

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
E IMUNOLOGIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE  
BAÇOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM  
CORONAVÍRUS

EDSON DELGADO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas, área de  
Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maria F. de Araújo

Campinas - SP  
1997



Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato a)  
Edson Delgado Rodri -  
guez  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
08/09/97 PMA

000 000 449

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	R.619a		
V.	Ex		
TOMBO BC/	39.906		
PROC.	278/00		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	12/02/00		
N.º CPD			

CM-00130609-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Rodrigues, Edson Delgado**

R619a Aspectos imunológicos e histológicos de baços de camundongos infectados com coronavírus/ Edson Delgado Rodrigues. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.....  
70f. ilus.

Orientador: Paulo Maria Ferreira de Araújo  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Imunologia. 2. Infecção 3. Vírus. I. Araújo, Paulo Maria Ferreira de. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 18 de agosto de 1997

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

Prof. Dr. Paulo Maria F. de Araújo (orientador)



assinatura

Prof. Dr. Irineu José B. de Camargo



assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da S.C. Tamashiro



assinatura

**SUPLENTE:**

Profa. Dra. Júlia K. Sakurada



assinatura

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissionais de Ensino Superior (CAPES).

*Para minha companheira,  
SUZANA,  
por tudo*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria F. de Araújo, pela orientação e amizade.

Aos Profs. Drs. Irineu J.B. de Camargo, Wirla Maria da S.C. Tamashiro, Júlia K. Sakurada e Sílvia Maria V. Gatti, pela análise prévia do trabalho.

À Cristina, Daniele, Dirce e Isaias, pelo auxílio técnico e amizade.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelas informações obtidas na sala de aula.

Ao CNPq e à CAPES, pelo auxílio financeira.

Agradeço ainda a todos os amigos deste departamento e desta universidade pelo constante apoio e carinho.

## ÍNDICE

Introdução, 01

Objetivos, 16

Material e Métodos, 17

Resultados, 23

Discussão, 43

Conclusões, 50

Resumo, 51

Bibliografia, 52

Anexos, 65

## LISTA DE ABREVIATURAS

S.I. - Sistema Imunológico

P.F.C. - Células formadoras de placas ou secretoras de imunoglobulinas

d.p.i. - dias pós-infecção

S.P.F. - Livre de patógenos específicos

DEAE -Dextran - Dietilaminoetil-Dextran

PBS - Solução tampão de fosfato

BSS - Solução salina tamponada

IgT - Imunoglobulinas totais (somatória de classes)

MHV - *Murine hepatitis virus*

PVM - *Pneumonia virus of mice*

MVM - *Minute virus of mice*

ROPV - *Rodent orphan parvovirus*

TMEV-GD/7 - *Theiler's mouse encephalomyelitis virus* cepa GD/7

LCMV - *Lymphocytic choriomeningitis virus*

REO-3 - *Reovirus*

MCMV - *Mouse cytomegalovirus*

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

Laboratórios em diferentes países desenvolvem pesquisas imunológicas envolvendo doenças parasitárias de importância para a saúde pública. Em vários momentos são utilizados animais de laboratório como modelos experimentais ou para a obtenção de reagentes biológicos de uso diverso. Entretanto, a utilização de animais convencionais na pesquisa laboratorial pode contar com a presença inconveniente de diferentes patógenos naturais da população murina (FOSTER *et al.*, 1982; SMITH *et al.*, 1983; BIA *et al.*, 1980; CARRANO *et al.*, 1984). Essas infecções muitas vezes são de difícil detecção e podem mascarar respostas biológicas dos animais em experimentação. A condição sanitária do modelo animal, portanto, é um fator determinante para a obtenção de resultados adequados na pesquisa biomédica (MELBY & BALK, 1983). Este é um problema de caráter multidisciplinar, afetando diferentes modelos experimentais que utilizam animais de laboratório.

A Tripanosomíase Americana é uma dessas doenças de interesse da saúde pública uma vez que retira do mercado formal pessoas em idade produtiva devido às alterações cardíacas e gástricas da fase crônica, justificando assim a pesquisa na área com a necessária utilização de animais. Causador do Mal de Chagas, o agente protozoário *Trypanosoma cruzi*, é usualmente mantido por passagens seriadas de sangue fresco contaminado para camundongos *naive*. Nesses estudos experimentais da Doença de Chagas, camundongos de diferentes linhagens são empregados como importantes modelos, em especial para a fase aguda desta patologia humana (W.H.O., 1977; BRENER, 1980). Quando infectados pelo parasita estes animais desenvolvem uma fase aguda, onde podemos detectar altos níveis do parasita no sangue circulante (BRENER, 1980). Em linhagens de camundongos resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, pode haver o estabelecimento inclusive de uma fase crônica irreversível caracterizada por um extenso parasitismo em tecidos do hospedeiro e uma impossibilidade de detecção dos parasitas circulantes no sangue através de métodos diretos (ANDRADE, 1991).

Considerando-se a forma mencionada de como o protozoário vem sendo mantido ao longo dos anos em laboratório, é possível que estoques de cepas de *T. cruzi* mantidos somente por transmissão entre diferentes lotes de camundongos estejam contaminadas com um ou mais patógenos endógenos. De fato, cepas Y (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e CL (BRENER & CHIARI, 1963) de *T. cruzi*, originalmente mantidas desta forma em nosso Departamento, foram demonstradas estar contaminadas pois causavam um aumento da patogenicidade do parasita e alteração da resposta imune do hospedeiro. A saber, estudos realizados por RANGEL *et al.* (1994) demonstraram a presença de um vírus murino nestas condições, contaminando cepas de *T. cruzi*. Animais infectados com estoques originais do parasita demonstravam maiores níveis de parasitemia e menor tempo de sobrevivência que aqueles infectados com estoques obtidos em cultura de células. Estoques do parasita previamente passados em cultura de células ou em meio axênico estão livres da partícula viral. Plasma sanguíneo retirado destes animais indicaram a presença de um fator filtrável, hábil em aumentar a parasitemia e diminuir o tempo de sobrevivência de animais infectados com estoques de cultura. Testes sorológicos indicaram a presença de uma partícula viral nestes plasmas, os quais podiam ser inativados através de aquecimento. Esta partícula, provisoriamente designada vírus-X, demonstrou sua ação letal em experimentos com camundongos BALB/c de 4 semanas de idade.

*Map tests* realizados com plasma de animais infectados foram negativos na pesquisa de anticorpos contra uma bateria de antígenos, entre eles *Mouse Hepatitis Virus 3* (MHV-3), *Theiler Mouse Encephalomyelitis Virus* cepa GDVII (TMEV-GDVII), *Pneumonia Virus of Mice* (PVM), *Sendai virus*, *Minute Virus of Mice* (MVM), *Vaccinia*, *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV), *Mouse Adenovirus*, *Polyoma Virus*, *K-Virus*, *Reovirus* (Reo-3), *Mouse Cytomegalovirus* (MCMV), *Rotavirus* e *Lactate Dehydrogenase-elevating Virus* (LDHV). Imunossoros contendo anticorpos anti-X promoveram a diminuição dos níveis de parasitemia e aumento na sobrevivência de camundongos CBA/J inoculados com estoques originais do *T. cruzi*. Resultados intermediários, em menor intensidade, foram obtidos com a administração de imunossoros contendo anticorpos anti-MHV-3, indicando uma reatividade cruzada entre moléculas do vírus-X e o MHV-3. Estes fatos sugerem que o vírus-X é um coronavírus do grupo MHV com sorologia distinta, apesar da reação cruzada com o MHV-3. Esta interpretação acompanha o fato de que coronavírus murinos são na verdade uma grande família viral, com relações antigênicas e genéticas complexas (BARTHOLD &

SMITH, 1984; BARTHOLD, 1986). Atualmente, o vírus-X é também designado MHV-CAM ou simplesmente coronavírus, como adotamos neste estudo.

Embora algumas viroses possam infectar protozoários e alterar algumas de suas características biológicas (WANG & WANG, 1991), é improvável que o coronavírus encontrado nos estoques originais do *T. cruzi* tenha uma ação direta sobre o parasita, desde que o vírus-X manteve suas características após passagens seriadas em camundongos livres do protozoário. A partícula viral deve agir diretamente no sistema imune do camundongo, como já foi observado em outras viroses murinas (FALLON *et al.*, 1991; JOLICOUER & LAMONTAGNE, 1989; SMITH *et al.*, 1991a).

A ocorrência de diferentes manifestações patológicas associadas à infecção pelo *T. cruzi* pode ser parcialmente creditada às características típicas das sub-populações isoladas do parasita. Realmente, diferentes cepas do parasita apresentam variações significativas quanto à morfologia, tropismo, letalidade e antigenicidade. Tais características devem ser fundamentais para determinar o curso da doença, em associação com as propriedades genéticas, imunológicas e biológicas do hospedeiro, como linhagem, idade, sexo, estado sanitário.

Igualmente, infecções associadas ao parasitismo do *T. cruzi* podem determinar uma alteração dos resultados experimentais, através de diferentes processos de imunomodulação (SMITH *et al.*, 1992; FUJIWARA & WAGNER, 1994). Alguns trabalhos indicam que fenômenos de imunossupressão podem estar presentes na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Os mecanismos envolvidos nesta supressão da resposta imune são de complexidade multifatorial, envolvendo diferentes órgãos e células (LAFAILLE *et al.*, 1990), grau de expressão de receptores (KIERSZENBAUM *et al.*, 1991), produção de interleucinas (SOONG & TARLETON, 1992) e fenômenos desconhecidos, já que a compreensão deste tema é incompleta.

Como a manutenção dos estoques de *T. cruzi* nos laboratórios de pesquisa é feita, via de regra, através de repiques periódicos de camundongos, patógenos típicos da população murina estão sendo transferidos. A presença sub-clínica destes patógenos pode trazer alterações variadas aos resultados experimentais, indicando que alguns dados obtidos devem ser interpretados com cautela. Diante deste quadro, parece conveniente estudar os efeitos causados pela infecção do MHV na biologia de camundongos de laboratório usados na pesquisa da Tripanosomíase Americana.

Os coronavírus foram reconhecidos e definidos primeiramente por TYRREL *et al.* (1968) como um grupo de partículas virais pleomórficas, geralmente esféricas, com típicas projeções

espiculares, os peplômeros. Estes vírus são de ampla distribuição natural, estando associados à diferentes doenças. A família Coronaviridae, da qual faz parte o Murine Hepatitis Virus (MHV), engloba um conjunto de agentes patológicos de grande interesse biomédico e veterinário, causadores de doenças que variam desde manifestações sub-clínicas até rinite, enterite, hepatite, encefalite e morte (WEGE *et al.*, 1982).

Os membros do grupo coronavírus podem ser classificados através de suas relações antigênicas. Apesar do conhecimento incompleto neste campo, existem aparentemente dois grupos antigenicamente não relacionados, os chamados coronavírus aviários e não-aviários. Nos Anexos I e II mostramos uma tabela sinóptica destas relações antigênicas bem como a manifestação clínica predominante no hospedeiro. Os coronavírus são pantrópicos, causando doenças nos Sistemas Respiratório e Gastro-Intestinal ou em múltiplos órgãos.

A localização dos sítios antigênicos dos coronavírus tem sido estudada. Nos sistemas humano, suíno e murino os sítios antigênicos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão associados principalmente às glicoproteínas de superfície, os chamados peplômeros. Essas glicoproteínas participam como moléculas antigênicas nos testes laboratoriais de fixação do Sistema Complemento e Inibição de Hemaglutinação (WEGE *et al.*, 1982).

Além do interesse pela biologia natural deste grupamento viral e suas implicações com as diferentes colônias de camundongos usados em pesquisa, o estudo dos coronavírus pode apresentar algum impacto em áreas diversas como, por exemplo, na Oncologia, onde o vírus geralmente compromete protocolos de transplantação de tumores (COMPTON *et al.*, 1993).

Os coronavírus compõem um grupo de RNA-virus de fita simples, envelopados, com 120-160nm de diâmetro e pleomórficos. O RNA é poliadenilatado e encapsulado, variando entre 27 e 31Kb. O RNA genômico purificado permanece infeccioso, sendo considerado "positive-sense" (ST. SIDDEL *et al.*, 1982; COMPTON *et al.*, 1993). São vírus que apresentam de 3-4 proteínas estruturais, entre elas a Proteína do nucleocapsídeo (N/ proteína fosforilada com 50-60K) que inclui o genoma. O nucleocapsídeo é, por sua vez, envolvido por um envelope com 2-3 glicoproteínas virais. A Proteína Integral de Membrana (M ou E1/ 30-35K), como uma glicoproteína altamente conservada em sua estrutura primária que estabelece uma ligação entre o nucleocapsídeo e o envelope. A Proteína Spike (S ou E2/ 180-220K) formadora dos peplômeros ou projeções espiculares típicas dos coronavírus, são as principais estruturas antigênicas presentes, determinando

respostas de caráter humoral e celular. Anticorpo monoclonal anti-S inibe a infectividade do vírus. A proteína S pode ser clivada naturalmente por tripsina formando duas subunidades de 90K (S1 e S2). Esta clivagem parece não ser essencial para a infectividade viral e sua função na patogênese é obscura. Proteína HE (E3/ 65K), um dímero presente no envelope de algumas linhagens virais com aparente atividade de hemaglutinina e esterase, além de possibilitar uma segunda alternativa para interações ao nível do envelope viral. Apesar disso, sua função na patologia é incerta (SPAAN *et al.*, 1988; LAI *et al.*, 1990; COMPTON *et al.*, 1993).

Iniciam a infecção geralmente através da interação das proteínas S com receptores específicos nas células-alvo. A fusão viral deve se estabelecer entre seu envelope e as membranas celulares e sub-celulares. Todo o ciclo de multiplicação viral ocorre no citoplasma da célula infectada, sendo desnecessárias funções nucleares diretas. Após a penetração ocorre uma translação primária do genoma para a formação de polimerase viral e elaboração de RNAs sub-genômicos, que formarão as proteínas estruturais e não-estruturais das novas partículas através de translações secundárias. A taxa de recombinação genética nos coronavírus é bastante alta, condicionando uma constante alteração molecular típica nestes vírus (LAI *et al.*, 1990). Novas partículas virais completas devem ser liberadas por exocitose e/ou citólise, permitindo novas infecções (HOLMES, 1990; COMPTON *et al.*, 1993). É possível liberar novas partículas virais artificialmente, submetendo o meio de cultura infectado a congelamentos e degelos. O ciclo completo do MHV deve durar em torno de dez a doze horas após a infecção da célula, em uma temperatura próxima de 37° C. As infecções por coronavírus geralmente determinam alterações citopáticas, mais frequentemente a vacuolação e consequente desintegração celular ou a formação de sincícios em alguns casos (ST. SIDDELL *et al.*, 1982).

A rota natural de infecção é oronasal, estando associada a um quadro da biologia comum dos camundongos, inclusive os de laboratório. Um quadro agudo ocorre quando se inocula camundongos imunocompetentes por essa via, sem evidência de qualquer persistência ou latência (COMPTON *et al.*, 1993). Tais infecções são geralmente sub-clínicas, mas doença clínica pode ser ativada por co-infecções com vírus da leucemia murina ou agentes protozoários (WEGE *et al.*, 1982). Alguns estudos indicam que a replicação viral pode alterar a função imune de maneira variada e, até certo ponto, imprevisível (SMITH *et al.*, 1992).

MHV é um coronavírus contagioso que infecta camundongos mantidos em laboratório com alta frequência (CARTHEW *et al.*, 1978; KRAFT & MEYER, 1986). A transmissão de MHV para linhagens susceptíveis pode ocorrer naturalmente através de fezes e urina. Transmissão vertical por infecção intra-uterina foi verificada com MHV-JHM (KATAMI *et al.*, 1978). No campo da Imunologia, a infecção pelo MHV parece estar associada à alterações dos mecanismos de imunomodulação (BOORMAN *et al.*, 1982; CASEBOLT *et al.*, 1987; de SOUZA & SMITH, 1991; de SOUZA *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1983, 1987, 1991a/b).

As doenças causadas por tais infecções são geralmente hepatites, encefalomyelites e enterites (WEGE *et al.* 1982). MHV-1, MHV-3, MHV-A59 e MHV-JHM (considerados modelos-protótipo dos coronavírus) e outros sorotipos infectam a mucosa respiratória superior e a partir daí diferentes órgãos e tecidos, como a mucosa e o endotélio vascular respiratório, cérebro, medula óssea, timo, linfonodo, baço, tecido linfóide associado a mucosa (MALT), fígado, útero, placenta, peritônio e outros (COMPTON *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de doenças causadas por MHV depende das propriedades biológicas do vírus, tais como virulência e organotropismo, da susceptibilidade, idade e condições sanitárias do hospedeiro, da dose e da rota de inoculação utilizada, entre outros fatores. Camundongos imunocomprometidos por tratamentos químicos e físicos desenvolveram um quadro clínico severo com alta mortalidade após infecção com MHV. O tipo da doença pode variar de uma infecção inaparente até manifestações clínicas entéricas, respiratórias, hepáticas e encefálicas, ocasionalmente determinando a morte do indivíduo (COMPTON *et al.*, 1993).

