

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIZ AUGUSTO CORRÊA PASSOS

**ANÁLISE DO DETERMINISMO GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM A CEPA Y DE
Trypanosoma cruzi.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Biológicas, curso de
Genética e Biologia Molecular, Área de
Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada

Campinas, SP.
2003

Data da Defesa: 28/11/2003

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra.
Júlia Keiko Sakurada

Assinatura

Profa. Dra.
Ana Maria A. Guaraldo

Assinatura

Prof. Dr.
Thales Rocha de Mattos Filho

Assinatura

Profa Dra.
Iscia Lopes Cendes

Assinatura

Profa. Dra.
Nívea Lopes de Souza

Assinatura

Prof. Dr.
Paulo Maria Ferreira de Araújo

Assinatura

Profa. Dra.
Sílvia M. Gomes Massironi

Assinatura

Aos meus pais,
Luiz de Oliveira Passos e Erothides Corrêa Passos,
*por haverem me mostrado que o conhecimento é o
único caminho para a liberdade.*

À
Neiri, Letícia e Otávio,
*meus mais importantes
estímulos neste desafio*

A todos os animais que, neste e em outros
trabalhos, doaram suas vidas para que outras
sofram menos, meu mais profundo respeito.

“A DOENÇA, O MAL.
A CURA, O DESEJO.
A CIÊNCIA, O CAMINHO”.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão – FAEP

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Ao Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale INSERM – Paris – França

Ao Institut Pasteur de Paris – Laboratório de Genética de Mamíferos

Ao Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp – CEMIB / UNICAMP

Ao Conselho Científico do CEMIB pelo integral apoio ao programa de pesquisa envolvendo a Genética da Resistência

Ao Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – IMT – FMUSP/SP

À Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, em especial:

À Prof^a. Dr^a. Júlia Keiko Sakurada, pela orientação dedicada e compreensiva, que influenciou de forma decisiva a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr Humberto de Araújo Rangel pelo inestimável apoio e incentivo em importantes etapas de minha formação profissional.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela compreensão, incentivo e estímulo para que eu seguisse adiante.

Ao Prof. Dr. Jean Louis Guènet, *brasileiro de coração*, por seu exemplo de cientista e grande mentor desta pesquisa.

Aos Profs. Drs. Oswaldo A. Sant'Anna, Iscia Lopes Cendes e Nanci Nascimento, pelas enriquecedoras sugestões feitas durante a análise prévia.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, pelo decisivo estímulo à conclusão deste trabalho e pelas análises histológicas realizadas.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do IMT, André Gustavo Tempone Cardoso e Daniel Perez Vieira pela competência e presteza na realização dos testes de infecção com macrófagos.

Aos muitos amigos Patrick, Johnny, Rutinha, Jana, Neidinha, Murilo, Eder, Calixto e dona Genivalda pela carinhosa acolhida nas minhas idas ao IPEN.

A todos os funcionários do CEMIB que apoiaram a realização deste trabalho, em especial às Sras. Joana Lopes e Maria Inês G.T.S. de Oliveira pela amizade e apoio constantes.

À Profa. Dra. Wirla Tamashiro, pelo apoio constante e generoso que possibilitou a continuidade do trabalho.

Às técnicas Rose, Cristina e Márcia pela importante colaboração na manutenção dos primeiros grupos experimentais.

À bióloga Dirce Lima Gabriel, pelo carinho e presteza na orientação técnica da manutenção e repique dos parasitas.

Aos amigos sempre presentes e solidários Delma, Marcos, Rovilson e Armando pela paciência e apoio imprescindíveis à realização deste trabalho.

Aos amigos do CONSTEC, pela participação em momentos importantes à continuidade do trabalho, minha gratidão.

Aos amigos Marcelo, Érika e Marcus pelo agradável convívio no laboratório e também pelo apoio experimental.

Às minhas queridas amigas Viviane e Paulinha, cuja dedicação, profissionalismo e empenho foram determinantes para o trabalho.

A você Nanci, por uma convivência mais que agradável, onde eu pude aprender que competência, autoridade e liderança somente fazem sentido, se vierem acompanhadas da gentileza, atenção, bom humor e principalmente amizade.

A todos os professores e colegas da pós-graduação que de diferentes maneiras colaboraram para a viabilização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AcB6** – Linhagem Recombinante Congênica derivada de C57BL/6/Uni e A/Uni
- **A/Uni** – Linhagem Isogênica de Fenótipo Susceptível
- **B6AF1** - Animais Híbridos de primeira geração
- **B6AF2** – Animais Híbridos de Segunda Geração
- **C57BL/6/Uni** – Linhagem Isogênica de Fenótipo Resistente
- **CDC** – *Centre for Disease Control*
- **cM** – *Centimorgan*
- **DBA** – *Diluted Brown Agouti*
- **DNA** – *Desoxyribonucleic acid*
- **EDTA** – *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- **F1** – Filhos de Primeira Geração
- **F2** – Filhos de Segunda Geração
- **GWS** – *Genome Wide Scan*
- **H.E** – Hematoxilina - Eosina
- **IFN** - *Interferon*
- **I.P.** – Intra-Peritonal
- **IMT- FMUSP/SP** – Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- **PBS** – *Phosphate Buffer Solution*
- **PCR** – *Polymerase Chain Reaction*
- **RIS** – *Recombinant Inbred Strain*
- **X²** - Qui Quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Mapa de distribuição dos países endêmicos	8
Figura 2 . <i>Triatoma infestans</i>	9
Figura 3 . <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Figura 4 . Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	13
Figura 5 . Forma infectante do parasita	14
Figura 6 . Esquema de desenvolvimento do AcB6	46
Figura 7 . Infecção de macrófagos em diferentes linhagens	66
Figura 8 . Campos da infecção de macrófagos de diferentes linhagens	67
Figura 9 . Histopatologia do tecido cardíaco	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Colônia de fundação	30
Tabela 2 . Marcadores empregados na colônia de fundação	34
Tabela 3 . <i>Primers</i> para análise genética dos resistentes e susceptíveis... ..	35
Tabela 4 . Marcadores para isogenia	35
Tabela 5 . Relação de marcadores do <i>genome wide scan</i>	42
Tabela 6 . Distribuição da cor de pelagem	52
Tabela 7 . Padrão de resistência: resistente e susceptível.....	54
Tabela 8 . Inoculação das linhagens	55
Tabela 9 . Análise do X^2 de resistente e B6AF1	56
Tabela 10 . Análise de X^2 de susceptível e B6AF2	56
Tabela 11 . Animais recombinantes de segunda geração	57
Tabela 12 . Análise X^2 para herança monogênica.....	57
Tabela 13 . Comparação entre sobreviventes de híbridos F1 e F2.....	58
Tabela 14 . Infecção com RIS BxA1 e BxA7.....	59
Tabela 15 . Infecção com RIS BxA2 e BxA4.....	59
Tabela 16 . Regiões de desequilíbrio nos animais B6AF2.....	61
Tabela 17 . Relação de marcadores B6AF2 resistentes e RIS	62
Tabela 18 . Genotipagem parcial de recombinantes congênicos.....	64
Tabela 19 (a-d) . Famílias AcB6.....	65

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE	6
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 MATERIAIS	
4.1.1 Parasita	28
4.1.2 Animais	28
4.1.3 Reagentes	29
4.2 MÉTODOS	
4.2.1 Certificação genética das linhagens	29
4.2.1.1 Colônia de fundação	29
4.2.1.1.1 Teste de histocompatibilidade	30
4.2.1.1.2 Análise de amostras de DNA	31
4.2.1.1.2.1 Extração fenólica	31
4.2.1.1.2.2 Extração alcoólica	32
4.2.1.1.2.3 Certificação genética das linhagens	33
4.2.1.1.2.4 Reação de PCR	36
4.2.1.1.2.5 Análise dos resultados da reação de PCR	36
4.2.1.1.3 Testes de acasalamento	37

4.2.2	Infecção experimental com o <i>T. cruzi</i>	37
4.2.2.1	Descongelamento do parasita	37
4.2.2.2	Manutenção do <i>T. cruzi</i>	37
4.2.2.3	Determinação da dose discriminatória	38
4.2.2.4	Obtenção de camundongos resistentes	38
4.2.2.5	Infecção das linhagens parentais isogênicas originais ...	39
4.2.2.6	Acasalamentos para a análise da resistência	39
4.2.2.6.1	Obtenção e infecção dos híbridos B6AF1	39
4.2.2.6.2	Obtenção e infecção dos recombinantes B6AF2	40
4.2.2.6.3	Infecção dos animais RIS	40
4.2.3	Varredura genética de B6AF2 resistente	40
4.2.4	Análise da frequência dos marcadores moleculares	44
4.2.5	Análise genética dos RIS	45
4.2.6	Desenvolvimento da linhagem AcB6	45
4.2.6.1	Registro da linhagem AcB6	47
4.2.6.2	Genotipagem das famílias AcB6	47
4.2.6.3	Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos peritoniais.....	47
4.2.6.4	Histologia do tecido cardíaco	48
4.2.6.5	Análise estatística	49

5. RESULTADOS

5.1	Monitoração genética das linhagens	51
-----	--	----

5.1.1	Teste de histocompatibilidade	51
5.2	Testes de acasalamento	51
5.2.1	Análise dos animais F1	51
5.2.2	Análise dos animais F2	51
5.3	Certificação genética com microssatélites	52
5.3.1	Perfil fenotípico	52
5.3.2	Perfil amplo	53
5.3.3	Perfil específico	53
5.4	Determinação da dose infectante	53
5.5	Infecção experimental	55
5.5.1	Animais B6AF1	55
5.5.2	Animais B6AF2	56
5.5.3	Infecção dos animais RIS	58
5.6	Análise do determinismo genético	60
5.7	Regiões de desequilíbrio de B6AF2 e RIS	62
5.8	Desenvolvimento do modelo congênico resistente	63
5.8.1	Infecção com animais AcB6.....	66
5.8.2	Histopatologia da infecção em AcB6	67
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÕES	93
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

9. ANEXOS

- Soluções (1 a 4)
- Teste de acasalamento para coloração de pelagem (5)
- Cromossomos envolvidos com a resistência e susceptibilidade a protozoários (6)
- CHAGAS: Fenômeno da Resistência
Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento
(5): p. 26-31, 2002.

RESUMO

Desde sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, a Tripanossomíase Americana revelou diferenças significativas na resistência entre indivíduos infectados, conduzindo à hipótese de que a constituição genética do hospedeiro influenciaria seu desenvolvimento e a sobrevivência dos infectados. Desde o final do século passado e início deste, o número de trabalhos que procuram esclarecer os eventos genéticos, ou regiões do genoma envolvidas com a resistência às doenças causadas por esses parasitas aumentou significativamente. As estratégias adotadas obedecem a protocolos similares baseados na utilização de acasalamentos programados realizados entre linhagens isogênicas não relacionadas. Essas apresentam fenótipos distintos de resistência ou suscetibilidade à doença, associados a marcadores moleculares polimórficos, indicando frequências variáveis de determinados alelos nas populações. Estas estratégias têm permitido identificar regiões do genoma envolvidas na resistência à infecção experimental a diferentes patógenos como *Plasmodium chabaudi*, *Trypanosoma congolensis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis*. No caso do *T. cruzi*, os poucos experimentos referentes à análise da genética da resistência à infecção experimental foram realizados no início da década de 80, mostrando a importância do complexo H-2, além do possível envolvimento de outros genes não relacionados a esses loci. Entretanto, não há trabalhos que identifiquem as regiões do genoma murino relacionadas à resistência por este patógeno. No presente estudo, a partir de linhagens resistente ou sensível, realizaram-se cruzamentos seletivos entre animais apresentando fenótipos informativos para os caracteres *resistência* (C57BL/6/Uni) e *susceptibilidade* (A/Uni) à infecção experimental com a cepa Y de *T. cruzi*. As análises dos descendentes de segunda geração e que resistiram à infecção experimental, evidenciam regiões importantes nos cromossomos 7, 11, 14, 17 e 19, condicionando a sobrevivência de camundongos infectados com altas doses deste parasita. A identificação destas regiões permitiu a obtenção de animal recombinante congênico, modelo importante para o entendimento da participação de genes na resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

ABSTRACT

Chagas' disease is amongst the major health problems in South America, impairing the wealth fare of population.

Since its discovery, in 1909, by Carlos Chagas, American Trypanosomiasis showed significant differences in the resistance of infected people. Such observations led to the hypothesis that the genetic background of the host could have an influence on the development of the disease and lifespan of infected people.

By the end of the last century and beginning of the current, the amount of publications aiming to investigate the genetic events and the regions of the genome involved with the resistance to parasitic diseases has significantly increased. The strategies used in these studies follow similar protocols and are based on the use of informative crossings between non-related inbred strains, presenting different phenotypes on what refers to resistance or susceptibility to a given disease, associated to the use of polymorphic molecular markers to track the frequency of specific alleles within the population.

These strategies have allowed the identification of genome regions involved in the resistance to experimental infection with different pathogens such as *Plasmodium chabaudi*, *Trypanosoma congolensis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* and *Mycobacterium tuberculosis*.

In the specific case of *T. cruzi*, the few experiments analyzing the genetics of the resistance to experimental infection were performed in the early 80's and showed the importance of the H2 locus and the possible involvement of other genes not related to this *locus*.

However, there is no record in the literature identifying the regions of the mouse genome related with the resistance to the experimental infection with *T. cruzi*.

In the present work, informative crossings between *T. cruzi* resistant and susceptible strains have been made. The resistant second-generation offspring were analyzed and displayed important regions for the resistance against high doses of the parasites on chromosomes 7, 11, 14, 17 and 19. The identification of these regions allowed the development of a congenic recombinant animal model, an important tool for the understanding of the involvement of genes present in these regions in the resistance to the infection by *T. cruzi*.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, descoberta em 1909, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, intracelular, que possui um ciclo biológico complexo, infecta vários tipos celulares e prolifera lentamente, imerso no citoplasma das células, o que dificulta a ação da resposta imune e de drogas (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Andrews, 1994).

Esta tripanossomíase está entre os principais problemas de saúde da América do Sul, afetando milhões de pessoas, apresentando alto impacto na morbidade e mortalidade (WHO, 2003).

Devido a ausência de vacinas ou disponibilidade, em grande escala, de tratamento específico, a principal estratégia de controle tem sido a prevenção da transmissão, principalmente na eliminação do vetor e no controle da transfusão sangüínea (Goldenberg & Krieger, 1997).

Entretanto, a ocorrência de casos novos demonstra que estas medidas, ainda carecem de investigação científica, com o propósito de ampliar a eficiência em seu emprego.

É possível distinguir 3 estágios principais quando se aborda a Doença de Chagas do ponto de vista patogenético: O primeiro, denominado fase do parasita, compreendendo o período imediatamente após a descoberta da doença, quando não se questionava o papel patogenético do *T. cruzi*. Neste período os pesquisadores tentaram, sem grande êxito, empregar métodos biológicos, bioquímicos e marcadores moleculares, a fim de associar a variabilidade do parasita, com a forma clínica da doença (Macedo & Pena, 1998).

O insucesso destes esforços, associado à escassez do parasita no sangue e nos tecidos de pacientes crônicos, conduziram ao segundo estágio, denominado auto-imune, onde o parasita foi relegado a um segundo plano, atuando apenas como provedor de epítomos que reagem cruzadamente, capazes de desencadear reações auto-ímunes (Soares et al., 2001b).

Mais recentemente, o papel principal do *T. cruzi* na patogênese da Doença de Chagas, tem sido resgatado, originando o estágio genômico (Tibayrenc et al., 1999).

A doença agora é vista como um produto da interação entre dois genomas altamente variáveis: o do parasita e o do hospedeiro humano (Andersson et al., 2003a).

Entretanto, grande parte do conhecimento da doença deriva da investigação científica realizada em modelos animais, que quando padronizados do ponto de vista sanitário e genético atuam como importantes ferramentas para a compreensão da doença aguda e crônica (Andersson et al., 2003b; Festing, 1999).

Experimentos utilizando cepas com diferentes perfis de virulência, demonstram que a distribuição estocástica dos parasitas em órgãos é freqüente e induz a patologias desiguais. Estas variações refletem na susceptibilidade do parasita, ao mecanismo imune efetor do hospedeiro e na indução diferenciada de tais mecanismos, sugerindo que genes, presentes no genoma do hospedeiro influenciam no grau de susceptibilidade e resistência. No entanto, o modo como esses genes participam na indução desta resposta, não está elucidado (Moulia et al., 1996; Girones & Fresno, 2003).

Por outro lado, doenças multifatoriais como diabetes, câncer e a resistência a patógenos, entre outras, sofrem a influência tanto de fatores ambientais como genéticos e, por esta razão, são designadas de doenças com características fenotípicas complexas (Morel et al., 1996; Sant'Anna et al, 1982).

Assim, a investigação, com o propósito de esclarecê-las, requer o emprego de modelos *in vivo*, porém com composição genética e sanitária controlada (Rangel et al., 1994; Festing, 1999).

Os primeiros protocolos, dirigidos para a compreensão de mecanismos associados à resistência a patógenos intracelulares, surgiram no final do século passado e início deste século, quando aumentou significativamente o número de trabalhos que procuravam esclarecer os eventos genéticos ou regiões do genoma, relacionadas com a resistência às doenças causadas por estes patógenos (Biozzi et al., 1979; Roberts et al, 1997).

As estratégias, adotadas nestes estudos, são semelhantes e se baseiam na utilização de acasalamentos programados, realizados entre linhagens isogênicas não relacionadas, que apresentam fenótipos diferentes quanto à resistência ou susceptibilidade à doença (Fortin et al., 2002).

Os animais, derivados destes acasalamentos, são avaliados com o uso de marcadores moleculares polimórficos para estas linhagens, possibilitando a observação direta da molécula de DNA, o que permite a análise da frequência de alelos, presentes na população, relacionados com o fenótipo do animal frente à doença (Iraqi et al., 2000).

Com estas estratégias, foram identificadas regiões do genoma envolvidas com a resistência à infecção experimental de diferentes patógenos como o *P. chabaudi*, *T. congolense*, *L. major*, *T. gondii*, *M. tuberculosis* e *S. typhimurium* (Brown, 1995; Fortin et al., 1997; Kemp et al., 1997; Roberts et al., 1997; Kramnik et al., 1998; Trezena et al., 2002).

A acentuada diferença, observada na resistência de pessoas infectadas com *T. cruzi*, conduziu à hipótese de que, a constituição genética do hospedeiro poderia influenciar o desenvolvimento da doença e a sobrevivência dos doentes.

Os estudos realizados, no final da década de 70, relatavam a importância da constituição genética do hospedeiro no controle da infecção. Trischmann et al. (1978) investigaram o controle da infecção em algumas linhagens isogênicas de camundongos, inoculando tripomastigotas da cepa Brasil. Os resultados encontrados, por estes autores, demonstraram diferenças significativas, na resistência observada em animais de linhagens com haplótipos H-2 distintos, ressaltando a importância genética na sobrevivência dos animais. A partir de suas conclusões, outros experimentos, com linhagens congênicas para aquele locus, foram realizados e demonstraram que o fenômeno da resistência estava associado à constituição genética do animal como um todo, e não apenas ao seu haplótipo H-2.

