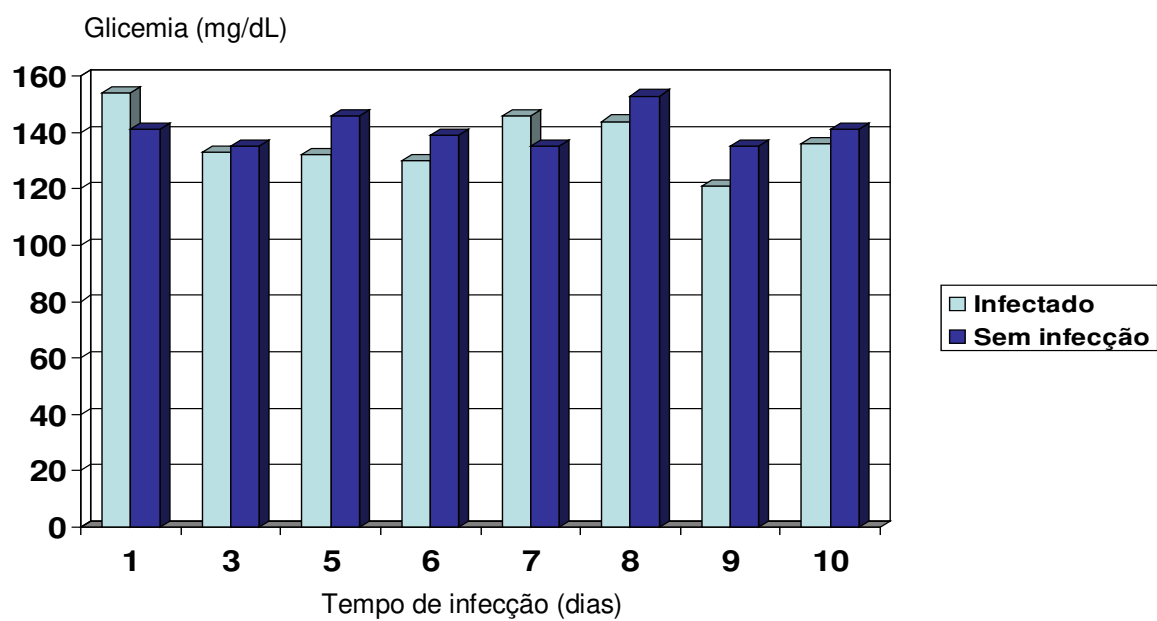


Gráfico 2 - Evolução da glicemia em camundongos fêmeas BALB/c com infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR e sem infecção no períodos 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias após a infecção.

4.2. Parasitemia

No decorrer da infecção dos camundongos NOD/Uni pelo *P. chabaudi chabaudi* linhagem CR, foi possível observar o pico parasitêmico no sétimo dia e posterior controle da infecção, o que pode ser confirmado pela queda da parasitemia no 12º dia de infecção (Gráfico 3). Os camundongos da linhagem BALB/c também apresentaram o pico da infecção no sétimo, no entanto a média da parasitemia nesta linhagem foi ligeiramente maior.

A média da parasitemia e o desvio padrão no sexto, sétimo e 12º dias de infecção em uma amostra de 5, 17 e 11 camundongos NOD/Uni, respectivamente, podem ser observados na Tabela 1. Os dados do Gráfico 3 e da Tabela 1 correspondem aos dois grupos de camundongos NOD/Uni (diabetes severa e moderada).

Na Tabela 2 os dados de glicemia e parasitemia dos camundongos NOD/Uni do grupo com diabetes moderada (n=3) e em uma amostra do grupo com diabetes severa (n=6) no sétimo dia de infecção pelo *P.chabaudi chabaudi* CR podem ser observados separadamente. Neste período, a parasitemia foi em média mais alta nos animais com diabetes severa.

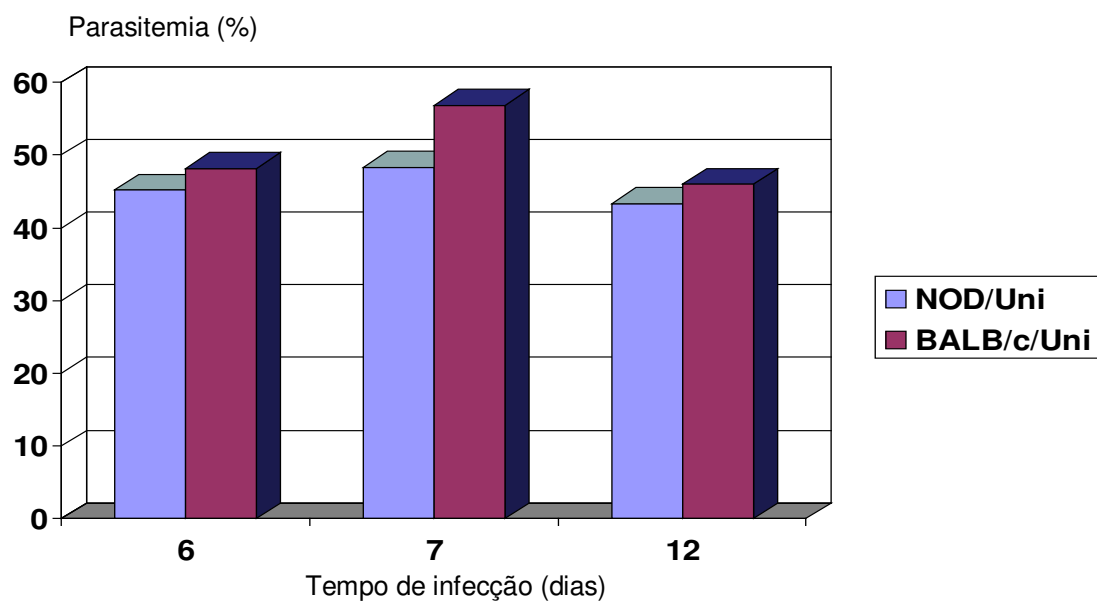


Gráfico 3 – Média da parasitemia em uma amostra de camundongos fêmeas NOD/Uni e BALB/c/Uni no decorrer da infecção por *P. chabaudi chabaudi* CR nos dias 6, 7 e 12.

Tabela 1 – Média da parasitemia e desvio padrão em uma amostra dos camundongos fêmeos NOD/Uni no decorrer da infecção por *P. chabaudi chabaudi* CR nos dias 6, 7 e 12.

Tempo de infecção em dias	Parasitemia	Desvio padrão
6 (n=5)	45,2%	20,8
7 (n=17)	48,29%	19,1
12 (n=11)	43,32%	20,07

Tabela 2 – Resultados individuais de parasitemia e glicemia em uma amostra de camundongos fêmeos NOD/Uni no sétimo dia de infecção pelo *P.chabaudi chabaudi* CR.

Diabetes moderada	Parasitemia (%)	Glicemia (mg/dL)
M 1	23,85	442
M 2	39,59	491
M 3	47,22	238
Diabetes severa		
S 1	43,6	>600
S 3	63,61	423
S 5	22,15	517
S 6	35,9	508
S 8	66,43	>600
S 9	67,16	>600

4.3. Avaliação histopatológica

As principais alterações renais observadas foram edema, necrose e infiltração glomerular, descamação e dilatação dos túbulos contorcidos.

As principais alterações renais encontradas nos camundongos da linhagem NOD/Uni podem ser observadas nas figuras a seguir.

Nas Figuras 1A e 1B é possível observar corte histológico de rim sadio de camundongo fêmeo da linhagem BALB/c/Uni sem infecção em aumento de 200x e 400x, respectivamente.

Nas demais figuras podem ser observadas as principais alterações renais encontradas em camundongo da linhagem NOD/Uni sem infecção (Figura 2) e em camundongos fêmeos NOD/Uni infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR em diferentes tempos de infecção e de diabetes (Figuras 3-9). Edema glomerular e descamação das células tubulares estiveram presentes com maior frequência. A presença de núcleos picnóticos (Figs. 5A e B) foi considerada o início do processo de necrose glomerular, entretanto a necrose glomerular foi a lesão renal encontrada em menor frequência (Fig. 9B). Estas alterações renais estiveram presentes tanto nos camundongos diabéticos com infecção quanto nos diabéticos sem infecção.

Na Tabela 3 é possível observar as alterações renais em uma amostra de camundongos NOD/Uni infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR divididos segundo o grau de diabetes. Os dados observados do único animal obtido que apresentou diabetes leve também estão presentes nesta tabela.

Na coloração pelo PAS, foi possível observar o espessamento da membrana basal do glomérulo nos camundongos NOD/Uni analisados, esses valores diferiram significativamente do observado no camundongo BALB/c controle. Neste aspecto, porém não houve diferença entre o camundongo NOD/Uni com infecção e sem infecção, ambos apresentavam diabetes severa.

Tabela 3 – Alterações renais em camundongos fêmeas NOD/Uni infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR em diversos tempos de infecção e no estágio de diabetes leve (L), moderada (M) e severa (S).