Camundongos BALB/c são considerados susceptíveis para o MHV-JHM, enquanto a linhagem SJL é considerada resistente. Em BALB/c, foi verificado que o MHV-JHM infecta naturalmente pela rota oronasal, sendo drenado pelo sangue e linfáticos locais para multiplicar-se no endotélio vascular pulmonar. Ocorre então uma viremia secundária em múltiplos órgãos. Camundongos BALB/c jovens mostraram-se mais susceptíveis, com maior taxa de mortalidade. Como outras linhagens susceptíveis, camundongos BALB/c demonstram uma breve supressão da função de células T como consequência da infecção com MHV-JHM por rota natural (de SOUZA & SMITH, 1991; de SOUZA *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1987, 1991b). Camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com MHV-JHM apresentaram uma moderada hepatite que culmina ao 7<sup>o</sup> dpi, quando também se estabelece uma soroconversão. Dados acumulados suportam a noção de que

a replicação viral ou a exposição para maiores quantidades do antígeno são requisitos para a indução de resposta humoral detectável (SMITH *et al.*, 1992). Camundongos SJL mostraram-se resistentes nestas condições experimentais, com manifestações menos severas e rápida recuperação.

Cruzamentos genéticos entre camundongos C3H (resistentes) com PRI (susceptíveis) demonstraram que a resistência à infecção pelo MHV deve ser controlada por um gene autossômico recessivo. Em sistemas utilizando o MHV-2 a resistência dos hospedeiros ao parasita pode estar associada a um gene recessivo no camundongo. Desta forma, um fenótipo recessivo poderia ser um dos mecanismos atuantes no fenômeno da resistência. O resultado da infecção viral dependeria da habilidade das células do hospedeiro, em geral macrófagos, para interagir com a partícula através de receptores específicos, permitindo a replicação do vírus. Nos sistemas em que se usa o MHV-3, a resistência e a susceptibilidade também está relacionada com o grau de replicação viral em culturas de macrófagos e outras células. Alguns experimentos indicam que pelo menos dois genes recessivos do Complexo de Histocompatibilidade (H2) estão associados à resistência, sugerindo que o reconhecimento antigênico por linfócitos T têm uma função na eliminação do vírus. Tratamentos imunossupressivos de timectomia ou administração de soro anti-Thy-1 agravam a doença causada por MHV-3, também indicando que mecanismos imunológicos mediados por células T contribuem para a resistência. Este fenômeno também foi observado em sistemas utilizando MHV-2 (WEGE *et al.* 1982).

Camundongos BALB/c e A/J expostos ao MHV-3 apresentam diferentes graus de resistência e susceptibilidade à doença. Camundongos SJL são considerados resistentes para a infecção com o MHV-A59 e MHV-JHM, enquanto camundongos BALB/c são completamente susceptíveis ao MHV. Todas as linhagens murinas testadas apresentaram padrões de susceptibilidade e resistência à infecção pelo MHV. A resistência de camundongos SJL à infecção pelo MHV-A59 parece estar associada a um gene autossômico recessivo do cromossomo 7. É possível que o quadro de resistência observado nestes camundongos esteja relacionado com uma ausência de receptores funcionais para o MHV-A59. Tais receptores parecem ser da família antigênica carcinoembrionária, da superfamília das imunoglobulinas (COMPTON *et al.*, 1993).

Diferentes graus da doença causados pelo MHV-3 em camundongos BALB/c, C3H e A/J são devidos, ao menos em parte, ao tipo de resposta inflamatória associada com a infecção. Em camundongos BALB/c, a infecção determinou um panorama de alta atividade monocítica

procoagulante, acarretando uma severa e progressiva anormalidade na microcirculação hepática. Foi verificada uma resistência parcial nos camundongos C3H infectados, com lesões hepáticas moderadas, e uma resistência geral dos camundongos A/J frente ao MHV-3 (COMPTON *et al.*, 1993).

Uma produção intensa de imunoglobulinas especialmente da sub-classe IgG2a foi observada em camundongos infectados com diferentes vírus. Experimentos com adenovírus e lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) indicaram que somente uma pequena fração destas imunoglobulinas (<5 a 10%) eram anticorpos antivirais, sugerindo que a maior parte deles decorreram de uma ativação policlonal da população B (COUTELIER *et al.*, 1988; COUTELIER & VAN SNICK, 1985). Embora uma função destas imunoglobulinas na defesa do hospedeiro não possa ser excluída, é possível que a ativação policlonal induzida por tais viroses possa resultar em reações de auto-imunidade e processos de imuno-deficiências (KLINMAN & MORSE III, 1989).

Camundongos CBA inoculados intraperitonealmente com adenovírus cepa FL demonstraram uma importante proliferação esplênica, que se inicia ao 4º dpi e atinge um pico ao 10º dpi, indicando que o vírus é um potente ativador *in vivo* de linfócitos B murinos. As sub-classes IgG2a e, em menor extensão, IgG2b foram amplamente produzidas no curso da infecção pelo adenovírus, atingindo um pico de resposta no 10º dpi. Resultados semelhantes foram obtidos quando camundongos CBA foram inoculados com LDV. O uso de anticorpos monoclonais anti-CD4, inibidores de linfócitos T<sub>helper</sub>, não afeta a produção esplênica, mas reduz a produção de IgG pelos esplenócitos de camundongos infectados com Adenovírus e LDV, sem contudo alterar as proporções observadas para as outras sub-classes. Estes resultados indicam que linfócitos T induzem a secreção de IgG2a por células B que estejam altamente ativadas, caracterizando uma via T-dependente na resposta à infecção. É provável que a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T seja um fator de mediação na preponderância de IgG2a secretadas durante infecções virais (COUTELIER *et al.*, 1990).

O papel de células T<sub>helper</sub> na proliferação de linfócitos induzida por vírus pode ser similar em alguns aspectos àquela observada com o parasita *T. cruzi*, onde o tratamento com anti-CD4 diminui a resposta policlonal celular induzida pela infecção parasitária, inclusive a resposta blastogênica (MINOPRIO *et al.*, 1987; COUTELIER *et al.*, 1990).

A ativação de linfócitos B pode ser iniciada por diferentes antígenos virais, como glicoproteínas de vírus Sendai, espículas de adenovírus, hemaglutininas de vírus da influenza e outros. Efeitos do MHV nas funções de células B são relativamente variáveis. Infecções de camundongos C57BL/6 ou (C57BL/6xA/J)F<sub>1</sub> com MHV-3 levou a um quadro de atrofia do baço e depleção de células da linhagem B (LAMONTAGNE *et al.*, 1989; JOLICOEUR & LAMONTAGNE, 1990, 1994). Camundongos cronicamente infectados com MHV-3 apresentaram depressão nos níveis de imunoglobulinas e na resposta anticórpica geral quando seguido de uma imunização simultânea com eritrócitos de carneiro (LERAY *et al.*, 1982; VIRELIZIER *et al.*, 1976). Em contraste, infecção de camundongos CBA/Rij com MHV-A59 causa uma hipergamaglobulinemia, em especial da sub-classe IgG2a (COUTELIER *et al.*, 1988). Modificações no padrão de distribuição isotípica com predomínio da sub-classe IgG2a foram observados em camundongos 129/Sv tratados com antígeno protéico solúvel e simultaneamente inoculados com MHV-A59 (COUTELIER *et al.*, 1988, 1991).

O sistema interferon representa outra importante linha de defesa contra infecções por MHV. Produzidas entre outros por macrófagos e linfócitos, estas citocinas têm efeitos antivirais e imunoregulatórios estabelecidos os quais podem ser cruciais na resistência à infecção. Um de seus efeitos antivirais consiste na indução enzimática da degradação do genoma viral, bloqueando a síntese de suas proteínas. Em experimentos usando análogos enzimáticos da proteína degradadora, foi verificada uma diminuição da replicação viral em macrófagos peritoniais, com um efeito dose-dependente. Entretanto, tal inibição não foi suficiente para impedir o desenvolvimento da doença (FINGEROTE *et al.*, 1995).

Células de baço de camundongos BALB/c inoculados com MHV-JHM por via oronasal mostraram-se pouco ativadas no 5<sup>o</sup> dpi, desenvolvendo cinética alterada de proliferação e produção de citocinas, com picos no decorrer da infecção primária aguda (COMPTON *et al.*, 1993).

Camundongos 129/Sv, CBA/Rij e CBA/Ht inoculados com MHV-A59 mostraram uma forte esplenomegalia induzida pelo vírus, atingindo um máximo no 7<sup>o</sup> dpi. Apesar disso, secções histológicas (5µm) dos baços destes camundongos mostraram uma estrutura geral preservada, com aumento dos centros germinativos e no número de células da polpa vermelha, quando comparados aos controles. Vários linfócitos, grandes e de caráter blástico, foram encontrados na polpa branca e vermelha dos animais infectados. O índice mitótico também estava aumentado após a infecção viral. O aumento no número de células nestes órgãos foi confirmado através de análise citométrica. A

produção de imunoglobulinas, analisada através de ELISA, foi máxima ao 7<sup>o</sup> dpi com um predomínio da sub-classe IgG2a. Entretanto, ao absorver soros imune com diferentes concentrações do vírus e posterior análise (ELISA) do sobrenadante recuperado, foi verificado que os níveis totais de IgG2a eram só marginalmente afetados, indicando que a maior parte das imunoglobulinas produzidas após a infecção pelo MHV-A59 não eram anticorpos específicos ao vírus. A produção de IgG2a foi amplamente inibida nos baços infectados de animais que receberam tratamentos com anticorpos monoclonais anti-CD4, sugerindo que linfócitos T<sub>helper</sub> são fundamentais neste fenômeno (LARDANS *et al.*, 1996).

É possível que haja uma diferenciação seletiva das células T para o fenótipo T<sub>H1</sub> em função do aumento da expressão de interleucina-12 (IL-12) observado após infecção pelo MHV-A59 (COUTELIER *et al.*, 1995). Provavelmente, a produção de IL-12 por macrófagos estimulados após a infecção resulte em uma modulação indireta de respostas não-antivirais, determinando uma secreção de grande quantidade de IgG2a associada à produção de anticorpos antivirais (COUTELIER *et al.*, 1988).

Outros mecanismos podem estar envolvidos na proliferação de linfócitos B. Glicoproteínas da família antigênica carcinoembriônica podem servir de receptores para MHV-A59 (DVEKSLER *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1991). Como estes receptores estão expressos nas membranas de linfócitos B (COUTELIER *et al.*, 1994), é possível que ocorra, ao menos em parte, uma ativação destas células através da interação direta com partículas virais (LARDANS *et al.*, 1996).

O aumento na produção de anticorpos após a infecção pelo MHV poderia estar envolvido com manifestações de caráter auto-imune. LARDANS *et al.*, (1996) demonstraram que camundongos imunizados somente com eritrócitos de rato desenvolviam uma moderada produção de auto-anticorpos, enquanto altos níveis foram verificados em animais que receberam MHV-A59 concomitantemente. Estes resultados indicam que a infecção pelo MHV-A59 pode elevar significativamente respostas auto-imunes.

Respostas imunológicas de caráter humoral e celular devem interagir no curso da doença e sua recuperação. Camundongos imunocompetentes apresentam soro-conversão em aproximadamente dez dpi, quando inoculados pela via oronasal. Animais recuperados da infecção apresentam imunidade vírus-específica até aproximadamente doze meses pós-infecção, dependendo da rota de inoculação. Camundongos infantis são imunologicamente incompetentes e sua resistência ao vírus

deve-se em parte às imunoglobulinas transferidas pela mãe durante o período gestacional ou após o parto, através da lactação. IgG e IgA são as principais moléculas transferidas, esta última apresentando uma importante função na proteção intraluminal (COMPTON *et al.*, 1993).

Embora a proliferação de linfócitos B induzida pelo MHV tenha se mostrado amplamente T-independente, uma função de células T<sub>helper</sub> na secreção de imunoglobulinas seletivas por células B já ativadas foi demonstrada pelo efeito de anticorpos anti-CD4 em camundongos infectados. A incubação de células B infectadas, retiradas de animais T-depletados, com fatores solúveis de células T conseguem restaurar a produção seletiva de vários isotipos, como foi observado na influência de IFN- $\gamma$  sobre os níveis de IgG2a (COUTELIER *et al.*, 1990). Estes resultados sugerem que os coronavírus não suprimem a habilidade de células B em secretar diferentes isotipos exceto IgG2a e que sua influência no desvio seletivo na produção de imunoglobulinas pós-infecção seria mediado pela estimulação de células T<sub>helper</sub> secretando linfocinas apropriadas.

Os dados referentes à biologia geral dos MHVs sugerem que uma infecção primária aguda em camundongos deve durar no máximo três a quatro semanas, mas em geral as infecções naturais são sub-clínicas, com possibilidade de reinfecção por novos sorotipos virais. A partícula viral é frágil no ambiente e desinfetável, apesar da ampla distribuição, elevado poder de contágio e mutabilidade. Camundongos imuno-deficientes desenvolvem doenças mais severas. Embora a soro-conversão anuncie a recuperação da fase aguda, camundongos permanecem soro-positivos durante a eliminação do vírus. Células B parecem ser ativadas de maneira policlonal nas infecções agudas de camundongos pelo MHV, determinando a formação de de uma grande proporção de anticorpos sem especificidade ao vírus. É possível que neste *pool* secretado haja anticorpos reativos contra epítopos autólogos que poderiam ser agentes condicionantes de reações de auto-imunidade (COMPTON *et al.*, 1993).

Uma infecção compreende a implantação, crescimento e multiplicação de organismos inferiores no corpo de seres superiores, abrangendo inclusive situações de micro-parasitismo, prejudiciais ao hospedeiro. Assim, o desenvolvimento da doença dependerá do binômio virulência (V) do(s) patógeno(s) e resistência (R) do hospedeiro. Em função do antagonismo presente nesta relação podemos definir a virulência como  $V=1/R$ , considerando que diferentes variáveis podem modular tais mecanismos. A medição da virulência de microrganismos, através da definição de uma dose

letal mediana ( $DL_{50}$ ), é usualmente obtida através do método de REED & MUENCH (1938), baseado nos conceitos dos totais cumulativos.

Mecanismos celulares e humorais da resposta imune devem exercer uma função significativa nos processos de defesa contra microrganismos intracelulares. Na infecção pelo *T. cruzi*, respostas específicas são importantes no fenômeno de defesa (TARLETON, 1990; NICKELL *et al.*, 1993). No curso dessa infecção experimental pelo *T. cruzi*, a determinação de células formadoras de anticorpos independente da especificidade, realizada através da técnica de PFC-reverso (D'IMPÉRIO LIMA *et al.*, 1985) registrou um predomínio de isotipos IgG2a e IgG2b e padrões de resposta T-dependente e T-independente. Também foi evidenciada uma expansão global de repertórios de linfócitos T (MINÓPRIO *et al.*, 1986), reforçando a ideia de que os dois processos coexistem durante a infecção. Uma condição semelhante foi observada na infecção de camundongos com MHV (COUTELIER *et al.*, 1988, 1991).

O fenômeno de ativação policlonal B e T tem sido também demonstrado em protocolos experimentais associados com diferentes processos infecciosos causados por protozoários, helmintos, bactérias e vírus (CRANDALL & CRANDALL, 1971a,b; JARRET & FERGUSON, 1974; SHER *et al.*, 1977; D'IMPÉRIO LIMA *et al.*, 1985; MINÓPRIO *et al.*, 1986; LOPES *et al.*, 1990; MEDEIROS *et al.*, 1991, 1995; FALCÃO *et al.*, 1995; COMPTON *et al.*, 1993; LARDANS *et al.*, 1996). Ativação policlonal com produção de auto-anticorpos, geralmente associados a complicações de auto-imunidade, também foi observada em estimulações de camundongos com eritrócitos de carneiro e outras substâncias, incluindo cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ) (AL-BALAGHI *et al.*, 1996).

A fase aguda da infecção experimental de camundongos com *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por uma alta ativação celular B e T, com avanços pela fase crônica e produção persistente de autoanticorpos similares a anticorpos naturais. Esta ativação surge bastante cedo na fase aguda, sendo observada em órgãos linfóides como baço, linfonodos e placas de Peyer (MINOPRIO *et al.*, 1986, 1988, 1989; TERNYNK *et al.*, 1990; PINGE F<sup>2</sup>, 1993). Uma situação semelhante foi observada em experimentos de infecção de camundongos com coronavírus (COMPTON *et al.*, 1993; LARDANS *et al.*, 1996). Os estudos de MEDEIROS *et al.* (1997) e COSTA (1996), realizados em animais de origem SPF e convencionais, associam a ativação

policlonal de células B com a presença de autoanticorpos em camundongos infectados com *Yersinia enterocolitica* 0:3, demonstrando a presença de alguns clones de linfócitos auto-reativos.

Em uma perspectiva de atividade sistêmica, a ativação policlonal poderia ser uma manifestação presente em qualquer evento imunológico, como um mecanismo de auto-regulação. Haveria uma expansão quantitativa e qualitativa, necessária ao equilíbrio das conexões do Sistema Imunológico. Assim, é possível que efeitos somatórios ou contrários possam ser estabelecidos em infecções concomitantes de camundongos com MHV e *T. cruzi*. É evidente que um complexo de fatores bioquímicos, celulares e ambientais estão associados. Os interesses biológicos opostos presentes na relação parasita-hospedeiro podem determinar a eliminação de um deles através de mecanismos eficientes de infecção ou defesa, ou então, estabelecer processos deletérios para o hospedeiro.