No mesmo período, Wrightsman et al. (1982), trabalhando com a cepa Peru do *Trypanosoma*, sugerem a participação de pelo menos dois genes, no fenômeno

de resistência, fora da região H-2. Estes resultados, embora de extrema importância, não podem ser considerados conclusivos para a infecção com o *T. cruzi*.

Atualmente, os dados existentes na literatura apontam para a necessidade de se realizar experimentos, especificamente desenhados, com o propósito de esclarecer a influência de regiões do genoma, envolvidas com o controle da infecção.

A gravidade da doença, associada à evidência do parasitismo resultar da interação entre os genomas do *T. cruzi* e do hospedeiro, justificam quaisquer esforços que possam conduzir ao entendimento da Doença de Chagas, principalmente com relação à importância da constituição genética do hospedeiro nos mecanismos de controle da infecção, que têm sido pouco explorados.

Além disso, a identificação de regiões do genoma, envolvidas com a sobrevivência dos animais infectados, permite a construção de modelos animais, os quais podem servir, como importantes ferramentas para a compreensão do complexo fenômeno de resistência ao *T. cruzi*.

ESTADO DA ARTE

2 - ESTADO DA ARTE

Saúde, Ciência e Tecnologia vêm sendo reconhecidas, cada vez mais, como pré-requisitos para o desenvolvimento econômico e social e não como sua consequência (Sachs, 2001, 2002). Entretanto, apesar dos recentes avanços científicos e tecnológicos, as doenças infecciosas continuam a afetar as populações pobres e marginalizadas (Gwatkin & Guillot, 2000). Do ponto de vista da Saúde Pública, além da necessidade de recursos financeiros, três fatores chaves contribuem: falha no uso de ferramentas existentes; ferramentas inadequadas ou inexistentes; falta de conhecimento da doença (Morel, 2003).

A despeito do progresso observado, tanto na área de conhecimento básico de muitas doenças infecciosas, como na descoberta e desenvolvimento de drogas, as doenças infecciosas tropicais como malária, leishmaniose, filariose, doença de chagas e esquistossomose continuam a causar morbidade e mortalidade (Trouiller et al., 2002).

Doença de Chagas:

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária que acomete um grande contingente de pessoas na América do Sul (FIG. 1).

Não obstante os esforços para o seu controle, a doença ainda não tem cura e demonstra ser de grande importância tanto do ponto de vista social, como por apresentar problemas científicos ainda não esclarecidos.

No final do século passado, ela foi considerada pelo Banco Mundial, como a mais importante das doenças parasitárias, tanto por apresentar um impacto sócio econômico significativamente maior que o obtido do efeito combinado de todas as outras infecções causadas por parasitas (WHO, 2003), como também porque morrem anualmente, 23.000 pessoas vítimas deste mal, um índice que, na América

Latina, é superado apenas pelas infecções respiratórias agudas, diarreia e AIDS (Prata, 2001).



FIGURA 1: Mapa de distribuição dos países endêmicos

Levantamentos realizados pelo CDC (*Centre for Disease Control*), no princípio deste século, relatam uma prevalência de 16-18 milhões de infectados, e uma mortalidade anual ainda maior, estimada em 50000 pessoas (<http://martin.parasitology.mcgill.ca/incidence.htm>) (Hirst & Stapley, 2000).

No início do século XX, esta doença era uma enzotia presente em populações de animais silvestres, de espécies variadas. As mudanças no ambiente, decorrentes da ocupação humana, modificaram este panorama, agravando o problema do ponto de vista epidemiológico e, desta forma, no princípio da década de 90, o número de pessoas expostas ao risco totalizava 100 milhões de indivíduos (WHO, 2003).

A Doença de Chagas pode ser adquirida por meio de um inseto hematófago infectado; transfusão sanguínea; congenitamente ou, com menos freqüência, por transplante de órgãos, alimentos contaminados e acidentes de laboratório. Estas últimas são de menor importância epidemiológica, dado que 5 a 20% dos casos

novos decorrem de transfusão sanguínea, e 0,5 a 8% dos casos agudos acontecem por meio de contaminação congênita. Mesmo assim, o controle destas vias é essencial, pois tem reflexos no surgimento de novos casos e por esta razão exigiu melhorias nos programas de triagem sorológica para a seleção de doadores de sangue, instituindo o uso profilático de drogas tripanosomicidas em sangue suspeito (Dias et al., 2002 ; Coura & Castro 2002; Coura et al., 2002).

Aproximadamente, 80 a 90% dos casos de transmissão da doença decorrem do vetor infectado da família *Reduviidae*, fundamental para que o ciclo do parasita se complete. Desta forma, as iniciativas destinadas ao seu controle, nas regiões de maior prevalência, são as medidas mais eficientes para a interrupção desta via principal, evitando que a doença se dissemine.

Existem mais de 100 espécies de triatomíneos identificadas e, cerca de 10, são consideradas domésticas. No Brasil, são conhecidas 44 espécies, porém apenas 5 são consideradas domésticas e portanto, de interesse epidemiológico: o *Triatoma infestans*, o *Panstrongylus megistus*, o *Triatoma brasiliensis*, o *Triatoma pseudomaculata* e o *Triatoma sordida*. Dentre estas espécies, o *T. infestans* (FIG. 2) e o *P. megistus*, assumem um papel fundamental na infecção chagásica, pois comumente defecam e urinam imediatamente após haverem ingerido sangue, liberando o parasita (Coura & Castro, 2002).

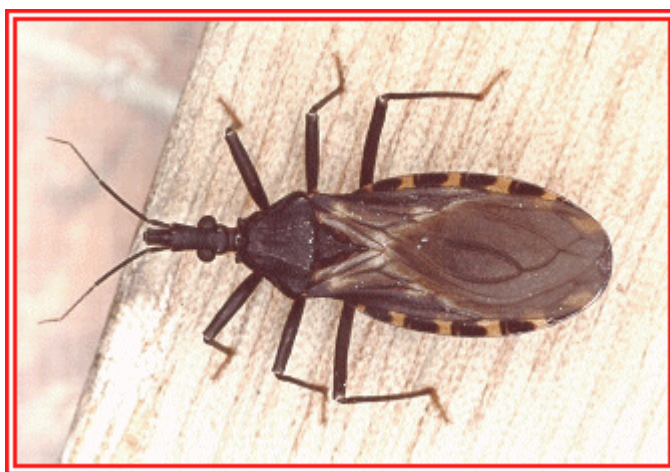


FIGURA 2: *Triatoma infestans* (<http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/chagas.html>)

Não obstante as medidas instituídas para o controle das vias de transmissão, levantamentos realizados no final da década passada indicam que resta ainda infectado, um contingente de 11 milhões de pessoas (WHO, 2003) e, mesmo em áreas declaradas como livres do contágio, há um permanente risco da recrudescência da infecção, uma vez que os insetos vetores podem ultrapassar a fronteira entre países que apresentam áreas tratadas e outros que não possuem programas de prevenção e controle da doença (Wanderley & Corrêa, 1995; Goldenberg & Krieger, 1997; Wizen et al., 1998; WHO, 2003).

Além disso, o ressurgimento de casos agudos no norte da América do Sul; as dificuldades na priorização de ações preventivas, nas regiões onde a doença foi erradicada; a identificação de triatomíneos silvestres com potencial de se tornarem domiciliares; os custos médicos e sociais no cuidado das pessoas infectadas e a ausência de drogas eficientes para tratamento específico distinguem esta parasitose de outros males, que afligem o Cone Sul e justificam porque, quase um século após sua descoberta, a Doença de Chagas ainda faz parte dos programas de incentivo à pesquisa da Organização Mundial de Saúde, estando entre as quatro doenças tropicais que integram um programa especial, destinado a sua eliminação como problema de Saúde Pública (Prata, 2001; Remme et al., 2002; WHO 2003).

O agente etiológico da doença é o *Trypanosoma cruzi* (FIG. 3), um protozoário flagelado intracelular, pertencente ao subgênero *Schizotrypanum*, que surgiu há 150 milhões de anos, mantendo-se em mamíferos não humanos, e transmitido por vetores hemípteros, em um ciclo exclusivamente silvestre. Porém, com a introdução dos humanos e o estabelecimento de um ciclo doméstico, a doença rapidamente se expandiu pela América Latina, comprometendo principalmente a parcela de população mais carente deste Continente (Teixeira, 1987; Macedo & Pena, 1998; Macedo et al., 2002).

Este parasita pode infectar cerca de 90 espécies de organismos invertebrados e 100 espécies de mamíferos, distribuídos em várias ordens e presentes em muitos

países (Teixeira, 1987). Esta ampla variedade de animais constitui importante reservatório natural, propiciando o progresso da doença nas Américas.

Poucas espécies de *Trypanosoma* são encontradas no Novo Mundo e, do ponto de vista de saúde humana, a mais importante é o *T. cruzi*, causador da Tripanossomíase Americana, denominada Doença de Chagas após a descoberta do parasita no vetor, por Carlos Chagas.



FIGURA 3: Forma circulante do *T. cruzi*.
(www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/chagas.html)

O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo (Brener, 1980) (FIG. 4) e várias cepas, que diferem quanto à epidemiologia, patogenia, resposta ao tratamento, bioquímica ou imunogenicidade.

Os primeiros experimentos demonstrando a variabilidade genética do parasita foram delineados por Miles (1977); Miles (1978) e Ready & Miles (1980). Estudos subsequentes mostraram uma variabilidade ainda maior do protozoário (Tibayrenc et al, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1999; Guhl et al., 2002).

A despeito de inúmeras metodologias estarem sendo empregadas para o estudo da diversidade genética do *T. cruzi*, ao nível do DNA, o aparecimento do PCR propiciou uma abordagem mais simplificada, de alta sensibilidade, baixo custo e facilidade de uso. Por outro lado, embora diferentes cepas do parasita tenham sido

identificadas com o *fingerprint* e com microssatélites de DNA, buscam-se ainda métodos, com maior especificidade para o *T. cruzi*, que permitam uma tipagem genética, inequívoca na presença do DNA do hospedeiro, ou ainda, métodos onde o alvo seja hipervariável, possibilitando a individualização genética das cepas. Existem dois grupos taxonômicos principais e identificar a qual deles, uma cepa de *T. cruzi* pertence, ou determinar a relação de proximidade entre os parasitas, são alguns exemplos do que se tem estudado sobre a genética deste protozoário (Macedo et al, 2002).

Complementando as informações de Tibayrenc (1995), acerca da existência de duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi*, altamente heterogêneas, Brisse et al., (2000) e Brisse et al., (2003) apresentam cinco subdivisões menores, totalizando pelo menos seis linhagens filogenéticas.

Atualmente, as diferentes cepas têm sido classificadas em dois grandes grupos, definidos como I e II, onde o *T. cruzi* I é extremamente comum em áreas endêmicas, no ciclo silvestre, enquanto o *T. cruzi* II é predominante em humanos e ciclos domésticos e foi subdividido em 5 subdivisões genéticas (Barnabé et al., 2000). Os dois grupos, entretanto, estão associados às lesões cardíacas em humanos infectados, porém apenas o *T. cruzi* II está também associado às lesões do trato digestivo (Prata, 2001).

Esta acentuada diversidade genética, associada a uma considerável capacidade de adaptação fisiológica do parasita, respondem pelas diferenças na severidade da doença (Macedo & Pena, 1998). Somam-se ainda, as influências ambientais, bem como as decorrentes das interações parasita hospedeiro.

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Tripanossomíase americana ou doença de Chagas)

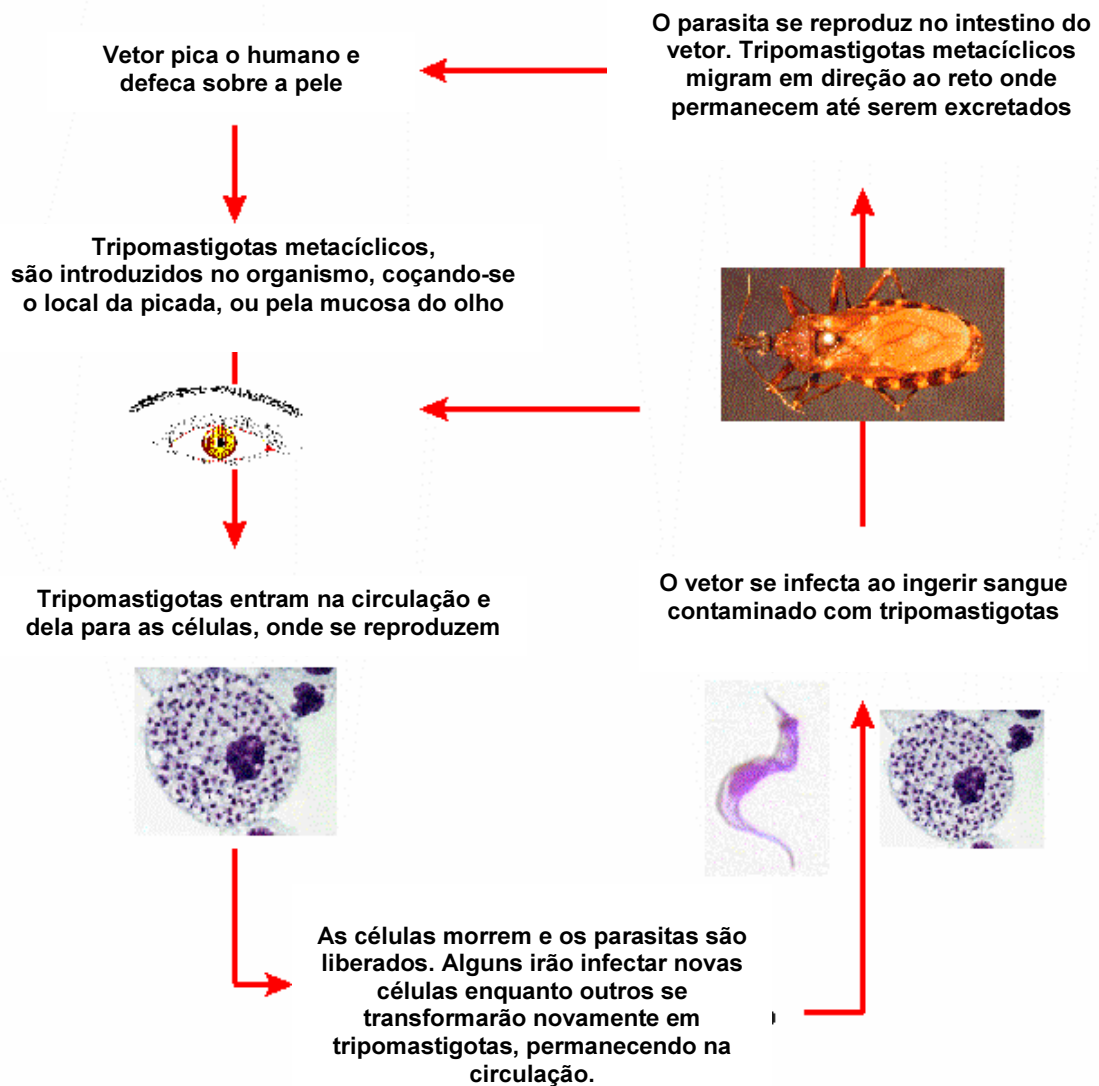


FIGURA 4: Ciclo de vida do *T. cruzi* (www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/chagas.html)

Após ser ingerido, o parasita sofre modificações na porção anterior do intestino do inseto, transformando-se em epimastigota, uma forma replicativa do parasita. Após várias replicações, os parasitas migram para a porção terminal do intestino onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, responsáveis pela infecção do hospedeiro (FIG. 4).

Em humanos, o *T. cruzi* pode ser encontrado tanto na forma intracelular ou amastigota, quanto na forma sangüícola ou tripomastigota (FIG. 5).

Clinicamente, a doença se estabelece em duas fases distintas: a aguda, iniciada imediatamente após a entrada do parasita, na circulação do hospedeiro e a crônica. Na fase aguda, o período de incubação é de 1 a 2 semanas e a doença se manifesta primeiramente com a presença de grande quantidade de parasitas, sendo portanto determinante no controle da infecção, por ser a mais eficiente para o tratamento da doença (Leon & Engman, 2001; Leon et al., 2001). Entretanto, a escassez de sinais clínicos, nesta fase, dificulta uma ação terapêutica efetiva e, como conseqüência, os tripomastigotas metacíclicos circulantes vão para o interior das células, tanto pela resposta fagocitária, promovida pelas células do sistema imune do hospedeiro, como por penetração ativa em outras células (Goldenberg & Krieger, 1997; Macedo et al., 2002).

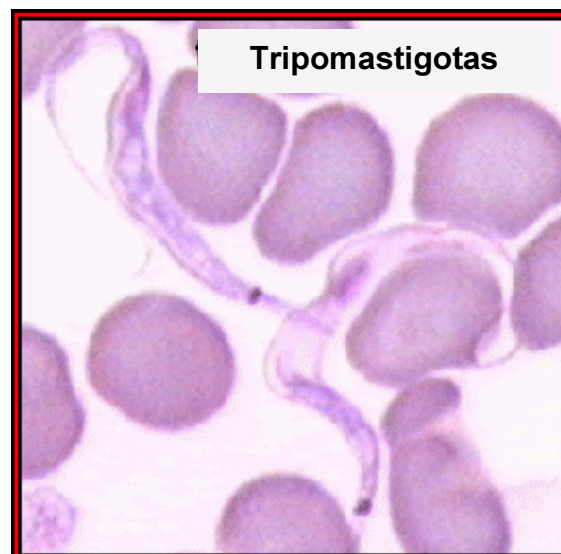


FIGURA 5: Forma infectante do parasita
(www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/chagas.html)

As drogas disponíveis são ativas na fase aguda, porém com pouca eficácia (Urbina, 2001 e 2002; Urbina et al., 2003a ; Urbina et al. 2003b).

Além disso, o tratamento com drogas é prolongado, com baixa eficácia, alcançando 55% de sucesso em crianças recém contaminadas e 19%, em adultos infectados há mais tempo. Estes resultados demonstram a dificuldade de estabelecer protocolos eficientes e indicam a importância da investigação científica, notadamente na fase aguda. Por outro lado, as pessoas infectadas normalmente sobrevivem à fase aguda e iniciam uma fase crônica, razão pela qual, o número de casos crônicos supera significativamente o número de casos agudos, dificultando ainda mais a possibilidade de cura (Mendes, 1994).

A fase crônica pode ser assintomática ou sintomática, porém é freqüente a ausência de parasitas na circulação. Nesta fase, os indivíduos acometidos podem desenvolver a doença, com diferentes manifestações clínicas podendo ser cardíaca, digestiva, cardio-digestiva ou indeterminada. Entretanto, as razões pelas quais a doença se manifesta de forma diferente entre os hospedeiros, permanecem desconhecidas (Cunha-Neto, 1999).

Uma vez estabelecida a infecção, o protozoário consegue evadir-se do vacúolo parasitóforo inicialmente produzido, proliferando-se lentamente, imerso no citoplasma das células, o que dificulta uma ação efetiva da resposta imune e de drogas tripanosomicidas (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Andrews, 1994).