T – trombose; H – hiper celularidade no glomérulo; E – edema glomerular; N – necrose; DCT – descamação das células tubulares.

Animal	Tempo de infecção no sacrifício (dias)	Parasitemia (%)	Glicemia na morte (mg/dL)	Tempo de diabetes no dia da infecção (dias)	Alterações renais				
					T	H	E	N	DCT
L 1	42	57,62	173	7	-	+++	+++	-	++
M 1	12	45,55	478	23	-	+	+	+	+++
M 2	20	57,36	>600	17	++	++	+++	+	+++
M 3	42	57,3	497	7	-	+	-	+	+
S 5	12	27,57	>600	30	-	+++	+++	+	+++
S 6	12	50,62	584	34	-	+++	+++	-	+++
S 10	8	53,95	575	8	-	++	+++	-	++
S 11	8	56,06	>600	7	+++	++	+++	++	+++

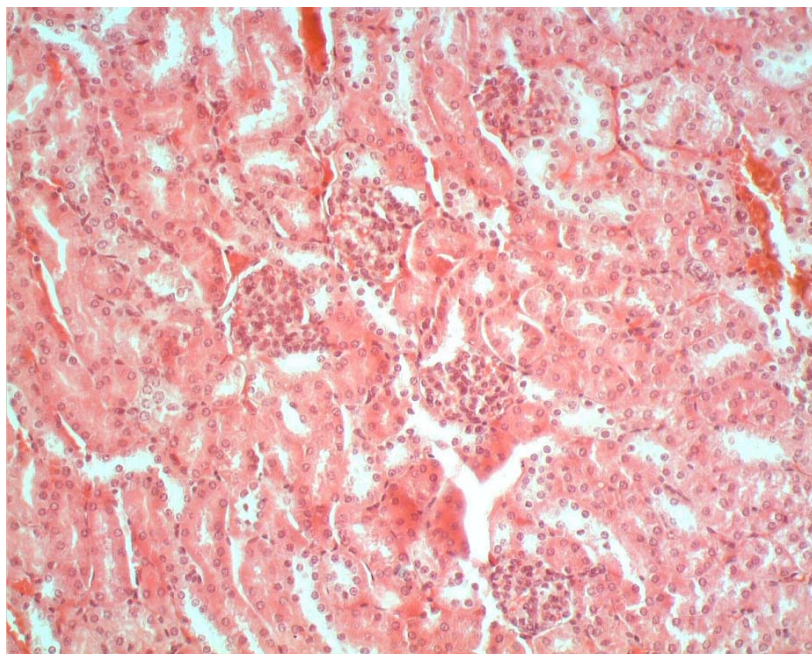


Figura 1A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo BALB/c/Uni. Observar organização tecidual normal. Coloração HE (Aumento 200x).

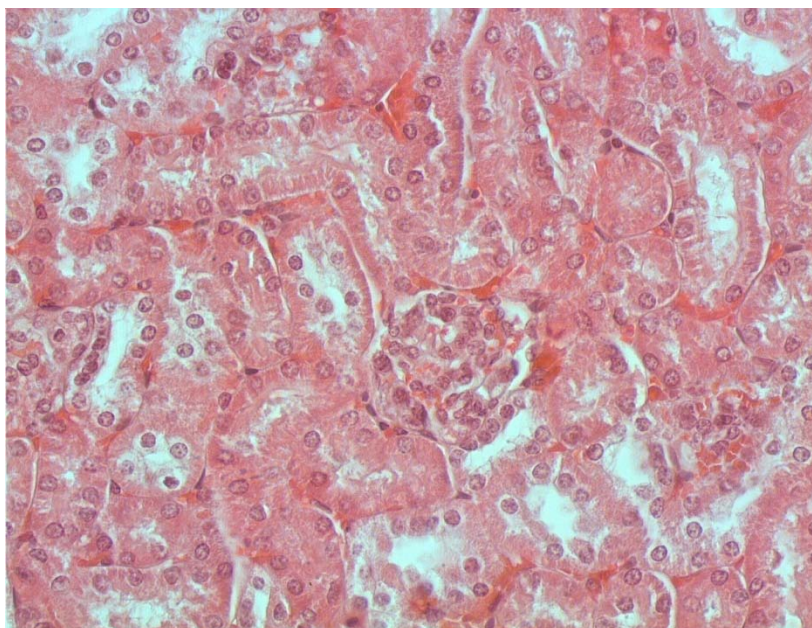


Figura 1B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo BALB/c/Uni. Observar glomérulo e túbulos contorcidos normais. Coloração HE (Aumento 400x).

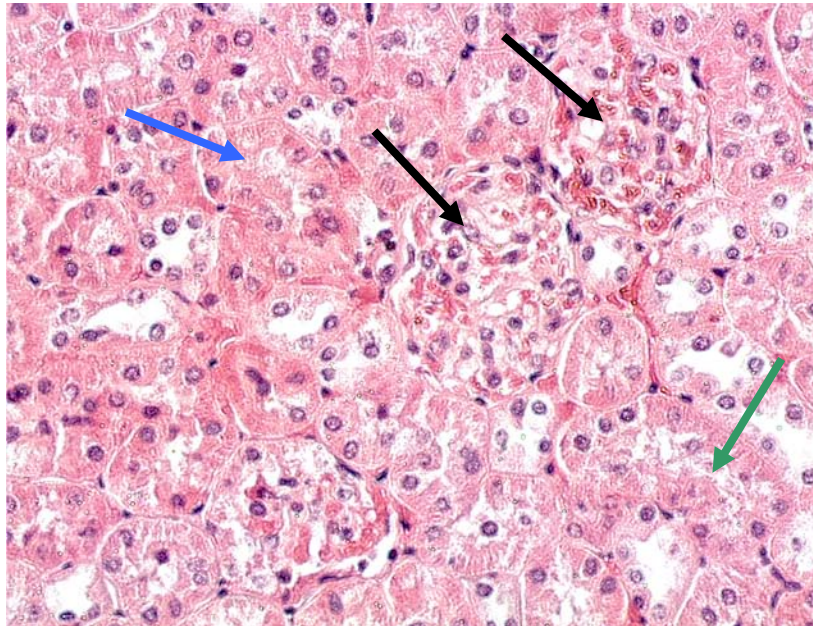


Figura 2 – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni controle com diabetes severa. Observar edema glomerular (seta preta), descamação de células tubulares (seta verde) e dilatação tubular (seta azul). Coloração HE (Aumento 400x).

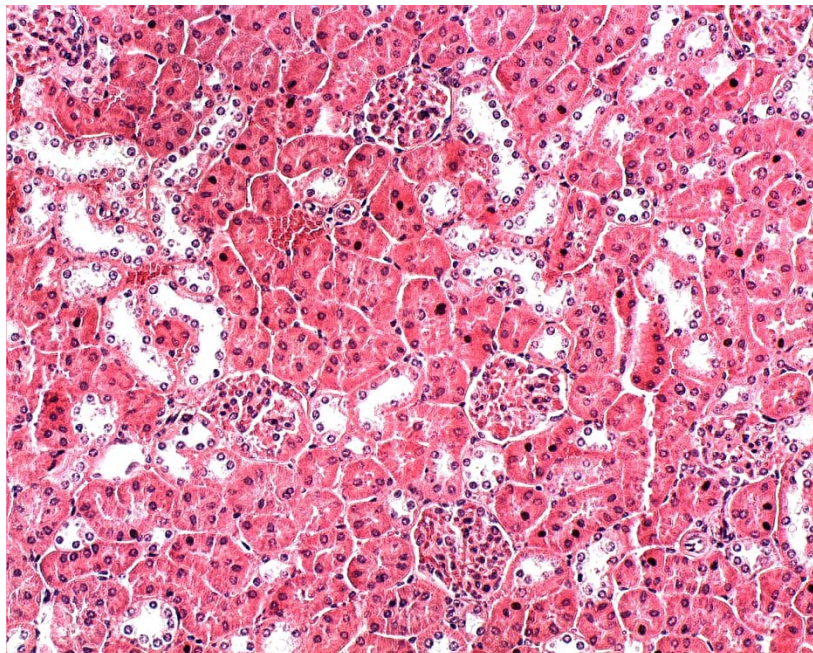


Figura 3A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar desorganização tecidual e dilatação tubular. Coloração HE (Aumento 200x).