No conhecimento científico imunológico atual, os mecanismos específicos ativados contra infecções, associam ao antígeno um papel central na condução da resposta, isto é, os clones linfocitários são ativados especificamente por um dado antígeno (JERNE, 1955). Na expansão dessa idéia, BURNET (1957) propôs a hipótese de que a reatividade imunológica estaria associada a processos de seleção clonal linfocitária. Neste panorama, ocorre uma noção subjetiva de que a maquinaria imune está fora de operação na ausência dos antígenos que induzem a resposta imune. Entre outros fatores, isto se deve por um lado pela forte influência do pensamento linear ocidental, aqui representado pelo modelo de causa-efeito; e por outro, devido ao interesse histórico da Imunologia no controle ou erradicação de doenças de importância social e econômica, através de soroterapias ou vacinação coletiva. A pesquisa da especificidade da resposta imune se desenvolve, portanto, paralelamente aos interesses clínicos e terapêuticos das Ciências Biomédicas, de onde surgiram os pensamentos e dogmas da Ciência Imunológica. Essa concepção teórica centrada no antígeno sustenta ainda hoje a Ciência Imunológica e certamente continuará recebendo a necessária atenção investigativa, em função da ampla fundamentação metodológica e teórica existente. Entretanto, nesta forma de pensamento, a idéia de (auto)controle do Sistema Imune (SI) torna-se vaga e secundária, não admitindo a estratégia recursiva de *feedback* positivo e negativo para manutenção do equilíbrio interno, ou seja, a auto-determinação (COUTINHO *et al.*, 1984).

Um mecanismo circular-causal pode ser uma propriedade essencial na organização de sistemas vivos. Todas as ações do sistema visariam a manutenção de níveis auto-referenciados de sua composição e organização. Estas perspectivas autopoieticas podem ser aplicadas ao SI (VAZ &

VARELA, 1978) nas bases lançadas pela Teoria da Rede de Interações Idiotípicas proposta por JERNE (1974). Verificando a existência de anticorpos que reconhecem e interagem com determinantes em outros anticorpos formados pelo mesmo organismo (OUDIN & MICHEL, 1963; KUNKEL, 1970) esta teoria propõe que todos os linfócitos, como integrantes da rede, têm função exclusiva de manutenção dos níveis de auto-referência. Anticorpos e células efetoras são complementares para estruturas autólogas e somente ligam materiais estranhos como imagens externas destes determinantes internos. Em um equilíbrio fisiológico normal ou durante a resposta imune, o organismo formaria anticorpos capazes de interagir para a formação de anti-anticorpos e estes, por sua vez, outros anti-anticorpos. Estas conexões formariam uma rede de auto-reatividade imunológica voltada para o próprio organismo. A resposta imune não estaria assim direcionada em função do antígeno, como na Seleção Clonal (VAZ, 1988; VAZ & FARIA, 1990).

Um aspecto central da abordagem de JERNE (1974) para o SI é que um distúrbio desencadeado pelo antígeno afeta muito mais linfócitos que aqueles capazes de interagir diretamente com tal antígeno. A atividade policlonal e o aumento de imunoglobulinas inespecíficas representariam, ao menos em parte, a desordem consequente e necessária para buscar o equilíbrio do sistema. É possível mesmo que o organismo registre este distúrbio sem fazer a discriminação entre *self* e *non self* (VAZ & VARELA, 1978). De fato, perturbações no SI podem promover a ativação linfocitária e a síntese de imunoglobulinas e citocinas, que modificarão o sistema como um todo, de forma a compensar as alterações precedentes, mesmo na ausência de contatos externos (COUTINHO *et al.*, 1984). Nesta visão de atividade imunológica sistêmica as multi-conexões estabelecidas entre os componentes celulares e moleculares poderiam conduzir à modulação de diferentes mecanismos de ação imune, entre eles os fenômenos de tolerância e auto-imunidade.

A existência de anticorpos naturais reativos com auto-antígenos (GILBERT *et al.*, 1982; DIGUIERO *et al.*, 1983; ACHTNICH & ZOLLER, 1991) e os indícios de que a maior fração dos anticorpos naturais são multi-específicos (ARAÚJO *et al.*, 1987) podem reforçar a idéia de que o SI possui conectividade interna e autonomia quanto à sua (re)organização, agindo em função do próprio sistema, independente da presença de um antígeno invasor específico (VAZ & VARELA, 1978; COUTINHO, 1989; VAZ & FARIA, 1990).

Algumas teorias argumentam que o SI pode participar da modulação de outras interações moleculares no organismo. Consequentemente, considera-se a auto-reatividade como fisiológica e

que patologias auto-imunes são um forte argumento de que o SI está envolvido com outras estruturas e tecidos do indivíduo em condições normais, sendo a doença um desarranjo funcional. A auto-reatividade fisiológica seria uma manifestação dos mecanismos de equilíbrio sem levar à auto-destruição. Em função dos conceitos propostos por JERNE (1974), novas perspectivas de estudo sobre o SI vem permitindo o entendimento da sua relação com outros sistemas, assim como o desenvolvimento de abordagens experimentais voltadas para a funcionalidade do SI (COUTINHO *et al.*, 1984).

A funcionalidade global do SI dentro de condições fisiológicas normais parece ser importante para a compreensão biológica dos mecanismos de defesa envolvidos no equilíbrio orgânico do indivíduo. Um aparato sistêmico complexo, formado por vários tecidos, secretando milhões de proteínas diferentes, deve ser mais que uma sofisticada máquina de ataque, apesar de sua importante função anti-microbiana (COUTINHO *et al.*, 1984). A ativação policlonal e o conseqüente aumento de imunoglobulinas inespecíficas podem, assim, desempenhar atividades reguladoras em quaisquer situações de desequilíbrio do sistema imunológico.

Diante das observações anteriores sobre a presença de um coronavírus em cepas de *T. cruzi* (RANGEL *et al.*, 1994) e conhecedores também da manifestação de atividade policlonal associada ao protozoário, este trabalho procura investigar a influência do coronavírus na fisiologia de camundongos mantidos em laboratório e o papel da infecção viral na patologia experimental desenvolvida, especialmente quanto a geração de atividade policlonal. Uma avaliação dos aspectos patogênicos promovida por tal infecção poderia trazer novos dados para análise simultânea com resultados já estabelecidos.

## Objetivos

Diante da complexidade multi-fatorial envolvida nas infecções pelo MHV, procuramos estudar alguns dos aspectos imunológicos e histológicos associados à infecção pelo Vírus-X, ou coronavírus, analisando as condições dos baços de camundongos CBA/J quanto ao estado de ativação de células B, manifestações de atividade policlonal e alterações estruturais na arquitetura do órgão. Neste estudo, empregamos uma abordagem epizootica da infecção do coronavírus em camundongos *naive*, através do inóculo intraperitoneal de uma dose subletal da suspensão com a partícula viral. Assim, procuramos contribuir para o entendimento da infecção murina por coronavírus e, de maneira indireta, para a análise do significado fisiológico desta infecção em animais utilizados como reagentes biológicos ou modelos experimentais de doenças parasitárias.

Desta forma, procuramos:

- Determinar o número de células secretoras de imunoglobulinas, através de ensaios de PFC-reverso, com amostras celulares esplênicas de animais infectados pelo coronavírus murino e animais controles, no terceiro, sétimo, décimo-primeiro e décimo-quinto dia pós-infecção.
- Pesquisar a presença de anticorpos anti-coronavírus nos soros recolhidos de camundongos nos diferentes dias pós-infecção citados, utilizando o método de Imunofluorescência Indireta e MHV-3 como antígeno.
- Acompanhar as condições histopatológicas esplênicas durante a cinética experimental e registrar possíveis mudanças estruturais na arquitetura do órgão associadas à infecção subaguda de camundongos, comparando animais infectados e controles.

## MATERIAL E MÉTODOS

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

Camundongos CBA/J machos e fêmeas com 10-12 semanas foram obtidos do Centro Multi-institucional de Bioterismo (CEMIB-UNICAMP) a partir de colônias “SPF” e mantidos sob condições convencionais em nosso Departamento durante os protocolos experimentais. Testes sorológicos realizados pelo Serviço de Sorodiagnóstico do CEMIB-UNICAMP apresentaram resultados negativos para uma bateria de patógenos, entre eles: MHV, PVM, MVM, ROPV, TMEV-GD/7, *Sendai Virus*, *Vaccinia*, LCMV, *Mouse Adenovirus*, *Polyoma Virus*, REO-3, MCMV, *Rotavirus*, *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium piliforme* (Tizzer) e *Toxoplasma gondii*. Possíveis infecções são monitoradas trimestralmente por testes de Imunofluorescência Indireta (KRAFT and MEYER, 1986) verificando a produção de anticorpos específicos para a bateria de dezesseis antígenos, comuns à população murina.

Os animais foram mantidos em grupos de 4 a 6 por caixa de criação, com ração e água estéreis *ad libitum*.

### 2. Amostra viral

O coronavírus descrito por RANGEL *et al.* (1994) foi mantido em camundongos CBA/J criados em isoladores, através de repiques semanais de um homogenato de fígado para o inóculo intraperitoneal. A fonte do coronavírus empregado neste trabalho também foi derivada de homogenatos de fígado de camundongos CBA/J infectados. Os fígados foram retirados e homogeneizados em 5ml de RPMI-1640, de onde foram preparadas alíquotas de 0,5ml. Todo o

procedimento foi realizado sob condições estéreis em Fluxo Laminar (VECO) e as alíquotas estocadas em Freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### **3. Ensaio de mortalidade com estimativa de dose sub-letal**

Seguindo as orientações de REED & MUENCH (1938), alíquotas das preparações contendo o coronavírus em estoque, foram utilizadas para a determinação de uma dose sub-letal conveniente aos protocolos de infecção. Para isso, foram feitas diluições progressivas dessas alíquotas, na ordem de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  vezes em RPMI-1640. Camundongos machos CBA/J adultos provenientes de colônias SPF foram divididos em seis grupos de 4 animais e cada grupo foi inoculado pela via intraperitoneal com uma diluição respectiva da amostra viral. Animais do grupo 6 foram inoculados com RPMI como controles. Todos os camundongos receberam um inóculo de 0,1ml pela via intraperitoneal e foram observados por um período de trinta dias quanto ao surgimento de manifestações clínicas externas, recuperação e/ou morte. Os animais foram mantidos em laboratório para prevenir uma eventual dispersão do vírus nos biotérios de experimentação.

### **4. Infecção experimental de camundongos**

As alíquotas estocadas e posteriormente usadas nos protocolos de infecção apresentaram uma estimativa de  $DL_{50}$  em uma diluição na ordem de  $1 \times 10^{-5,5}$  vezes a partir do estoque original.

Lotes de camundongos CBA/J, divididos em quatro grupos, foram inoculados por via intraperitoneal com 0,1ml de uma suspensão em RPMI-1640 de fígado de camundongo contaminado com o coronavírus, diluída  $10^6$  vezes a partir de uma alíquota.

Nos 3<sup>os</sup>, 7<sup>os</sup>, 11<sup>os</sup> e 15<sup>os</sup> dias pós-infecção, grupos de até 4 camundongos experimentais foram anestesiados e sangrados por punção cardíaca para obtenção de soros.

Após sacrifício dos animais, os baços foram cuidadosamente removidos e pesados antes do preparo das suspensões celulares esplênicas usadas nos ensaios de PFC. Alguns baços foram mantidos íntegros e preparados para os procedimentos histopatológicos previstos. Animais

inoculados pela via intra-peritoneal com 0,1ml de um homogenizado de fígado normal de camundongos em RPMI-1640 foram usados como controles.

## **5. Determinação de peso do baço e do número de esplenócitos viáveis**

5.1. Avaliação de peso. Os baços de camundongos dos grupos controle e infectados foram recolhidos em BSS pH7,2 resfriado à 4° C. Retirado o excesso de líquidos, os órgãos foram pesados sobre gaze estéril em uma balança eletrônica semi-analítica.

5.2. Obtenção de Esplenócitos e controle de viabilidade. Após avaliação de peso, os baços foram macerados cuidadosamente para a liberação das células. As suspensões celulares foram homogeneizadas e, após a sedimentação de grumos, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos e centrifugado à 2000 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada FR22 (Fanem- BR). O material foi ressuspenso em BSS e repetindo-se a seguir a operação de lavagem- 3 vezes. No final, as células foram recuperadas em um volume de 10ml de BSS pH7,2 - Glicose 0,1% e mantidas a 4° C até o momento de uso.

O número de células viáveis dos baços estudados foi avaliado através da técnica de exclusão com Azul de Trypan 0,2% (MISHELL & SHIGI, 1980)

## **6. PFC-Reverso**

O número de células secretoras de Imunoglobulinas nos baços de animais infectados e controles foi determinado através do ensaio do PFC-Reverso-Proteína A, conforme descrição feita por BERNABÉ *et al.* (1981). O ensaio utiliza hemáceas sensibilizadas com proteína A de *Staphylococcus aureus*, permitindo a enumeração de células secretoras de imunoglobulinas, independente da especificidade destes anticorpos.

6.1. Sensibilização de Eritrócitos de Carneiro com Proteína A (hemácea-PA). Eritrócitos de carneiro em solução de Álsever, com no máximo 15 dias de extração, foram lavadas 3 vezes em salina 0,15M. No processo de aspiração entre as lavagens foram retirados os leucócitos.

Uma solução estoque de  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,05M foi diluída 1:200 no momento da sensibilização. Para cada 10ml dessa solução adicionamos 1ml de uma solução salina contendo 0,5mg/ml de Proteína A (Pharmacia) e 1ml de papa de hemáceas. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30° C por 1 hora, sob agitação lenta. Após esse período, as hemáceas sensibilizadas foram lavadas 2 vezes em Salina 0,15M e ressuspensas em BSS pH 7,2 - Glicose 0,1%, diluídas 1:3.

6.2. Preparo do Ágar-DEAE/Dextran - 0,75 ug/ml. Bacto-Ágar (Difco) foi utilizado numa concentração de 0,5% em BSS pH 7,2 - Glicose 0,1%. Após a dissolução completa do Ágar, foi adicionado DEAE-Dextran (Pharmacia) a partir de uma solução com 50mg/ml em BSS, na proporção de 1,5ml de DEAE-Dextran para cada 100ml de Ágar. Esse material foi mantido em banho-maria a 46° C até o momento de uso.

6.3. Complemento. Soro de cobaias (LARA) foi liofilizado e previamente titulado para ser utilizado como fonte de Complemento para o ensaio. Após uma titulação inicial para a determinação de sua  $\text{CH}_{50}$ , a fonte de Complemento foi utilizada diluída 1:4 em BSS pH7,2 contendo 0,1% de Glicose.

6.4. Soros anti-Imunoglobulinas de Camundongos. Foram utilizados soros de Cabra anti-Imunoglobulina Total e anti-IgM de Camundongo (Serotec/Oxford), diluídos em BSS pH7,2 - Glicose 0,1%, com titulação pré-determinada pelo fabricante.

6.5. Suspensão Celular. Preparadas paralelamente, conforme a descrição no item 5.2.

6.6. Execução do Ensaio. Apesar de não ser necessária a execução técnica em condições de esterilidade, foram utilizados reagentes e materiais estéreis. Em temperatura de 4° C, misturou-se em tubos de hemólise (identificados) 100ul das amostras celulares (em diluições apropriadas) com 25ul de Hemáceas-PA, 25ul do anti-soro específico e 25ul do Complemento titulado, nessa ordem.

Após uma breve agitação em Vortex, foram adicionados 250ul do gel de Ágar-DEAE-Dextran e misturados gentilmente. Rapidamente, através de movimentos circulares, o gel foi distribuído sobre placas de petri (Delata-Lab, Espanha) descartáveis de 9cm, previamente identificadas. Após a solidificação do Ágar, as placas foram fechadas e incubadas por 3-6 horas em uma estufa incubadora com  $\text{CO}_2$  (Lab-Line Instruments, Inc., EUA) a 37° C, com atmosfera úmida. Ao final deste período, foi realizada a contagem das placas de hemólise com o auxílio de uma lupa e recontagem a olho desarmado. Uma nova contagem foi feita após 18 horas, com as placas conservadas a 4° C.

## **7. Avaliação histológica**

Foi feita uma avaliação histopatológica nos baços de animais infectados e controles, usando as instruções de BURKE *et al.* (1972). Os órgãos coletados nos 3<sup>os</sup>, 7<sup>os</sup>, 11<sup>os</sup> e 15<sup>os</sup> dpi foram segmentados em sua porção mediana, fornecendo duas peças histológicas que permitiram a obtenção de cortes transversais e longitudinais.

As peças histológicas foram identificadas e acondicionadas em cápsulas plásticas vazadas permanecendo vinte e quatro horas em formol tamponado, sendo depois lavadas por seis horas em água corrente. Na continuação, as peças foram colocadas em álcool 80% por um período de dezoito horas e, posteriormente, em uma bateria de quatro banhos em álcool absoluto, cada qual com duração de trinta minutos. Foi feita uma nova sequência de três banhos em xilol, com quinze minutos cada, antes da impregnação das peças com parafina. Inicialmente, fizemos um banho de uma hora em uma mistura de parafina com xilol e uma impregnação final em parafina pura por novos sessenta minutos.

As peças histológicas foram então incluídas em blocos de parafina, nas posições de corte, com o auxílio de um inclusor automático. Cortes longitudinais e transversais de 0,4µm foram obtidos em micrótomo e montados sobre lâminas pré-tratadas e identificadas, que então foram tratadas com xilol para a retirada da parafina. Uma nova sequência de banhos em álcool absoluto, 95, 80 e 70% providenciaram a reidratação do material histológico. Os cortes foram então corados com Hematoxilina-Eosina e as lâminas montadas para observação microscópica.