A ausência de parasitas circulantes na doença crônica dificulta a identificação dos doentes e, muitos indivíduos acometidos permanecerão infectados por toda a vida sem conhecimento. Entretanto, após um período que pode variar de 10 a 20 anos após o contato com o parasita, cerca de 30% dos infectados desenvolverão uma severa cardiomiopatia. Este percentual representa cerca 2 milhões de pessoas, das quais outras 50.000 evoluem para óbito a cada ano (Wizel et al., 1998; Cunha-Neto, 1999). A cardiomiopatia observada se caracteriza por uma intensa miocardite, que pode alterar o funcionamento do coração de diferentes maneiras, sendo muito freqüente as arritmias seguidas de morte.

Os mecanismos, relativos à resistência ao estabelecimento desta cardiopatia chagásica, são ainda assunto de intenso debate, havendo, entretanto, o consenso da importância da constituição genética do indivíduo, no desenvolvimento da doença congestiva.

Estudos recentes sugerem que, na fase crônica, a doença pode se desenvolver na forma de uma auto-imunidade, decorrente da presença de proteínas derivadas dos parasitas, as quais podem mimetizar moléculas constituintes de células do hospedeiro, dificultando a ação de seu sistema imunológico. A cardiopatia Chagásica congestiva, pode ser explicada, em parte, pela agressão ao tecido cardíaco, mesmo na ausência do parasita *in situ*, como resultado de um evento secundário a uma resposta imunológica, dirigida contra antígenos do *T. cruzi* com semelhanças antigênicas, ou também, por um mimetismo molecular a um componente cardíaco. Atribui-se a esse mecanismo de reação imunológica cruzada, gerada pelas respostas imunes ao *T. cruzi* e pela auto-imunidade aos componentes cardíacos, a responsabilidade como desencadeadores da inflamação e da destruição do tecido cardíaco observado na cardiopatia Chagásica (Cunha-Neto, 1999).

Por outro lado, as quimiocinas produzidas controlam o influxo de células imunes e inflamatórias para o sítio de infecção parasitária, participando ativamente do processo de resistência do hospedeiro ao parasita (Teixeira et al., 2002).

Contudo, a despeito das questões de política de saúde pública no controle da infecção; das avaliações clínicas em pacientes Chagásicos e das observações *post mortem* é fundamental considerar os aspectos técnico-científicos da doença e as relações parasita-hospedeiro.

Embora uma parcela significativa das informações acerca do mal de Chagas, se origine de observações clínicas e da epidemiologia da região de origem dos doentes, do ponto de vista científico, a maior parte do conhecimento acumulado deriva da investigação científica realizada em modelos animais (Andersson et al. 2003b).

Dentre as espécies mais utilizadas, destacam-se os cães, coelhos e camundongos, sendo que a doença foi mais estudada nestes últimos, em função da

disponibilidade de linhagens definidas do ponto de vista sanitário e genético. Enquanto a padronização sanitária reduz o risco de interferência nos resultados experimentais, decorrentes da presença de patógenos contaminantes, cujas infecções podem conduzir a conclusões equivocadas acerca da doença (Rangel et al., 1994), resultados obtidos com estudos de infecção experimental por tripanosomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, demonstram que a sobrevivência observada, em algumas linhagens isogênicas de camundongos, deriva de um mecanismo de resistência composto de múltiplas partes, onde é fundamental a constituição genética do hospedeiro (Andrade et al., 2002).

Desta forma, não obstante os aspectos relacionados à sanidade animal, a complexidade da Doença de Chagas exige o uso de modelos definidos também do ponto de vista genético. Assim, as *linhagens isogênicas* com uma homozigose em seus alelos, próxima a 99%; as *heterogenéticas* com alelos recombinando equilibradamente na população; as *recombinantes isogênicas* cujo genoma é constituído da mistura ao acaso de duas linhagens isogênicas, com homozigose em 99% de seus alelos; as *congênicas* ou portadoras de 1 gene mutante não original, inserido por acasalamentos programados entre uma linhagem mutante (doadora) e a linhagem receptora (congênica) e as *mutantes*, entre outras, atuam como “ferramentas” indispensáveis para a compreensão da doença *in vivo*, possibilitando o estabelecimento de inúmeros protocolos de infecção, com o propósito de investigar as relações parasita-hospedeiro (Eksi et al., 1996; Godard & Guénet, 1999; Fortin et al., 2001b).

Nos murinos, a Doença de Chagas se desenvolve de forma diferente daquela observada na população humana. Nestes animais, a fase aguda da infecção é caracterizada por uma alta parasitemia, grande disseminação e uma importante imunossupressão, ocorrendo com freqüência a morte dos modelos (Minoprio et al., 1989). Contudo, a constituição genética do hospedeiro pode possibilitar o controle das formas circulantes ou tripomastigotas, conduzindo o animal para uma fase crônica, caracterizada por um parasitismo tecidual e uma parasitemia dificilmente detectável. Portanto, a linhagem utilizada no estudo da doença, não apenas facilita sua compreensão, mas é também crítica na realização de alguns ensaios

experimentais, como os relacionados à resistência ao parasita, possibilitando entender o desenvolvimento da doença em outras espécies (Corsini et al., 1980a; Soares et al., 2001a; Soares et al., 2001b; Pontes-de-Carvalho et al., 2002).

Estudos realizados em camundongos normais, mutantes e *knock-out* com o propósito de identificar componentes do sistema imune, envolvidos com o controle da infecção, demonstraram que os mecanismos relacionados à resistência e à susceptibilidade são complexos e sofrem influência do genoma dos animais, tanto com relação aos elementos conhecidos da imunidade inata, celular e humoral, como de aspectos ainda não esclarecidos de controle da infecção (Martins et al., 1999).

Entretanto, a resposta imune inata por si só não pode responder pelo controle da infecção (Cunha-Neto, 1999). Nabors & Tarleton (1991), investigando a participação de outras células e moléculas envolvidas na resposta imune da infecção Chagásica, já haviam observado, no princípio da década de 90, que linfócitos T extraídos de linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, produziam maior quantidade de IFN γ , indicativo de uma resposta imune complexa.

Posteriormente, Bahia-Oliveira et al. (1998) reforçam a complexidade da doença, demonstrando que a manutenção de uma resposta imune, com altos níveis de produção IFN γ durante a fase crônica da infecção, pode favorecer a cura, ou influenciar o desenvolvimento da forma cardíaca da doença.

Além disto, moléculas como citocinas, que atuam como amplificadores da resposta imune, são extensamente estudadas e relacionadas à resistência ao parasita, sem que possam, contudo, serem consideradas isoladamente, demonstrando pertencerem a um mecanismo integrado de resposta, que conduz à sobrevivência do hospedeiro (Sírová et al., 1993; Reed et al., 1994; Laucella et al., 1996a e 1996b; Kierszenbaum, 1995; Kierszenbaum et al., 2002), conforme já havia sido relatado no princípio da década de 90, quando Nabors & Tarleton (1991) observaram uma acentuada produção de IFN γ , por linfócitos T extraídos de camundongos resistentes e susceptíveis, após a inoculação com o *T. cruzi*, demonstrando a influência desta citocina, no controle da infecção.

Ademais, a complexidade dos eventos imunológicos relacionados à resistência a parasitas intracelulares, tem sido relatada, observando-se que a produção de citocinas, IFN γ e óxido nítrico varia em função do parasita (Reed et al., 1994; Zhang & Tarleton, 1996; Moulia et al. 1996; Oliveira, et al., 2000, Nickell & Sharma 2000; Araújo et al., 2000; Hiyama et al., 2001; Tarleton, 2001; Borges et al., 2003). Os aspectos imunológicos relatados por estes autores reforçam a hipótese de que, a Doença de Chagas é multifatorial, de expressão variável e dependente de genes do hospedeiro para a modulação da resposta imune, com vista a controlar a infecção.

É aceito, que a infecção chagásica desencadeia uma série de respostas imunológicas, que convergem para reações similares àsquelas encontradas em doenças auto-imunes, as quais, além de serem influenciadas por eventos bioquímicos, como mimetismo molecular, dependem de um mecanismo genético complexo, ainda não elucidado (Vyse & Todd, 1996). O diabetes tipo I, insulino dependente, por exemplo, está associado a um conjunto de genes composto de múltiplos alelos, sendo ainda totalmente desconhecidos quais exercem papel determinante no desenvolvimento da doença e na sobrevida dos doentes (Vyse & Todd, 1996; Engman & Leon, 2002).

Na verdade, diversas doenças como a hipertensão arterial, câncer, diabetes mellitus e asma, entre outras, têm comportamento semelhante e dependem da combinação de fatores ambientais e genéticos, sendo por esta razão, designadas como doenças com características fenotípicas complexas (Matesic et al., 1999). A investigação científica, *in vivo* destas doenças, exige o emprego de modelos animais, com composição genética conhecida e padronizada (Fortin et al., 2001a).

Entretanto, apesar da multiplicidade de modelos para o estudo da infecção, é ainda crítica a incapacidade técnica na solução destas doenças, demonstrando a necessidade de uma abordagem científica, que as esclareçam sob o ponto de vista das várias áreas de investigação, como imunologia, parasitologia, farmacologia, bioquímica e genética. Parte desta incapacidade reside na complexa interação entre o parasita e o hospedeiro, onde a variabilidade genética do primeiro contrasta com a

influência da constituição genética do animal utilizado como modelo experimental (Lauria-Pires et al. 1996; Muñoz et al., 1994; Moulia et al., 1996).

A manipulação genética de camundongos, com propósitos experimentais, acentuou-se a partir do estabelecimento das linhagens isogênicas no início do século XX, com os experimentos realizados por William Castle, estudando padrões de herança em animais (Beck et al., 2000).

Neste mesmo período, Abbie Lathrop (Mobraaten & Sharp, 1999) gerou diferentes colônias de camundongos, entre elas, linhagens que desenvolviam tumores. Os camundongos usados por Castle e Lathrop são os ancestrais de muitas linhagens isogênicas atuais, como a *DBA* (*Diluted, Brown, Agouti*), desenvolvida em 1909 e ainda bastante utilizada. Outras linhagens isogênicas como o C3H, CBA, e BALB/c, produzidas nas décadas seguintes, continuam sendo muito empregadas na investigação científica, reforçando a importância do modelo definido geneticamente para a pesquisa biomédica (Moutier, 1971; Russel et al., 1993; Silver, 1995; Festing, 1999; Beck et al., 2000).

Little e Castle (Mobraaten & Sharp, 1999), empregando estes modelos na pesquisa do câncer, demonstraram que o padrão de herança, na susceptibilidade de uma linhagem isogênica, não obedecia aos princípios Mendelianos conhecidos. Segundo estes autores, a utilização de animais de primeira e segunda geração, provenientes de acasalamentos programados, entre linhagens isogênicas de fenótipos diferentes, viabilizariam este tipo de estudo, conforme foi demonstrado posteriormente (Mobraaten & Sharp, 1999).

A partir dos resultados obtidos na primeira parte do século XX, demonstrando que o crescimento de tumores era dependente de uma resposta imune dirigida contra antígenos celulares do transplante, foram realizados experimentos, com o objetivo de identificar e isolar os genes responsáveis por estes antígenos. Para tanto, foram empregados acasalamentos programados entre linhagens isogênicas, utilizando-se o caráter de susceptibilidade como fator de seleção. Os resultados obtidos conduziram ao desenvolvimento dos primeiros modelos congênicos murinos para os genes H. Estes estudos foram determinantes para o extraordinário

progresso, que se seguiu nas várias áreas da ciência, com reflexos na qualidade de vida das populações, principalmente na transplantação (Mobraaten & Sharp, 1999).

Posteriormente outros protocolos, para a produção deste tipo de modelo, foram introduzidos e, como consequência, novas linhagens congênicas, para o locus H-2 e para outros loci, foram produzidas, permitindo associá-los a fenômenos biológicos complexos, como os observados nas doenças decorrentes de patógenos intracelulares, como a infecção Chagásica (Trischmann et al., 1978; Trischmann & Bloom, 1982; Trischmann, 1983; Trischmann, 1984a e 1984b; Potter et al., 1983; Potter et al., 1994; Mobraaten & Sharp, 1999).

No final da década de 70, Trischmann et al. (1978) avaliaram a sobrevivência de algumas linhagens isogênicas de camundongos, infectadas experimentalmente com tripanosomas da cepa Brasil. Os resultados encontrados por estes autores demonstraram diferenças significativas na resistência, em animais de linhagens com haplótipos H-2 distintos, ressaltando a importância deste locus na sobrevivência dos animais. A partir de suas conclusões, outros experimentos, com linhagens congênicas para esta região do genoma, foram realizados e demonstraram que o fenômeno da resistência estava associado à composição genética do animal como um todo, e não apenas ao seu haplótipo H-2 (Trischmann et al., 1978; Trischmann & Bloom 1982).

No mesmo período, Wrightsman et al. (1982 e 1984), trabalhando com a cepa Peru do tripanosoma, sugerem a participação de pelo menos dois genes, no fenômeno de resistência, fora da região H-2.

É consenso, que estes resultados, embora de extrema importância, não são conclusivos para a infecção ao *T. cruzi*, requerendo a realização de outros ensaios, que permitam investigar a importância da constituição genética do hospedeiro no controle da infecção (Wrightsman et al., 1994; Wrightsman et al., 1995; Wrightsman & Manning, 2000; Wrightsman et al., 2002)

As análises, que até então se baseavam essencialmente no produto da expressão de genes, com o desenvolvimento de técnicas moleculares, passaram a ser realizadas com a observação direta da molécula do DNA, implicando em

importantes avanços na investigação genética de mecanismos complexos, como os de resistência à infecção por patógenos intracelulares (Britto et al., 1995; Alves et al., 1996). A reação de PCR, por exemplo, consorciada à utilização de microssatélites polimórficos de DNA e acasalamentos programados, permitiu o estudo de regiões cromossômicas, envolvidas na susceptibilidade a doenças, como a infecção pelo vírus de Theiler (Bureau et al., 1993; Bureau et al., 1992; Fitte et al., 1995), animais bons e maus respondedores (Puel et al., 1995; Trezena et al., 2002), entre outros.

Esta metodologia foi utilizada na investigação da resistência ao *T. congolense*, identificando a participação dos cromossomos 1 e 5 no controle da infecção experimental com este parasita, sugerindo um evento poligênico, com a participação de genes fora da região H-2 (Kemp et al. 1997). Posteriormente os estudos complementares confirmaram a existência de outros genes influenciando na resistência a este patógeno (Iraqi et al., 2000; Clapcott et al., 2000).

Por outro lado, Roberts et al. (1997) identificaram a participação de uma região do cromossomo 9 que, juntamente com o locus H-2, era importante para o controle da infecção experimental por *Leishmania major*. Estudos mais detalhados apontaram para outros genes envolvidos com a resistência a este parasita, sugerindo uma interação epistática na sobrevivência dos animais (Roberts et al., 1999).

O emprego deste protocolo, na investigação de outros protozoários, identificou, para o *Plasmodium chabaudi*, regiões importantes para a sobrevivência de camundongos infectados (Foot et al., 1997; Fortin et al, 1997; Fortin et al., 2001b e Fortin et al., 2002).

Todavia, quando Graefe et al. (2003) estudaram a susceptibilidade murina à Doença de Chagas, identificaram que regiões, presentes nos cromossomos 5 e 17, estariam influenciando a susceptibilidade dos camundongos à cepa *Toulahuen* do *T. cruzi*. Contudo, estes autores ressaltam que, os mecanismos genéticos associados à doença, não estão elucidados, estimulando a realização de experimentos adicionais com este enfoque.

Ainda que o PCR tenha sido a técnica mais utilizada no delineamento experimental dos trabalhos citados, o emprego de outras ferramentas deve ser

associado, quando se investiga a participação, *in vivo*, de múltiplos genes em doenças que apresentam características fenotípicas complexas. Entre estas, destacam-se os modelos recombinantes, derivados de linhagens isogênicas com fenótipo conhecido.

Desta forma, outros modelos como as linhagens recombinantes isogênicas (RIS) foram desenvolvidos e colaboraram para o aprofundamento na investigação de doenças, como a resistência ou susceptibilidade a patógenos e diabetes entre outras, as quais dependem da ação de múltiplos genes, muitos deles ainda com funções desconhecidas (Matesic et al., 1999; Bailey, 1971 e 1981).

Melvold (1986) descreve as linhagens RIS como o produto de misturas ao acaso do genoma, de dois indivíduos F1, fixado com acasalamentos consangüíneos por 20 gerações. Desta forma, as séries de linhagens recombinantes resultantes, portarão os alelos das linhagens isogênicas parentais originais, em homozigose, porém distribuídos de maneira diferente entre cada linhagem recombinante produzida.

Empregando este modelo e animais F2, Mock et al. (1993) estudaram o controle genético da *Leishmania major*, observando o padrão de distribuição gerado para o gene Scl-1 em animais recombinantes isogênicos CXB e CXS. Os resultados obtidos por estes autores sugeriram a participação do cromossomo 11 no controle da infecção por aquele parasita e reforçaram a importância do uso desse modelo, como ferramenta para o estudo de doenças com características fenotípicas complexas.

Atualmente, estão disponibilizadas em *sítes* especializados como o *Jackson Laboratory* (<http://www.jax.org.br>) séries de linhagens RIS, originadas a partir de linhagens isogênicas com múltiplos fenótipos, entre eles, a susceptibilidade ou resistência a patógenos (Prows & Horner, 2002).

Além dos camundongos RIS descritos, um novo modelo, com segmentos congênicos entre linhagens isogênicas, foi desenvolvido por Demant & Hart (1986). Segundo estes autores, as linhagens congênicas recombinantes, são formadas a partir de pelo menos dois retro-acasalamentos, originados nos híbridos F1 com uma das linhagens parental isogênica original, seguida de cruzamentos consangüíneos e sem o

uso de seleção. Como consequência, cada linhagem formada será homozigota para alelos que foram distribuídos ao acaso e que são oriundos das linhagens parentais. A recombinação e a participação de cada linhagem no genoma dos animais variam, em função do número de retro-acasalamentos realizados.

Com o emprego destes modelos, a análise de regiões do genoma, importantes para um determinado fenótipo, pode ser realizada individualmente, ou mesmo com arranjos que identifiquem relações genéticas entre elas (Stassen et al., 1996; Moen et al. 1997; Peirce, 2001).

Empregando estes modelos, Kramnik et al. (1998) demonstraram que a susceptibilidade à tuberculose é um evento poligênico.

Morel et al. (1996) produziram quatro linhagens congênicas de camundongos, cada uma carregando um dos intervalos gênicos, importantes para a susceptibilidade ao Lupus Eritematoso Sistêmico.

Assim, a análise da resistência nas infecções experimentais com o *T. cruzi*, empregando-se linhagens isogênicas, revelou a importância da constituição genética do hospedeiro na sobrevivência e apontou para a necessidade de se realizar experimentos especificamente desenhados, com o propósito de esclarecer a influência de genes envolvidos no fenômeno da resistência (Wrightsmann et al., 1982; Corsini et al., 1980).

A complexidade do componente genético, influenciando o desenvolvimento da doença, no homem e nos camundongos, torna prioritário qualquer esforço na busca de ferramentas, que permitam decifrar este mecanismo.