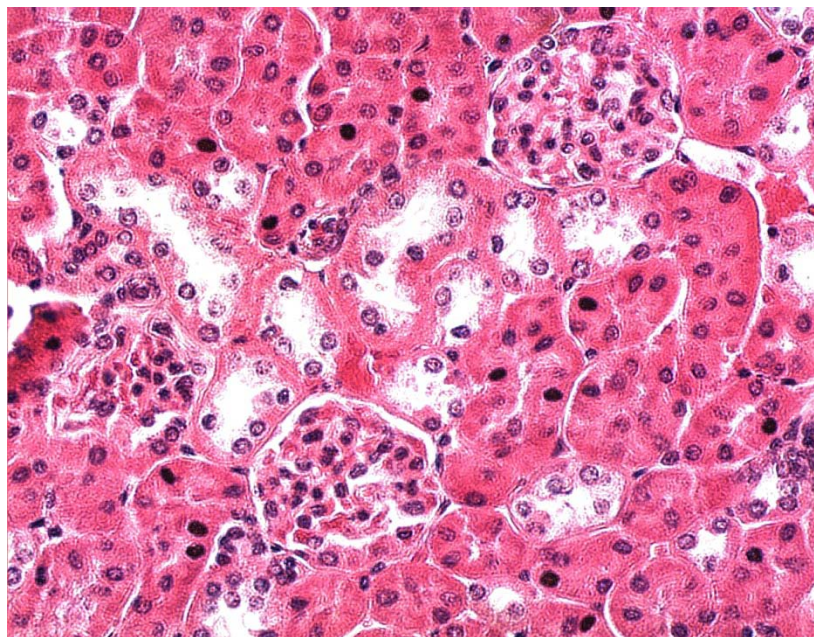


Figura 3B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar edema de túbulos contorcidos proximais e distais. Coloração HE (Aumento 400x).

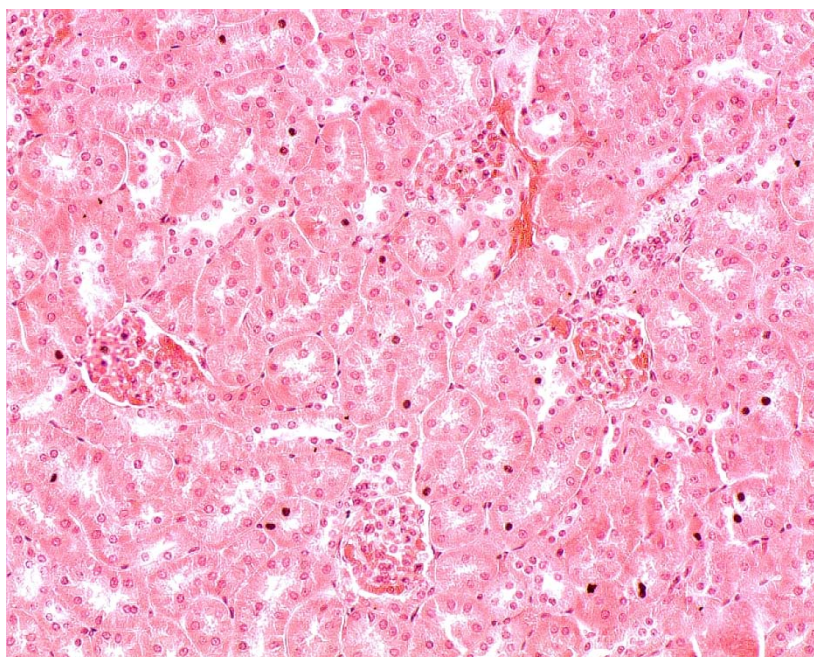


Figura 4A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 20 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar hiper celularidade glomerular. Coloração HE (Aumento 200x).

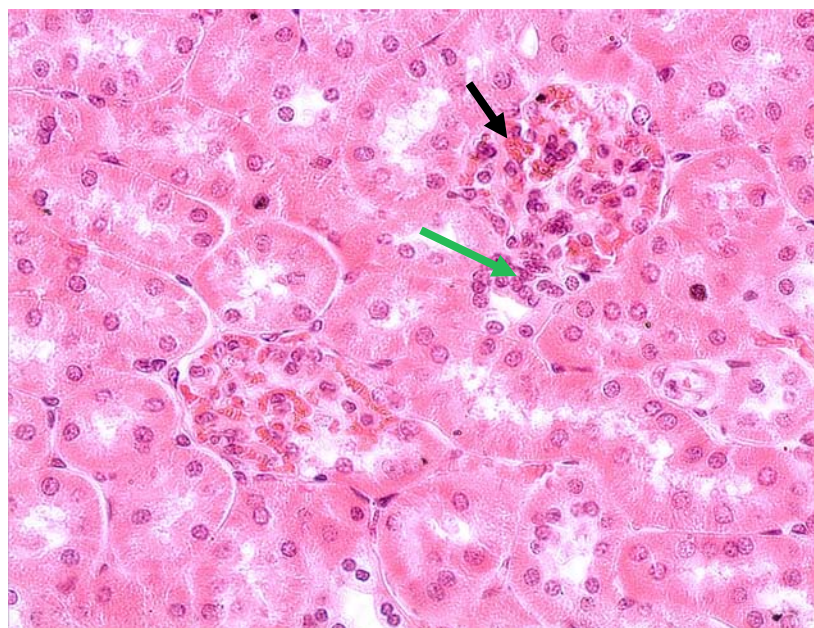


Figura 4B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 20 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar trombose glomerular (seta preta) e hiper celularidade (seta verde). Coloração HE (Aumento 400x).

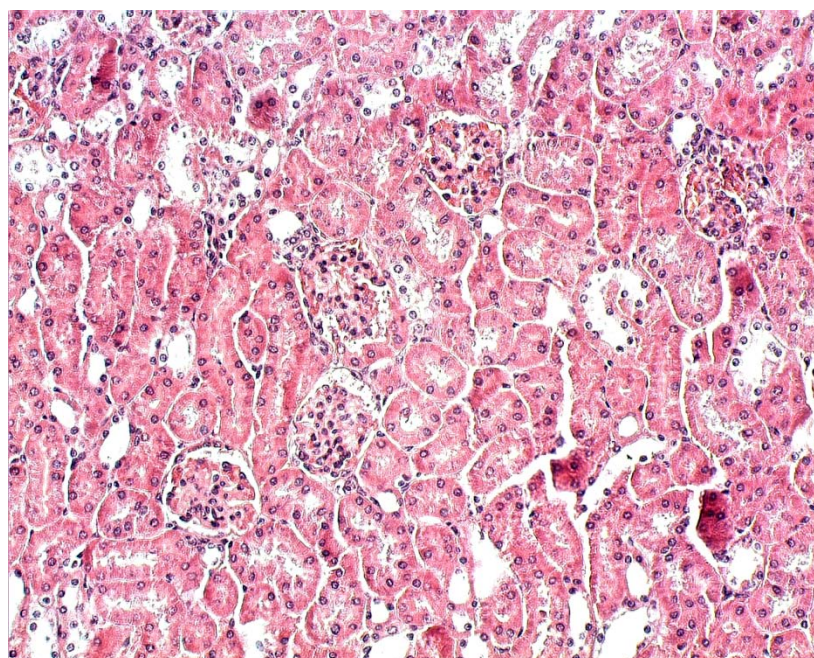


Figura 5A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 42 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar a presença de núcleos picnóticos nos glomérulos. Coloração HE (Aumento 200x).

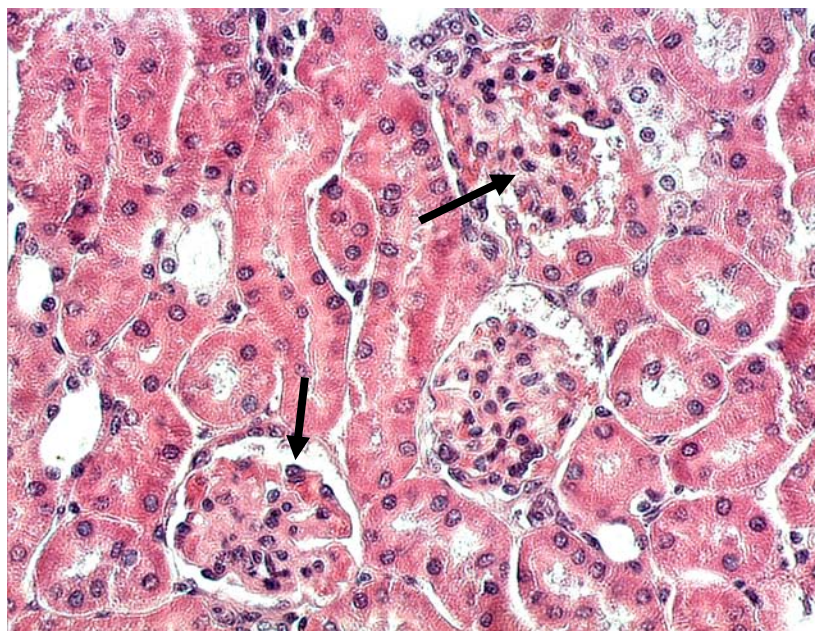


Figura 5B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 42 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes moderada. Observar glomérulos em processo de necrose com núcleos picnóticos (setas). Coloração HE (Aumento 400x).