As fotografias foram realizadas usando um Microscópio Ótico Olympus CBA-213 com fotocâmera C. Zeiss C35 e filmes coloridos de 35mm ISO 100 (Kodak).

## **8. Pesquisa de anticorpos séricos por imunofluorescência indireta**

Foi realizada a pesquisa de anticorpos séricos reativos contra o coronavírus e outros grupos virais nos soros de animais infectados e controles, coletados ao final dos ensaios experimentais,

usando o ensaio de imunofluorescência indireta (KRAFT & MEYER, 1986). Possíveis contaminações naturais (patógenos listados no item 1) durante os experimentos foram também analisadas desta forma, usando animais controle.

Lâminas multi-teste teflonadas, preparadas com culturas de células infectadas com os diferentes antígenos listados no item 1, foram usadas para o ensaio de IFI. Trabalhando-se em câmara úmida, adicionou-se 25µl/well de uma diluição a 1:20 dos soros-teste, com a presença de soros-controle positivo e negativo. Após uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas por duas vezes em PBS para a retirada de um possível excesso de anticorpos. Depois desta etapa, as lâminas foram secas e acrescidas de 25µl de uma diluição pré-titulada de um conjugado anti-Ig de camundongo com fluoresceína. Incubadas a seguir por 20 minutos em temperatura ambiente e posteriormente novas lavagens das lâminas com PBS e água destilada. As lâminas e laminulas foram montadas finalmente com o auxílio de Glicerina tamponada alcalina, PBS-glicerol 90% (pH 8,2). Este método foi realizado usando controles positivo e negativo recém-preparados, com o auxílio do Serviço de Sorodiagnóstico do CEMIB-UNICAMP.

A leitura das lâminas de IFI foi feita usando um microscópio de fluorescência Zeiss Standart 20. A fluorescência específica de soros reagentes indica uma reação positiva, com classificação de intensidade através de um código pré-determinado. Respostas negativas foram definidas pela ausência de fluorescência específica.

## **9. Testes estatísticos**

Os dados obtidos neste estudo foram analisados estatisticamente pela determinação de variância entre as médias (ANOVA) utilizando o programa Microcal Origin 3.5 (Microcal Software Inc. 1994). Os graus de significância das diferenças entre as médias foram determinados estabelecendo o nível de significância em  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1. Avaliação da dose sub-letal e mortalidade associada à infecção viral

1.1. Ensaio de Mortalidade. Camundongos CBA/J divididos em grupos (1, 2, 3, 4, 5) e inoculados com diferentes diluições do homogenato de fígado contendo o coronavírus, foram estudados quanto à mortalidade associada à infecção. Os resultados obtidos estão sumarizados Tabela 01 e Figura 01.

A taxa de mortalidade obtida com animais dos grupos um, dois e três foi de 100% entre o 8º e 10º dpi. Estes animais receberam as doses mais elevadas, determinando manifestações clínicas com debilitação física ao redor do 6º dpi, com agravamento progressivo até o óbito. Alguns animais dos grupos quatro e cinco apresentaram um quadro de doença com retorno à sua condição normal externa após o 11º e 12º dpi.

Os animais do grupo quatro e cinco que sobreviveram foram mantidos em nosso laboratório até o 30º dpi, recebendo todo o suporte de criação necessário. Esses camundongos apresentaram um comportamento biológico normal, sem qualquer sinal clínico ou de *stress*. A autópsia destes animais revelou baços com aparência convencional e pesos próximos aos obtidos com os controles.

1.2. Estimativa de DL<sub>50</sub>. Os dados obtidos com o ensaio de mortalidade possibilitaram a elaboração de um cálculo aproximado para a DL<sub>50</sub> das amostras virais utilizadas, através de uma interpolação simples dos resultados obtidos em torno de 50% de óbito. Resultados cumulativos de mortalidade e sobrevivência foram analisados de acordo com as instruções de REED & MUENCH (1938), com os cálculos sumarizados a seguir.

Considerando que uma diferença igual a 1(um) do expoente negativo da dose corresponde a uma diferença de (75-25) na porcentagem de mortalidade, uma diferença de (75-50) na taxa de

mortalidade corresponderá a uma diferença  $x$  que, adicionada ao expoente da dose maior ( $10^{-5}$ ), dará o valor da  $DL_{50}$  para a amostra. Assim:

$$(75-50)/(75-25) = 25/50 = 0,5 \Rightarrow$$

$$L_{50} = 10^{-5.5} = 1/317000, \text{ expressa em termos de diluição injetada.}$$

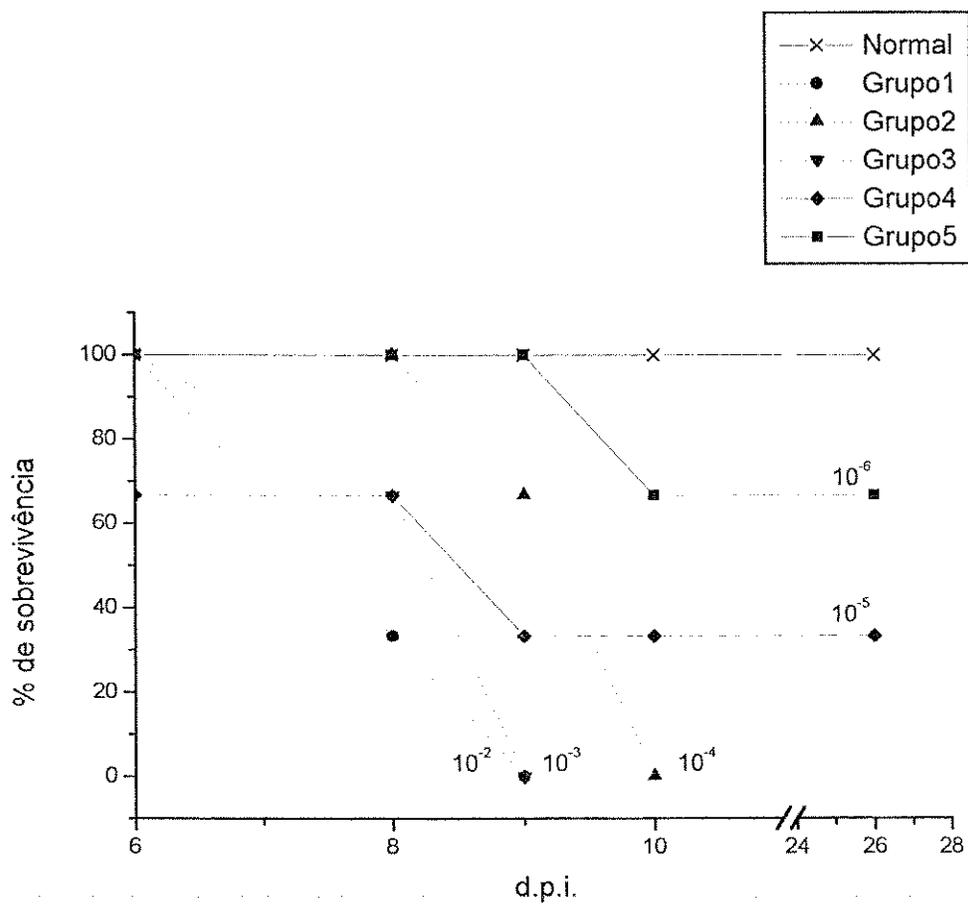
Como cada camundongo recebeu  $0.1 \text{ cm}^3$  de uma diluição igual a  $10^{-6}$  (ou  $1/1000000$ ), a dose sub-letal injetada corresponde, na realidade, a  $0.1/1000000$  ( $10^{-7}$ ) ou aproximadamente 0,03 unidades de  $DL_{50}$ .

**Tabela 01.** Resultados acumulados obtidos no ensaio de mortalidade com camundongos CBA/J inoculados com diferentes diluições do homogenato de fígado contendo o coronavírus.

Grupo	Diluição	RESULTADOS ACUMULADOS					
		M↓	S↑	m	s	total	% m
5	10 <sup>-6</sup>	1	2	1	3	4	25
4	10 <sup>-5</sup>	2	1	3	1	4	75
3	10 <sup>-4</sup>	3	0	6	0	6	100
2	10 <sup>-3</sup>	3	0	9	0	9	100
1	10 <sup>-2</sup>	3	0	12	0	12	100

M = n° de mortos no ensaio/ S = n° de sobreviventes no ensaio

↑↓ – sentido da soma/ m = n° de mortos acumulados/ s = n° de sobreviventes acumulados



**Figura 01.** Curvas de mortalidade obtidas em camundongos CBA/J inoculados com diferentes diluições da suspensão de coronavírus.

## 2. Avaliação da atividade de células B esplênicas na infecção pelo coronavírus

2.1. Quantificação das células secretoras de Imunoglobulinas. O número de PFCs foi determinado referente à totalidade de células secretoras (Ig Total) e ao isotipo IgM. Dois padrões de diluição dos esplenócitos foram adotados nos diferentes ensaios (A, B, C, D) incluindo-se as variações de sexo e idade dos camundongos). No padrão de diluição I cada baço foi diluído  $10^{-4}$  vezes em solução de BSS, enquanto que no padrão II adotamos uma diluição maior, na ordem de  $2,5 \times 10^{-4}$  vezes.

Na tabela 02 encontram-se os valores médios e desvio padrão dos números de PFC anti-IgTotal obtidos em diferentes d.p.i. para camundongos CBA/J inoculados com coronavírus e controles. Os valores demonstram que picos de produção de IgT oscilam entre o 7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> d.p.i., seguido por um declínio gradual caracterizado pelos números intermediários de PFC detectados no 15<sup>o</sup> d.p.i..

Na tabela 03 encontram-se os valores médios e desvio padrão dos números de PFC anti-IgM obtidos em diferentes d.p.i. para camundongos CBA/J inoculados com coronavírus e para animais controle. Picos na produção de IgM concentram-se igualmente entre o 7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> d.p.i., a partir do qual um declínio gradual dos números de PFC se estabelece. Os números de PFC anti-IgM foram menores quando comparados aos valores obtidos para IgTotal. Os números de PFC obtidos em animais controles demonstraram variações sem significado estatístico ( $\alpha=0,05$ ).

Valores obtidos em animais inoculados com coronavírus referentes ao índice de aumento do número de PFC anti-IgT e anti-IgM estão representados respectivamente nas tabelas 04A e 04B. Estes índices estão relacionados aos controles normais utilizados nos diferentes d.p.i.. PFC secretando IgT aumentaram em média 6,7 a 7,3 vezes entre o 7<sup>o</sup> e o 11<sup>o</sup> d.p.i., enquanto índices de aumento na ordem de 4,5 a 5,1 vezes foram observados para PFC anti-IgM neste mesmo período. Estas condições de variação quantitativa nos números de PFC anti-IgT e anti-IgM entre camundongos estimulados com o vírus e controles normais estão ilustradas nas figuras 02 e 03, respectivamente.

**TABELA 02.** Número de células secretoras de imunoglobulinas totais (IgT) em baços de camundongos CBA/J inoculados com coronavírus obtido em diferentes d.p.i., através de ensaios de PFC-reverso com dois padrões de diluição dos esplenócitos.

<b>Padrão de diluição I</b>					
média ± d.p. do número de PFC/baço x 10 <sup>4</sup>					
Ensaio	d.p.i.				
	3 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>	controle
A	35.6 <sup>a</sup> ± 8.7	79 <sup>a</sup> ± 4.9	133.8 <sup>a</sup> ± 15.4	79.8 <sup>a</sup> ± 4.6	16.3 <sup>a</sup> ± 3.1
B	32.1 <sup>a</sup> ± 6.9	162.2 <sup>b</sup> ± 29.5	199.8 <sup>ab</sup> ± 75.6	107.6 <sup>a</sup> ± 31.1	22.8 <sup>a</sup> ± 6.2
C	21.2 <sup>b</sup> ± 1.3	112.8 <sup>abc</sup> ± 81.3	90.6 <sup>ac</sup> ± 34.9	--	14.8 <sup>a</sup> ± 3.8
D	27.2 <sup>a</sup> ± 3.1	179 <sup>bc</sup> ± 21.2	77.5 <sup>bc</sup> ± 21.2	--	19 <sup>a</sup> ± 3.2
<b>Padrão de diluição II</b>					
A	17.8 <sup>a</sup> ± 5.9	54.6 <sup>a</sup> ± 5.6	69.3 <sup>a</sup> ± 7.2	40.6 <sup>a</sup> ± 6.7	7.1 <sup>a</sup> ± 1.5
B	15.9 <sup>a</sup> ± 2.7	57.1 <sup>a</sup> ± 10.1	135.3 <sup>ab</sup> ± 76.4	50.3 <sup>a</sup> ± 13.3	11.5 <sup>a</sup> ± 3.5
C	11.5 <sup>a</sup> ± 3.5	60.3 <sup>a</sup> ± 40.2	45.3 <sup>bc</sup> ± 15.7	--	9.1 <sup>a</sup> ± 2.6
D	18.7 <sup>a</sup> ± 5.3	81.5 <sup>a</sup> ± 25.2	33.7 <sup>bc</sup> ± 7	--	10.4 <sup>a</sup> ± 3.1

Padrão de diluição I = 1/10<sup>4</sup>; Padrão de diluição II = 1/2.5x10<sup>4</sup>

Ensaio A/B = cam. machos adultos; C = machos jovens; D = cam. fêmeas adultas

n = 4

Valores na mesma coluna que não possuem ao menos uma letra superescrita em comum diferem significativamente entre si ( $\alpha = 0.05$ )

**TABELA 03.** Número de células secretoras de imunoglobulinas da classe IgM em baços de camundongos CBA/J inoculados com coronavírus obtido em diferentes d.p.i., através de ensaios de PFC-reverso com dois padrões de diluição dos esplenócitos.

<b>Padrão de diluição I</b>					
média ± d.p. do número de PFC/baço x 10 <sup>4</sup>					
Ensaio	d.p.i.				controle
	3 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>	
A	40.6 <sup>a</sup> ± 4.7	62.7 <sup>a</sup> ± 12.9	74.7 <sup>a</sup> ± 8.5	47.3 <sup>a</sup> ± 6.6	15.3 <sup>a</sup> ± 0.4
B	69 <sup>b</sup> ± 12.3	131.6 <sup>b</sup> ± 22.1	141.5 <sup>b</sup> ± 50.6	68.7 <sup>b</sup> ± 15.6	22.6 <sup>a</sup> ± 3.6
C	19 <sup>c</sup> ± 0.8	117.7 <sup>ab</sup> ± 78	53 <sup>ac</sup> ± 26.2	--	17 <sup>a</sup> ± 4.2
D	25.2 <sup>d</sup> ± 3.1	88.2 <sup>ab</sup> ± 5.3	39.7 <sup>bc</sup> ± 9.5	--	21.8 <sup>a</sup> ± 7
<b>Padrão de diluição II</b>					
A	25 <sup>a</sup> ± 5.8	43.4 <sup>a</sup> ± 12.8	41.2 <sup>bc</sup> ± 5.3	33.7 <sup>a</sup> ± 7.2	7.1 <sup>a</sup> ± 1.5
B	40.3 <sup>b</sup> ± 5.2	52.5 <sup>a</sup> ± 11.7	76.2 <sup>ac</sup> ± 31.7	41.1 <sup>a</sup> ± 12.1	10.9 <sup>a</sup> ± 4
C	8.7 <sup>c</sup> ± 2.2	47.8 <sup>a</sup> ± 33	27.1 <sup>b</sup> ± 14.6	--	9.1 <sup>a</sup> ± 3.8
D	16.8 <sup>a</sup> ± 0.8	41.2 <sup>a</sup> ± 5.3	28.7 <sup>bc</sup> ± 5.3	--	11.2 <sup>a</sup> ± 2.1

Padrão de diluição I = 1/10<sup>4</sup>; Padrão de diluição II = 1/2,5 x 10<sup>4</sup>.

Ensaio A/B = cam. machos adultos; C = machos jovens; D = cam. fêmeas adultas

n = 4

Valores na mesma coluna que não possuem ao menos uma letra superescrita em comum diferem significativamente entre si (α = 0,05)

**TABELA 04.** Variação quantitativa do número de células secretoras de imunoglobulinas totais (A) e IgM (B) em baços de camundongos CBA/J inoculados com coronavírus obtido em diferentes d.p.i., através de ensaios de PFC-reverso com dois padrões de diluição dos esplenócitos.