Neste contexto, o uso de um delineamento experimental que associe acasalamentos programados, entre animais selecionados com o parasita, contribuirá, sobremaneira, na obtenção de um modelo ideal à investigação do fenômeno da resistência à cepa Y do *T. cruzi*.

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta três objetivos principais:

- Caracterização do padrão de herança genética no fenômeno da resistência à cepa Y do *T. cruzi*, quanto ao caráter dominante ou recessivo;
- Investigação do padrão de herança nos animais resistentes, infectados com altas doses de parasita;
- Identificação de regiões cromossômicas que participam da resposta do hospedeiro infectado.
- Desenvolver um modelo recombinante congênico para a resistência ao *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação animal do Instituto de Biologia.

4.1 – MATERIAIS

Para atingir os objetivos propostos e facilitar a compreensão do delineamento experimental, serão descritos o parasita, os animais e os reagentes utilizados.

4.1.1. Parasita

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, utilizada em todos os testes de infecção, foi proveniente do Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, onde era mantida em nitrogênio líquido, conforme as indicações de Rangel et al. (1994).

As amostras com os parasitas foram testadas no laboratório de controle de qualidade sanitária do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB), afim de isentá-las de contaminações por vírus, antes do seu congelamento

4.1.2 - Animais

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados animais oriundos das Colônias de Fundação do Cemib/Unicamp e do *Jackson Laboratory* (BarHarbor – Maine).

Os animais importados foram mantidos em quarentena para a realização preventiva da técnica de derivação cesariana, sendo posteriormente transferidos para as áreas com barreiras de proteção contra contaminações.

Em todas as etapas deste trabalho, a integridade sanitária e genética dos animais foi preservada pela manutenção dos modelos em unidades isoladoras flexíveis (Passos & Alves, 1996).

A alimentação e a água foram disponibilizadas *ad libitum*.

4.1.3 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise. Para o preparo das soluções foi utilizada água Milli-Q.

Nos Anexos (1 a 4) encontram-se as soluções utilizadas nas diversas etapas do presente trabalho.

4.2 – MÉTODOS

A metodologia empregada incluiu a certificação genética dos modelos, o preparo e manutenção dos parasitas, a infecção dos animais com *T. cruzi*, os acasalamentos programados e a produção de uma linhagem recombinante congênica resistente à cepa Y do *T. cruzi*.

4.2.1 – Certificação genética das linhagens.

Para a realização do presente trabalho, uma avaliação das linhagens foi realizada com o propósito de confirmar a sua constituição genética, bem como para excluir a existência de contaminações que pudessem comprometer a qualidade e interpretação dos resultados. Para tanto, foram utilizados testes de acasalamento, transplante de pele e análise do DNA com microssatélites polimórficos.

Inicialmente foram investigados animais oriundos das colônias de fundação do Cemib/Unicamp, selecionando-se amostras derivadas de linhagens fenotipicamente similares. Este grupo foi analisado com transplante singeneico heterotrópico de tecidos e com marcadores moleculares de DNA.

4.2.1.1 – Colônia de Fundação.

As matrizes que formam estas colônias foram obtidas de Centros de Pesquisa, que mantêm rotinas de monitoramento da qualidade animal, existentes na Alemanha (*Zentralinstitut für Versuchstierzucht – Hanover*), França (*Institut Pasteur – Paris*) e do Brasil (Instituto de Ciências Biomédicas II da USP - São Paulo). Os animais destas colônias são mantidos em unidades isoladoras flexíveis.

TABELA 1: Origem das matrizes das Colônias de Fundação de camundongos mantidas no Cemib / Unicamp.

LINHAGEM	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
BALB/c AN	Zentral Institut für Versuchstierzucht
BALB/c nu/nu	Institut Pasteur de Paris
C57BL/6	Zentral Institut für Versuchstierzucht
C57BL/6 nu/nu	Zentral Institut für Versuchstierzucht
C57BL/6 bg/bg	Institut Pasteur de Paris
C57BL/6 ScCr	Institut Pasteur de Paris
C57BL/6 ScCr nu/nu	Institut Pasteur de Paris
CB17 Scid/Scid	Institut Pasteur de Paris
CB17 +/+	Institut Pasteur de Paris
CBA/Han/Uni	Zentral Institut für Versuchstierzucht
CBA/N Xid	Institut Pasteur de Paris
C3H/He nu/nu	Zentral Institut für Versuchstierzucht
NOD	Hospital Necker - Paris
A/J	ICB 3 - USP

Linhagens certificadas oriundas de Centros de Pesquisa que mantêm as matrizes em sistema de isolamento e monitoram as colônias do ponto de vista sanitário e genético. As linhagens em destaque foram utilizadas nas diferentes etapas do trabalho.

4.2.1.1.1 - Teste de histocompatibilidade

Grupos de animais das linhagens CBA/Han/Uni, C57BL/6/Uni e A/J/Uni, com 10 a 12 semanas de idade, foram retirados aleatoriamente da colônia de fundação, para serem testados pela técnica de transplante singeneico heterotrópico de pele (orelha x dorso), conforme descrito por Hedrich (1983).

Como controle da técnica, todos os animais testados receberam um auto-enxerto.

Estes animais foram observados em dois períodos: diariamente até o 10^o dia e semanalmente até o terceiro mês ou 120 dias. As observações buscavam identificar a aceitação ou rejeição do enxerto.

4.2.1.1.2 – Análise de amostras de DNA com microssatélites polimórficos.

Além da análise genética com o transplante de pele, as linhagens isogênicas foram investigadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se padrões de DNA existentes no banco de DNA do Cemib/Unicamp. Este banco foi formado com DNA extraído de animais das colônias geneticamente monitoradas, mantidas no Instituto Pasteur de Paris. Nesta técnica, o DNA retirado é comparado com amostras de DNA padrão, amplificado com diferentes marcadores moleculares.

Para a realização da técnica, foram utilizadas duas metodologias na obtenção do DNA:

- a extração fenólica que apresenta um bom rendimento com moléculas de alto peso;
- a precipitação alcoólica que é mais rápida e não implica no sacrifício do animal.

4.2.1.1.2.1– Extração fenólica das amostras de DNA.

Moléculas de DNA, de alto peso molecular, foram extraídas do baço de animais das linhagens resistente e susceptível. O protocolo de extração foi realizado segundo a metodologia descrita por Sambrook et al (1989).

Na realização da técnica, o baço de cada animal foi retirado, depositado em placas de petri descartáveis e em seguida, 2ml de tampão fosfato salina (PBS) foram adicionados. O órgão foi então macerado, com o auxílio de uma peneira de nylon de malha fina. Após a total dissolução, a mistura foi transferida, para tubos tipo *ependorf*, com capacidade de 5ml e a ela foram adicionados 2ml de tampão de lise, 2 vezes concentrado.

Os tubos ficaram em banho maria a 55°C, por uma hora, e então 8 µl da solução de proteinase K (20mg/ml) foram adicionados. Os tubos permaneceram nesta temperatura por uma noite. Na manhã do dia seguinte, 25 µl da solução de RNase (10mg/ml), foram adicionados.

Os tubos com as amostras de DNA foram deixados em banho maria a 37°C por 30 minutos. Após este período, a cada tubo foram adicionados 4ml da solução saturada

de fenol e deixados em agitação lenta por 15 a 20 minutos para a primeira lavagem. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o DNA recolhido foi transferido para um outro tubo. Para a segunda lavagem, foram utilizados 4ml de uma solução composta de fenol e clorofórmio (V/V) e os tubos permaneceram em agitação lenta por 15 a 20 minutos, antes de serem centrifugados a 3000 rpm. A última lavagem foi realizada após a transferência do DNA para um novo tubo, seguido da deposição de clorofórmio em um volume igual ao de DNA e agitação lenta por 1 hora. Após este prazo, as amostras foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições, e o sobrenadante recolhido foi dialisado por 24 hs, a 4°C contra tampão de diálise. As amostras foram então amplificadas, a partir da reação de PCR, utilizando-se marcadores polimórficos de microssatélites para várias linhagens isogênicas de camundongos.

As soluções utilizadas nesta etapa do trabalho encontram-se descritas nos Anexos (1 a 4).

4.2.1.1.2.2– Extração das amostras de DNA por precipitação alcoólica.

Um pedaço da orelha ou a ponta da cauda dos animais foram retirados e tratados para a extração das amostras de DNA.

Os tecidos foram colocados em tubos tipo *ependorf*, previamente identificados e, em seguida, 700µl de tampão de lise e 4µl de proteinase K (20 mg/ml) foram adicionados. Os tubos permaneceram em banho maria por uma noite a 37°C.

Na manhã do dia seguinte, foram iniciadas as lavagens das amostras, afim de que o DNA pudesse ser retirado. Para a primeira lavagem, 700 µl de uma solução de fenol saturado foram adicionados e os tubos ficaram em agitação lenta por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 9000 rpm, por 5 minutos para a retirada do sobrenadante, que foi transferido para um outro tubo. A este novo tubo, foram adicionados 700 µl de clorofórmio e a segunda lavagem teve início, seguindo as mesmas condições da lavagem anterior. O sobrenadante foi novamente recolhido e transferido para um outro tubo, ao qual juntaram-se 70 µl de acetato de sódio 3 M pH 7,0, seguidos de uma homogeneização lenta. As amostras foram então colocadas em

freezer à -20°C, pelo período de 20 minutos. Após este período, o tubo teve o seu volume completado com etanol e foi homogeneizado lentamente para a precipitação do DNA. A medusa formada foi recolhida e transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 300 µl de etanol 70%. Este procedimento foi repetido mais uma vez e em seguida o excesso de álcool foi cuidadosamente retirado, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Os tubos foram deixados em câmara de vácuo por alguns minutos, para a evaporação completa do álcool e em seguida, 500 µl de água deionizada estéril foram adicionados. Após uma homogeneização manual, os tubos foram conservados em geladeira a 4°C até o momento de uso.

4.2.1.1.2.3- Certificação genética das linhagens isogênicas por microssatélites.

Animais das linhagens isogênicas, indicadas na Tabela 1, foram separados, para a análise de sua constituição genética. Os testes foram realizados, utilizando-se os marcadores moleculares indicados nas Tabelas 2, 3 e 4, capazes de identificar regiões de microssatélites presentes nos animais. Foram realizados 3 testes com objetivos diferentes.

O primeiro, designado de perfil fenotípico, foi realizado com os marcadores indicados na Tabela 2. Este teste possibilita a detecção de alterações no padrão genético de linhagens mantidas no Cemib/Unicamp. Os *primers* indicados nesta Tabela são polimórficos, permitindo, principalmente, a observação de contaminações genéticas entre as linhagens fenotipicamente iguais. Com estes marcadores pode-se identificar a origem de uma possível contaminação.

O segundo teste, designado de perfil amplo, foi realizado com os *primers* da Tabela 3, que permitem a observação de polimorfismo entre as linhagens C57BL6/Uni e A/Uni de fenótipos resistente e susceptível à cepa Y do *T. cruzi*.

O último teste, designado de perfil específico para isogenia, foi realizado com os *primers* apresentados na Tabela 4, permitindo a constatação de possíveis comprometimentos na isogenia das linhagens C57BL6/Uni e A/Uni.

TABELA 2: Marcadores moleculares selecionados para a análise das colônias de camundongos (Perfil fenotípico).

Cromossomo	Primers	Posição (cM)	A/Uni (pb)	C57BL/6 (pb)	NOD (pb)	BALB/c (pb)	DBA/2 (pb)	C3H/H (pb)	CBA (pb)
1	Crp	94,2	101		151	121	158	121	
3	D3MIT49	41		128		151	151	110	110
7	D7MIT31	44	230	246	238	236	229	226	222
12	D12MIT19	58	324	346	338	340	304	334	
	Igh	59		214		197	189	181	181
13	D13MIT77	73	320	280	280	280	270	270	
14	D14MIT260	19,5	138	164	152	156	156	138	
16	D16MIT5	38	132	156	158	137	143	156	163
17	D17MIT16	18,15	92	124	88	106	106	92	92
	D17MIT176	22,5	160	174	154	176	172	182	
18	D18MIT51	37	154	150	154	194	198		
X	DXMIT166	15,5	126	114	126	122	126	126	
	DXMIT64	45	114	134	133	114	133	114	207

Tabela de exclusão demonstrando a posição, peso molecular (bp) dos produtos de PCR e polimorfismo entre diferentes linhagens isogênicas.

A escolha dos marcadores utilizados para a análise genética, levou em consideração as linhagens existentes nas colônias de fundação do Cemib/Unicamp.

Os marcadores foram selecionados considerando-se a capacidade de se analisar linhagens fenotipicamente semelhantes.

O tamanho dos produtos de PCR em pares de base (pb) para cada linhagem foi utilizado na seleção dos marcadores. Os resultados foram considerados por comparação direta com os padrões de DNA oriundos do banco do CEMIB / UNICAMP.

TABELA 3 – *Primers* utilizados na análise genética das linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni, respectivamente resistente e susceptível (Perfil amplo).

<i>Primers</i>	Posição	A/Uni	C57BL/6/Uni	<i>Primers</i>	Posição	A/Uni	C57BL/6/Uni
	(cM)				(cM)	(pb)	(pb)
D1MIT3	11	185	160	D13MIT115	7	139	151
D5MIT10	54	188	198	D14MIT260	19,5	138	164
D7MIT31	44	230	246	D18MIT51	37	154	150
D10MIT134	59	125	101	D19MIT100	27	144	154
D11MIT263	57,1	156	144	DXMIT64	45	114	134

As linhagens C57BL/6/Uni e A/J/Uni foram testadas com 10 marcadores moleculares de microssatélites, a fim de se excluir a possibilidade de contaminação genética entre elas.

Os marcadores indicados na Tabela 4 permitem a observação de múltiplos pontos do genoma dos animais, possibilitando a detecção de comprometimentos no grau de isogenia dos modelos.

TABELA 4: Posição dos marcadores utilizados na análise de isogenia, nas linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni (Perfil específico).

Crom.	Marcador	Posição (cM)	Crom.	Marcador	Posição (cM)	Crom.	Marcador	Posição (cM)
1	D1MIT156	32.8	8	D8MIT69	31	14	D14MIT214	19
	D1MIT148	92.3		D8MIT280	72		D14MIT165	52
2	D2MIT66	47.6	9	D9MIT247	17	15	D15MIT111	18.8
	D2MIT113	103		D9MIT212	61		D15MIT246	60.1
3	D3MIT21	19.2	10	D10MIT230	49	16	D16MIT130	4
	D3MIT19	87.5		D10MIT180	64		D16MIT86	66
4	D4MIT89	19.8	11	D11MIT162	8	17	D17MIT164	4.1
	D4MIT14	78.5		D11MIT164	32		D17MIT20	34.3
				D11MIT167	71			
5	D5MIT135	42	12	D12MIT46	12.3	18	D18MIT111	7.8
	D5MIT285	89		D12MIT101	50		D18MIT4	57
6	D6MIT74	28.5	13	D13MIT88	21	19	D19MIT119	27.5
	D6MIT201	74		D13MIT77	73			
7	D7MIT246	15				X	DXMIT166	15.5
	D7MIT255	60						

Comparação de vários pontos do genoma dos animais, provenientes das linhagens utilizadas na formação dos grupos experimentais, com as amostras de DNA padrão.

Os testes foram conduzidos tomando-se por base o protocolo descrito por Love et al (1990).

A certificação foi realizada comparando-se os produtos de PCR obtidos com os marcadores das Tabelas 2, 3 e 4, com amostras padrão de DNA, provenientes de linhagens mantidas no Instituto Pasteur de Paris, que são rotineiramente monitoradas, bem como padrões do banco de DNA do Cemib/Unicamp.

4.2.1.1.2.4 - Amplificação das amostras de DNA padrão - Reação de PCR.

Para a realização da técnica foram utilizados termocicladores de diferentes marcas, tanto para placas de 96 poços, como para tubos de PCR.

Na reação, as amostras de DNA, dos diferentes grupos, foram diluídas a uma concentração final de 20 ng/ μ l. A cada reação, uma alíquota de 5,0 μ l foi homogeneizada com 6,9 μ l de uma solução contendo: tampão Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; 2% de Tween 20; KCl 180 mM; dNTPs 4 mM; *primers Reverse ((R) e Foward (F)*; Taq DNA polimerase (4,5 a 5,0 UI/ μ l); MgCl₂ em concentrações variáveis de 20 mM a 40 mM em função do *primer* e 13,1 μ l de água (volume final de reação de 25/ μ l) . A mistura, coberta com 2 gotas de óleo mineral (Nujol - Sigma), foi submetida ao programa de amplificação. Os programas utilizados para a reação da PCR variavam de acordo com cada *primer*.

Em geral foi empregada uma desnaturação primária de 92°C a 94°C por dois minutos; anelamento variando de 50°C a 58°C em um tempo de 45 segundos e alongamento de 72°C por 2 minutos, em um total de 40 a 45 ciclos.

4.2.1.1.2.5 - Análise dos resultados da reação de PCR.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 4,2%, diluído em tampão Tris-Ácido Bórico e EDTA, com a adição de 3 μ l de brometo de etídio.

Os produtos de PCR formados receberam 2,5 μ l de bromofenol blue (10X concentrado) e em seguida foram transferidos para o gel de agarose, onde foram

submetidos a uma diferença de potencial de 100 V por um período de 40 a 70 minutos à temperatura ambiente.

As soluções adotadas nesta etapa de reação estão descritas nos Anexos (1 a 4).

Os resultados foram registrados em filme polaroid® (667 iso 3000) com o sistema MP4 *Land Camera* sob luz ultravioleta (transiluminador Pharmacia® LKB Macro Vue), imediatamente após o término da eletroforese.

4.2.1.1.3 – Testes de acasalamento.

Além dos testes realizados com amostras da colônia de fundação, durante a realização dos grupos experimentais, o padrão de pigmentação dos animais, obtidos com os acasalamentos, foi observado e comparado com dados da literatura.

A análise foi conduzida conforme descrito por Esaki (1984), para descendentes de casais formados a partir das linhagens C57BL/6/Uni e A/J/Uni, onde a progênie F1 é investigada para a cor da pelagem. Um exemplo deste teste está apresentado no Anexo 5.

4.2.2 - Infecção experimental com o *T. cruzi*.

Para a realização dos ensaios com o parasita, foram realizadas as etapas de descongelamento, manutenção e determinação da dose discriminatória.

4.2.2.1 – Descongelamento do parasita.

Ampolas contendo o *T. cruzi* foram levadas ao banho maria a 37°C por 5 minutos. De cada ampola foi retirada, no fluxo laminar, uma alíquota para a confirmação, em microscopia ótica, da presença do protozoário.

4.2.2.2 – Manutenção do *T. cruzi*.

Após o descongelamento, um total de 10^2 formas de parasitas, por animal, foi inoculado via intraperitonal em camundongos da linhagem C.B. -17 Scid/Scid, como primeira passagem, a fim de aumentar a sobrevivência e a virulência dos parasitas descongelados.

Decorridos 14 dias foi feita a sangria branca pelo plexo braquial. Um volume de 100 µl, contendo 10^5 parasitas, foi inoculado pela mesma via, em camundongos da linhagem CBA/Uni.