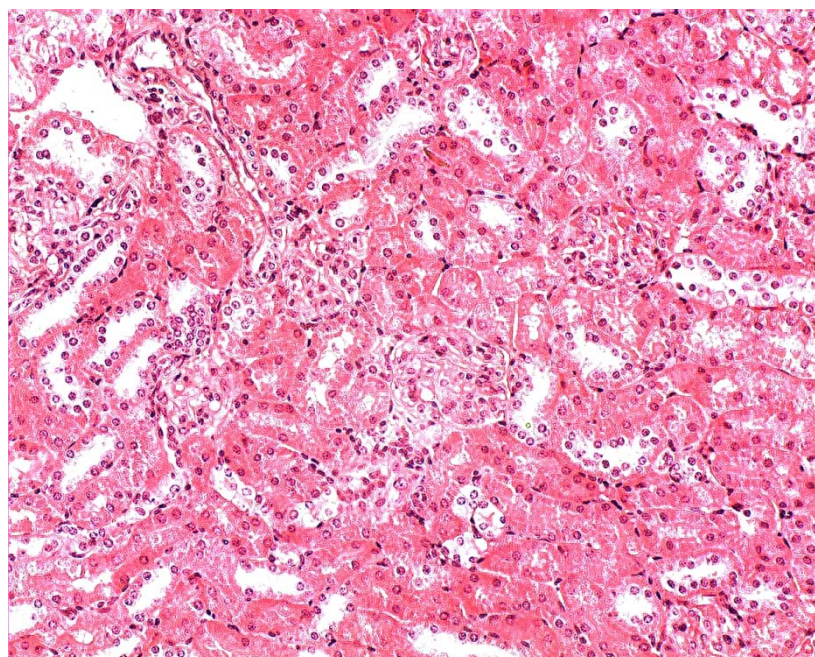


Figura 6A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar desorganização tecidual. Coloração HE (Aumento 200x).

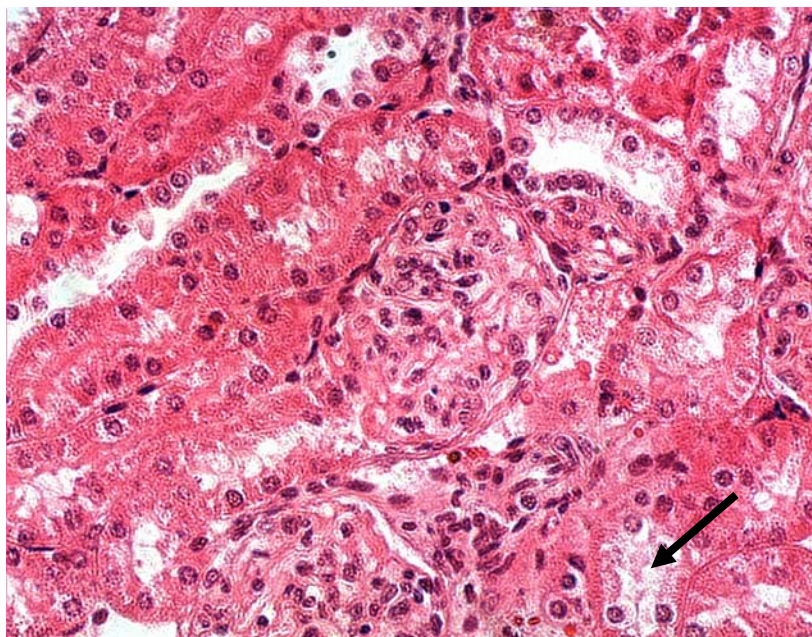


Figura 6B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema glomerular e descamação tubular (seta). Coloração HE (Aumento 400x).

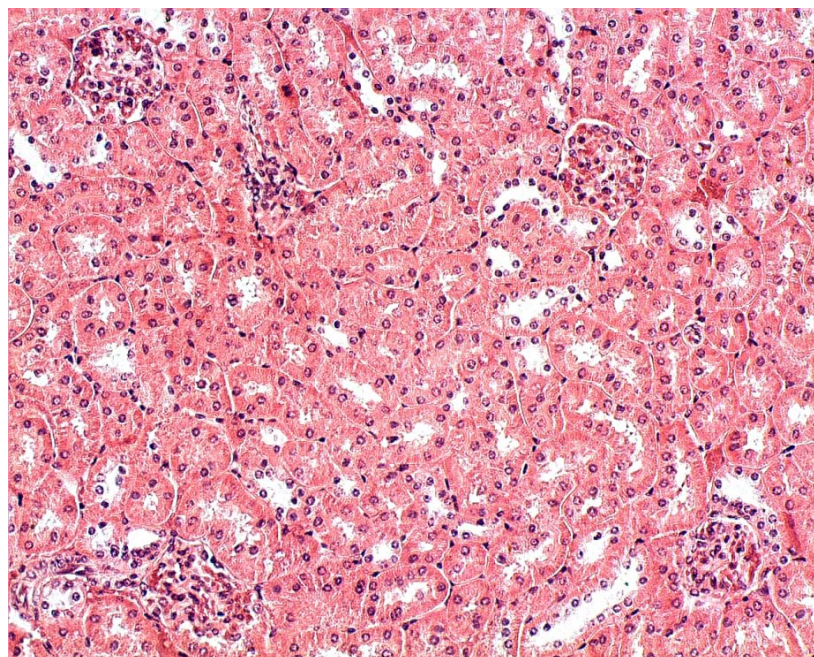


Figura 7A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema de túbulos contorcidos proximais e distais. Coloração HE (Aumento 200x).

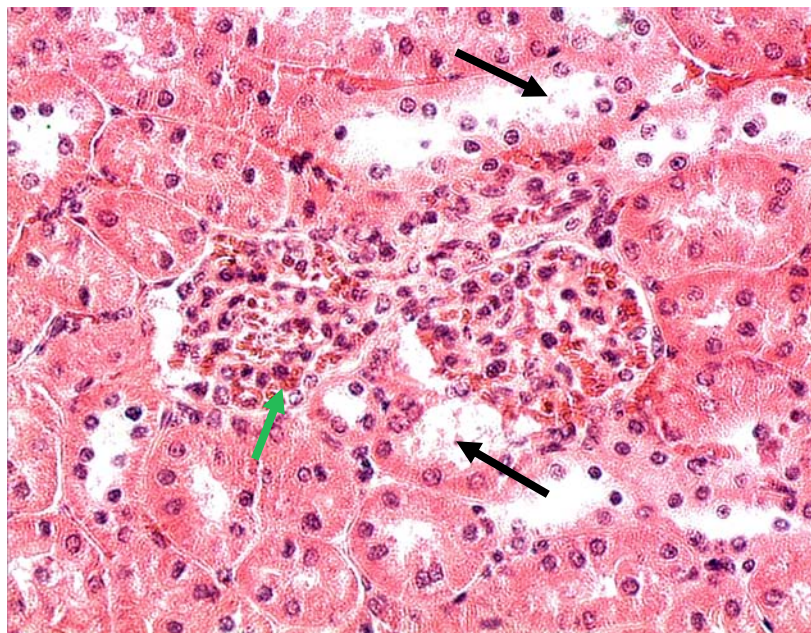


Figura 7B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com 12 dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar descamação celular nos túbulos contorcidos proximais e distais (seta preta) e trombose glomerular (seta verde). Coloração HE (Aumento 400x).

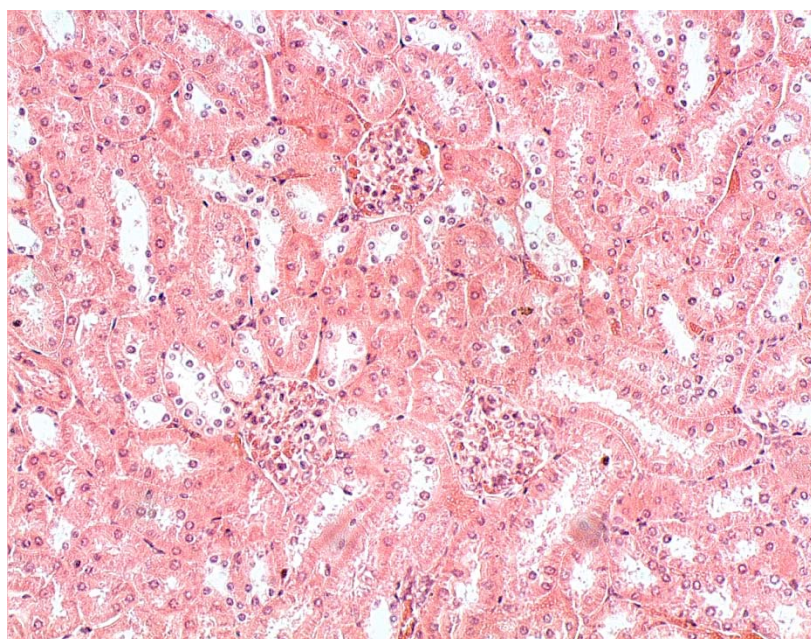


Figura 8A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com oito dias de infecção *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema glomerular. Coloração HE (Aumento 200x).