(A)

<b>Padrão de diluição I</b>				
Índice de aumento de PFC (em número de vezes)				
d.p.i.				
Ensaio	3 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>
A	2.1	4.8	8.2	4.8
B	1.4	7.1	8.7	4.7
C	1.4	7.6	6.1	
D	1.4	9.4	4	
X	1.5	7.2	6.7	4.7
<b>Padrão de diluição II</b>				
A	2.5	7.6	9.7	5.7
B	1.3	4.9	11.7	4.3
C	1.2	6.6	4.9	
D	1.7	7.8	3.2	
X	1.6	6.7	7.3	5

(B)

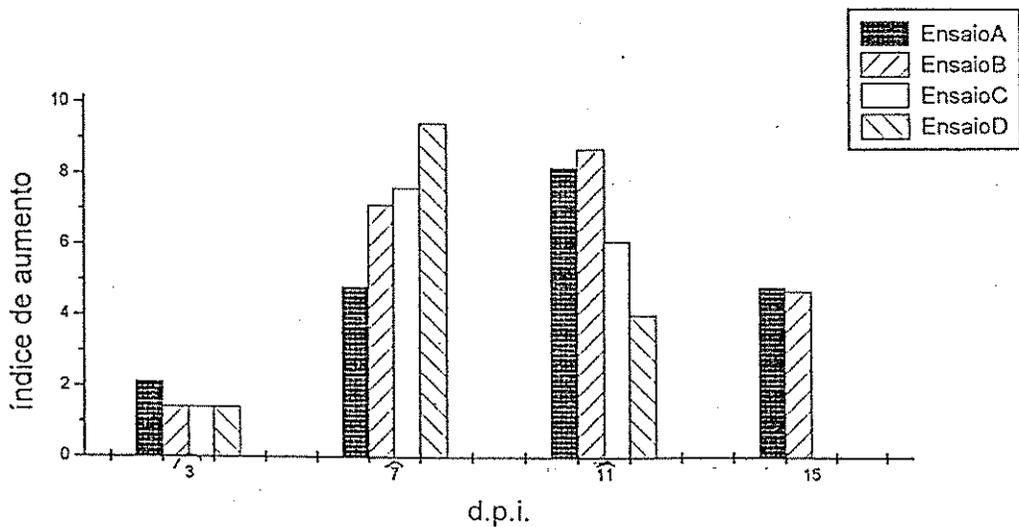
<b>Padrão de diluição I</b>				
Índice de aumento de PFC (em número de vezes)				
d.p.i.				
Ensaio	3 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>
A	2.6	4	4.8	3
B	3	5.8	6.2	3
C	1.1	6.9	3.1	
D	1.1	4	1.8	
X	1.9	5.1	3.9	3
<b>Padrão de diluição II</b>				
A	3.5	6.1	5.8	4.7
B	3.6	4.8	6.9	3.7
C	1	5.2	2.9	
D	1.5	3.6	2.5	
X	2.4	4.9	4.5	4.2

n = 4

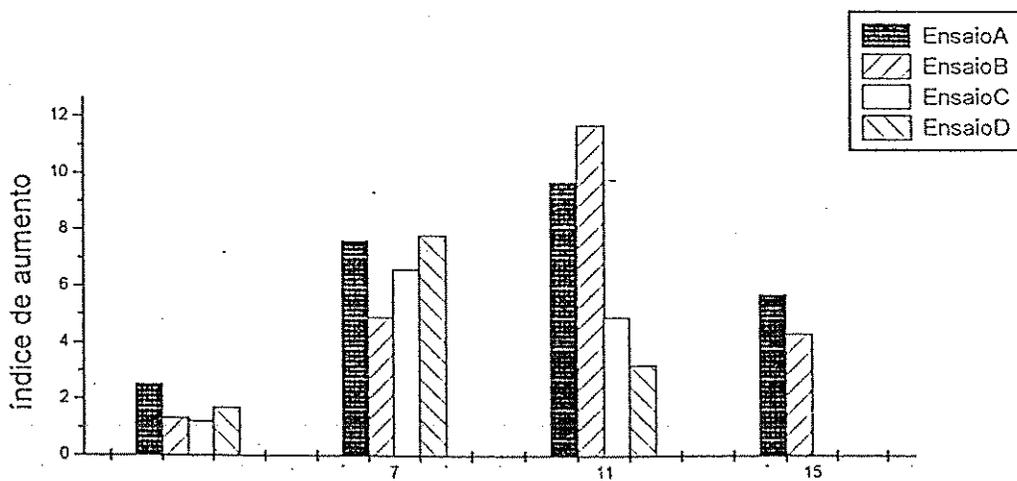
Padrão de diluição I =  $1/10^4$ ; Padrão de diluição II =  $1/2,5 \times 10^4$

Ensaio A/B = machos adultos; C = machos jovens; D = fêmeas adultas

X = média

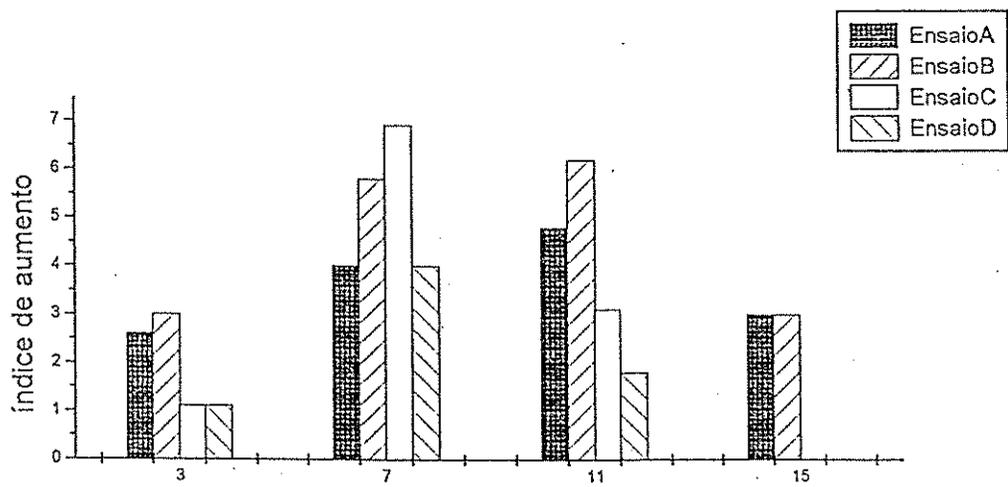


(A)

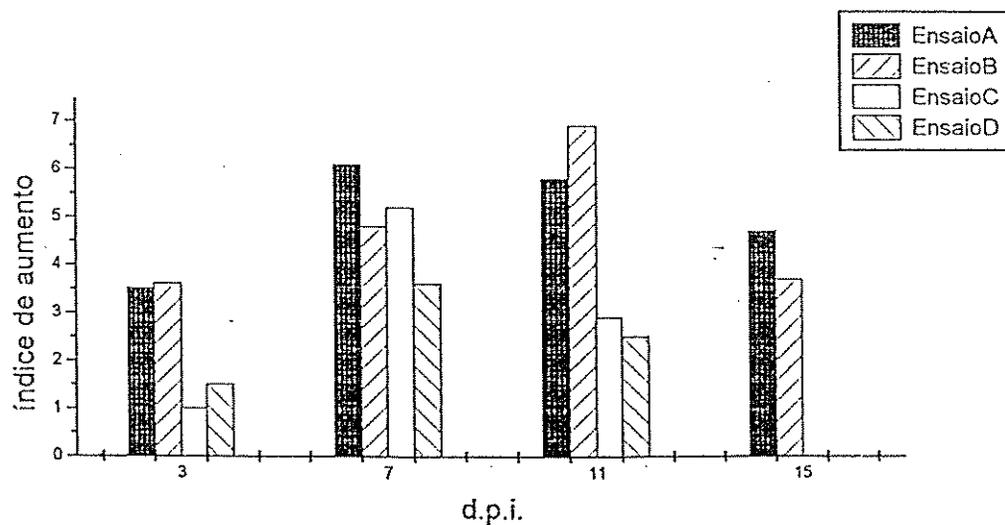


(B)

**FIGURA 02.** Variação quantitativa (em número de vezes) obtida nos ensaios de PFC anti-IgTotal realizados em suspensão de esplenócitos de camundongos CBA/J inoculados com coronavírus. (A) Esplenócitos diluídos  $10^4$  vezes, (B) esplenócitos diluídos  $2,5 \times 10^4$  vezes.



(A)



(B)

**FIGURA 03.** Variação quantitativa (em número de vezes) obtida nos ensaios de PFC anti-IgM realizados em suspensão de esplenócitos de camundongos CBA/J inoculados com coronavírus. (A) Esplenócitos diluídos  $10^4$  vezes, (B) esplenócitos diluídos  $2,5 \times 10^4$  vezes.

2.2. Avaliação do peso médio e contagem celular. Baços de camundongos inoculados com coronavírus foram estudados quanto ao peso e número de células viáveis obtidos nos diferentes dias de infecção analisados. A tabela 05 mostra os valores médios obtidos no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias pós-infecção nos diferentes ensaios realizados, bem como as variações quantitativas obtidas no peso do órgão e número de células. No 7<sup>o</sup> d.p.i., os baços de camundongos CBA/J estimulados apresentaram o máximo crescimento em termos de peso fresco, mantendo valores próximos ao dobro do peso médio obtido nos controles. Esta mesma condição está refletida no número de células viáveis utilizadas durante os ensaios experimentais. A figura 04 ilustra as variações obtidas durante os diferentes dias analisados após a infecção pelo coronavírus.

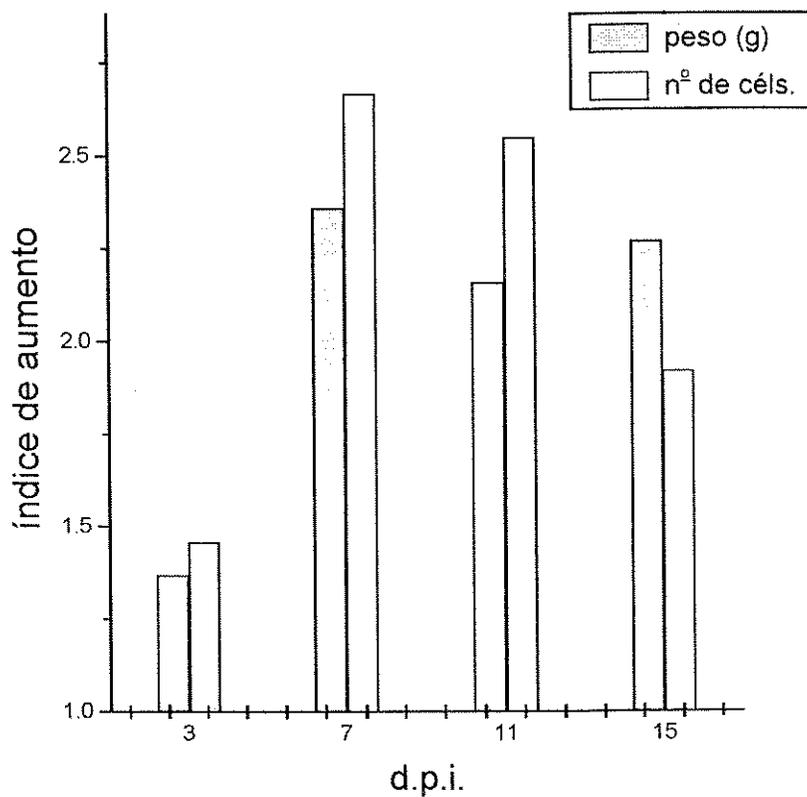
2.3. Avaliação da produção de anticorpos. A produção de anticorpos específicos anti-MHV foi acompanhada através de ensaios de imunofluorescência indireta com os soros coletados durante os ensaios de PFC. Os controles normais utilizados durante os ensaios resultaram negativos após os testes. Dos soros obtidos de animais infectados e testados por imunofluorescência indireta, nenhum deles mostrou reação positiva para o MHV-3.

2.4. Avaliação do estado sanitário dos animais experimentais e controles. O status sanitário dos animais foi verificada através de testes de imunofluorescência desenvolvidos pelo Serviço de Sorodiagnóstico do CEMIB-UNICAMP. Todos os animais responderam negativamente para a produção de anticorpos específicos contra a bateria de antígenos estudados (ver material e métodos).

**TABELA 05.** Números médios, desvio padrão e variação quantitativa (em número de vezes) do peso do órgão e contagem celular obtida dos baços coletados durante os protocolos experimentais na infecção pelo coronavírus.

d.p.i.	peso (g)	nº células (x10 <sup>7</sup> )	Variação quantitativa	
	média ± d.p.	média ± d.p.	peso	nº células
3	0.063 ± 0.006	11.000 ± 0.612	1.37	1.46
7	0.109 ± 0.019	20.000 ± 8.233	2.36	2.67
11	0.100 ± 0.023	19.125 ± 7.800	2.16	2.55
15	0.105 ± 0.017	14.437 ± 6.098	2.27	1.92
C	0.046 ± 0.004	7.483 ± 0.799	-	-

n = 4 / C= controle



**Figura 04.** Variação quantitativa (em número de vezes) observada entre as médias de peso e contagem celular obtidas nos protocolos experimentais realizados em camundongos CBA/J inoculados com coronavírus.

### 3. Avaliação histológica dos baços nos diferentes dias de infecção pelo coronavírus

Cortes histológicos de amostras de baços obtidos nos ensaios de infecção demonstraram pouca alteração da estrutura interna do órgão frente a infecção sub-letal desenvolvida em resposta ao vírus. Apesar do aumento quantitativo dos baços infectados, verificado através dos pesos e do número de células obtidos, a estrutura interna do órgão mantém-se estável, com a disposição típica entre polpa branca e vermelha.

Os tecidos linfóides da polpa branca se apresentaram de maneira difusa ou em formação folicular, distribuídos de maneira randômica, em números aproximadamente equivalentes entre os animais experimentais e controles. Cortes histológicos de baços de camundongos controles, inoculados com uma suspensão de fígado de CBA/J normal, estão apresentados na figura 05, onde podemos observar a disposição dos Foliculos Linfóides (FL) com finas Zonas Marginais (ZM) e algumas Arteriolas Centrais (AC). A Polpa Vermelha (PV) tem apresentação normal com eritrócitos abundantes. É possível observar Trabéculas (T) nestes cortes, compondo o que consideramos ser um quadro histofisiológico normal para nossas condições experimentais.

Baços de animais infectados com o coronavírus apresentaram cortes histológicos estruturalmente semelhantes aos normais (figura 06) durante os dias de infecção analisados. Notamos a mesma disposição aleatória dos Foliculos Linfóides, com Zona Marginal visível e algumas Arteriolas Centrais e Trabéculas.

A figura 07 compara sob maior aumento (80x) cortes transversais obtidos de animais infectados e controles no 7<sup>o</sup> d.p.i.. Não há sinais evidentes da influência da infecção viral sobre a arquitetura do órgão nesta situação. A disposição celular do baço mantém-se estável com nítida organização folicular. Na Figura 07(a) podemos observar um Foliculo Linfóide típico, com bainha linfóide periarteriolar ao redor de uma arteríola.

Ao 11<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> d.p.i., não foi possível notar qualquer alteração conclusiva na estrutura dos órgãos coletados, mesmo sob observação em aumento de 80x (ver figura 08). Entretanto, fusão dos centros germinativos e aumento celular na polpa vermelha podem estar associadas à infecção pelo coronavírus. A presença de células grandes, possivelmente Megacariócitos (Mc) ou Células gigantes multinucleadas, ocorre normalmente nos cortes obtidos (figura 09) com uma concentração

maior destes tipos celulares nas amostras histológicas obtidas de camundongos infectados. É possível que haja alguma relação entre este fato e a infecção viral estabelecida.



(a)



(b)

**Figura 05.** Baços de camundongos (controles) inoculados com suspensão de fígado de camundongo CBA/J normal. Cortes longitudinais corados com H-E em aumento de 32x. (a) 7<sup>a</sup> d.p.i., (b) 15<sup>a</sup> d.p.i..



(a)

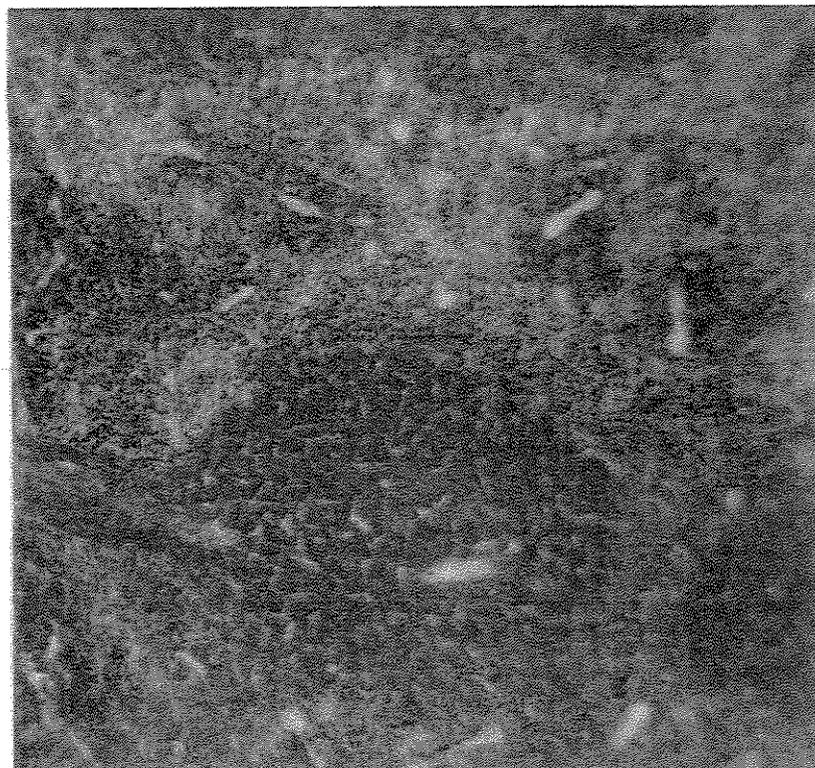


(b)

**Figura 06.** Baços de camundongos CBA/J inoculados com coronavirus no (a) 3<sup>o</sup> d.p.i. e (b) 11<sup>o</sup> d.p.i.. Cortes transversais corados com H-E em aumento de 32x.



