

Malária em camundongos imunodeficientes

A malária experimental por *Plasmodium chabaudi* em camundongo scid

Fabiana Martins Batista Motta

Mestre em Parasitologia (Unicamp).

fabiana@cemib.unicamp.br

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profa. Dra. Do Instituto de Biologia –
Departamento de Parasitologia (Unicamp);
Diretora do CEMIB (Centro Multidisciplinar
para Investigação Biológica).

guaraldo@cemib.unicamp.br

Imagens cedidas pelos autores

1. Introdução

A malária é um dos maiores desafios de saúde pública que afeta o desenvolvimento dos países mais pobres. Segundo a OMS, a cada ano são registrados aproximadamente 300-500 milhões de casos e 1 milhão de mortes por malária, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas. Deste número alarmante, 90% se concentram na África e os outros 10% estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas da Oceania (RBM – OMS).

Na América Latina, 99% ocorrem na Amazônia brasileira, dos quais 78% dos casos relatados referem-se ao *Plasmodium vivax* e 22% ao *Plasmodium falciparum* (Funasa-2002).

A malária murina é útil na pesquisa científica, pois a escolha de linhagem do hospedeiro e do parasita pode simular a doença humana. O *P. chabaudi chabaudi* tem sido adotado pelos pesquisadores como modelo para estudar imunidade adquirida para o estágio eritrocítico, pois é um parasita de roedor equivalente ao *P. falciparum*.

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

A importância das células T CD4+ na resolução do estágio sanguíneo da infecção por *P. chabaudi* linhagem AS tem sido estabelecida com

base na incapacidade do camundongo nude, camundongo scid e camundongo deficiente de célula T CD4+ para controlar a infecção. O mecanismo pelo qual as células T CD4+ fornecem proteção imune tem sido alvo de recentes e intensivas investigações. Com base no padrão de produção de citocinas e na habilidade em promover ajuda para as células B, foi demonstrado que células T CD4+ correspondem ao tipo inflamatório ou subconjunto Th1, que predominam durante a fase aguda ou inicial da malária, seguida pelo aparecimento, durante a fase crônica ou tardia da infecção, das células Th2, que são capazes de induzir a produção de anticorpos *Plasmodium*-específico e citocinas, como IL-4 e IL-10 (Larghorne *et al.* 1998). Conclusões similares foram alcançadas por Taylor-Robinson em 1996.

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

As células NK, definidas como células citotóxicas, dotadas de

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

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

Apesar de estudos comprovarem que as células NK e suas citocinas exercem papel importante no controle imunológico da malária, sabe-se que fatores genéticos representam um dos maiores determinantes da resistência do hospedeiro contra a malária. Estudos sobre o modelo *P. chabaudi* AS, usando análise genética, mostraram que a atividade da célula NK e a resistência a esse parasita segregam independentemente (Skamene *et al* 1983). De acordo com Fortin *et al* (2002), as linhagens A/J, BALB/c, AKR, DBA/1, C3H/HeJ, S/JL e 129/ICR são susceptíveis ao *P. chabaudi*, enquanto que as linhagens C57BL/6, B10. A, CBA, DBA/2 e C57L são resistentes ao *P. chabaudi*.

A linhagem *P. chabaudi chabaudi*

CR, não-letal, representa a malária experimental de autocontrole, apropriada para estudos de imunidade em estágio sanguíneo (Garnica *et al.*, 2002). Esta linhagem propicia o estudo da fase crônica da infecção em linhagens imunodeficientes.

O objetivo deste trabalho é estudar a importância das células NK no controle do *P. chabaudi* em camundongos mediante a comparação

da parasitemia, após inoculação do parasita nas linhagens de camundongos scid e C57BL/6 Knockout para interfero-gama.

2. Material e Métodos

Camundongos. Quatro linhagens de camundongos machos livres de patógenos específicos (SPF), com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do CEMIB/Unicamp foram adotadas : C.B17 scid/Uni (12 animais); BALB/c/Uni (48 animais); C57BL/6 knockout (KO) para interferon gama (4 animais); e C57BL/6/Uni (3 animais) .