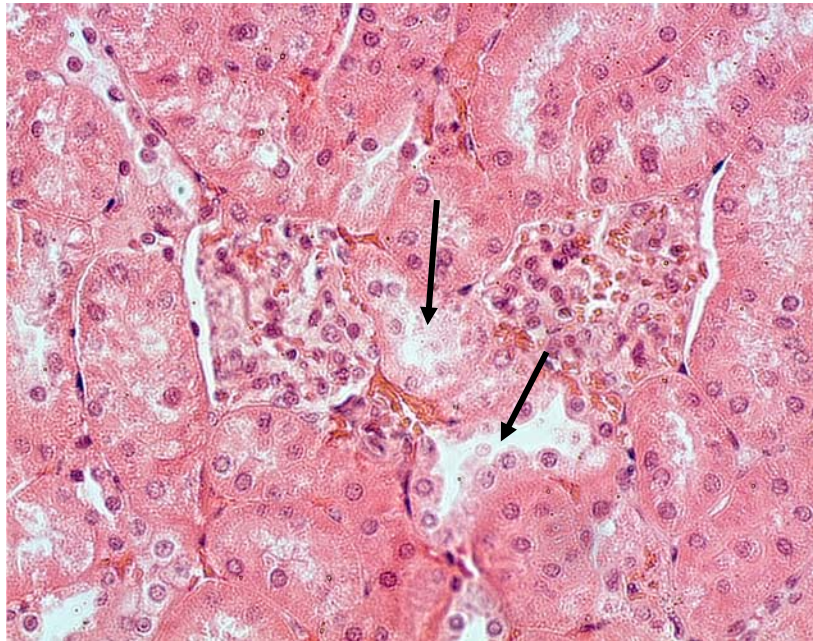


Figura 8B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com oito dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema e descamação celular nos túbulos contorcidos proximais e distais (seta) e desorganização tecidual. Coloração HE (Aumento 400x).

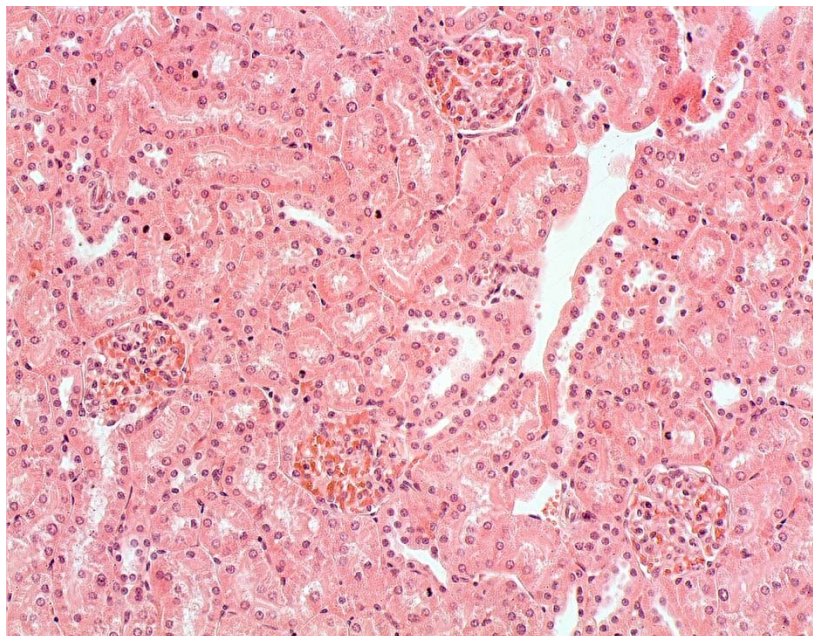


Figura 9A – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com oito dias de infecção por *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema glomerular e tubular. Coloração HE (Aumento 200x).

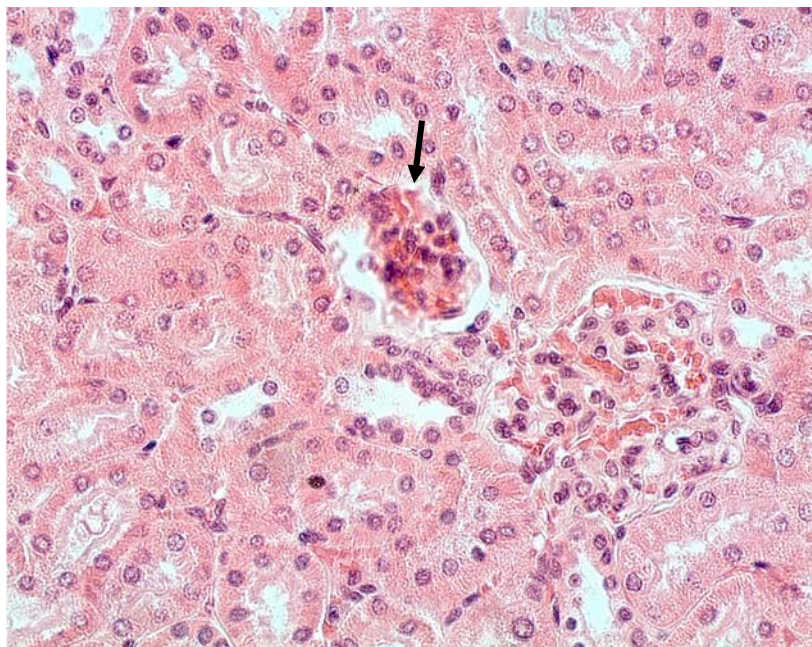


Figura 9B – Corte histológico de rim de camundongo fêmeo NOD/Uni com oito dias de infecção pelo *P. chabaudi chabaudi* CR, diabetes severa. Observar edema glomerular e necrose (seta). Coloração HE (Aumento 400x).

4.4. Mortalidade

Nos camundongos fêmeos da linhagem NOD/Uni infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR a média do tempo de vida foi de 29,13 semanas, superior ao observado no grupo piloto mantido no CEMIB em 2005 cuja sobrevivência média foi de 22,73 semanas.

Após o aparecimento da glicemia positiva, os camundongos NOD/Uni mantidos no CEMIB sobrevivem em média 4 semanas (comunicação pessoal), enquanto que os camundongos NOD/Uni infectados sobreviveram em média 6,5 semanas.

Não foi observada morte natural nos camundongos BALB/c/Uni infectados, devido à utilização da linhagem CR não letal de *Plasmodium chabaudi chabaudi*.

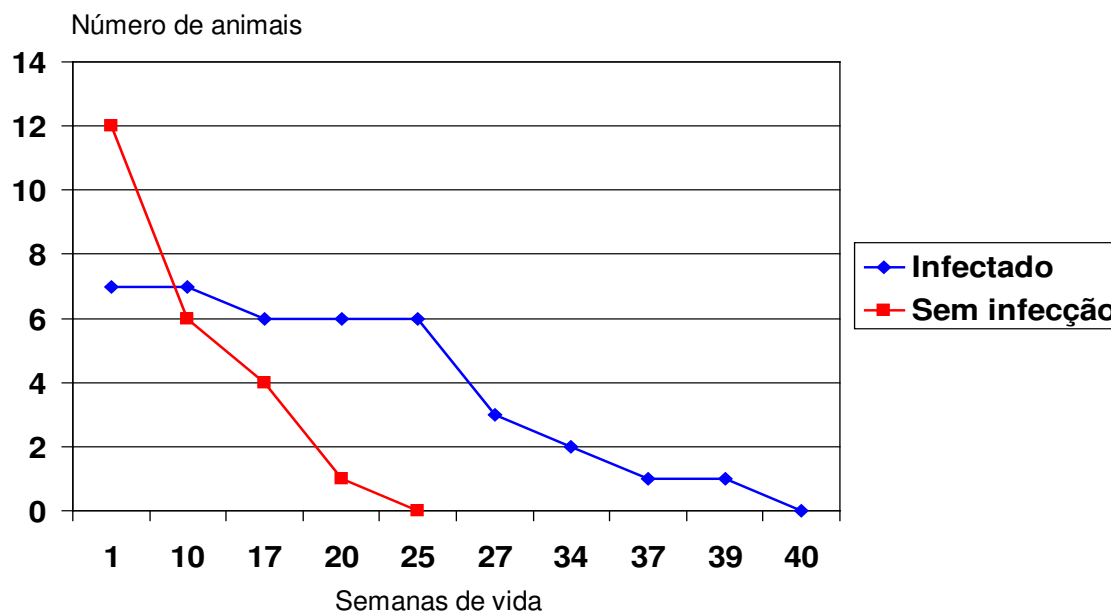


Gráfico 4 – Sobrevida dos camundongos fêmeos da linhagem NOD/Uni sem infecção (Dados do CEMIB 2005) e infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR.

5. Discussão

O estudo da influência de infecções parasitárias em camundongos diabéticos tem sido alvo de pesquisa, porém poucos são os trabalhos que utilizam modelos animais que expressam o diabetes geneticamente.

Andrade (2003) observou que a infecção por *Schistosoma mansoni* apresenta um papel protetor no diabetes em camundongos da linhagem NOD/Uni. Saunders e colaboradores (2007), também utilizando a linhagem NOD, obtiveram resultados semelhantes com a associação do diabetes à *Trichinella spiralis* e *Heligmosomoides polygyrus*. Estes autores observaram que a indução e a progressão do diabetes em camundongos da linhagem NOD pode ser inibida pela infecção por estes helmintos gastrintestinais.