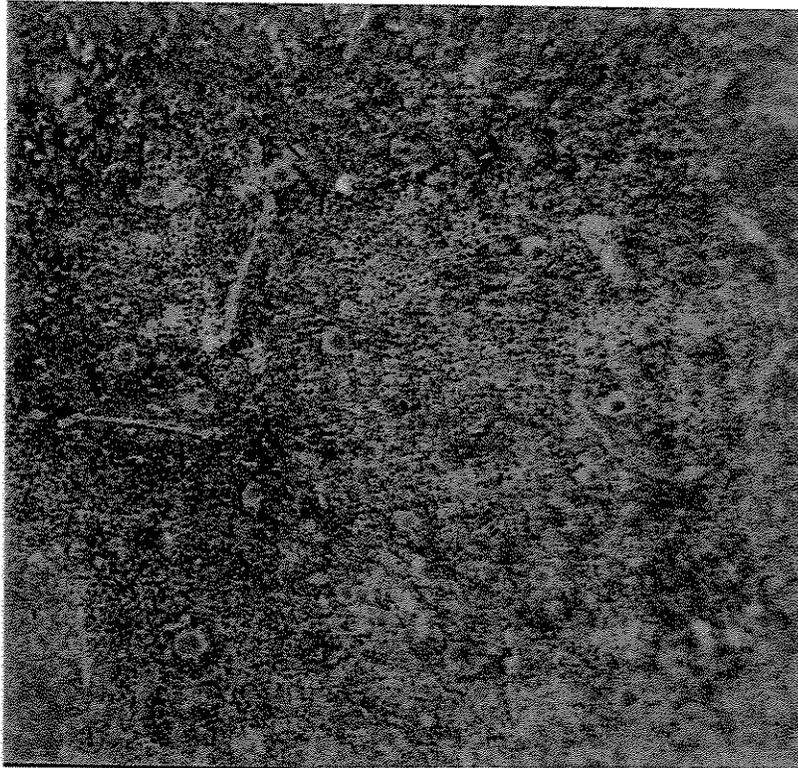
(a)



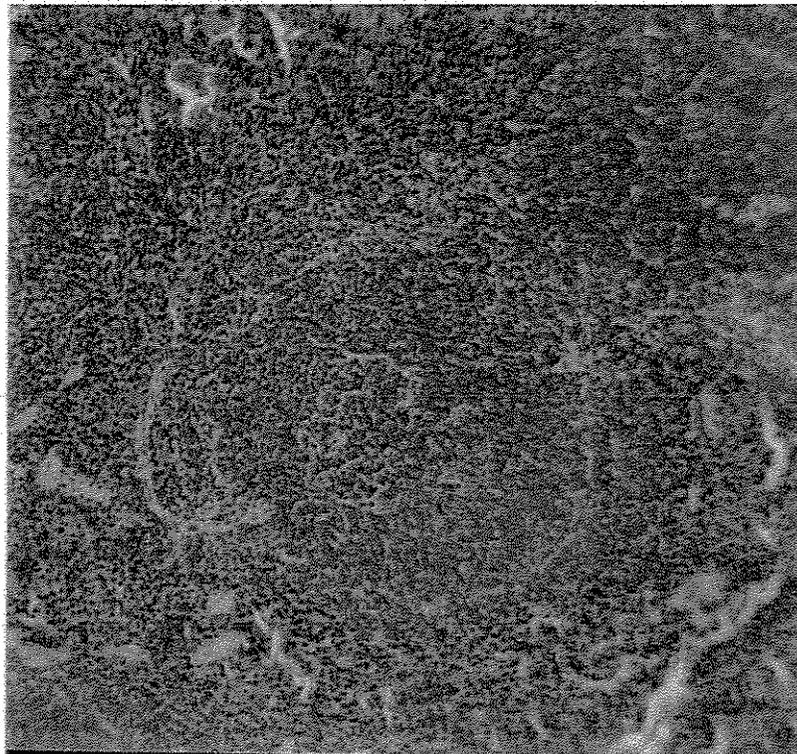
(b)

**Figura 07.** Cortes longitudinais de baço de camundongos CBA/J (a) inoculados com coronavírus e (b) controles, no 7<sup>o</sup> d.p.i., corados com H-E em aumento de 80x.

(a)

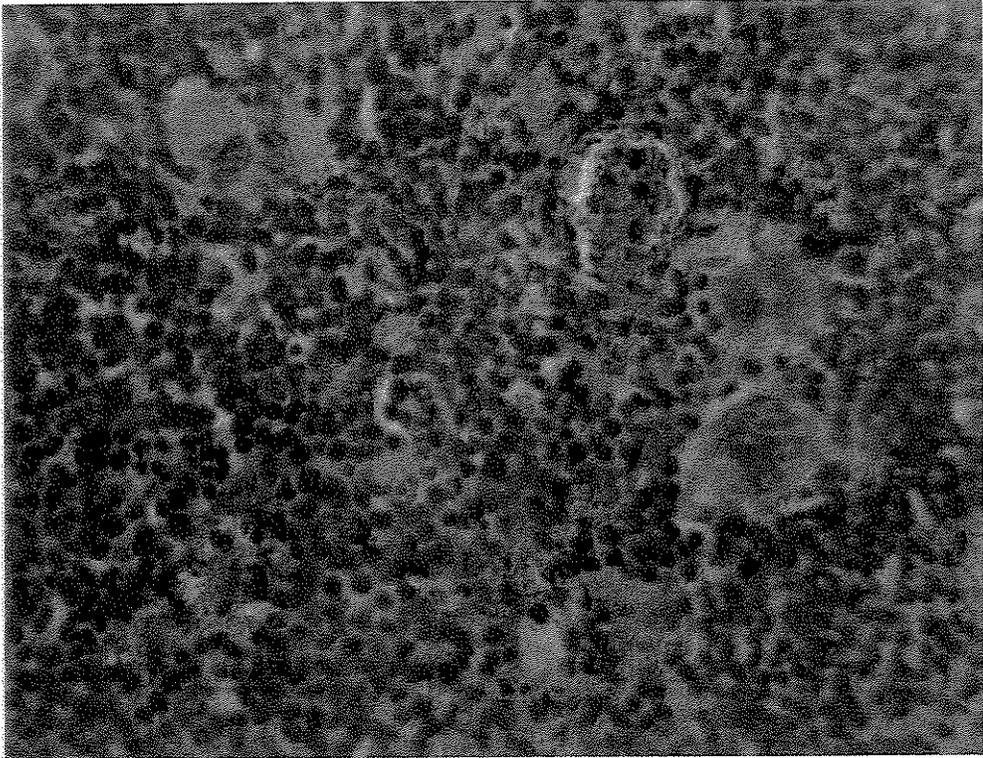


(b)

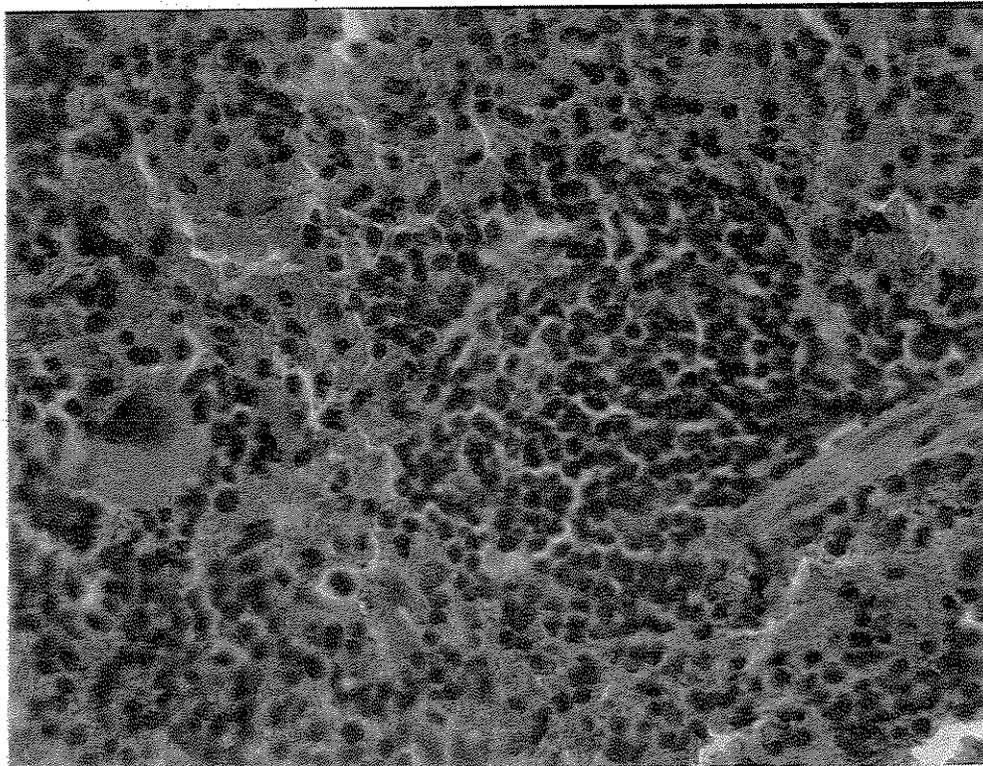


**Figura 08.** Cortes longitudinais de baço de camundongos CBA/J (a) inoculados com coronavírus e (b) normais, no 15<sup>o</sup> d.p.i., corados com H-E em aumento de 80x.

(a)



(b)



**Figura 09.** Cortes longitudinais de baço de camundongos CBA/J (a) inoculados com coronavírus e (b) controles, no 15<sup>o</sup> d.p.i., corados com H-E em aumento de 320x.

## DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, camundongos CBA/J foram infectados com dose subletal de coronavírus contida em homogenato de fígado e analisados quanto ao comportamento da resposta imune associada aos linfócitos B frente à infecção viral. Essa ativação de linfócitos B foi estudada através da determinação do número de células secretoras de imunoglobulinas, da pesquisa de anticorpos séricos reativos com vírus do grupo MHV-3 e da observação das alterações na estrutura histológica dos baços de animais infectados durante intervalos pós-infecção de até 15 dias.

A infecção sub-clínica de camundongos CBA/J com amostras do coronavírus resultou em um aumento do número de células secretoras de imunoglobulinas nas suspensões celulares de baços dos animais infectados quando são comparados às determinações feitas em animais controle. Um aumento na ordem de 6.7 a 7.3 vezes foi observado entre o 7<sup>o</sup> e o 11<sup>o</sup> dias pós-infecção na produção total de imunoglobulinas enquanto anticorpos da classe IgM mostraram aumento entre 4.5 a 5.1 vezes com pico de elevação no mesmo período. Uma queda gradual nos níveis de células secretoras parece se estabelecer no decorrer da infecção. A variabilidade obtida nos dados experimentais pode estar relacionada com diferentes fatores, entre eles variações individuais como sexo e idade dos camundongos, influências de um ambiente convencional de manutenção dos animais e limitações da metodologia. Controles normais, inoculados com suspensões de hepatócitos isogênicos, também mostraram variações nos números de PFC, com significado estatístico nulo. Tais variações representam um *background* normal nestes ensaios.

A determinação dos pesos dos órgãos verificou um aumento que caracteriza uma esplenomegalia associada à infecção. Estes dados sinalizam para a ocorrência de uma ativação policlonal de linfócitos B nos animais infectados pelo coronavírus. A pesquisa de anticorpos reativos com o coronavírus usando MHV-3 como antígeno resultou negativa quando testados pela técnica de imunofluorescência indireta. É possível que os níveis de anticorpos produzidos sejam incompatíveis para explicar o padrão de estimulação das células secretoras ao longo das

observações. Anticorpos específicos têm função relativa, pois a transferência de soro imune de camundongos resistentes para outro susceptível nem sempre garante proteção.

A ativação de linfócitos B pode ser elicitada por diferentes antígenos virais, como glicoproteínas de vírus Sendai e Sindbis, espículas de Adenovirus, hemaglutinina de Influenza Virus e outros. Efeitos do MHV nas funções de células B são relativamente variáveis. Infecções de camundongos C57BL/6 ou (C57BL/6 x A/J) $F_1$  com MHV-3 levou a um quadro de atrofia do baço e depleção de células da linhagem B (LAMONTAGNE *et al.*, 1989; JOLICOEUR & LAMONTAGNE, 1990, 1994). Camundongos cronicamente infectados com MHV-3 apresentaram depressão nos níveis de imunoglobulinas e na resposta anticórpica geral seguida por uma imunização simultânea com eritrócitos de carneiro (LERAY *et al.*, 1982; VIRELIZIER *et al.*, 1976). Em contraste, infecção de camundongos CBA/Rij com MHV-A59 causa uma hipergamaglobulinemia, em especial do isotipo IgG2a (COUTELIER *et al.*, 1988). Modificações no padrão de distribuição isotípica com predomínio da subclasse IgG2a foram observadas em camundongos 129/Sv tratados com antígeno protéico solúvel e simultaneamente inoculados com MHV-A59 (COUTELIER *et al.*, 1988, 1991).

Embora não tenha sido alvo de análise neste trabalho, onde foram verificados os clones secretores de IgT e IgM, uma produção intensa de imunoglobulinas especialmente da subclasse IgG2a foi observada em camundongos infectados com diferentes vírus. Camundongos CBA inoculados intraperitonealmente com adenovirus linhagem FL demonstraram uma importante proliferação esplênica, que se inicia ao 4<sup>o</sup> d.p.i. e atinge um pico ao 10<sup>o</sup> d.p.i., indicando que o vírus é um potente ativador *in vivo* de linfócitos B murinos (COUTELIER *et al.*, 1990). As subclasses IgG2a e, em menor extensão, IgG2b foram amplamente produzidas no curso da infecção pelo adenovirus, atingindo um pico de resposta no 10<sup>o</sup> d.p.i.. Resultados semelhantes foram obtidos quando camundongos CBA foram inoculados com LDV. É possível que um comportamento patológico semelhante se estabeleça nas infecções pelo coronavírus. O uso de anticorpos monoclonais anti-CD4, inibidores de linfócitos T-helper, não afeta a proliferação esplênica, mas reduz dramaticamente a produção de IgG pelos esplenócitos de camundongos infectados com Adenovirus e LDV, sem contudo alterar as proporções observadas para as outras subclasses. Estes resultados indicam que linfócitos T induzem a secreção de IgG2a por células B que estejam altamente ativadas, caracterizando uma via T-dependente na resposta à infecção. É possível que a

secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T seja um fator de mediação na preponderância de IgG2a secretadas durante infecções virais.

O papel de células T-helper na proliferação de linfócitos induzida por vírus pode ser similar em alguns aspectos àquela observada com o parasita *T. cruzi*, onde o tratamento com anti-CD4 diminui a resposta policlonal celular induzida pela infecção parasitária, inclusive a resposta blastogênica (MINOPRIO *et al.*, 1987).

O aumento do número de células secretoras de imunoglobulinas observado nos camundongos CBA infectados com o coronavírus foi acompanhado de um processo de esplenomegalia, caracterizado através do aumento de peso dos órgãos infectados e do número de células totais obtidos em nossos protocolos experimentais. Durante a cinética estudada, esta esplenomegalia foi máxima no 7<sup>o</sup> d.p.i. Camundongos 129/Sv, CBA/Rij e CBA/Ht inoculados com MHV-A59 mostraram uma forte esplenomegalia induzida pelo vírus, atingindo um máximo no 7<sup>o</sup> dpi. (LARDANS *et al.*, 1996), com semelhança aos dados obtidos com o coronavírus.

A histopatologia também é uma metodologia indicada para a pesquisa de infecções agudas pelo MHV. Apesar do aumento quantitativo dos baços infectados, verificado através dos pesos e do número de células obtidos, a estrutura interna do órgão mantém-se estável, com a disposição típica entre polpa branca e vermelha. Os tecidos linfóides da polpa branca se apresentaram de maneira difusa ou em formação folicular, distribuídos de maneira randômica, em números aproximadamente equivalentes entre os animais experimentais e controles. A análise do perfil histológico obtido nos ensaios com camundongos inoculados com coronavírus demonstraram pequenas alterações estruturais provavelmente transientes. Entre as principais observações, evidenciamos um aumento quantitativo no volume dos órgãos. Porém, a infecção experimental pelo coronavírus não alterou significativamente a estrutura interna dos baços. A distribuição da polpa branca entre a polpa vermelha obedece o padrão de normalidade, apesar de um possível processo de fusão dos folículos linfóides e expansão hematopoiética durante o desenvolvimento da infecção. Estes dados coincidem com os resultados obtidos em outros sistemas de infecção, onde alterações ou lesões de origem patológica são brandos e transientes. Se presentes, tais alterações se concentram nos tecidos trópicos à cepa viral utilizada (COMPTON *et al.*, 1993). A presença de células grandes, provavelmente megacariócitos ou células gigantes multi-nucleadas, ocorre normalmente nos cortes histológicos obtidos. Entretanto, observamos uma maior concentração destes tipos celulares nas

amostras de tecido esplênico obtidas de camundongos estimulados com o vírus. É possível que haja alguma relação entre este fato e a infecção viral estabelecida.