Plasmodium chabaudi chabaudi

CR. A linhagem de *P. chabaudi chabaudi* (CR) foi cedida pelo Prof. Dr. Heitor F. Andrade Junior, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Um camundongo da linhagem C57BL/6 foi a fonte de *P. chabaudi*. Os parasitas foram mantidos mediante passagens semanais sucessivas no camundongo BALB/c Uni por 12 semanas antes da

hemácias parasitadas em camundongos macho BALB/c/Uni mantidos em isoladores. Amostras de esfregaços também foram coradas pelo Giemsa, para avaliação das formas de *Plasmodium*.

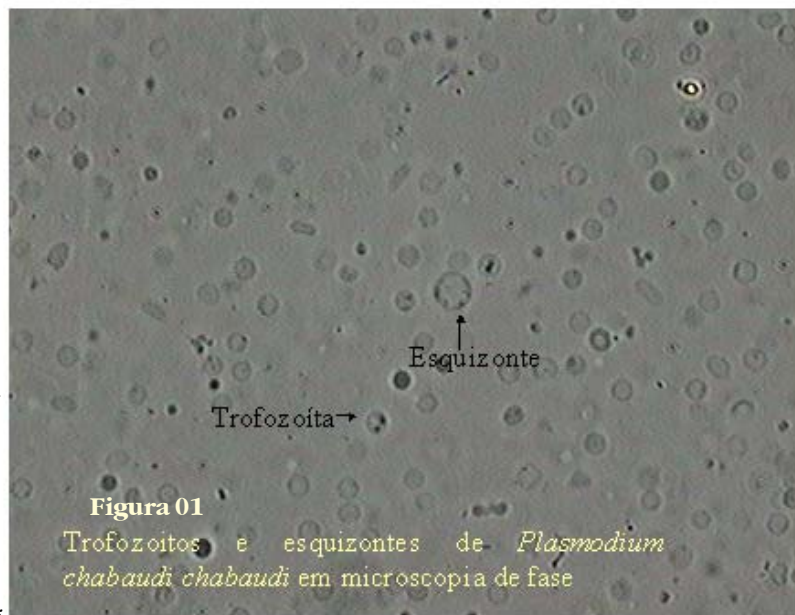
Manutenção dos animais em isolador de PVC.

Os camundongos infectados foram mantidos em isolador de plástico flexível (LNF – Ind. & Com. Ltda.), de pressão positiva, com 16 a 18 trocas de ar por hora, no Departamento de Parasitologia da UNICAMP. O material necessário para a manutenção dos animais (gaiolas, tampas, ração, água, maravalha, bebedouros, pinças etc.) foi devidamente submetido a processos de esterilização em autoclave, conforme normas de procedimentos adotados pelo CEMIB.

Determinação da Parasitemia.

Amostras de 20 ml de sangue foram coletadas com micropipeta da cauda do camundongo infectado. A coleta aconteceu a intervalos semanais até a 6ª semana de infecção. Após este período, os intervalos para determi-

nação da parasitemia foram de 15 dias. Para a contagem de parasitas, o sangue foi diluído 1000 x em NaCl 0,15 M. As hemácias parasitadas e os parasitas livres foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia de fase (Figura 1). Os valores foram expressos em número de hemácias parasitadas x 10⁸/mL. Os camundongos do experimento foram infectados com 10⁶ parasitas (hemácias parasitadas + parasitas



livres) mediante injeção intraperitoneal. No decorrer do experimento foi registrada a mortalidade dos animais.

infecção do scid e KO. Após este período um “pool” de células sanguíneas foi coletado da veia da cauda dos animais, para o preparo do inoculo em solução NaCl 0,15 M. A contagem destas células foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de contraste de fase.

A manutenção do *P. chabaudi chabaudi* CR foi realizada mediante repiques semanais do inoculo de 10⁷

livres) mediante injeção intraperitoneal. No decorrer do experimento foi registrada a mortalidade dos animais.

Monitoramento imunológico da linhagem C.B-17 scid/Uni.