São escassos os artigos na literatura que avaliam o efeito do diabetes na infecção pelo *Plasmodium* sp. Neste contexto, a utilização da linhagem NOD/Uni, que simula o diabetes do tipo 1, concomitante à infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR foi descrita pela primeira no presente trabalho.

A hipoglicemia em infecções por *Plasmodium falciparum* é uma das características da malária severa (WHO, 1990). Esta alteração pode ser associada ao tratamento com quinino, no entanto, hoje se sabe que este não é o único fator que causa a hipoglicemia. Em 1912, Bass e Johns relataram a necessidade de glicose para o sucesso de cultura de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. O nível de TNF sangüíneo também influencia a redução da glicemia, entretanto este sozinho não é suficiente, outras citocinas como IL-1 e IL-6 parecem atuar sinergicamente. As causas da hipoglicemia, entretanto ainda não foram completamente elucidadas e atualmente é considerada multifatorial (ELASED et. al., 1996).

Tolbert e McGhee (1960) observaram redução do nível da glicose sangüínea em ratos com diabetes induzido pelo aloxano e infectados pelo *Plasmodium berghei*.

Elased e colaboradores (1995) observaram que a infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS promoveu uma redução drástica da glicemia em camundongos com diabetes induzida pela streptozotocina (STZ). Estes resultados também foram observados pela inoculação de parasitos inativados, extratos ou produtos de *Plasmodium yoelli* e *Plasmodium chabaudi* tanto em camundongos com diabetes induzida pela STZ como nas linhagens de camundongos geneticamente diabéticos que simulam o diabetes do tipo 2 (C57BL/6J-ob/ob e C57BL/Ks-db/db) (ELASED et. al., 2000; ELASED et. al., 2001). Posteriormente, Elased e colaboradores (2004) observaram que a administração de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium yoelli* demonstrou atividade antidiabética em modelos animais do diabetes tipo 2. As GPIs, componentes essenciais da membrana plasmática presente nos *Plasmodium* sp., possuem um papel central na homeostase da glicose sangüínea, e uma vez totalmente caracterizada, as GPIs podem revelar informações importantes para a o desenvolvimento da síntese de novas drogas para o controle do diabetes.

No presente trabalho, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem NOD/Uni que desenvolvem espontaneamente o diabetes simulando, em diversos aspectos, o diabetes humano do tipo 1. Nesta linhagem, camundongos fêmeas apresentam maior porcentagem de expressão do diabetes (LEITER et. al., 1987). No grupo piloto de camundongos NOD/Uni mantido no CEMIB, em 2005, 74,7% das fêmeas expressaram o diabetes enquanto nos machos este valor foi de 41,3%.

Na maioria dos camundongos NOD/Uni infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR (52,34%) foi observada redução da glicemia. Esta redução ocorreu principalmente no pico da infecção, que ocorreu entre o sexto e oitavo dia de infecção, confirmando os resultados obtidos por Elased e colaboradores (1996).

A parasitemia observada nos camundongos NOD/Uni foi alta, em média 45,5% de eritrócitos parasitados no pico da infecção. Este valor foi maior nos camundongos com diabetes severa que apresentaram parasitemia média de 49,8% enquanto nos camundongos com diabetes moderada este valor foi de 36,8%. Nos camundongos BALB/c/Uni a parasitemia observada também foi alta. Elased e colaboradores (1995) também observaram uma alta parasitemia (50%) em camundongos com diabetes induzida pela STZ infectados pelo *Plasmodium chabaudi*. Garnical e colaboradores (2002) também observaram parasitemia elevada no pico da infecção, em torno de 50%, em camundongos BALB/c infectados pelo *P. chabaudi chabaudi* CR.

5.1. Histopatologia renal

Além da malária cerebral, um dos aspectos clínicos importantes que definem a malária severa causada pelo *Plasmodium falciparum* é a patologia renal (WHO, 1990).

As lesões renais (glomerulonefrite, nefrite, síndrome nefrótica) associadas à malária podem ser divididas em aguda e crônica. As lesões agudas caracterizam-se pelo desenvolvimento de anomalias urinárias e deposição de imunoglobulinas, complemento e antígenos no glomérulo a partir da segunda semana de infecção. Estas lesões são reversíveis e ocorrem principalmente na infecção pelo *P. falciparum*. As lesões descritas na infecção pelo *P. malariae* se desenvolvem lentamente e tendem a progredir para lesões crônicas, em adultos as lesões crônicas mais comuns são glomerulonefrite proliferativa, inchaço do tufo glomerular e proliferação das células endoteliais (HOUBA, 1979).

Na malária causada pelo *P. falciparum* as alterações glomerulares são: hiper celularidade glomerular, aumento das células endoteliais em tamanho e número, irregularidade na espessura da membrana basal, proliferação mesangial,

hipertrofia das células epiteliais com fusão dos podócitos e depósito de complexo imune (EL-SHOURA, 1994).

As lesões renais também podem ser observadas em infecções experimentais. Estudos histopatológicos em ratos infectados pelo *P. chabaudi* confirmaram a presença de glomerulonefrite com aumento e celularidade dos tufo glomerulares, inchaço do epitélio tubular principalmente entre o quinto e sétimo dia de infecção (MUSOKE et. al., 1977).

Vuong e colaboradores (1999) observaram congestão das alças glomerulares, hemorragia, edema, proliferação das células mesangiais, necrose e trombose glomerular, necrose tubular, necrose da cápsula de Bowman e infiltrado linfocítico em camundongos da linhagem Swiss OF1 infectados pelo *P. chabaudi chabaudi*.

No diabetes, a nefropatia diabética é uma complicação microvascular relativamente comum em ambos os tipos de diabetes. Clinicamente, ela é caracterizada pela presença de proteinúria persistente (>0,5g/24h). Histologicamente, lesões nodulares podem ser encontradas no glomérulo. Estes nódulos são massas consistentes e bem delimitadas, eosinofílicas e PAS-positivas localizadas nas regiões centrais dos lóbulos glomerulares. Quando não são acelulares, apresentam núcleos picnóticos e freqüentemente podem ser encontradas células com aspecto espumoso ao redor. Outras alterações histológicas encontradas são: lesão glomerular difusa, que pode ser caracterizada pelo aumento da área glomerular, espessamento da parede capilar e, em estágios mais avançados, fibrose periglomerular. Alguns estudos relatam a presença de glomeruloesclerose diabética em 90% dos pacientes com diabetes do tipo 1 e tempo de diabetes acima de 10 anos. No diabetes do tipo 2 essa prevalência é de 25-51%. Em indivíduos com diabetes do tipo 1 o aumento no volume glomerular pode ser observado em 1 a 6 anos após o diagnóstico da doença. Os túbulos renais podem apresentar uma grande variedade de mudanças não específicas e semelhantes às encontradas em outras doenças renais progressivas (VIBERTI et. al., 1994).

No entanto, alguns pacientes com diabetes do tipo 1 não desenvolvem lesão renal mesmo após muitos anos de expressão da doença, independente do controle glicêmico. Por outro lado, algumas pessoas apresentam nefropatia diabética poucos anos após a presença do diabetes, muitas vezes somente com uma leve elevação do nível de glicose sanguínea (ROSENSTOCK e RASKIN, 1989).

Alguns estudos relatam que a maior prevalência da nefropatia diabética ocorre após 20 a 25 anos de diabetes e declina subsequente em torno de 10% em paciente que sofrem de diabetes por 40 anos ou mais. Após o estabelecimento da proteinúria, o estágio terminal de falência renal se desenvolve em aproximadamente 25% dos pacientes em seis anos, em 50% dos pacientes em 10 anos e em 75% em 15 anos. No entanto alterações patológicas ocorrem no glomérulo sem que haja manifestações clínicas (ROSENSTOCK e RASKIN, 1989).

O papel do controle da glicemia no desenvolvimento da nefropatia diabética tem sido estudado em modelos experimentais. Algumas evidências sugerem fortemente que um ambiente metabólico anormal tem um papel importante na gênese da nefropatia diabética. Estudos mostram que a melhora ou a normalização do meio metabólico em diabetes experimental pode prevenir, retardar ou até mesmo reverter algumas lesões microvasculares semelhantes às observadas em humanos (ROSENSTOCK e RASKIN, 1989).

As mudanças estruturais no glomérulo, conhecida como glomerulopatia diabética, é o aspecto que mais tem chamado atenção na nefropatia diabética. As alterações fundamentais são aumento da espessura da membrana basal e expansão mesangial com acúmulo de matriz (BANSTAD et. al., 2000). Estas alterações podem ser particularmente bem observadas em cortes com coloração de PAS ou prata (OLSEN, 2000).