LARDANS *et al.* (1996) mostram secções histológicas (5µm) de baços infectados com MHV-A59 com estrutura geral preservada, apesar do aumento dos centros germinativos e no número de células da polpa vermelha, quando comparados aos controles. Vários linfócitos, grandes e de caráter blástico, foram encontrados na polpa branca e vermelha dos animais infectados. O índice mitótico também estava aumentado após a infecção viral. O aumento no número de células nestes órgãos foi confirmado através de análise citométrica. A produção de imunoglobulinas, analisada através de ELISA, foi máxima ao 7<sup>o</sup> dpi com um predomínio da subclasse IgG2a. Entretanto, ao absorver soros imune com diferentes concentrações do vírus e posterior análise (ELISA) do sobrenadante recuperado, foi verificado que os níveis totais de IgG2a eram só marginalmente afetados, indicando que a maior parte das Imunglobulinas produzidas após a infecção pelo MHV-A59 não eram anticorpos específicos ao vírus. A produção de IgG2a foi amplamente inibida nos baços infectados de animais que receberam tratamentos com anticorpos monoclonais anti-CD4, sugerindo que linfócitos T helper são importantes neste fenômeno.

Procedimentos histológicos executados com baços contaminados pelo MHV-3 obtidos de camundongos com diferentes padrões de resistência mostraram algumas alterações histopatológicas, notadamente dose-dependente. Processos degenerativos com depleção linfocitária nas áreas de células T, formação de células gigantes multinucleadas e necrose ao redor das arteriolas centrais foram observados nos baços. A infecção não mata camundongos imunocompetentes, levando a supor que as lesões esplênicas e hepáticas observadas se estabilizam após a recuperação do animal (FUJIOKA *et al.*, 1985).

A ausência de anticorpos anti-MHV, verificada até o 15<sup>o</sup> dpi, também sugere a ocorrência de um processo de ativação policlonal. A metodologia usada na pesquisa sorológica através de ensaios de imunofluorescência é recomendada por diferentes autores, juntamente com o método de ELISA. Entretanto, o conjunto de dados fornecidos pela pesquisa sorológica indica que uma soroconversão deva ocorrer somente entre o 7<sup>o</sup> e o 10<sup>o</sup> dpi. Como a dose aplicada nos ensaios experimentais era francamente sub-letal, é possível que o estabelecimento de uma resposta humoral específica tenha sido retardada. Em infecções epizoóticas de camundongos *naive* com MHV respiratório é esperada uma soroconversão em aproximadamente 2 semanas pós-infecção, com manifestações

variáveis de doença subclínica, de maneira semelhante ao que acontece em infecções enzoóticas (COMPTON *et al.*, 1993).

A produção seletiva de imunoglobulinas específicas pode representar uma vantagem defensiva para o indivíduo infectado, mas a ativação policlonal de diferentes células seria de algum valor para a reestruturação do equilíbrio orgânico do hospedeiro? Associado a uma estimulação policlonal de células T<sub>citotóxicas</sub> (YANG *et al.*, 1989), a secreção de anticorpos hábeis na interação com diferentes antígenos, mesmo com baixa afinidade, poderia representar uma primeira linha de defesa, antes que respostas específicas se estabeleçam (COUTELIER *et al.*, 1990). Entretanto, em algumas situações, esta ativação policlonal generalizada pode culminar em manifestações de imuno-deficiências e doenças auto-imunes (KLINMAN & MORSE III, 1989).

Experimentos com Adenovirus e Lactate Dehydrogenase-elevating Virus (LDV) indicaram que somente uma pequena fração destas imunoglobulinas (<5 a 10%) eram anticorpos antivirais, sugerindo que a maior parte deles decorreram de uma ativação policlonal de linfócitos B (COUTELIER *et al.*, 1988; COUTELIER & VAN SNICK, 1985). Embora uma função destas imunoglobulinas na defesa do hospedeiro não possa ser excluída, é possível que a ativação policlonal induzida por tais viroses possa resultar em reações de autoimunidade e processos de imunodeficiências (KLINMAN & MORSE III, 1989).

Um gamaherpesvirus murino, o MHV-68, causa aguda infecção respiratória seguida de uma latente infecção em linfócitos B. Duas semanas após a infecção há o estabelecimento de uma marcada esplenomegalia, onde os números celulares são 2-3 vezes maiores. Análises citofluorimétricas durante a esplenomegalia revelaram um aumento nos números de linfócitos B, T/CD4<sup>+</sup> e T/CD8<sup>+</sup>, com valores maiores para este último. Depleção de células T/CD4<sup>+</sup> elimina a esplenomegalia e reduz a infectividade (USHERWOOD *et al.*, 1996).

Apesar do alto grau de disseminação previsto para os MHV, é possível manter uma condição experimental controlada quanto à ausência do vírus através da utilização de uma estrutura apropriada na manutenção dos animais, conforme verificado em nossos experimentos. É importante que o local de manutenção seja limpo, abrigando poucas caixas de criação e que o material em contato direto com os animais seja autoclavado antes das trocas. Entretanto, em grandes colônias mantidas convencionalmente, um surto infeccioso pode se alastrar de maneira subclínica, com algumas alterações na resposta biológica dos camundongos. Alguns laboratórios já conseguiram

manter camundongos livres de MHV por até 1 ano em ambientes contaminados através da utilização de gaiolas de criação com armações filtrantes rígidas (COMPTON *et al.*, 1993). Embora MHV seja de fácil inativação ambiental e desinfecção química, eles estão amplamente distribuídos, com alto poder de contágio e mutabilidade.

Desta forma, a utilização de animais convencionais na pesquisa laboratorial pode determinar a presença inconveniente de diferentes patógenos naturais à população murina (FOSTER *et al.*, 1982; SMITH *et al.*, 1983; BIA *et al.*, 1980; CARRANO *et al.*, 1984). Essas infecções muitas vezes são de difícil detecção e podem mascarar respostas biológicas dos camundongos. A condição sanitária do modelo animal, portanto, é um fator determinante para a obtenção de resultados na pesquisa biomédica (MELBY & BALK, 1983). Este é um problema de caráter multidisciplinar, afetando diferentes modelos experimentais que utilizam animais de laboratório. É importante, desta forma, garantir o estado sanitário dos animais utilizados para que não haja alterações significativas nos resultados obtidos na pesquisa científica. É possível manter uma estrutura experimental controlada em condições convencionais.

Para evitar a ocorrência de infecções naturais enzoóticas nas populações murinas é necessária a utilização de colônias mantidas sob barreiras, como isoladores, gaiolas protegidas por filtros e acomodações em sistema fluxo-laminar, além do uso de ração, água e equipamentos estéreis. Nas colônias mantidas de modo convencional, pode haver um surto infeccioso de difícil prevenção e controle. A implantação de um Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB-UNICAMP) nesta universidade possibilitou a utilização de animais SPF (Specific Pathogen Free) de alta qualidade, minimizando os problemas decorrentes da criação convencional de camundongos.

Essa preocupação com a qualidade sanitária dos animais de experimentação acentuou, sem dúvida, o questionamento sobre a possibilidade de contaminantes nas cepas de protozoários transmitidas em cadeia como forma de manutenção em laboratório. De fato, foi detectada a presença de um coronavírus associado com cepas de *T. cruzi*, nos estoques mantidos em nosso departamento através de repiques periódicos de sangue fresco contaminado em camundongos *naive* (RANGEL *et al.*, 1994). Este procedimento de manutenção dos estoques pode ter favorecido a transmissão dos coronavírus entre os lotes de camundongos usados. A presença sub-clínica deste grupamento viral é de difícil detecção e pode facilmente passar despercebida durante a infecção.

Desta forma, é possível que alguns protocolos de modelos experimentais da doença de Chagas tenham sido desenvolvidos sob a pressão de um agente viral contaminante, ou seja, um coronavírus.

Assim, de maneira indireta, este trabalho procurou determinar se o quadro de infecção sub-clínica de um coronavírus associado a cepas originais de *T. cruzi*, em camundongos de uma linhagem padrão para esses estudos, exerceria algum tipo de pressão nos resultados obtidos em infecções concomitantes destes dois microrganismos.

Concluindo, verificamos que a infecção de camundongos imunocompetentes com o coronavírus apresenta um quadro típico observado para as Coronavíruses. O inóculo de uma dose subletal propiciou o estabelecimento de um quadro subclínico com sintomatologia inaparente, à semelhança do que acontece com animais infectados naturalmente ou por via oronasal pelo MHV. Os efeitos observados guardam semelhanças com outros diferentes modelos experimentais citados na literatura, apesar da característica variabilidade de respostas elicitadas pelos coronavírus. É possível que tais efeitos atuem concomitantemente quando associados a outras infecções, alterando resultados experimentais. Contudo, apesar da pequena extensão do distúrbio causado pela infecção sub-clínica, pode haver um comprometimento do quadro geral de parasitismo desenvolvido pelo *T. cruzi* em camundongos, especialmente se a ativação policlonal tiver um caráter cumulativo. Esta condição poderia ser explorada comparando-se o comportamento de camundongos infectados pelo *T. cruzi* na presença ou ausência do vírus contaminante. O risco de infecção natural pode ser eliminado com o uso de isoladores e animais “SPF”.

Os fenômenos de ativação policlonal observados nas infecções com algumas cepas do MHV, inclusive com o coronavírus em questão, poderia representar um distúrbio no sistema imune do hospedeiro decorrente da infecção. Este distúrbio seria necessário para o restabelecimento do equilíbrio do sistema, sendo um reflexo da multirreatividade entre os inúmeros clones presentes. Neste contexto, é possível que a infecção concomitante de *T. cruzi* e coronavírus em um animal se expresse de maneira aditiva, como duas pressões que se somam para ativar um maior número de linfócitos, inclusive aqueles autorreativos. Em uma situação descontrolada, a formação de diferentes clones reativos com estruturas autólogas pode culminar com processos de imunodeficiências e reações posteriores de autoimunidade.

## CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

- A infecção de camundongos CBA/J com doses subletais de preparações contendo coronavírus determinou um quadro de fase aguda sub-clínica transiente, associada à uma ativação linfocitária de células B.
- A infecção determinou uma elevação dos níveis de células secretoras de imunoglobulinas totais - IgT alcançando um pico máximo entre os dias 7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> após a infecção, representando um aumento da ordem de 6.7 - 7.3 vezes os números normais.
- Os níveis de células secretoras de anticorpos da classe IgM, com um pico máximo no mesmo intervalo, estavam aumentados 4.5 - 5.1 vezes em relação aos valores normais.
- A esplenomegalia associada à infecção foi máxima no 7<sup>o</sup> dia, mantendo valores próximos ao dobro do peso de baços normais até o 15<sup>o</sup> dia.
- A análise histológica dos baços de animais infectados mostrou uma estrutura geral do órgão preservada, com alterações transitórias da sua organização.
- A ausência de anticorpos reativos com vírus do grupo MHV-3, pesquisada durante o intervalo da infecção, sugere também a ocorrência de uma ativação policlonal.
- A infecção sub-clínica de camundongos com coronavírus é de difícil detecção, em função da ausência de sinais clínicos evidentes e mortalidade associada. Entretanto, a presença do coronavírus pode determinar alterações na resposta biológica de camundongos quando usados como modelo experimental, destacando-se assim a importância da sua qualidade sanitária.

## RESUMO

## RESUMO

### ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE BAÇOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CORONAVÍRUS.

A presença de coronavírus do tipo MHV foi associado à cepas Y de *T. cruzi* usualmente empregadas em modelos experimentais da Doença de Chagas, sugerindo que as observações imunohistológicas desenvolvidas nos animais são decorrentes da infecção concomitante do protozoário com o vírus (Exp. Parasitol. **78**:429-431, 1994). Neste trabalho camundongos foram submetidos à infecção pelo coronavírus, visando o estudo da ativação de linfócitos B esplênicos e das possíveis alterações histológicas nesse órgão.

Camundongos CBA/J obtidos de colônias "SPF" (CEMIB-UNICAMP) foram inoculados intraperitonealmente com uma dose da suspensão viral, determinada através de uma estimativa de  $DL_{50}$ . Nos dias 3, 7, 11 e 15 pós-infecção, os camundongos foram sangrados para a obtenção de soros e sacrificados a seguir. Os baços isolados foram pesados e preparadas suspensões celulares que foram utilizadas nos ensaios de PFC-reverso, visando a determinação do número de células secretoras de imunoglobulinas. No mesmo período, cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina foram utilizados para a pesquisa de alterações na estrutura interna do órgão. Nesta cinética de estudo pôde-se observar que entre os dias 7 e 11 pós-infecção houve um aumento no peso dos baços infectados (2 a 3 vezes superiores aos controles) associado com um aumento de 7 a 8 vezes no número de células secretoras de imunoglobulinas totais (PFC com anti-IgTotal) e de 5-6 vezes no número de células secretoras de imunoglobulinas da classe IgM (PFC com anti-IgM). Não foram detectados anticorpos específicos anti-MHV nos soros de quaisquer destes animais durante o período de observação. Alterações histológicas foram observadas nas preparações de animais infectados, caracterizadas por uma leve desestruturação nas áreas de polpa branca e polpa vermelha, quando comparadas com aquelas de baços normais.

A alteração no perfil de linfócitos B esplênicos de camundongos infectados com o coronavírus, caracterizada pelo aumento no número de células secretoras de imunoglobulinas, está possivelmente associada à um processo de ativação policlonal. Assim, uma infecção sub-clínica dessa estirpe viral associada com outros patógenos poderá alterar substancialmente a resposta imune de animais desenvolvendo diferentes patologias.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- ACHTNICH M., and ZOLLER (1991) Autoreactive antibodies in thymus and spleen of neonatal and young adult BALB/c mice: influence of prenatal tolerization. *Scand. J. Immunol.* **33**: 25-36.
- AL-BALAGUI S., MÖLLER E., MÖLLER G., AND ABEDI-VALUGERDI M. (1996) Mercury induces polyclonal B cell activation, autoantibody production and renal immune complex deposits in young (NZBxNZW)F<sub>1</sub> hybrids. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1519-1526.
- ANDRADE Z.A. (1991) Pathogenesis of Chagas' Disease. *Res. Immunol.* **142**:126-129.
- ARAÚJO P.M.F., HOLMBERG D., MARTINEZ -A.C. AND COUTINHO A. (1987) Idiotypic multireactivity of natural antibodies: natural anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scand. J. Immunol.* **25**: 497-506.
- BARTHOLD S.W. (1986) Research complications and state of knowledge of rodent coronavirus. *In* Complications of viral and mycoplasmal Infections in rodents to Toxicology Research and Testing (T.E. Hamm, Ed.), pp. 53-89, Hemisphere, Washington, DC.
- BARTHOLD S.W., AND SMITH A.L. (1984) Mouse Hepatitis Virus strain-related patterns of tissue tropism in suckling mice. *Arch. Virol.* , **81**: 103-112.

- BERNABÉ R.R., TUNESKOG M., FORNI L., MARTINEZ C.A., HOLMBERG D., IVARS F., AND COUTINHO A. (1981) The protein A plaque assay for the detection of immunoglobulin-secreting cells. *Immunol. Methods* **2**.
- BIA F.J., THORNTON G.F., MAIN A.J. (1980) Western equine encephalitis mimicking herpes simplex encephalitis. *J. Am. Med. Assoc.* **244**: 367-369.
- BOORMAN, G.A., LUSTER, M.I., DEAN, J.H., CAMPBELL, M.L., LAUER, L.A., TALLEY, F.A., WILSON, R.E., COLLINS, M.J. (1982) Peritoneal macrophage alterations caused by naturally occurring MHV. *Am. J. Pathol.*, **106** :110-117.
- BRENER Z. (1980) Immunity to *Trypanosoma cruzi* . *Adv. Parasitol.* **18**:247-291.
- BRENER Z. AND CHIARI E. (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* . *Rev. Inst. Med. Trop.* **5**: 220-244.
- BURKE J.D., WEYMOUTH R., AND SEIBEL H.R. (1972) Histological Methods. In: *Essentials of Histology*. N. York. Barron's Educational Series: 5-7.
- BURNET F.M. (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.* **20**: 67-77.
- CARRANO V., BARTHOLD S.W., BECK D.S. (1984) Alteration of viral respiratory infections of mice by prior infection with mouse hepatitis virus. *Lab. Anim. Sci.* **34**: 573-576.
- CARTHEW P., SPARROW S., AND VERSTRAETE A.P. (1978). Incidence of natural virus infection of laboratory animals 1976-1977. *Lab. Anim. Sci* **12**:245-246.

- CASEBOLT, D.B., SPALDING, D.M., SCHOEB, T.R., LINDSEY, J.R. (1987) Suppression of immune response induction in Peyer's patch lymphoid cells from mice infected with MHV. *Cell. Immunol.* **109** : 97-103
- COMPTON S.R., BARTHOLD S.W., AND SMITH A.L. (1993) The Cellular and Molecular Pathogenesis of Coronavirus. *Lab. Animal Sci.* **43**: 15-28.
- COOK-MILLS J.M., MUNSHI H.G., PEARLMAN R.L., et al (1992) Mouse hepatitis virus infection suppresses modulation of mouse spleen T-cell activation. *Immunology* **75**: 542-545.
- COUTELIER J.-P. AND VAN SNICK J. (1985) Isotypically restricted activation of B lymphocytes by lactate dehydrogenase virus. *Eur. J. Immunol.* **15**, 250-255.
- COUTELIER J.-P., VAN DER LOGT J.T.M., AND HEESSEN F.W.A. (1991) IgG subclass distribution of primary and secondary immune responses concomitant with viral infection. *J. Immunology* **147**: 1383-1386.
- COUTELIER J.-P., COULIE P.G., WAUTERS P., HEREMANS H., AND VAN DER LOGT J.T.M. (1990) *In vivo* polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J. Virol.* **64**:5383-5388.
- COUTELIER J.-P., GODFRAIND C., DVEKSLER G.S., WYSOCKA M., CARDELLICCHIO C.B., NOËL H., AND HOLMES K.V. (1994) B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serves as receptors for murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1383-1390.
- COUTELIER J.-P., VAN BROECK J., AND WOLF S.F. (1995) Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. *J. Virol.* **69**: 1955-1958.