A classificação dos animais homozigotos ou heterozigotos da linhagem C.B-17 scid/Uni foi realizada pelo teste Dot-Elisa para imunoglobulinas. (Alves *et al.*, 2002).

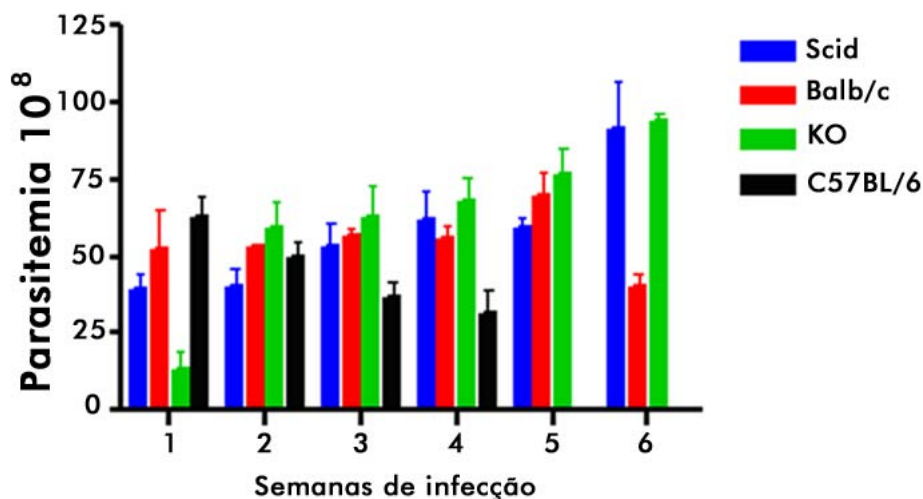


Figura 2 - Média e erro padrão dos valores de parasitemia em camundongos C.B-17 SCID, BALB/c/Uni, C57BL/6 KO para interferon gama durante 6 semanas de infecção com *Plasmodium chabaudi chabaudi* (CR) e durante as semanas 1, 2, 3 e 4 nos camundongos C57BL/6/Uni.

Mouse Antibody Production (MAP – teste).

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

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

3. Resultados

A maior parasitemia da linhagem C.B-17 scid aconteceu por volta da 6ª semana e uma recrudescência foi observada na 12ª semana. No controle correspondente, BALB/c/Uni, a

maior parasitemia aconteceu na 10ª semana.

A análise estatística comparativa entre as linhagens BALB/c e scid nas primeiras 6 semanas de infecção permitiu constatar a capacidade do animal competente em controlar a parasitemia na 6ª semana (Figura 2).

Os camundongos C57BL/6 KO para INF-g atingiram níveis mais elevados de parasitemia quando comparados com o seu controle C57BL/6 (Figura 2) e também em relação ao modelo scid (Figura 2). A maior parasitemia em KO ocorreu na 10ª semana.

Foi feita a comparação estatística entre os valores médios de parasitemia durante as primeiras seis semanas no grupo de animais C.B-17 scid, BALB/c/Uni e KO para INF-γ. Os resultados evidenciaram o aumento marcante de parasitemia em animais KO e scid, resultando em diferença significativa entre a 1ª e 6ª semanas de infecção (Figura 2).

Durante o período máximo de observação, correspondente a 23 semanas para as linhagens KO e scid, não foi observada mortalidade em KO. Entretanto, do grupo de doze scid, quatro morreram: um, na segunda semana; um, na décima semana; e, outro, na décima terceira semana; e, outro, na décima sexta.

É importante ressaltar que houve mortalidade dos camundongos BALB/c/Uni (2/48), linhagem de manutenção do *P. chabaudi*: um, na décima primeira semana; e, outro, na déci-

ma nona semana após infecção.

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

Todos os animais scid adotados nos experimentos apresentaram-se homocigotos.

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

4. Discussão

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

murino), e ainda o *Pneumocystis carinii*. (Percy & Barta 1993).