As principais alterações renais observadas no diabetes são: hipertrofia glomerular, aumento da espessura da membrana basal, danos estruturais

relacionados à excreção de albumina e finalmente, danos estruturais avançados (MOGENSEN, 2000).

Estudos histoquímicos demonstraram que as alterações na matriz mesangial nas lesões nodulares em pacientes diabéticos ocorrem devido ao acúmulo de colágenos dos tipos I, III e principalmente tipo VI, além do componente original, o colágeno do tipo IV (NISHI, 2000). Em indivíduos com nefropatia diabética a membrana basal do glomérulo pode aumentar de 2 a 10 vezes a espessura normal (HOSTETTER e DANIELS, 1989). Também pode ser observado um aumento do número de células na região periférica do glomérulo (NISHI, 2000).

Em ratos com diabetes induzido pela STZ é possível observar um período inicial de hiperplasia das células renais seguido de um período hipertrófico (ZHANG et. al., 2007).

Camundongos diabéticos db/db apresentam um expressivo aumento de albuminúria e expansão da matriz mesangial (SHARMA et. al., 2003).

O diabetes em camundongos da linhagem NOD é caracterizado histologicamente pela presença de infiltrado linfocitário nas ilhotas pancreáticas (insulite) a partir da quarta semana de vida, bem antes do estabelecimento do diabetes clínico que ocorre em torno da 15ª semana de vida (HANAFUSA e TARUI, 1990). Nesta linhagem, hipertrofia renal e lesão glomerular também podem ser observadas nos estágios iniciais do aparecimento do diabetes e alterações estruturais nos túbulos proximais no estágio mais avançado da fase aguda (MAEDA et. al., 2003).

Doi e colaboradores (1990) observaram, em camundongos NOD, aumento da área glomerular independente da duração da glicemia, esclerose mesangial, glomeruloesclerose e proteinúria. Os dados observados na Tabela 3 confirmam a presença de alterações renais em indivíduos com diferentes tempos de glicemia positiva.

A espessura da membrana basal nos camundongos NOD/Uni observada neste trabalho foi significativamente maior que nos camundongos BALB/c sadios,

confirmando os dados descritos acima. No entanto, não houve diferença significativa no espessamento da membrana basal do glomérulo entre camundongos NOD/Uni infectados e não infectados.

As alterações renais observadas foram: edema, infiltração glomerular, descamação e dilatação dos túbulos contorcidos. A presença de núcleos picnóticos indicativo do processo de necrose e glomérulos necrosados foi encontrada em menor freqüência.

No que diz respeito às alterações histológicas nos camundongos da linhagem NOD/Uni não foi possível observar a influência da infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR pois os camundongos NOD/Uni não infectados também apresentaram lesões renais similares.

5.2. Mortalidade

Andrade (2003) observou que a infecção por *Schistosoma mansoni* promoveu aumento da sobrevivência de camundongos NOD/Uni quando comparado com camundongos desta mesma linhagem sem infecção. Neste caso a alteração entre o balanço Th1/Th2 parece influenciar na mortalidade dos animais (ANDRADE, 2003).

As infecções parasitárias são caracterizadas pela habilidade do parasita em induzir uma resposta imunoregulatória do hospedeiro de maneira a impedir que este seja eliminado, podendo alterar o equilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2 (TAVERNE e BRADLEY, 1999).

Em camundongos da linhagem NOD pré diabéticos, infecções por helmintos e bactéria parecem inibir o diabetes do tipo 1 através da interrupção do mecanismo que leva à destruição, mediada pelas células Th1, das células beta produtoras de insulina. A interleucina 10 (IL-10) produzida pelas células Th2 tem

sido associada a uma resposta regulatória responsável pela proteção contra o diabetes (SAUNDERS et. al. 2007).

A infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS em camundongos da linhagem BALB/c é normalmente caracterizada pela mudança da resposta dos linfócitos T-helper. Durante a primeira semana da infecção observa-se uma resposta Th1, caracterizada pela produção de interferon gama e interleucina 2 (IL-2) seguida por uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 e anticorpos. Esta mudança na resposta Th é observada geralmente no momento do pico da infecção (HELMBY ET. AL., 2000).

Estudos mostram que infecções bacterianas podem induzir a mudança da resposta Th1 para Th2 em camundongos da linhagem NOD influenciando no aparecimento e evolução do diabetes. No entanto, esta mudança na resposta das células T pode ser uma simplificação de um complexo mecanismo regulatório (COHEN, 1997).

No presente trabalho foi observada maior sobrevida nos camundongos NOD/Uni infectados em relação aos camundongos desta linhagem não infectados. Os animais que foram infectados após um tempo maior de expressão do diabetes sobreviveram somente até a fase aguda da infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR (7-8 dias após infecção). Em animais cujo tempo entre a expressão do diabetes e a infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR foi menor, o tempo de sobrevivência após a infecção foi de 43 dias em média.

A prevenção do diabetes em modelos animais por agentes infecciosos como helmintos, bactérias e vírus pode estar relacionada à hipótese higiênica que postula que o aumento da incidência de doenças auto imunes como o diabetes em países desenvolvidos é resultado da diminuição da exposição a agentes infecciosos. Os mecanismos de ação podem variar desde a indução de células T regulatórias à alteração das células T diabetogênicas circulantes (SAUNDERS et. al. 2007).

Finalmente, é importante salientar que a influência da infecção pelo protozoário causador da malária murina *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR no

comportamento glicêmico após o aparecimento do diabetes em camundongos fêmeos NOD/Uni pôde ser observada pela primeira vez no presente trabalho. Contudo os mecanismos envolvidos nas alterações do comportamento glicêmico desta linhagem ainda não foram completamente elucidados.

6. Conclusão

- A infecção pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR promoveu redução da glicemia na maioria dos camundongos fêmeos da linhagem NOD/Uni durante o pico da infecção.
- Os camundongos da linhagem NOD/Uni apresentaram parasitemia elevada, principalmente em camundongos com diabetes severa.
- As principais lesões renais observadas foram: edema, infiltração glomerular, descamação e dilatação dos túbulos contorcidos e necrose glomerular.
- Foi possível observar espessamento da membrana basal glomerular nos camundongos NOD/Uni. Porém não houve diferença entre os camundongos NOD/Uni com infecção e sem infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* linhagem CR.
- A infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* CR promoveu maior sobrevivência nos camundongos da linhagem NOD/Uni em relação aos camundongos pertencentes ao grupo piloto desta mesma linhagem mantidos no CEMIB.

7. Referências

ADORINI, L.; GREGORI, S.; HARRISON, L. C. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p.31-38, 2002.

ALSAAD, K. O.; HERZENBERG, A. M. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. **Journal of Clinical Pathology**, v.60, p.18-26, 2007.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: A model of immune dysregulation. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.441-485, 2005.

ANDRADE JUNIOR, 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 of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 1209-1218, 1991.

ANDRADE, L. A. G. **Esquistossomose mansônica em camundongos NOD/Uni (non-obese diabetic), modelo do diabetes mellitus tipo 1**. 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ASHLEY, E.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NOSTEN, F. Malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.4, p.159-173, 2006.

BANGSTAD, H. J.; RUDBERG, S.; OSTERBY, R. Renal structural changes in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria. In: MOGENSEN, C. E. **The kidney and hypertension in diabetes mellitus**. 5 ed. Kluwer Academic Publishers, cap. 18, p. 211-223, 2000.

BARSOUM, R. S. Malarial nephropathies. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.13, p. 1588-1597, 1998.

BASS, C. C.; JOHNS, F. M. The cultivation of malarial plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v.16, p.567-579, 1912.

BAXTER, A. G.; MANDEL, T. E. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. **European Journal of Immunology**, v. 21, p. 2051-2055, 1991.

BHAMARAPRAVATI, N.; BOONPUCKNAVIQ, S.; BOONPUCKNAVIQ, V.; YAEMBOONRUANQ, C. Glomerular changes in acute plasmodium falciparum infection. A immunopathologic study. **Archives of Pathology**, v.96, p.289-293, 1973.

CARTER, R.; DIGGS, C. L. Plasmodia of Rodents. In: **Parasitic Protozoa**. Ed.J.P.Kreier v.3, cap.8, p. 359-465, 1977.

CHANG, K. H.; STEVENSON, M. M. Effect of anemia and renal cytokine production on erythropoietin production during blood-stage malaria. **Kidney International**, v.65, p. 1640-1646, 2004.

DAMIANI, D. Critérios diagnósticos no diabetes mellitus. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.4, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302000000400023. Acesso em 25 Nov 2007.

DAVIS, T. M. E.; BROWN A. E.; SMITH C. D. Metabolic disturbances in *Plasmodium coatneyi*-infected *Rhesus* monkeys. **International Journal for Parasitology**, v. 23, p. 557-563, 1993.

DOI, T.; HATTORI, M.; AGODOA, L. Y.; SATO, T.; YOSHIDA, H.; STRIKER, L. J.; STRIKER, G. E. Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after the onset of hyperglycemia. **Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology**, v.63, p.204-212, 1990.