A parasitemia foi observada e, no 7º dia, os animais foram sacrificados, por sangria total, para que os tripomastigotas pudessem ser novamente inoculados em animais machos e fêmeas da linhagem CBA/Uni, como segunda passagem. Após a terceira passagem, realizada com o mesmo protocolo, o parasita foi mantido com repiques semanais ou quinzenais, em animais da linhagem CBA/Uni de ambos os sexos, com 10 a 12 semanas de idade.

Este procedimento foi realizado no Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, em unidades isoladoras flexíveis possibilitando a preservação da integridade sanitária e genética dos modelos, técnicos e pesquisadores.

4.2.2.3 - Determinação da dose discriminatória.

Camundongos resistentes e susceptíveis, respectivamente das linhagens C57BL6/Uni e A/Uni, foram infectados (i.p.) com diferentes doses de *T. cruzi* ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4$ e 10^5 tripomastigotas) por animal. A determinação do número de parasitas circulantes foi realizada diariamente entre o 7º e o 14º dia após o inóculo, a partir de amostras de sangue, retiradas da cauda de cada animal, segundo o método descrito por Brener (1980). A parasitemia foi expressa em log (N+1) parasitas/mL.

A mortalidade destes animais foi observada por um período de 30 dias e os sobreviventes foram considerados resistentes.

4.2.2.4 – Obtenção de camundongos resistentes ao *T. cruzi*.

A seleção de animais, machos e fêmeas, resistentes à infecção experimental com o *T. cruzi*, foi realizada após a inoculação de 10^4 formas de tripomastigotas por animal, injetados intraperitonealmente.

A constatação da infecção foi feita no 8º dia após o inóculo e a mortalidade foi acompanhada diariamente por um mês.

Foram considerados resistentes os animais que apresentaram parasitemia no 8º dia e sobreviveram, por pelo menos 30 dias, após a inoculação com 10^4 tripomastigotas.

4.2.2.5 – Infecção das linhagens parentais isogênicas originais.

A partir da Colônia de Fundação, foram selecionados machos e fêmeas das linhagens C57BL6/Uni e A/Uni, em destaque na Tabela 1, as quais apresentam respectivamente o fenótipo resistente e susceptível após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. Estas linhagens foram utilizadas para o desafio com o parasita, como também foram acasaladas, programadamente, para a formação dos grupos experimentais.

A inoculação foi realizada em animais com 10 a 12 semanas de idade com a dose discriminatória de parasitas.

4.2.2.6 – Acasalamentos programados para a análise do determinismo genético da resistência após a infecção com o *T. cruzi*.

A análise genética dos animais, infectados com o *T. cruzi*, foi realizada por meio de acasalamentos programados entre as linhagens de fenótipo resistente e susceptível.

4.2.2.6.1 – Obtenção e infecção dos híbridos B6AF1.

Animais oriundos das linhagens resistente e susceptível foram acasalados para a obtenção de híbridos F1. Os casais foram constituídos de fêmeas da linhagem C57BL6/Uni e machos da linhagem A/Uni, mantidos em isoladores flexíveis. A progênie F1 obtida foi acompanhada até alcançarem a idade de 8 a 12 semanas, quando foram inoculadas com 10^2 , 10^3 e 10^4 formas de tripomastigotas por via i.p.

A constatação da infecção e a mortalidade seguiram, os mesmos procedimentos descritos nos itens 4.2.2.3 e 4.2.2.4.

4.2.2.6.2 – Obtenção e infecção dos recombinantes B6AF2.

Camundongos, machos e fêmeas F1, foram acasalados por *intercross*, e a população de animais F2 obtida, foi identificada individualmente antes da administração do inóculo.

Após alcançarem a idade de 10 a 12 semanas, estes animais, recombinantes de segunda geração B6AF2, foram inoculados (i.p.) com 10^4 formas de parasitas.

A constatação da infecção e a mortalidade seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.2.4.

4.2.2.6.3 – Infecção dos animais das linhagens recombinantes isogênicas (RIS) com *T. cruzi*.

As linhagens recombinantes isogênicas são formadas a partir do acasalamento consanguíneo por 20 ou mais gerações entre duas linhagens isogênicas parentais originais (Bailey, 1971).

As linhagens isogênicas recombinantes BXA1; BXA2; BXA4 e BXA7, derivadas de C57BL/6 e A/J, foram importadas, acasaladas e mantidas conforme descrito no item 4.1.2, para posterior inoculação com a cepa Y do parasita.

Amostras de animais de cada uma destas linhagens foram inoculadas com a dose de 10^4 parasitas por animal.

A infecção foi constatada no 8º dia e os sobreviventes a um período igual ou superior a 30 dias foram considerados resistentes.

4.2.3 – Varredura genética realizada no DNA dos animais recombinantes de segunda geração B6AF2 resistentes.

Para a identificação de regiões, do genoma dos camundongos, envolvidas com a resistência à cepa Y do *T. cruzi*, foram realizadas análises de frequência dos alelos transmitidos à progênie F2, por cada um dos parentais isogênicos originais de fenótipo resistente e susceptível. A avaliação do DNA foi conduzida por meio da observação de regiões de microssatélites presentes nestes animais.

Para tanto, os animais F2 que resistiram à inoculação da dose discriminatória de parasitas (item 4.2.2.4) foram sacrificados, e as amostras de DNA, obtidas conforme indicado nos itens 4.2.1.1.2.1 e 4.2.1.1.2.2.

A genotipagem foi efetuada pela PCR sendo empregados 199 marcadores apresentados na Tabela 5. Como controle foram utilizadas amostras de DNA oriundas das linhagens parentais C57BL/6/Uni e A/Uni.

TABELA 5: Relação de marcadores moleculares utilizados na análise do genoma dos animais recombinantes de segunda geração B6AF2. Os *primers* estão indicados por cromossomo.

Cromossomo 1

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D1MIT3	11	D1MIT415	52	Crp	94,2
D1MIT156	32,8	D1MIT14	81,6	D1MIT17	106,3
D1MIT7	41	D1MIT148	92,3		

Cromossomo 2

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D2MIT82	14,5	D2MIT380	39,8	D2MIT483	52,5
D2MIT244	31,9	D2MIT66	47	D2MIT309	71
D2DNS3	39,1	D2MIT66	47,6	D2MIT113	103

Cromossomo 3

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D3MIT21	19,2	D3MIT137	35,2	D3MIT17	71,8
D3MIT185	29,5	D3MIT49	41	D3MIT19	87,5
D3MIT22	33,7	D3MIT189	49,7		

Cromossomo 4

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D4MIT89	19,8	D4MIT203	50,6	D4MIT131	68,6
D4MIT15	42,6	D4MIT146	53,6	D4MIT189	71
D4MIT175	49,6	D4MIT37	56,5	D4MIT14	78,5

Cromossomo 5

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D5MIT13	20	D5MIT157	57	D5MIT99	80
D5MIT135	42	D5MIT188	64	D5MIT101	84
D5MIT87	33,9	D5MIT163	64,1	D5MIT409	84
D5MIT10	54	D5MIT321	72	D5MIT285	89

Cromossomo 6

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D6MIT8	25,8	D6MIT74	28,5	D6MIT254	57,1
D6MIT184	26,34	D6MIT8	35,20	D6MIT201	74

Cromossomo 7

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D7MIT178	0,5	D7MIT27	23	D7MIT66	57,5
IL.11	3	D7MIT82	25	D7MIT285	59
D7MIT190	2,5	D7MIT163	30,2	D7MIT255	60
D7MIT246	15	D7MIT38	38	D7MIT186	64
D7MIT309	16	D7MIT31	44	D7MIT332	65,6
D7MIT310	18	D7MIT301	46,5	D7MIT259	72,4
D7NDS5	19,1	D7MIT222	52,6		
Ngfg	22	D7MIT238	53		

Cromossomo 8

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D8MIT64	11,2	D8MIT69	31	D8MIT14	63,8
D8MIT4	14	D8MIT45	36,9	D8MIT280	72
D8MIT226	22	D8MIT113	52		

TABELA 5 : continuação ...**Cromossomo 9**

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D9MIT247	17	D9MIT10	42,5	D9MIT16	56
D9MIT27	29	D9MIT11	48	D9MIT18	64,2
D9MIT162	30	D9MIT212	55,3		

Cromossomo 10

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D10MIT83	4,4	D10MIT230	49	D10MIT180	64
D10MIT282	12	D10MIT10	49,5	D10MIT14	65
D10MIT106	17	D10MIT10	51		
D10MIT223	29,8	D10MIT134	59		

Cromossomo 11

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D11MIT162	8	D11MIT242	31	D11MIT263	57,1
D11MIT83	16	D11MIT164	32	D11MIT10	63
D11MIT135	17	D11MIT4	37	D11MIT258	65
D11MIT20	19,9	D11MIT41	49	D11MIT167	71
D11MIT20	20	D11MIT38	49	D11MIT48	77
D11MIT131	29	D11MIT179	52		

Cromossomo 12

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D12MIT46	12,3	D12MIT101	50	Igh	59
D12MIT52	32	D12MIT19	58	Igh-V	59

Cromossomo 13

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D13MIT3	10	D13MIT13	35	D13MIT77	73
D13MIT115	7	D13MIT76	41,4		
D13MIT88	21	D13MIT148	59		

Cromossomo 14

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
Plau	1	D14MIT113	25	D14MIT7	44
D14MIT207	5,5	D14MIT37	27,5	D14MIT228	47
D14MIT133	10	D14MIT102	28,5	D14MIT265	48
D14MIT214	19	D14MIT114	30	D14MIT165	52
D14MIT260	19,5				

Cromossomo 15

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D15MIT11	10,4	D15MIT71	46,7	D15MIT15	60,8
D15MIT111	18,8	D15MIT246	60,1		
D15MIT26	29	D15MIT217	57,8		

Cromossomo 16

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D16MIT130	4	D16MIT4	27,3		
D16MIT9	4,4	D16MIT5	38	D16MIT86	66
D16MIT34	12,3	D16MIT19	54		

TABELA 5 : continuação ...

Cromossomo 17

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D17MIT164	4,1	D17MIT233	20,9	D17MIT139	30,2
D17MIT57	7,6	D17MIT176	22,5	D17MIT254	34
D17MIT213	9,33	D17MIT66	24,5	D17MIT20	34,3
D17MIT55	12,6	D17MIT88	29,5	D17MIT142	42,9
D17MIT16	18,1				

Cromossomo 18

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D18MIT20	5	D18MIT58	22	D18MIT4	38,1
D18MIT111	7,8	D18MIT51	25,8	D18MIT9	42
D18MIT111	11	D18MIT51	26	D18MIT186	46
D18MIT120	15	D18MIT122	29	D18MIT210	47
D18MIT58	15,8	D18MIT53	33,3		

Cromossomo 19

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
D19MIT61	9	D19MIT40	25	D19MIT119	27,5
D19MIT61	10,3	D19MIT19	26	D19MIT70	51
D19MIT46	22,1	D19MIT100	27	D19MIT1	52

Cromossomo X

Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)	Primers	Posição (cM)
DXMIT54	2,2	DXMIT25	27,8	DXMIT149	45,7
DXMIT166	15,5	DXMIT64	45	DXMIT197	62

Um total de 199 *primers* foi utilizado para a análise do genoma dos animais F2 que resistiram à dose de 10^4 formas de tripomastigostas injetados i.p..

Esses marcadores permitem a observação de várias regiões do genoma dos animais.

4.2.4 - Análise da Frequência dos Marcadores Moleculares.

Cada um dos cromossomos das amostras de DNA, extraídas dos animais resistentes, foi investigado com os marcadores relacionados na Tabela 5, e as frequências de cada marcador em cada um dos grupos de animais foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ($p > 0,05$).

Inicialmente, a taxa de recombinação foi considerada no intervalo de 30 cM entre os marcadores, sendo posteriormente reinvestigada em intervalos menores, implicando na utilização de novos marcadores moleculares, de acordo com os dados obtidos.

4.2.5 – Análise Genética dos Animais Recombinantes Isogênicos (RIS).

As regiões do genoma, associadas à resistência, identificadas nos animais B6AF2 que sobreviveram, foram comparadas com a constituição genética de cada uma das linhagens recombinantes isogênicas adotadas.

A genotipagem destes animais, obtida com microssatélites polimórficos para as linhagens C57BL/6 e A/J, está disponibilizado na página do *Jackson Laboratory*, (<http://www.jax.org>).

4.2.6 – Desenvolvimento da linhagem recombinante congênica resistente AcB6.

Por definição, as linhagens recombinantes congênicas são formadas a partir do acasalamento entre duas linhagens isogênicas, seguido por poucos retro-acasalamentos dos híbridos com uma das linhagens parentais originais. A partir de então, empregam-se acasalamentos por *intercross*, para que a homozigose entre os vários alelos seja estabelecida (Demant & Hart, 1986).

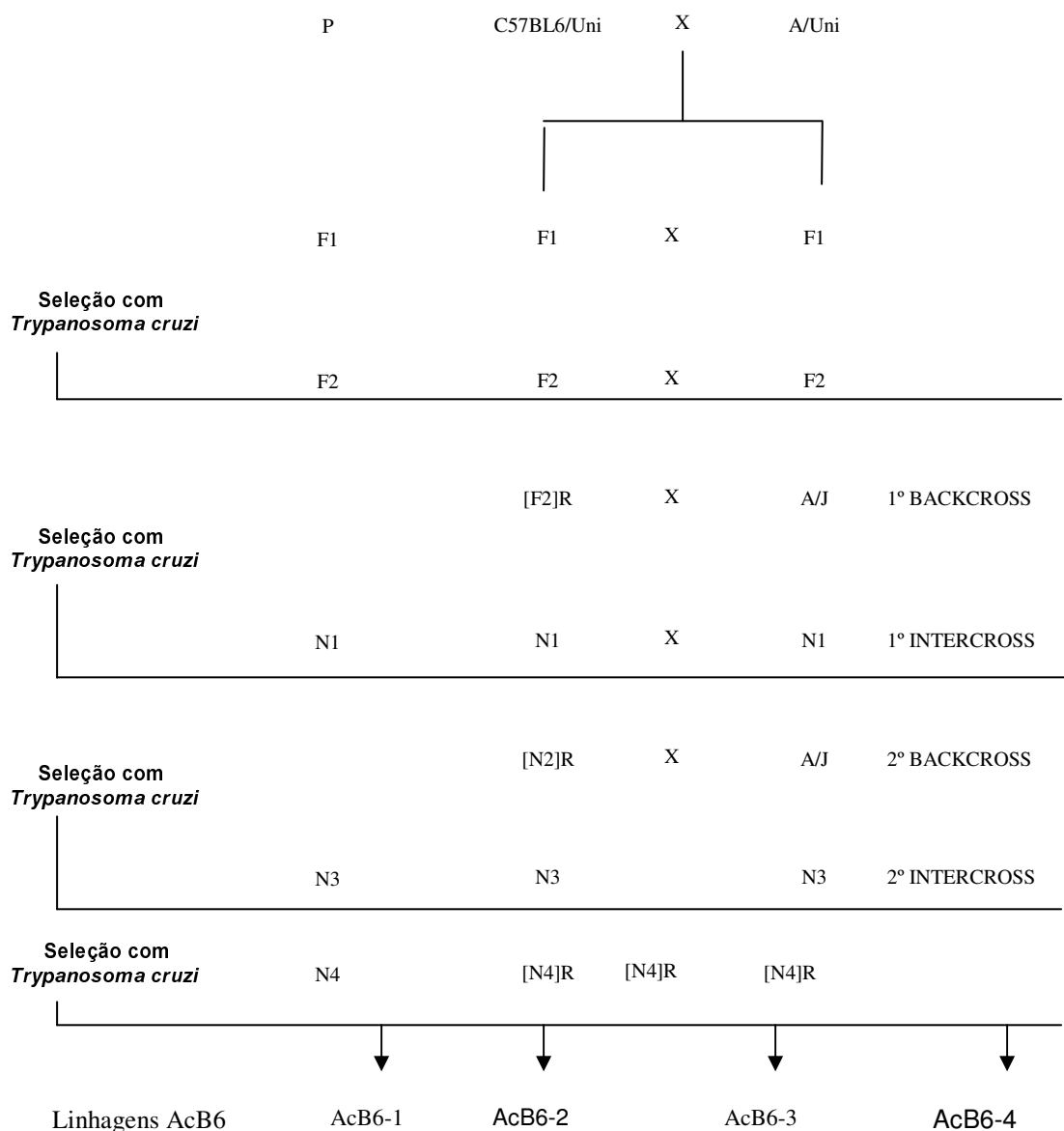
Com os resultados observados nos animais resistentes de segunda geração (B6AF2), iniciou-se um programa de acasalamento, para que as regiões, do genoma desses animais, relacionadas com a resistência à cepa Y de *T. cruzi*, fossem transferidas para a linhagem isogênica parental de fenótipo susceptível, conduzindo à formação de uma linhagem recombinante congênica resistente.

O protocolo utilizado para a produção deste novo modelo é o mesmo descrito por Demant & Hart (1986) para a produção de linhagens recombinantes congênicas, com poucas modificações.

Para a produção deste novo modelo, uma fêmea B6AF2 foi acasalada com um macho da linhagem A/Uni. Assim, a linhagem recombinante congênica resistente que está sendo desenvolvida deriva deste único casal.

Um resumo do esquema utilizado na produção deste novo modelo está apresentado na Figura 6.

FIGURA 6 – Esquema adotado no desenvolvimento da linhagem recombinante congênica resistente (AcB6).



A linhagem derivou de uma única fêmea B6AF2, que resistiu ao inóculo com a dose discriminatória de parasitas.

A participação do genoma da linhagem parental C57BL/6/Uni foi reduzida com o emprego de retro-acasalamentos.

O uso de *intercross* possibilitou o aumento no número de animais a cada geração, ampliando as chances na seleção com o parasita.

A seleção com 10^4 formas de *T. cruzi* foi utilizada desde a fêmea B6AF2 até a geração N4.

A distribuição dos animais resistentes (AcB6) em famílias foi a estratégia adotada para a preservação de mecanismos comuns e específicos a cada uma, no fenômeno da resistência.

As famílias AcB6-1; AcB6-2; AcB6-3 e AcB6-4 foram selecionadas após um ajuste na dose de parasitas para 10^3 formas. Estas famílias foram genotipadas para todos os cromossomos.

4.2.6.1 – Controle por mapa da linhagem recombinante congênica resistente AcB6.

Os animais portadores de algumas das regiões identificadas foram acasalados programadamente e os casais e seus descendentes foram registrados em mapas genéticos. Este procedimento permitiu o controle por geração de cada família em desenvolvimento. A partir desta metodologia estão sendo produzidos modelos para estudos de infecção com o *T. cruzi*, onde estão presentes todas as regiões envolvidas com a resistência, como também animais portadores de cada região em separado.

4.2.6.2 - Genotipagem das famílias recombinantes congênicas resistentes (AcB6).