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

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

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

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

O tratamento de camundongo susceptível A/J com IL-12 murina

reduziu muito a parasitemia e melhorou a sobrevivência do hospedeiro. Essa proteção induzida por IL-12 é mediada por INF- γ e TNF- α secretados por células NK durante infecção inicial (Stevenson *et al* 1995; Mohan *et al* 1997). Além disso, foi observado que em camundongos deficientes de receptor para INF- γ (Balmer *et al* 2000; Favre *et al* 1997) e camundongo KO para INF- γ (Su & Stevenson 2000), infectados com *P. chabaudi* AS, ocorreu incapacidade para reduzir a parasitemia primária e alta mortalidade. Batchelder *et al* 2003, comprovaram também em seus estudos, a importância que o INF- γ exerce na imunidade celular contra *P. chabaudi adami*.

Camundongos KO para IL-12 (gene p 40) infectados com *P. chabaudi* AS, tiveram os níveis de INF- γ diminuídos bem como IgG2a e IgG3 Th1-dependente. Com esses resultados concluiu-se que a citocina IL-12 produzida na fase inicial do estágio sanguíneo da infecção por *P. chabaudi* AS é importante para indução de resposta imune INF- γ -dependente tipo Th1 responsável pelo controle da fase aguda da infecção e sobrevivência do hospedeiro, influenciando fortemente a imunidade tipo Th2 mediada por anticorpo necessária para resolução da fase crônica (Su & Stevenson, 2002; Bastos *et al*, 2002).

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

Os modelos animais utilizados em nosso trabalho, scid, KO para INF- γ e BALB/c são considerados geneticamente susceptíveis por Fortin *et al* (2002).

A linhagem scid, cuja única fonte de resposta imune é a célula NK, revelou-se extremamente susceptível ao *P. chabaudi* CR, com 25% de morte em 12 animais.

Em C57BL/6 não se observou a parasitemia além das quatro semanas porque trata-se de linhagem resistente ao *Plasmodium*.

As células NK sozinhas não controlam a parasitemia. Entretanto, em camundongos C57BL/6 KO para INF- γ , os picos parasitemicos foram muito altos, levando à conclusão de que, as células NK, provavelmente devido à produção de interferon gama, contribuem para a redução da parasitemia.

Estudos (Prakash *et al*, 2003) demonstram correlação entre falência renal aguda e casos de malária severa por *P. falciparum* (79,6%), o que conduz à necessidade de avaliar a ocorrência de lesões histopatológicas renais provocadas por *P. chabaudi* CR em camundongos, o que possivelmente contribuiria para com a mortalidade desses animais.

Referências Bibliográficas

- ALVES, D P.; SAKURADA, J K.; ZANFOLIN, M.; SCARELLI, C A A.; EDIVANIA, V.; PASSOS, L A C.; GIGLIOLI, R.; GUARALDO, A M A. Leaky phenotype frequency among CB-17 scid/Uni mice reared in plastic isolator. **Abstract P137 on 53 rd. AALAS National Meeting**. October 27-31, San Antônio – Texas (USA), p. 135, 2002.
- BALMER, P.; ALEXANDER, J.; PHILLIPS, R S. Protective immunity to erythrocytic *Plasmodium chabaudi* AS infection involves INF- γ -mediated responses and a cellular infiltrate to the liver. **Parasitology**, v. 121, p. 473-482, 2000.
- BASTOS, K. R.; BARBOZA, R.; ELIAS, R. M.; SARDINHA, L. R.; GRISOTTO, M. G.; MARINHO, C. R.; AMARANTE-MENDES, G. P.; ALVAREZ, J. M.; LIMA, M. R. Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria in interleukin-12-deficient mice. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v. 22, n. 12, p. 1191-1199, 2002.
- BATCHELDER, J. M.; BURNS, J. M. Jr.; CIGEL, F. K.; LIEBERG, H.; MANNING, D. D.; PEPPER, B. J.; YANEZ, D. M.; van der HEYDE, H.; WEIDANZ, W. P. *Plasmodium chabaudi adami*: interferon-gamma