DUVIC, C.; RABAR, D.; DIDELOT, F.; NEDELEC, G. Acute renal failure during severe malaria: physiopathology and therapeutic management. A propos of 2 cases. **Medecine Tropicale (Marseilles)**, v. 60, n. 3, p. 267-270, 2000.

EHRICH, J. C.; STERZEL, R. B.; DEICHER, H. R.; FOELLMER, H. G. Rat malarial glomerulonephritis. An experimental model of post-infectious glomerular injury. **Virchows Archive B: Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 37, n. 3, p. 343-356, 1981.

ELASED, K. M.; SOUZA, J. B.; PLAYFAIR, J. H. L. Blood-stage malaria infection in diabetic mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 99, p. 440-444, 1995.

ELASED, K. M.; TAVERNE, J.; PLAYFAIR, J. H. L. Malaria, blood glucose, and the role of tumour necrosis factor (TNF) in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, p. 443-449, 1996.

ELASED, K. M.; SOUZA, J. B.; PLAYFAIR, J. H. L. Reversal of Type 2 diabetes in mice by products of malaria parasites – I. Effect of inactivated parasites. **Metabolism**, v. 49, p. 937-941, 2000.

ELASED, K. M.; GUMAA, K. A.; SOUZA, J. B.; RAHMOUNE, J. H. L.; PLAYFAIR, J. H. L.; RADEMACHER, T. W. Reversal of Type 2 diabetes in mice by products of malaria parasites – II. Role of Inositol Phosphoglycans (IPGs). **Molecular Genetics and Metabolism**, v.73, p. 248-258, 2001.

ELASED, K. M.; GUMAA, K. A.; SOUZA, J. B.; PLAYFAIR, J. H. L.; RADEMACHER, T. W. Improvement of glucose homeostasis in obese diabetic *db/db* mice given *Plasmodium yoelii* glycosylphosphatidylinositols. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v.53, p. 1048-1053, 2004.

ELLIS, R. **PAS Diastase Staining Protocol**. Disponível em: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/pas_diastase_ellis.htm. Acesso em 28 Set 2007.

GARNICAL, M. R; SOUTO, J. T; SILVA, J. S; ANDRADE JUNIOR, H. F. Stromal cell derived 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, p. 47-53, 2002.

GREENWOOD, B. M. & VOLLER, A. Suppression of autoimmune disease in New Zealand mice associated with infection with malaria. I. (NZBxNZW) F1 hybrid mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 7, n. 6, p. 793-803, 1970.

HAGEMAN, I; BUSCHARD, K. Diabetic animal models. In:**Handbook of Laboratory Animal Science: Animal models**, v.2, CRC Press, cap.10, p.103-125, 1994.

HANAFUSA, T.; TARUI, S. Immune pathogenesis of diabetes in the nonobese diabetic mouse: an overview. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.156, p.15-25, 1990.

HELMBY, H; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in spleen and peripheral blood of mice with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. **Infection and Immunity**, v.68, p.1485-1490, 2000.

HOSTETTER, T. H; DANIELS, B. S. Natural history of renal structural abnormalities in diabetes mellitus. In: BRENNER, B. M.; STEIN, J. H. **The kidney in diabetes mellitus**. 1 ed. Churchill Livingstone Inc., cap. 3, p. 51-65, 1989.

HOUBA, V. Immunologic aspects of renal lesions associated with malaria. **Kidney International**, v. 16, p. 3-8, 1979.

IKEGAMI, H; OGIHARA, T. Genetics of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Endocrine Journal**, v. 43, p. 605-613, 1996.

KIBUKAMUSOKE, J. W.; HUTT, M. S. R. Histological features of the nephrotic syndrome associated with quartan malaria. **Journal of Clinical Pathology**, v. 20, p.117-123, 1967.

KING, H; AUBERT, R. E; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1414-1431, 1998.

LEITER, E. H.; PROCHAZKA, M.; COLEMAN, D. L. The Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse. **American Journal of Pathology**, v.128, p. 380-383, 1987.

MAEDA, M.; YABUKI, A.; SUZUKI, S.; MATSUMOTO, M.; TANIGUCHI, K.; NISHINAKAGAWA, H. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. **Veterinary Pathology**, v.40, p.187-195, 2003.

MENENDEZ, C.; FLEMING, A. F.; ALONSO P. L. Malaria-related Anaemia. **Parasitology Today**, v.16, n. 11, p. 469-476, 2000.

MOGENSEN, C. E. Definition of diabetic renal disease in insulin dependent diabetes mellitus based on renal function tests. In: _____. **The kidney and hypertension in diabetes mellitus**. 5 ed. Kluwer Academic Publishers, cap. 2, p. 13-28, 2000.

MOTTA, F. M. B. **A malária experimental por *Plasmodium chabaudi chabaudi* em camundongo SCID**. 2003. 45f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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, p. 1081-1088, 1977.

NGUANSANGIAM, S.; DAY, N. P. J.; HIEN, T. T.; MAI, N. T. H.; CHAISRI, U.; RIGANTI, M.; DONDORP, A. M. O.; LEE, S. J. O.; PHU, N. H. O.; TURNER, G. D. H. O.; WHITE, N. J.; FERGUSIN, D. J. P.; PONGPONRATN, E. A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. **Tropical Medicine and International Health**, v.12, p. 1037-1050, 2007.

OLSEN, S. Light microscopy of diabetic glomerulopathy: the classic lesions. In: MOGENSEN, C. E. **The kidney and hypertension in diabetes mellitus**. 5 ed. Kluwer Academic Publishers, cap. 17, p. 201-210, 2000.

PRAKASH, J.; SINGH, A. K.; KUMAR, N. S.; SAXENA, R. K. Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 51, p. 265-257, 2003.

ROSENSTOCK, J.; RASKIN, P. Relationship of diabetic nephropathy to glycemic control. In: BRENNER, B. M.; STEIN, J. H. **The kidney in diabetes mellitus**. 1 ed. Churchill Livingstone Inc., cap. 1, p. 1-17, 1989.

ROSSINI, A. A.; HANDLER, E. S.; MORDES, J. P.; GREINER, D. L. Animal models of human disease – Human autoimmune Diabetes Mellitus: Lessons from BB rats and NOD mice – Caveat Emptor. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 74, p.2-9, 1995.

SAUNDERS, K. A. RAINE, T.; COOKE, A.; LAWRENCE, C. E. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. **Infection and Immunity**, v.75, p.397-407, 2007.

SHARMA, K.; MCCUE, P.; DUNN, S. R. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v.284, p.F1138-1144, 2003.

SHINICHI, N.; MITSUHIRO, U.; SHIMADA, H.; NORIAKI, I.; SEITAROU, I.; YUKO, O.; NAOFUMI, I.; MASAACKI, A.; FUMITAKE, G. Ultrastructural characteristics of diabetic nephropathy. **Medical Electron Microscopy**, v.33, p.65-73, 2000.

SILVA, R. C.; DIB, S. A. Patogênese e prevenção do diabetes mellitus tipo 1. In. **Diabetes mellitus**, v. 3, Editora Médica e Científica, p. 349-361, 2001.

SILVEIRA, A. C.; RESENDE, D. F. **OPAS Avaliação da Estratégia Global de Controle Integrado da Malária no Brasil**, OPAS. 2001. Disponível em: <http://www.opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=42>. Acesso em 31 Ago 2006.

STEVENSON, M. M; LYANGA, J. J; SKAMENE, E. Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. **Infection and Immunity**, v. 38, p. 80-88, 1982.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. Glomerulonephritis and nephrotic syndrome in *Plasmodium chabaudi chabaudi*: a potential murine model of chronic *P. malariae* infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 90, p. 635-637, 1996.

TISCH, R; MCDEVITT, H. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Cell**, v. 85, p. 291-297, 1996.

TOLBERT, M. G; MCGHEE, R. B. The effect of alloxan diabetes on *Plasmodium berghei* infection in albino rats. **The Journal of Parasitology**, v. 46, p.552-558, 1960.

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 malaria infection. **Parasitology**, v. 119, p. 543-553, 1999.

WANDERLEY, D. M. V; CIARAVOLO, R. M. C; BARBOSA, G. L; SPÍNOLA, R; LEITE, R. M. Malária no Estado de São Paulo: Aspectos da Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 3, 2006 [*Boletim on-line*]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa32_malaria.htm. Acesso em 30 Nov 2007.

WHO - World Health Organization. Severe and complicated malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, supl. 2, p. 1-65, 1990.

WHO - World Health Organization - Diabetes Action Online. 1999. Disponível em: <http://www.who.int/diabetesactiononline/diabetes/basics/en/index.html>. Acesso em 21 Nov 07.

WHO - World Health Organization – Malaria, Fact sheet nº 94. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Acesso em 22 Nov 2007.

ZHANG, Y.; SHI, Y.; LIU, Y.; DONG, H.; LIU, M.; LI, Y.; DUAN, H. Growth pattern switch of renal cells and expression of cell cycle related proteins at the early stage of diabetic nephropathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.363, p.159-164, 2007.