- COUVELIER J.-P., VAN DER LOGT J.T.M., HEESSEN F.W.A., VINK A., AND VAN SNICK J. (1988) Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J. Exp. Med.* **168**:2373-2378.
- COUTINHO A. (1989) Beyond clonal selection and network. *Immunol. Rev.* **110**: 64-87.
- COUTINHO A., FORNI L., HOLMBERG D., IVARS F., AND VAZ N. (1984) From an antigen-centered, clonal perspective of immune responses to an organism-centered, network perspective of autonomous activity in a self-referential immune system. *Immunol. Rev.* **79**:151-168.
- CRANDALL C.A., AND CRANDALL R.B. (1971a) *Ascaris suum*: Immunoglobulin response in mice. *Exp. Parasitol.* **30**: 426-437.
- CRANDALL R.B., AND CRANDALL C.A. (1971b) *Trichinella spiralis*: Immunologic response to infection in mice. *Exp. Parasitol.* **31**: 378-398.
- D'IMPÉRIO-LIMA M.R., JOSKOWICZ M., COUTINHO A., KIPNIS T., AND ELSEN H. (1985) Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cells responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* **15**: 201-203.
- de SOUZA, M.S., SMITH, A.L. (1991) Characterization of accessory cell function during acute infection of BALB/cByJ mice with MHV, strain JHM. *Lab. Anim. Sci.* **41** : 112-118
- de SOUZA, M.S., SMITH, A.L., BOTTOMLY, K. (1991) Infection of BALB/cByJ with the JHM strain of MHV alters in vitro splenic T cell proliferation and cytokine production. *Lab. Anim. Sci.* **41** : 99-105

- DIGUIERO G., LYMBERI J.C., MAZIE S., ROUYRE G.S., BUTLERBROWN G.S., WHALEN R.G., AND AVRAMEAS S. (1983) Murine hybridomas secreting natural antibody reacting with self antigen *J. Immunol.* **131**: 2267-2272.
- DVEKSLER G.S., DIEFFENBACH C.W., CARDELLICHIO C.B., MCCUAIG K., PENSIERO M.N., JIANG G.-S., BEAUCHEMIN N., AND HOLMES K.V. (1993) Several members of the mouse CEA-related glycoprotein family are functional receptors for murine coronavirus MHV-A59. *J. Virol.* **67**:1-8.
- FALCÃO D.P., MEDEIROS B.M.M., COSTA A.M., ARAÚJO P.M.F. (1995) Presence of autoantibodies in the serum of mice infected with *Yersinia enterocolitica* O:3. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **13**:195-198.
- FALLON M.T., BENJAMIN W.H., SCHOEB Jr. T.R., AND BRILES D.E. (1991) Mouse hepatitis virus strain UAB infection enhances resistance to *Salmonella typhimurium* in mice by inducing suppression of bacterial growth. *Infect. and Immunity* **59**: 852-856.
- FINGEROTE R.J., CRUZ B.M., GORCZYNSKI R.M., FUNG L.S., HUBBELL H.R., SUHADOLNIK R.J., AND LEVY G.A. (1995) A 2',5'-oligoadenylate analogue inhibits murine hepatitis virus strain 3 (MHV-3) replication *in vitro* but does not reduce MHV-3-related mortality or induction of procoagulant activity in susceptible mice. *J. Gen. Virol.* **76**: 373-380.
- FOSTER H.L., SMALL J.D. AND FOX J.G. (1982) "The mouse in Biomedical Research", Vol. II, Academic Press, New York/London.
- FUJIOKA N., FUJIWARA K., YAMANOUCHI K., AND HAYAMI M. (1985) Histopathology and Hematology of Acute Infection with Mouse Hepatitis Virus, MHV-3 in mice with different susceptibility. *Jpn. J. Vet. Sci.* **47**: 761-768.

- FUJIWARA K., WAGNER J.E. (1994) Mouse Hepatitis Virus. in: Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals. Nomura T., Waggle H., Kagiya N., Allen A. 2<sup>a</sup> Ed..
- GILBERT B., DIGUIERO G., AND AVRAMEAS S. (1982) Naturally-occurring antibodies against nine common antigens in normal humans I. detection, isolation, characterization. *Immunol.* **128**:2779-2787.
- HOLMES, K.V., 1990. Coronaviridea and their replication, p841-856, in B.N. Fields, D.N. Knipe et al (Eds), *Virology*, 2<sup>a</sup> Ed., Raven Press, Ltd.,NY.
- JARRET E., AND FERGUSON A. (1974) Effect of T cell depletion on the potentiated reagin response. *Nature* **250**:450-454.
- JERNE N.K. (1955) The natural selection theory of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**: 849-860.
- JERNE N.K. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Paris)* **125C**, 373.
- JOLICOUER P. AND LAMONTAGNE L. (1989) Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+  $\mu$ + B lymphocyte subpopulations. *J. Immunology* **143**: 3722-3730.
- JOLICOUER P. AND LAMONTAGNE L. (1990) Mouse Hepatitis Virus 3 pathogenicity and B and T lymphotropisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **276**: 543-552.
- JOLICOUER P. AND LAMONTAGNE L. (1994) Impaired T and B cell subpopulations involved in a chronic disease induced by mouse hepatitis virus type 3. *J. Immunol.* **153**: 1318-1327.

- KATAMI K, TAGUCHI F., NAKAYAMA M., GOTO N., FUJIWARA K. (1978) Vertical transmission of MHV infection in mice. *JPN. J. Exp. Med.* **48**:481-490.
- KIERSZENBAUM F., MORETTI E., SZTEIN M. (1991) *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of IL-2 receptors by stimulated Human B lymphocytes. *Immunol.* **74**:317-322.
- KLINMAN D.M., AND MORSE III H.C. (1989) Characteristics of B cell proliferation and activation in murine AIDS. *J. Immunol.* **142**: 1144-1149.
- KRAFT V. & MEYER B. (1986) Diagnosis of Murine Infections in relation to test methods employed. *Lab. Ani. Sci.* **36**: 272-276.
- KUNKEL H.G. (1970) Individual antigenic specificity and diversity of human antibodies. *Fed. Proc.* **29**: 55-60.
- LAFAILLE M.A.C., OLIVEIRA, L.C.B., LIMA G.C.A., ABRAHANSON I. (1990) *Trypanosoma cruzi* : maintenance of parasite-specific T cell responses in Lymphonodes during the acute phase of the infection. *Exp. Parasitol.* **70**:164-174.
- LAI, M.M.C. 1990. Coronavirus: Organization, replication and expression of genome. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**, 303-333.
- LAMONTAGNE L., AND JOLICOEUR P. (1994) Low-virulent Mouse Hepatitis Viruses exhibiting various tropism in Macrophages, T and B cell subpopulations, and Thymic Stromal cells. *Lab. Anim. Sci.* **44**: 17-24.

- LAMONTAGNE L., DESCOTEAUX J.-P., AND JOLICOEUR P. (1989) Mouse hepatitis virus 3 replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J. of Immunology* 142: 4458-4465.
- LARDANS V., GODFRAIND C., VAN DER LOGT J.T.M., HEESSEN F.W.A., GONZALEZ M.-D., COUTELIER J.-P. (1996) Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection. *J. Gen. Virol.* 77: 1005-1009.
- LERAY D., DUPUY C., AND DUPUY J.M. (1982) Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. IV. MHV-3-induced immunodepression. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 23:539-547.
- LOPES L.M., PEREIRA M.A.C., GERKEN S.E., AND VAZ N. (1990) Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 100: 83-91.
- LUCAS, C.J., UBELS-POSTMA, J.C., REZEE, A., GALAMA, J.M.D. (1978) Activation of measles virus from silently infected human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 148 : 940-952
- McCHESNEY, M.B., ALTMANN, A., OLDSTONE, M.B.A. (1988) Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J. Immunol.* 140 : 1269-1273
- MEDEIROS B.M.M., MENDES-GIANINI M.S.J., AND FALCÃO D.P. (1991) Immunoglobulin isotypes produced by mice experimentally infected with *Yersinia* sp.. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 12: 117-122.
- MEDEIROS B.M.M., COSTA A.M., ARAÚJO P.M.F., FALCÃO D.P. (1995) Occurrence of polyclonal B-cell activation after experimental infection with *Yersinia enterocolitica* O:3. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13: 207-210.

- MEDEIROS B.M.M., COSTA A.M., ARAÚJO P.M.F., FALCÃO D.P. (1997) Association between polyclonal cell activation and the presence of autoantibodies in mice infected with *Yersinia enterocolitica* O:3. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**:401-405.
- MELBY JR. E.C., BALK M.W. (1983) The importance of animal genetics, health and environment in biomedical research. Academic Press Inc.
- MINOPRIO P., BANDEIRA A., PEREIRA P., MOTA SANTOS T., AND COUTINHO A. (1989) *Int. Immunol.* **1** : 176-184.
- MINOPRIO P., BURLIN O., PEREIRA P., GUILBERT B., ANDRADE, L., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M., COUTINHO A. (1988) Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* **28**: 553-558.
- MINOPRIO P., EISEN H., FORNI L., D'IMPÉRIO LIMA M.R., JOSKOWICZ M., AND COUTINHO A. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* **24**: 661-668.
- MINOPRIO P., EISEN H., LOSKOWICZ M., PEREIRA P., AND COUTINHO A. (1987) Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* - infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* **139**:545-550.
- MISHELL, BB, AND SHIGI, SM (Eds.) Selected Methods in Cellular Immunology. New York, WH Freeman and Co., 1980, p.16
- NICKELL S.P., STRYKER G.A., AREVALDO C. (1993) Isolation from *Trypanosoma cruzi* mice of CD8<sup>+</sup>, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite infected Target cells. *J Immunol.* **150**:1446-1457.

- LOUDIN J., AND MICHEL M. (1963) Une nouvelle form d'allotypic des globulin du serun du lain apparemment lieé à la fonction et à la specificité anticorps. *CR Acad. Sci. (Paris)* **257**: 805-812.
- PINGE F<sup>o</sup> P. (1993) Aspectos imunohistológicos de placas de peyer de camundongos normais e infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Tese de Mestrado*. IB-UNICAMP, SP.
- RANGEL H.A., VERINAUD L., CAMARGO I.J.B., GIGLIOLI R. AND SAKURADA J.K. (1994) *Trypanosoma cruzi* : Murine Virus Contaminant of the Experimental Infection. *Experimental Parasitol.* **78**:429-431.
- REED L.J. AND MUENCH H. (1938) A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
- SHER A., McINTYRE S., AND VON LICHTENBERG F. (1977) *Schistosoma mansoni*: Kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Exp. Parasitol.* **41**: 415-422.
- SIDDEL ST., WEGE H., AND MEULEN V.T. (1982) The structure and replication of coronaviruses. *Curr. Top. Microb. Immunol.* **99**: 131-163
- SILVA LHP & NUSSENZWEIG V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanossoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, São Paulo, **20**:191-201.
- SMITH A.L., BARTHOLD S.W., DE SOUZA M.S., AND BOTTOMLY K. (1991a) The role of gamma interferon in infection of susceptible mice with murine coronavirus, MHV-JHM. *Arch. Virol.* **121**:89-100.

- SMITH, A.L., BOTTOMLY, K., WINOGRAD, D.F. (1987) Altered splenic T cell function of BALB/cByJ mice infected with MHV or Sendai virus. *J Immunol.* **138** : 3426-3430
- SMITH, A.L., CASALS, J., MAIN, A.J. (1983) Antigenic characterization of Tettnang virus: Complications caused by passage of the virus in mice from a colony enzooticamente infected with MHV. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32** : 1172-1176
- SMITH, A.L., DE SOUZA, M.S., FINZI, D., BARTHOLD, W. (1992) Responses of mice to murine coronavirus immunization. *Arch. Virol.* **125** : 39-52
- SMITH, A.L., WINOGRAD, D.P., DE SOUZA, M.S. (1991b) In vitro splenic T cell responses of diverse mouse genotype after oronasal exposure to MHV, strain JHM. *Lab. Anim. Sci.* **41** : 106-111.
- SOONG L., TARLETON R. (1992) Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2 c-myc and c-fos gene expression. *J. Immunol.* **149**:2095-2102.
- SPAAN, W. et al. (1988) Coronavirus: Structure and Genome Expression. *J. Gen. Virology*, **69**:2939-2952..
- TARLETON R.L. (1990) Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi* . *J. Immunol.* **144**: 717-724.
- TERNYNCK T.C., BLEUX J., GREGOIRE J., AVRAMEAS S., AND KANNELOPOULOS-LANGEVIN (1990) Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and the activation of TCR1 T cells. *Immunol. Rev.* **112**: 183-189.

- TYRREL D.A.J., ALMEIDA J.D., BERRY D.M., CUNNINGHAM C.H., HAMRE D., HOFSTAD M.S., MALLUCI L., AND MCINTOSH K. (1968) Coronaviruses. *Nature* **220**: 650.
- USHERWOOD E.J., ROSS A.J., ALLEN D.J., AND NASH A.A. (1996) Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4 cells. *J. Gen. Virol.* **77**: 627-630.
- VAZ N.M. (1988) Ordem e desordem: uma abordagem imunológica. *Ciê. Cult.* **40**: 452-459.
- VAZ N.M., AND FARIA A.M.C. (1990) The construction of immunological identity. *Ciê. Cult.* **42**(7): 429-443.
- VAZ N.M., AND VARELA F.G. (1978) Self and nonsense: an organism-centered approach to immunology. *Med. Hypotheses* **4**: 231.
- VIRELIZIER J.-L., VIRELIZIER A.-M., AND ALLISON A.C. (1976) The role of circulating interferon in the modifications of immune responsiveness by mouse hepatitis virus (MHV-3). *J. Immunol.* **117**: 748-753.
- WANG A.L., AND WANG C.C. (1991) Viruses of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* **7**: 76-80.
- WEGE, H., ST. SIDDELL, V. TER MEULEN (1982) The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **99**: 165-200.
- WILLIAMS R.K., JIANG G.-S., AND HOLMES K.V. (1991) Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carciniembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 5533-5536.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1977) Report of the first meeting of the scientific working group of Chagas' Disease. W.H.O., Buenos Ayres, Arg., 77:3.

YANG H., DUNDON P.L., NAHILL S.R., AND WELSH R.M. (1989) Virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte stimulation. *J. Immunol.* **142**: 1710-1718.

## ANEXOS

## ANEXO 1

**Tabela .** Reações antigênicas cruzadas entre Coronavíruses

		<b>Hospedeiro</b>	<b>Doença Clínica predominante</b>	
<b>Mamíferos</b>	<i>Grupo 1</i>			
	HCV-229E <sup>1</sup>	humanos	Respiratória; Resfriado comum	
	TGEV	porcos	Gastro-intestinal; Diarréia	
	CCV	cães	idem ant.	
	FIPV	Felinos	Peritonite; Infecção Múltipla	
	<i>Grupo 2</i>			
	HCV-OC43 <sup>1</sup>	humanos	Respiratório; Resfriado comum	
	MHV <sup>1,2</sup>	camundongos	Encefalomielite; Hepatite; Diarréia	
	RCV <sup>2</sup>	ratos	Pneumonite; Rinite	
	SDAV <sup>2</sup>	ratos	Adenite	
	BCV	bezerros	Diarréia	
	HEV	porcos	Gastro-intestinal; Encefalomielite	
	<b>Aves</b>	<i>Grupo 3</i>		
		IBV <sup>3</sup>	galinhas	Respiratória
<i>Grupo 4</i>				
TCV <sup>3</sup>		perus	Enterite	
<b>Isolados não-classificados</b>	HECV <sup>1</sup>	humanos	Diarréia	
	HCV <sup>1</sup>	humanos	Resfriado comum	
	CV-777	porcos	idem ant.	
	FECV	cavalos	idem ant.	
	outros			

Modificado a partir de WEGE ET AL. 1982

1) vários isolados, 2) membros altamente relacionados, 3) Sem reação cruzada

## ANEXO 2

Tabela . Sorotipagem de alguns Coronavirus de Camundongos.

<b>MHV</b>		<b>Efeito no Hospedeiro</b>
-JHM	1949	Hepatite; Encefalomielite
-1	1951	Hepatite
-2	1952	Hepatite
-3	1956	Hepatite; Ascite
-A59	1961	Hepatite, Encefalite
LIVIM*	1962	Enterite
-S	1963	Hepatite; Enterite
-LV	1972	em Cultura de Hepatócitos
-Nu66	1974, 76, 77	-
NuU, NuA	1975	Hepatite; Encefalite
-S/CDC*	1976	Enterite
-DVIM	1976	Enterite
-D	1978	Enterite; Hepatite
-N	1979	Hepatite após tratamento com Cortisona

Modificado a partir de WEGE et al. 1982

\* Provavelmente o mesmo sorotipo