- but not IL-12 is essential for the expression of cell-mediated immunity against blood-stage parasite in mice. **Experimental Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 159-166, 2003.
- BOSMA, G C; FRIED, M; CUSTER, R P; CARROL, A; GIBSON, D M; BOSMA, M J. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. **Journal Exp Med.** v. 167, n.3, p. 1016-1033. Março, 1988.
- FAVRE, N; RYFFEL, B; BORDMANN, G; RUDIN, W. The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection interferon-gamma receptor deficient mice. **Parasite Immunology**, v.19, n. 8, p. 375-383, Agosto 1997.
- FORTIN, A; STEVENSON, M M; GROS, P. Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. **Genes and Immunity**. n. 3, p. 177-186, 2002.
- GARNICA, M R; SOUTO, J T; SILVA, J S; JR, H F A. Stromaal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1a and CXCR4 receptor blocker. **Immunology Letters**, v. 83, n.1, p. 47-53, Agosto 2002.
- KITAGUSHE, T; NAGOYA, M; AMANO, T; SUZUKI, M; MINAMI, M. Analysis of roles of natural killer cells in defense against *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. **Parasitology Research**. n. 82, p. 352-357, 1996.
- LANGHORNE, J; CROSS, C; SEIXAS, E; LI, C; VONDER WEID, T. A role for cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Immunology**, v.95, p.1730-1734, 1998.
- MEDING, S J & LANGHORNE, J. CD4⁺ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Europe Journal Immunology**. n. 21, p. 1433-1438, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE: GOVERNO DO BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em 24 junho 2003.
- MOHAN, K; MOULIN, P; STEVENSON, M M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **The Journal of Immunology**, v.159, n. 10, p. 4990-4998, Novembro 1997.
- PERCY, D H & BATA, J R. Spontaneous and experimental infections in scid and scid/beige mice. **Laboratory Animal Science**. v. 43, n. 2, p. 127-132, Abril, 1993.
- PODOBA, J E; STEVENSON, M M. CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Infection and Immunity**, v. 59, n.1, p. 51-58, Janeiro 1991.
- PRAKASH, J.; SINGH, A. K.; KUMAR, N. S.; SAXENA, R. K. Acute Renal Failure in *Plasmodium vivax* malaria. **J. Assoc. Physicians India**, v. 51, p. 265-267, 2003.
- SAS INSTITUTE, INC. 1987. S. A. S. User's Guide: Statistics, 6th ed., Cary, N. C.
- ROLL BACK MALARIA, WORLD HEALTH ORGANIZATION. (RBM-OMS). Disponível em: http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1.htm. Acesso em 24 de junho de 2003.
- SCOTT, P. TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current opinion in Immunology**, v. 7, p. 34-40, 1995.
- SEIXAS, E; CROSS, C; QUIN, S; LANGHORNE, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Europe Journal Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2970-2978, Outubro 2001.
- SKAMENE, E; STEVENSON, M M; LE-MIEUX, S. Murine malaria: dissociation of natural killer (NK) cell activity and resistance to *Plasmodium chabaudi*. **Parasite Immunology**, v. 5, p. 557-565, Abril 1983.
- STEVENSON, M M; TAM, M; WOLF, S F; SHER, A. IL-12-Induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires INF-g and INF-a and occurs via a Nitric Oxide-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, n. 155, p. 2545-2556, 1995.
- SU, Z & STEVENSON, M M. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4399-4406, Agosto, 2000.
- SU, Z; STEVENSON, M M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 168, n.3, p. 1348-1355, Fevereiro 2002.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W. & PHILLIPS, STEPHEN R. Reconstitution of B-cell-depleted mice with B cells restores Th2-Type immune responses during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 366-370, 1996.
- YAP, G S; JACOBS, P; STEVENSON, M M. Th cell regulation of host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. **Resource Immunology**, v.145, n.6, p. 419-422, 1994.
- YOSHIDA, A; MARUYAMA, H; KUMAGAL, T; AMANO, T; KOBAYASHI, F; ZHANG, M; HIMENO, K; OHTA, N. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. **International Immunology**, v. 12, n. 8, p. 117-1125, 2000. 🌿