Todos os cromossomos dos animais que resistiram à infecção com 10^3 formas de *T. cruzi*, foram investigados. Os *primers* que estão sendo utilizados são os mesmos indicados na Tabela 5. Estes marcadores são polimórficos para as regiões de microssatélites existentes nos animais isogênicos de fenótipo resistente e susceptível, servindo como marcadores moleculares dessas linhagens.

4.2.6.3 – Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais.

O teste foi realizado no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP (IMT-FMUSP/SP) e teve por objetivo determinar, por meio da técnica de ELISA *in situ*, a resistência à infecção de macrófagos peritoneais de animais resistentes e susceptíveis.

Por meio deste teste preliminar, foi possível investigar o novo modelo, com o propósito de avaliar o seu potencial como ferramenta para estudos de infecção com o *T. cruzi*. Foram utilizados 5 animais com 10 a 12 semanas de idade, de cada uma das linhagens, sendo empregadas, como controle, as linhagens isogênicas parentais C57BL/6/Uni e A/Uni.

Para a realização do ensaio, formas metacíclicas de cultura de *T. cruzi*, em LLCMK2, foram incubadas na proporção 1:1 com macrófagos peritoneais de

camundongos da linhagem recombinante congênica resistente (AcB6) e representantes das linhagens isogênicas originais, de fenótipo resistente e susceptível, na relação de 4×10^4 /poço, previamente semeados em placa de polietileno (96 poços) para cultura de células, diluídas em meio RPMI sem soro fetal bovino. As células foram ensaiadas em quadruplicata e em diferentes tempos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% tamponado, pH 7,2 por 10 minutos, permeabilizadas com metanol-acetona (1:1) por 30 segundos e a atividade de peroxidase endógena, bloqueada pela incubação com H_2O_2 a 1%, por 10 minutos. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente (25°C) em câmara úmida, com os anticorpos específicos anti-*T. cruzi* diluídos em PBST, produzidos em coelhos. Novas lavagens foram feitas com PBS e as células foram então incubadas com IgG de cabra anti-IgG de coelho, ligada à peroxidase sob as mesmas condições. A revelação foi feita pela adição de solução cromogênica por 10 minutos ao abrigo da luz, seguido de leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 492 nm. A concentração de células presentes no sistema foi monitorada pela coloração das mesmas com solução aquosa a 1% de cristal de violeta, com subsequente extração do corante com ácido acético glacial a 33%. A densidade óptica a 575 nm foi determinada em leitor de microplacas (Piazza et al., 1994).

4.2.6.4 – Histologia do tecido cardíaco

A metodologia foi desenvolvida segundo protocolos clássicos de histologia.

Resumidamente, o coração foi retirado e fixado por 6 a 8 h em formol a 10%, tamponado com Fosfato pH 7,2.

Uma vez fixado, o órgão foi incluído em parafina e, com um micrótomo, foram obtidos cortes com 6 µm de espessura.

Em seguida as lâminas foram coradas com HE (hematoxilina/eosina) e observadas em microscópio óptico (10X a 40X), para pesquisa de ninhos de

amastigotas no tecido do miocárdio. As imagens foram registradas por meio de câmara digital Pixera instalada em sistema Leica com óptica planacromática (FIG. 9).

4.2.6.5 – Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de Análise de Qui-quadrado (X^2) ao nível de 95% de significância ($p>0,05$).

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 – Monitoração Genética das Linhagens Isogênicas.

5.1.1 – Teste de histocompatibilidade

Os resultados obtidos com o transplante de pele orelha X dorso, realizado nos animais isogênicos de fenótipo resistente (C57BL/6/Uni) e susceptível (A/Uni), demonstraram não haver rejeição entre os indivíduos de mesma linhagem, tanto na fase aguda como no período de até 150 dias após a realização da técnica.

O procedimento técnico-cirúrgico foi adequado, uma vez que o auto-enxerto caracterizado pelo implante da orelha do animal em seu próprio dorso, evoluiu sem que fossem observados processos inflamatórios e rejeições.

5.2 – Testes de acasalamento

5.2.1– Análise dos F1.

Animais híbridos F1, derivados de acasalamentos programados, realizados entre as linhagens resistente (C57BL/6/Uni) e susceptível (A/Uni), apresentaram padrão de pelagem compatível com os indicados na literatura para estas linhagens. No Anexo 5 é apresentado um modelo de teste de acasalamento entre uma linhagem albina e DBA/2.

5.2.2 – Análise dos animais B6AF2.

Os testes de acasalamento, apresentados na Tabela 6, demonstram ausência de alterações no padrão de pigmentação que sugiram contaminação genética nas linhagens utilizadas. Na coluna correspondente ao “esperado” estão representadas as porcentagens encontradas na literatura para este tipo de acasalamento.

TABELA 6: Distribuição da cor de pelagem observada nos camundongos da segunda geração (C57BL/6/Uni x A/Uni) F2

Cor da Pelagem	Número de Animais	Observado (%)	Esperado (%)
Branco	196	24	25
Preto	447	55	56
Chocolate	164	20	19
Total	807	100	100

Animais de primeira geração F1 (C57BL/6/Uni x A/Uni) oriundos das linhagens isogênicas originais A/Uni e C57BL/6/Uni foram acasalados entre si e o produto F2 analisado quanto ao padrão de pelagem (ESAKI, 1984; HEDRICH, 1992).

Os resultados demonstram não haver contaminação genética entre estas linhagens, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre o observado e o esperado.

5.3 – Certificação genética com microssatélites.

As amostras de DNA extraídas por ambas as metodologias (itens 4.2.1.1.2.1 e 4.2.1.1.2.2), apresentaram-se sem alterações para o uso na reação da PCR.

O uso de um padrão de peso molecular, na análise dos produtos de PCR, permitiu descartar a presença de deformidades durante a eletroforese assegurando a qualidade da reação e dos resultados obtidos.

5.3.1 - Perfil fenotípico: Certificação de linhagens da colônia de fundação.

Camundongos das linhagens isogênicas das colônias de fundação (4.2.1.1), indicadas em destaque na tabela 1, foram retirados e investigados geneticamente conforme descrito no item 4.2.1.1.2.

A análise realizada com os marcadores, apresentados na Tabela 2, empregados na comparação direta com os padrões de DNA para as linhagens isogênicas, não revelou contaminações genéticas entre as linhagens fenotipicamente

similares, bem como com outras existentes no Cemib/Unicamp, indicadas na Tabela 2.

5.3.2 – Perfil amplo: Comparação entre as linhagens resistente e susceptível.

As linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni, de fenótipos resistente e susceptível respectivamente, foram comparadas entre si com o emprego dos marcadores indicados na Tabela 3.

Os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças no perfil eletroforético das amostras quando comparadas aos padrões de DNA, para estas linhagens, indicando que o polimorfismo está preservado, sendo possível a análise genética das progênes.

5.3.3 – Perfil específico: Análise da isogenia das linhagens parentais.

Conforme descrito em 4.2.1.1.2.3, além dos marcadores moleculares empregados na detecção de contaminação genética (TABs. 2 e 3), o grau de isogenia de cada uma das linhagens resistente e susceptível foi investigado.

Os resultados obtidos com os *primers* da Tabela 4 e que permitiram a investigação de 39 pontos aleatórios do genoma dos animais de ambas as linhagens, não revelaram regiões em heterozigose nas linhagens testadas. Estes resultados demonstram que o padrão isogênico está preservado, endossando a realização de acasalamentos programados com propósitos de investigação genética.

5.4 – Determinação da dose infectante de formas sangüícolas de *T. cruzi*.

Os testes realizados com diferentes doses de parasitas, inoculados por via intraperitonal, em animais provenientes das linhagens resistente (C57BL/6/Uni) e susceptível (A/Uni), permitiram identificar a dose infectante capaz de discriminar a população de animais resistentes e susceptíveis, sem o fenótipo intermediário.

Em função das doses empregadas, todos os animais inoculados foram investigados no intervalo compreendido entre o 5º e 14º dia após a infecção, com o propósito de se assegurar a presença do parasita.

O padrão de resultados encontrados em ambas as linhagens obedeceu ao esperado para animais isogênicos, onde os indivíduos, que sobreviveram mais que 30 dias, foram considerados resistentes.

A Tabela 7 resume os resultados encontrados com a administração de diferentes doses nas linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni.

TABELA 7 – Padrão de resistência observado com as linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni, após a inoculação de diferentes doses de parasita.

Linhagem	Dose	Resistente/Total Desafiado	% de Resistência
C57BL6/Uni	10 ³	15/15	100
	10 ⁴	24/30	80
	10 ⁵	20/30	66
A/Uni	10 ¹	1/20	5
	10 ²	0/20	0

A linhagem C57BL/6/Uni foi submetida a cargas parasitárias crescentes em função de sua maior resistência.

A linhagem A/Uni, por ser susceptível, recebeu a concentração máxima de 10² formas de *T. cruzi*.

O inóculo foi administrado por via intraperitoneal e o período mínimo de observação dos sobreviventes foi de 30 dias.

Os resultados encontrados confirmam a existência de uma diferença significativa entre as duas linhagens, frente à administração de diferentes doses do parasita. A inoculação de 10² formas de *T. cruzi* foi capaz de matar todos os indivíduos oriundos da linhagem susceptível e nenhum, da resistente. O valor do χ^2 para estes resultados foi significativo: $\chi^2 = 20$ com $p = 7,7 \times 10^{-6}$.

A dose correspondente a 10⁴ formas de tripomastigotas sangüícolas, quando administrada por via intraperitoneal, discrimina as duas populações, impossibilitando a ocorrência de um fenótipo intermediário de resistência.

5.5 – Infecção Experimental com *Trypanosoma cruzi*.

5.5.1 – Híbridos de primeira geração: animais B6AF1.

O primeiro grupo experimental foi formado com animais híbridos F1, derivados de acasalamentos realizados entre as linhagens C57BL6/Uni e A/Uni, respectivamente de fenótipo resistente e susceptível.

Os indivíduos deste grupo são idênticos quanto à sua composição genética, possibilitando um padrão homogêneo de resposta após a inoculação com o *T. cruzi*.

Após a administração da dose discriminatória de parasitas (10^4 formas sangüícolas), os animais do grupo foram examinados no 8º- 9º dias, quando a infecção foi confirmada.

Os resultados obtidos com este grupo experimental estão sumariados no Tabela 8.

TABELA 8 – Inoculação das linhagens susceptível, resistente e híbrida.

	Fenótipo	Carga Parasitária	Nº de Animais Inoculados	Nº de Resistentes	(%) Resistência	Sobrevida pós infecção
A/Uni	Susceptível	10^4	10	0	0	11 ± 2
C57BL6/Uni	Resistente	10^4	30	24	80	21 ± 4
B6AF1	Híbrido	10^4	22	20	91	19 ± 5
		10^5	25	22	88	$14 \pm 1,5$

Comparação entre os animais híbridos de primeira geração B6AF1 e a linhagem isogênica de fenótipo resistente após a inoculação com a dose discriminatória de *T. cruzi*.

Os dados encontrados neste grupo experimental revelam que, frente à dose discriminatória de parasita, o comportamento observado nos animais híbridos B6AF1 é similar ao observado na linhagem isogênica original de fenótipo resistente (C57BL/6/Uni) conforme pode ser observado com a análise estatística apresentada no Tabela 9.

A elevada sobrevivência dos indivíduos deste grupo demonstra que a resistência foi transmitida e o fenômeno é dominante.

TABELA 9: Análise por X^2 da linhagem resistente isogênica original e animais F1.

Linhagem	Total Inoculado	Vivos	Mortos
C57BL6/Uni	30	24	6
B6AF1	22	20	2
Total	52	44	8

$$X^2=1,16$$

$$P=0,282932$$

Comparação entre a linhagem isogênica resistente original e os animais híbridos F1 com a dose de 10^4 parasitas. Os valores de X^2 igual a 1,16 e $p=0,28293$ atestam a similaridade entre as duas populações.

Comparativamente, a análise por X^2 entre a linhagem isogênica de fenótipo susceptível, e os animais híbridos B6AF1, apresentada na Tabela 10, evidenciam a diferença entre ambas as populações. A diferença entre os fenótipos destas duas populações foi bastante significativa.

TABELA 10: Análise por X^2 da linhagem susceptível isogênica original e animais híbridos F1.

	Total Inoculado	Vivos	Mortos
A/uni	10	0	10
B6AF1	22	20	2
Total	32	20	12

$$X^2 = 24,24$$

$$P = 8,49 \times 10^{-7}$$

Comparação entre a linhagem isogênica original de fenótipo susceptível e os animais híbridos F1 com a dose de 10^4 parasitas. Os valores de X^2 igual a 24,24 e $p=8,49 \times 10^{-7}$, confirmam a significativa diferença entre as duas populações.

5.5.2 – Híbridos de segunda geração: animais B6AF2.

O grupo experimental composto de animais recombinantes de segunda geração B6AF2, produto do acasalamento consangüíneo realizado entre os animais híbridos B6AF1 (item 4.4.1), foi inoculado (i.p.) com a dose discriminatória de *T. cruzi*. No 14º dia pós inóculo os animais foram investigados, confirmando-se a infecção.

Os resultados obtidos neste grupo experimental estão sumariados na Tabela 11.

TABELA 11 - Animais Recombinantes de segunda geração B6aF2. Relação entre o número de animais inoculados e resistentes.

Linhage	Geraça	Dose	Animais	Vivos	Resistentes
B ₆ AF2	F2	10 ⁴	107	43	40
B ₆ AF2	F2	10 ⁴	87	41	47
Total			194	84	43

Os animais receberam a dose discriminatória (i.p.) de parasitas e foram acompanhados por 30 dias. Os sobreviventes foram identificados individualmente por meio de perfuração auricular.

A hipótese de um padrão de herança monogênica, para a resistência à infecção com a dose discriminatória de *T. cruzi*, foi investigada com o teste de χ^2 , e o resultado obtido está demonstrado na Tabela 12.

TABELA 12 - Análise por χ^2 do desvio do esperado para uma herança monogênica

Linhagem	Total Inoculado	Vivos	Mortos	
B6AF2	194	84	110	$\chi^2 = 40,34$
	194	145,5	48,5	$P = 2,13 \times 10^{-10}$
Total	388	229,5	158,5	

A partir dos acasalamentos realizados, com os animais híbridos F1, foram obtidos 194 animais recombinantes (F2) que foram inoculados. Destes, 84 animais resistiram a um período superior a 30 dias, correspondendo a 43% do total de animais infectados.

Um padrão de herança monogênica para o fenômeno da resistência, com uma frequência de 75% de um alelo dominante (esperado = 145 animais) e 25% recessivo (esperado = 48 animais), apresentou um significativo desvio quando analisado pelo teste do qui-quadrado: $\chi^2 = 40,34$ $p = 2,13 \times 10^{-10}$

O número encontrado de animais resistentes (n=84) aliado ao desvio da frequência para uma herança monogênica supondo uma distribuição 1 : 2 : 1, demonstra que a resistência depende de mais que um gene.

A sobrevivência observada com os animais recombinantes de segunda geração indicada na Tabela 11, quando comparada com os resultados referentes aos animais híbridos B6AF1 (TAB. 8), apresenta uma diferença altamente significativa no χ^2 demonstrando que o fenômeno é poligênico e os genes foram dissociados durante a obtenção dos animais recombinantes de segunda geração B6AF2. Estes resultados podem ser observados na Tabela 13.

TABELA 13- Comparação entre o número de sobreviventes dos grupos experimentais da geração híbrida F1 e recombinante F2.

Linhagem	Total Inoculado	Vivos	Mortos
B6AF2	194	84	110
B6AF1	22	20	2
Soma	216	104	112

$$\chi^2 = 17,94$$

$$p = 2,27 \times 10^{-5}$$

O elevado valor no χ^2 demonstra o caráter poligênico do fenômeno da resistência. A recombinação dos alelos originada a partir dos acasalamentos consangüíneos entre animais híbridos de primeira geração, conduziu à separação de genes associados presentes nas populações B6AF1 e B6AF2.

5.5.3 - Infecção dos animais das linhagens Recombinantes Isogênicas (RIS) (item 4.1.2) com *T. cruzi*.

Animais das linhagens Recombinantes Isogênicas BXA1, BXA2, BXA4 e BXA7 foram inoculados com a dose discriminatória de parasitas (10^4) e acompanhados pelo período de 30 dias. Conforme já descrito, no 14º dia após a administração do inóculo os animais foram investigados para a presença de *T. cruzi*, quando a infecção foi confirmada.

Foram identificados dois grupos de animais com comportamento diferente, quanto à sobrevivência após a inoculação do parasita. No primeiro grupo, formado pelas linhagens BXA1 e BXA7, cerca de 50% dos indivíduos que receberam a dose discriminatória de *T. cruzi* permaneceram vivos após 30 dias de infecção. Por outro

lado, apenas 20% dos animais das linhagens BXA2 e BXA4 que foram inoculados sobreviveram.

Os resultados encontrados com estas populações de alta e baixa sobrevivência estão sumariados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - Infecção experimental dos animais RIS (BXA1 e BXA7).

RIS	Grupo	Carga Parasitária	Nºde Animais Inoculados	Vivos	% Sobrevivência
BXA1	I	10 ⁴	26	14	54
BXA7		10 ⁴	29	12	42
Total			55	26	48

$\chi^2 = 0,85$
 $p = 0,35$

A infecção experimental com animais das quatro linhagens isogênicas recombinantes, derivadas de C57BL/6 (resistente) e A/J (susceptível), exacerbou a diferença entre elas. As linhagens BXA1 e BXA7 constituíram o grupo de maior sobrevivência (cerca de 50% dos animais infectados com a dose discriminatória).

Os resultados obtidos com o grupo de menor sobrevivência também demonstram não haver diferenças significativas entre as linhagens BXA2 e BXA4 quando comparadas entre si (TAB. 15).

TABELA 15 - Infecção experimental dos animais RIS (BXA2 e BXA4).

RIS	Grupo	Carga Parasitária	Nº de Animais Inoculados	Vivos	% Sobrevivência
BXA2	II	10 ⁴	29	7	24
BXA4		10 ⁴	39	7	18
Total			68	14	21

$\chi^2 = 0,39$
 $p = 0,53$

Após a infecção experimental com os animais das linhagens isogênicas recombinantes BXA2 e BXA4, foi observado um nível de resistência menor que as outras duas testadas. Neste grupo, a sobrevivência foi cerca de 20% e a semelhança entre as linhagens foi analisada por χ^2 .

A comparação entre os dois grupos de animais (I e II) revelou existir uma diferença significativa. Os resultados, considerando-se o número de animais que sobreviveram após o inóculo (n=26 resistentes no grupo I e n=14 resistentes no grupo II); ($X^2 = 9,87$ com $p = 0,001$), revelam um comportamento diferenciado entre as duas populações após a inoculação com a dose discriminatória do parasita.

Por outro lado, a comparação entre a sobrevivência encontrada com a população de animais recombinantes de segunda geração (B6A)F2 apresentada na Tabela 11 e as linhagens recombinantes isogênicas do grupo I (maior sobrevivência - Tabela 14), revelou semelhança entre os animais destes dois grupos que sobreviveram à dose discriminatória ($X^2 = 0,27$ com $p = 0,6$).

Estes dados confirmam a hipótese de que algumas regiões importantes para a resistência foram preservadas durante a obtenção das linhagens recombinantes isogênicas.

5.6 – Análise do determinismo genético com marcadores moleculares.

Os animais recombinantes de segunda geração B6AF2, que resistiram à infecção com a dose discriminatória de *T. cruzi*, foram sacrificados afim de que as amostras de DNA fossem extraídas.

As amostras foram examinadas com a reação de PCR, para os marcadores moleculares apresentados na Tabela 5.

Os resultados observados com o uso dos *primers* bem como a análise estatística podem ser observados na Tabela 16.

TABELA 16 – Principais regiões envolvidas com a resistência à dose discriminatória de *T. cruzi*.

Cromossomo	Marcador Molecular	Posição (cM)	X ²	p	Genes candidatos *
Crom. 7	D7Mit27	23	8,83	0,012088	
	D7Mit82	25	17,57	0,000152	IL-2; IL-3; IL-4; IL-18;
	D7Mit301	46,6	13,03	0,001481	TGFβ; Fas.
	D7Mit222	52,6	8,92	0,011556	
Crom. 11	D11Mit162	8	1,80	0,406569	IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-
	D11Mit83	16	26,82	1,49x10 ⁻⁶	12; IL13; TGFβ; TNFα
	D11Mit135	17	2,57	0,276840	
Crom. 14	D14Mit7	44	3,16	0,206403	IL-2; TGFβ
	D14Mit265	48	19,47	5,92x10 ⁻⁵	
Crom. 17	D17Mit16	18	0,89	0,640218	IL-2; TGFβ; TNFα; TNFβ;
	D17Mit176	22	11,41	0,003326	Fas; Tir1; Lmr1
	D17Mit66	24	0,38	0,829020	
Crom. 19	D19Mit40	25	2,79	0,248246	
	D19Mit19	26	18,43	9,96x10 ⁻⁵	Pdcd4; Tnfrs6; Jak2; Fas
	D19Mit100	27	6,4	0,040839	

* Genes importantes ou relacionados à resposta imune, selecionados do *Jackson Laboratory* (www.jax.org). Foram considerados os seguintes intervalos: **Crom. 7:** 20 a 62 cM; **Crom. 11:** 8 a 29 cM; **Crom. 14:** 40 a 50 cM; **Crom. 17:** 17 a 25 cM; **Crom. 19:** 22 a 28 cM.

Foram consideradas apenas as regiões que apresentaram um valor estatístico com X² superior a 10. A hipótese de um padrão de resistência dependente de várias regiões exigiu a adoção de um valor elevado de X² com o intuito de incrementar a relação entre elas (X² igual a 10 é associado a um valor de *Lod score* de 3 que equivale a um $p = 10^{-4}$).

A participação de múltiplos genes no fenômeno da resistência à cepa Y de *T. cruzi*, confirma os resultados encontrados nos demais grupos experimentais.

Os resultados observados na Tabela 16 demonstram que regiões presentes nos cromossomos 7, 11, 14, 17 e 19 estão fortemente associadas à resistência de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

5.7 - Comparação entre as regiões de desequilíbrio observadas nos animais recombinantes resistentes de segunda geração B6AF2 e as linhagens recombinantes isogênicas.

As regiões associadas ao fenômeno da resistência, observadas nos camundongos B6AF2 após a inoculação da dose discriminatória de *T. cruzi* (TAB. 16), foram comparadas com o genótipo das linhagens recombinantes isogênicas de maior (BXA1 e BXA7) e menor (BXA2 e BXA4) sobrevivência.

O genótipo de cada uma das linhagens recombinantes isogênicas foi obtido do *Jackson Laboratory*, no endereço <http://www.jax.org>.

Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 17.

TABELA 17 – Relação entre os marcadores identificados nos animais B6AF2 que resistiram ao *T. cruzi* e as linhagens recombinantes isogênicas resistentes e susceptíveis importadas do *Jackson Laboratory*.

Marcador Molecular	X ² (B6A)F2r	Posição	Linhagens Recombinantes Isogênicas			
			Grupo I		Grupo II	
			BXA1	BXA7	BXA4	BXA2
D7Nds5		23	B	B	A	A
D7Mit82	17,57	25	B	B	A	A
D7Mit145		26,4	B	B	A	A
D7Mit70		27,8	B	A	A	A
D7Mit301		46,6	B	A	A	A
D11Mit162		8	A	A	A	B
D11Mit83	26,82	16	A	A	A	
D14Mit7		44	B	A	B	B
D14Mit265	19,47	48	B	B	B	B
D14Mit166		52	B	B	B	B
D17Mit17		19	B	B	A	B
D17Mit176	11,41	22	B	B	A	B
D17Mit66		24	B	B	A	B
D19Mit40		25	B	A	A	A
D19Mit19	18,43	26	B	B	B	A
D19Mit47		29	B	A	B	A

Os resultados encontrados demonstram uma consistência em 4 das 5 regiões nas linhagens de maior resistência (BXA1 e BXA7); três na linhagem BXA2 e duas na BXA4. Estes dados reforçam a importância dessas regiões, inicialmente identificadas nos animais recombinantes de segunda geração B6AF2, e a resistência a 10^4 formas de *T. cruzi* injetados i.p.

5.8 – Desenvolvimento de um modelo murino recombinante congênico resistente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

A identificação das regiões envolvidas com a sobrevivência dos camundongos estimulou o desenvolvimento de um novo modelo animal para o estudo das relações parasita-hospedeiro, durante a infecção experimental o *T. cruzi*.

Esta nova linhagem foi denominada de AcB6 (Eppig & Guenter, 2003) e uma vez utilizada na infecção experimental com a cepa Y de *Trypanosoma* auxiliará na compreensão de alguns eventos biológicos relacionados à resistência.

Em função da metodologia utilizada na sua obtenção, estes animais apresentam um genótipo constituído de cerca de 80% a 90% da linhagem A/Uni de fenótipo susceptível. Entretanto, a administração de 10^3 formas de parasita injetados por via i.p., não mata todos os animais, permitindo uma seleção de indivíduos resistentes.

Estes indivíduos foram acasalados programadamente, formando famílias que estão sendo mapeadas e mantidas separadas. A genotipagem dos animais destas famílias que sobreviveram a um período superior a 30 dias está demonstrada na Tabela 18.

TABELA 18 – Genotipagem parcial dos animais da linhagem congênica (BcA) em desenvolvimento, que sobreviveram à infecção com o *T. cruzi*.

Marcador molecular	Posição (cM)	Família AcB6 0042			Família AcB6 0043			Família AcB6 0044			Família AcB6 0045		
		A	AB	B	A	AB	B	A	AB	B	A	AB	B
D10Mit230	49												
D10Mit180	64												
D11Mit167	71												
D13Mit115	7												
D13Mit3	10												
D13Mit88	21												
D13Mit13	35												
D14Mit207	5,5												
D14Mit133	10												
D14Mit113	25												
D14Mit37	21												
D14Mit114	30												
D14Mit7	44												
D14Mit228	47												
D14Mit265	48												
D14Mit165	52												
D17Mit142	42												
D18Mit111	8												
D18Mit58	16												
D19Mit100	27												

A genotipagem está sendo realizada em todo o genoma, porém, prioritariamente, estão sendo considerados os cromossomos que mostraram importância para a sobrevivência dos animais dos grupos anteriores. A separação em famílias permite que tanto os acasalamentos consanguíneos como os retro-acasalamentos com A/Uni, sejam realizados com menores possibilidades de erros. As famílias são mapeadas e cada animal é marcado individualmente. Os marcadores hachurados apresentam animais com genótipos AB e BB em todas as famílias.

Na Tabela 18, foram consideradas as regiões cujos marcadores foram heterozigotos (AB) ou homozigotos (BB) para o genótipo da linhagem isogênica original resistente (C57BL/6/Uni).

Os cromossomos 11, 14, 17 e 19 presentes em outros grupos experimentais também são encontrados nesta população. O cromossomo 7 foi perdido durante o desenvolvimento do modelo congênico resistente.

A análise de cada família, em separado, revela regiões cromossômicas próprias e também comuns a todas elas. Os cromossomos e marcadores que apresentam apenas os genótipos AB ou BB em cada família podem ser observados nas Tabelas (19a – 19d).

TABELA 19 A - Família 0042

Cromossomo	Marcador Molecular	Posição
Crom. 10	D10Mit230	49
Crom. 11	D11Mit167	71
Crom. 13	D13Mit115	7
	D13Mit3	10
	D13Mit13	35
Crom. 14	D14Mit113	25
	D14Mit37	21
	D14Mit114	30
	D14Mit7	44
	D14Mit228	47
	D14Mit265	48
Crom. 18	D18Mit11	8
	D18Mit58	16
Crom. 19	D19Mit100	27

TABELA 19 B - Família 0043

Cromossomo	Marcador Molecular	Posição
Crom. 13	D13Mit115	7
	D13Mit3	10
	D13Mit88	21
Crom. 14	D14Mit113	25
	D14Mit37	21
	D14Mit114	30
	D14Mit7	44
	D14Mit228	47
	D14Mit265	48
Crom. 17	D17Mit142	42
Crom. 18	D18Mit11	8
Crom. 19	D19Mit100	27

TABELA 19 C – Família 0044

Cromossomo	Marcador Molecular	Posição
Crom. 10	D10Mit230	49
	D10Mit180	64
Crom. 13	D13Mit115	7
	D13Mit3	10
	D13Mit88	21
Crom. 14	D14Mit207	5,5
	D14Mit133	10
	D14Mit113	25
	D14Mit37	21
Crom. 17	D17Mit142	42
Crom. 18	D18Mit11	8
	D18Mit58	16
Crom. 19	D19Mit100	27

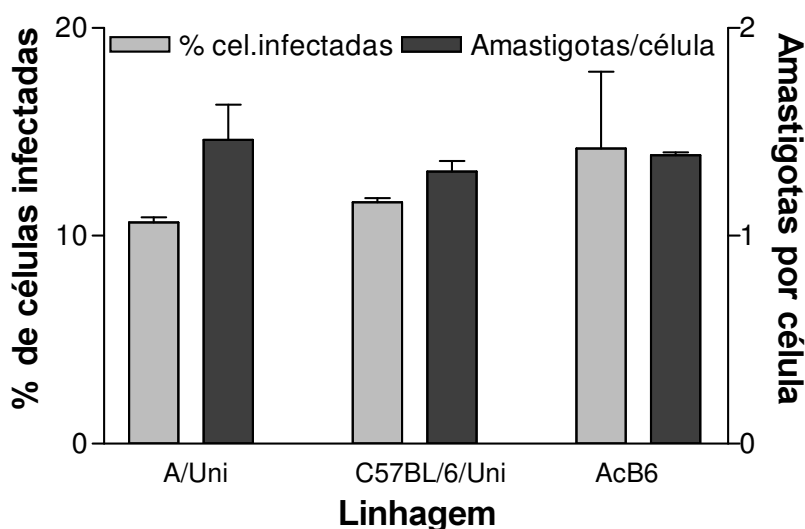
TABELA 19 D – Família 0045

Cromossomo	Marcador Molecular	Posição
Crom. 10	D10Mit230	49
Crom. 13	D13Mit115	7
	D13Mit3	10
Crom. 14	D14Mit207	5,5
	D14Mit133	10
	D14Mit113	25
	D14Mit37	21
	D14Mit114	30
	D14Mit228	47
	D14Mit265	48
	D14Mit165	52

5.8.1 – Teste de infecção com os animais recombinantes congênicos resistentes (AcB6).

Os macrófagos peritoneais das linhagens resistente (C57BL/6/Uni), susceptível (A/Uni) e dos congênicos resistentes (AcB6) foram processados e infectados pelo *T. cruzi* como descrito. Os resultados desta infecção podem ser observados na Figura 7. Imagens de campos representativos da infecção de cada uma das linhagens podem ser vistas na Figura 8.

FIGURA 7 - Infecção de macrófagos peritoneais oriundos das linhagens resistente, susceptível e dos congênicos resistentes (AcB6).

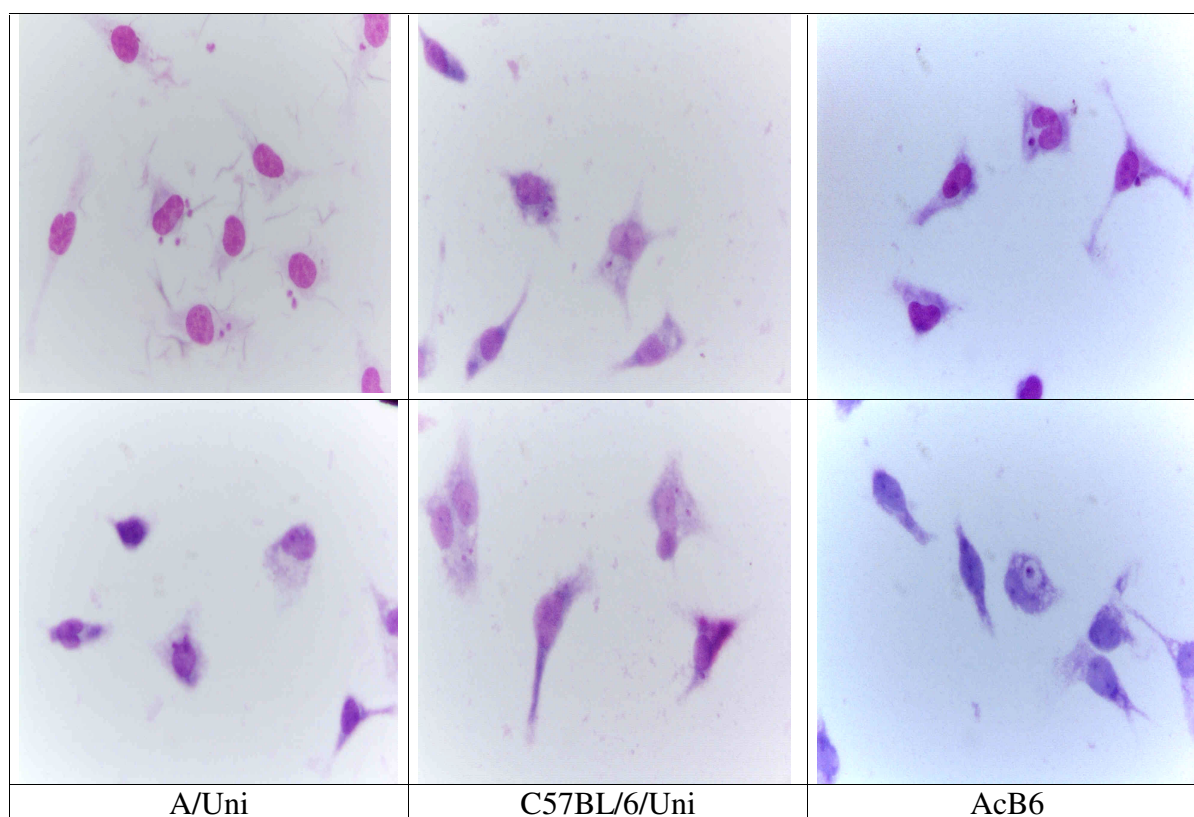


Infecção de macrófagos peritoneais obtidos de diferentes linhagens de camundongos. As barras representam erro padrão da média observada. Foram investigadas a porcentagem de células infectadas e a quantidade de parasitas em cada célula.

Os resultados obtidos demonstram não haver diferenças significativas entre as linhagens testadas, definindo que o parasita penetra igualmente nos três grupos de animais.

Esses dados demonstram não haver dependência de receptores de superfície celular específicos para a penetração do parasita, quer seja na linhagem de fenótipo resistente como na susceptível.

FIGURA 8 – Campos representativos da infecção dos macrófagos extraídos das linhagens resistente, susceptível e dos congênicos resistentes (AcB6).



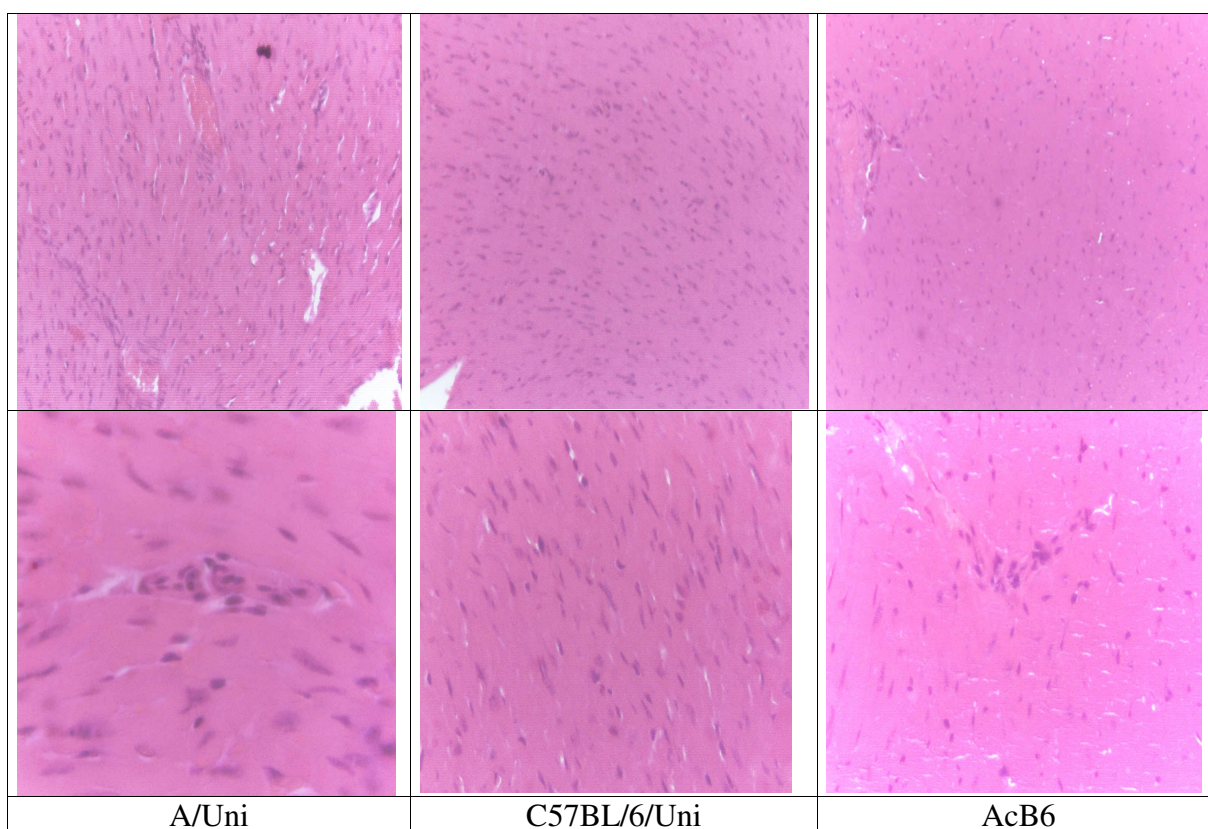
As imagens digitais da infecção de macrófagos peritoneais obtidos de diferentes linhagens de camundongos, foram realizadas após um período de 24hs de um desafio 2:1 com tripomastigotas da cepa Y de *T.cruzi*, obtidos de sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas.

5.8.2 - Histopatologia da infecção natural com a cepa Y de *T.cruzi*, realizada na linhagem de camundongos congênica resistente (AcB6).

Animais da linhagem congênica resistente (AcB6), infectados com o tripanosoma, foram investigados histologicamente na fase crônica. Os controles da

infecção foram as linhagens de fenótipo resistente (C57BL/6/Uni) e susceptível (A/Uni). O tecido de escolha para a validação do modelo foi o músculo cardíaco (FIG. 9).

FIGURA 9 - Histopatologia do coração de camundongos infectados com 10^3 formas de *T. cruzi*.



À esquerda imagens do tecido cardíaco oriundo da linhagem susceptível. Ao centro observamos o padrão obtido com animais da linhagem resistente e, a direita as imagens obtidas após a infecção dos animais Recombinantes Congênicos resistente.

Aumento superior obtido com objetiva 10x, inferior com 20x(C57BL/6/Uni e AcB6) e 40x(A/Uni). Documentado através de câmara digital Pixera instalada em sistema Leika, com óptica planacromática. Coloração HE, cortes de 6 μ m.

Como pode ser observado, a presença de cardite intensa, com infiltrados inflamatórios ao redor de fibras lesadas, ocorre somente na linhagem A/Uni, com maior preservação do tecido cardíaco nas demais linhagens testadas.

DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

Em função de sua importância, a Doença de Chagas figura entre quatro das principais doenças tropicais que integram um programa especial destinado a amenizar os problemas mundiais em Saúde Pública (Remme et al., 2002).

Há aproximadamente 30.000 anos, com a introdução dos humanos e sua proximidade aos animais, instalou-se o ciclo doméstico do *T. cruzi*. Posteriormente, roedores e morcegos estabeleceram a conexão entre estas duas vias de transmissão acentuando epidemiologicamente o problema, agravando-o do ponto de vista da saúde pública (Rassi et al., 2001; Macedo et al., 2002; Teixeira, 1987).

Assim, por tratar-se de uma infecção de história natural muito antiga, as relações parasita-hospedeiro apresentam-se extremamente complexas, envolvendo adaptações profundas de ambos os lados, interferindo no desenvolvimento da infecção (Andrade et al. 1985 e 2002; Aguillon et al., 2000; Andersson et al., 2003a e 2003b; Vera-Cruz, et al., 2003).

Nada em biologia faz sentido, a não ser à luz da evolução – Esse princípio formulado por Theodosius Dobzhansky, e as relações evolutivas das respostas imune inata e adaptativa, adquirem contornos claros para a Imunogenética, em especial quando estuda-se aspectos que envolvem as relações entre os microrganismos e imunidade. Os processos infecciosos são, provavelmente, a principal origem de pressão seletiva sobre a evolução do sistema imune com suas redes de células e moléculas que interagem no desenvolvimento de respostas aos agentes estranhos. E, vice-versa, a rede imunológica funcional exerce pressão seletiva sobre as características de virulência, infectividade e toxicidade dos microrganismos. Mais ainda, determinando a sobrevivência de microrganismos, bem como para cada segmento da resposta imune do hospedeiro, há uma gama de fatores resultantes da participação de componentes genéticos e ambientais. Portanto, a resposta imune é resultante da co-evolução, durante longos anos, tanto de vertebrados como de microrganismos, e inclui o estabelecimento de relações comensais e simbióticas constantes. As características genéticas, os mecanismos

operacionais, o complexo de efeitos pleiotrópicos do sistema imune serão afetados, em especial, pelas experiências prévias dos indivíduos com moléculas presentes em microrganismos, ou com moléculas administradas através de vacinações (Sant'Anna, comunicação pessoal).

Embora as doenças causadas por parasitas, muitas vezes não conduzam à morte imediata, podem comprometer, de maneira significativa, a saúde de indivíduos infectados, interferindo em sua qualidade de vida, na capacidade de trabalho e até mesmo em seu desenvolvimento pessoal (Coura & Castro, 2002; Kropf et al., 2003). No caso do mal de Chagas, o significativo aumento na compreensão científica da doença, observado nas últimas décadas, contribuiu sobremaneira no desenvolvimento de novos fármacos; de novas tecnologias para a pesquisa do parasita em pessoas suspeitas; na sistemática de triagem em bancos de sangue e em programas de saúde pública voltados para o atendimento dos doentes, com conseqüências no avanço da doença (Dias et al., 2002).

A extensa lista de publicações acerca do mal de Chagas demonstra que, após o primeiro contato com o parasita na fase aguda, ocorre a evolução para uma fase crônica com comprometimentos cardíacos, neurológicos e trato gastrointestinal, entretanto, permanecem desconhecidas as razões pelas quais pessoas portadoras do *T. cruzi* desenvolvem formas clínicas diferentes, onde 70% são assintomáticos ou apresentam forma indeterminada; 20% a 30% doença cardíaca e 8% a 10% moléstia digestiva (Cunha-Neto, 1999; Soares et al., 2001b). Investigações de casos clínicos, realizadas em pessoas com problemas de saúde, decorrentes da infecção Chagásica, demonstraram haver influência das constituições genéticas do parasita e do hospedeiro, no estabelecimento da doença e em sua gravidade (Girones & Fresno, 2003; Goldenberg & Krieger, 1997).

A despeito de existirem muitas informações, originadas a partir da investigação clínica em humanos, a maior parte dos conhecimentos acerca da doença de Chagas deriva dos ensaios realizados com modelos animais, sendo freqüente o uso de camundongos. Os resultados encontrados na literatura com estes animais demonstram que, também entre os murinos, a doença se manifesta de forma

diferente, em função das constituições genéticas do parasita, do hospedeiro (Moulia et al., 1996) e das relações entre ambos (Laucella et al., 1996a).

Por esta razão, estudos que busquem esclarecer a importância da constituição genética do parasita e do hospedeiro são plenamente justificados e para tanto, a investigação científica tem sido realizada utilizando modelos animais.

Assim, nas últimas décadas foram desenvolvidas mais de 1000 linhagens de camundongos, muitas delas com características únicas, sendo bem conhecida a necessidade de seu controle (Festing, 1982 e 1987; Hedrich, 1992 e 1983; Russel et al., 1993; Guénet & Bonhomme, 2003). Por outro lado, a criação de centros de referência capazes de mantê-las sob rígidos controles de ambiente e monitoradas do ponto de vista sanitário e genético passaram a ser imprescindíveis (Bleby, 1986; Festing, 1999)

Entretanto, se por um lado as linhagens de camundongo, quando padronizadas, atuam como ferramentas, capazes de simular as complexas interações entre órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionadas ao desenvolvimento da doença, experimentos realizados em animais contaminados são profundamente alterados, comprometendo a exatidão dos resultados, dificultando sua interpretação e tornando o animal inadequado como modelo experimental (Festing, 1982; Festing, 1999; Gubbels et al., 1985; Lovell et al., 1984; Andersson et al., 2003a e 2003b; Clarke & Hollstein, 2003; Fogo, 2003; Guarner et al., 2001).

Todavia, este fato é ainda mais importante quando os experimentos têm como objetivo, investigar fenômenos que sofrem influência da composição genética do indivíduo, como doenças degenerativas, mutações, hipertensão, diabetes tipo I e susceptibilidade ou a resistência a patógenos entre outras (Vyse & Todd, 1996; Dudley et al., 1995; Muraille et al., 2003; Potter et al., 1994; Prows & Horner, 2002; Rogner & Avner, 2003; Roberts et al., 1999; Morel et al., 1996; Kramnik et al., 1998; Di Marco et al., 2003).

Entretanto, dentre as múltiplas opções de animais a serem utilizadas, as linhagens isogênicas de camundongos são, em geral, a primeira escolha para o

desenvolvimento programas de investigação genética, uma vez que, por apresentarem uma homozigose em cerca de 99% dos alelos, respondem de forma homogênea oferecendo resultados universais e reprodutivos (Beck et al., 2000; Darvasi & Soller, 1995; Demant & Hart, 1986; Fortin et al., 2001a e 2001b).

Na Doença de Chagas experimental, o uso desta espécie demonstrou que existe um comportamento diferente entre as linhagens isogênicas de camundongos, após a inoculação com o *T. cruzi* (Corsini et al., 1980; Graefe et al., 2003; Wrightsman et al., 1982; Wrightsman et al., 1984; Wrightsman et al., 1995; Wrightsman et al., 2000; Trischmann et al., 1978; Trischmann & Bloom 1982; Trischmann, 1983, 1984a e 1984b).

Considerando-se que a genética do parasita vem sendo estudada por grande número de pesquisadores (Tibayrenc., 1995; Tibayrenc & Ayala 1999; Tibayrenc et al., 1986; Macedo & Pena, 1998; Macedo et al. 2002; Guhl et al. 2002; Devera et al. 2003; Brisse et al. 2003; Brisse et al. 2000; Borges et al. 2003; Barnabé et al. 2000), o presente trabalho aborda a constituição genética do hospedeiro, que é determinante no desenvolvimento da doença (Andersson et al. 2003a e 2003b; Andrade et al. 2002; Aguillon et al. 2000; Trischmann, 1983; Trischmann & Bloom 1982; Trischmann, 1986; Wrightsman et al. 1984; Wrightsman et al. 1982; WHO, 2003).

Com relação à importância da constituição do parasita, análises de diversidade morfológica mostram diferenças entre as linhagens. Atualmente as cepas são classificadas em dois subgrupos principais que apresentam diferenças no tropismo com reflexos sobre a morbidade da doença (Devera et al., 2003)

Dada esta diversidade, para a realização do presente trabalho, cuidou-se para que em todas as suas etapas, uma única cepa de *Trypanosoma* fosse utilizada.

No que diz respeito ao hospedeiro, dados coletados na literatura informam que algumas linhagens morrem ainda na fase aguda da doença e com baixas doses de parasitas injetados i. p., enquanto outras, controlam a infecção, passando para uma fase crônica com todos os indivíduos sobrevivendo (Trischmann, 1983; Pontes-de-Carvalho et al., 2002).

Desta forma, foi realizado um teste com linhagens do Cemib e os resultados encontrados confirmaram os dados da literatura de que, os animais das linhagens C57BL6/Uni e A/Uni comportam-se de maneira diferente na infecção com o *T. cruzi*, apresentando respectivamente os fenótipos resistente e susceptível (Corsini et al., 1980a e 1980b; Wrightsman et al., 1984).

Porém, estes dados somente são válidos se os animais utilizados, no ensaio experimental, forem geneticamente padronizados, de forma que os resultados encontrados possam ser comparados com a literatura (Kahan et al., 1982; Godard & Guénet, 1999; Festing, 1982; Festing, 1999; Beckman, 1992; Beck et al., 2000).

Por esta razão, os primeiros esforços, para a realização do presente trabalho, foram no sentido de assegurar a qualidade genética dos animais, certificando-os de forma a se descartar contaminantes de quaisquer gênese, que pudessem inviabilizar o seu uso. Os testes empregados são tradicionalmente utilizados em centros de referência que produzem animais certificados (Festing, 1987).

Uma vez que diferentes autores correlacionam a influência de genes presentes no cromossomo 17, à resistência ou susceptibilidade a patógenos, iniciou-se a análise por este cromossomo e, para tanto, foi observada a sua participação no reconhecimento de tecidos exógenos (Hedrich, 1983; Demant, 1980).

O método empregado foi o transplante de pele, um teste simples, porém bastante eficiente na detecção de alterações na constituição genética dos animais. Sua eficiência se baseia na expressão de genes existentes no complexo principal de histocompatibilidade (Medawar, 1958; Hedrich, 1992, Demant, 1980).

No período inicial de observação de 7 dias, os animais transplantados não apresentaram rejeição. Do mesmo modo, decorridos o mínimo de 200 dias, não foram observadas alterações no padrão de cor, tamanho da pele transplantada, tampouco inchaço ou manchas entre os indivíduos doadores e receptores. Paralelamente, o auto-enxerto utilizado como controle da técnica, apresentou “pega” normal, atestando que a mesma foi conduzida de forma apropriada.

Este conjunto de resultados demonstra que os tecidos transplantados foram aceitos, indicando que o sistema imune do receptor não foi capaz de reconhecer

diferenças significativas para a rejeição. Fundamentalmente a rejeição ocorre em dois momentos; por ocasião de uma infecção, ou pela ausência de compatibilidade entre os tecidos do doador e receptor. A observação dos animais deste grupo, não revelou quaisquer sinais sugestivos de infecção. Por outro lado, o aceite do tecido demonstra que, por esta metodologia, as linhagens testadas não apresentam contaminação genética.

Apesar da aparente simplicidade deste procedimento, outras informações, que não as diretamente associadas ao locus H2 podem ser obtidas, uma vez que, é esperada a influência de genes, ainda não identificados, na rejeição de tecidos, como parte de uma resposta imune que é poligênica, dependente de loci menores de histocompatibilidade e, portanto, bastante complexa (Festing, 1982; Hedrich, 1992).

A análise genética das linhagens empregadas neste trabalho seguiu as normas comumente utilizadas em Centros de excelência para a produção animal, onde heranças poligênicas como índices de produtividade, ganho de peso, tamanho médio da ninhada e cor da pelagem, entre outras, atuam como referencial, denunciando a ocorrência de contaminação genética (Lamoreux, 2000; Esaki, 1984).

Além destas informações, que são extraídas do acompanhamento diário das colônias, foi realizada a análise de um caráter poligênico baseado na cor da pelagem.

O teste de acasalamento para a observação da expressão de genes, relacionados à pigmentação, baseou-se na frequência da distribuição dos fenótipos entre indivíduos F1 e F2, auxiliando na detecção de deriva genética, uma vez que é freqüente a associação entre mudanças no padrão de pigmentação e mutação (Esaki, 1984; Hedrich, 1983).

Os resultados apresentados na Tabela 6 obtidos com a análise dos animais de segunda geração, derivados do acasalamento entre as linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni, não apresentam diferenças significativas entre as frequências observada e esperada, demonstrando que estas duas linhagens estão preservando suas características originais relacionadas aos alelos envolvidos com a cor da pelagem,

reforçando os dados obtidos previamente e que excluem uma contaminação ordinária entre estas linhagens.

Estes resultados são relevantes, uma vez que além de atestarem a ausência de contaminações nas linhagens utilizadas, denunciam ainda falhas técnicas de manipulação, que inviabilizariam a idéia de se obter um modelo recombinante congênico resistente à cepa Y do *T. cruzi* (Bleby, 1986).

Apesar da facilidade no uso e da eficiência destas metodologias, elas apresentam a desvantagem de necessitarem de um longo período de observação e de uma quantidade considerável de animais. Além disso, elas se baseiam na observação do produto da expressão de alguns genes e, por esta razão, apresentam uma limitação em sua sensibilidade. Tais desvantagens foram superadas, quando simultaneamente empregou-se a técnica da PCR para avaliar a qualidade genética dos animais (Love et al., 1990).

Desde então, esta metodologia e as regiões de microssatélite da molécula de DNA constituem importantes instrumentos para o mapeamento genético, estudo de doenças de fundo genético e para programas de controle de qualidade genética de animais de laboratório (Beckman, 1992; Kondo et al., 1993; MacCarthy et al., 1995; Serikawa et al., 1992).

As linhagens fenotipicamente iguais, oriundas da colônia de fundação, foram investigadas com os marcadores apresentados na Tabela 2. Os resultados obtidos demonstram que as linhagens oriundas desta colônia, e utilizadas para descongelamento, manutenção e repique dos parasitas, não apresentaram diferenças significativas quando foram comparadas com as amostras de DNA padrão.

Ainda com o uso dos microssatélites apresentados na Tabela 3, observou-se que o polimorfismo entre as linhagens C57BL/6/Uni e A/Uni, respectivamente de fenótipo resistente e susceptível à cepa Y do *T. cruzi*, está preservado. Estes resultados avalizam a realização de testes de infecção experimental com o parasita, uma vez que é possível identificar a participação de cada uma das linhagens parentais originais, nas progênies.

A confiabilidade do emprego destes animais foi reforçada com a observação de ausência de comprometimento, no grau de isogenia, das linhagens resistente e susceptível, observada com a utilização de um elevado número de *primers* (TAB. 4). Este procedimento amplia as chances de se observar alelos em heterozigose, que possam estar presentes em regiões do genoma dos animais de ambas as linhagens.

Todos os resultados de análise genética, obtidos com as metodologias empregadas, demonstram que as linhagens utilizadas não apresentavam diferenças quando comparadas com as amostras de DNA padrão, oriundas de centros de pesquisa da Europa.

A certificação destas linhagens excluiu a possibilidade de interpretações equivocadas ou inconclusivas, decorrentes de alterações na composição genética dos modelos utilizados, fato indispensável, quando se investiga a freqüência de alelos envolvidos com a resistência a patógenos (Graefe et al., 2003).

Porém, além da importância dos genótipos do parasita e do hospedeiro, faz-se necessário observar que, a sobrevivência dos animais varia também, em função da dose infectante. Por esta razão, diferentes inóculos foram testados, com o propósito de selecionar animais que sobreviviam exclusivamente às maiores doses administradas, variando-se de um inóculo constituído de 10^1 tripomastigotas, até 10^5 parasitas por animal, em ambas as linhagens.

Este procedimento possibilitou que uma população, altamente resistente a esta cepa de parasita, fosse isolada, excluindo-se indivíduos que apresentavam um fenótipo intermediário de resistência, bem como permitiu a identificação de uma dose discriminatória, definida como sendo a dose, onde ao menos 80% dos animais inoculados sobrevivem. Paralelamente, o fato de a resistência ser considerada apenas após um período, igual ou superior a 30 dias, foi importante para que a herança, responsável por este fenótipo, estivesse presente em todos os indivíduos que sobreviveram. O teste estatístico realizado neste experimento foi significativo, revelando um valor de $X^2 = 20$ com $p = 7,7 \times 10^{-6}$, enfatizando que a dose, correspondente a 10^4 formas de tripomastigotas, administrada por via intraperitoneal, discrimina as duas populações, sem a interferência de uma resistência intermediária,

possibilitando o acompanhamento do fenótipo nos descendentes de acasalamentos realizados entre estas duas linhagens.

Para determinar o comportamento frente ao *T. cruzi*, de uma progênie derivada dessas linhagens parentais isogênicas, foram realizados acasalamentos programados e os descendentes foram submetidos à dose discriminatória de 10^4 parasitas/animal. Esta população de híbridos de 1ª geração tem a característica de ser homogênea, possibilitando um padrão único de resposta, uma vez que cada metade de sua constituição genética corresponde aos parentais isogênicos resistente e susceptível (Beck et al., 2000; Festing, 1987).

Os resultados obtidos demonstram que a população de animais híbridos B6AF1, se comporta de maneira semelhante àquela observada com o parental isogênico de fenótipo resistente (C57BL6/Uni), com uma inferência estatística de X^2 igual a 1,16, equivalente a um $p=0,28293$, os quais atestam a similaridade entre as duas populações, corroborando os achados de Corsini et al. (1980a e 1980b) para experimentos de inoculação de híbridos F1, com esta cepa de parasita, e demonstrando que a resistência obedece a um padrão de herança de caráter dominante (Graefe et al., 2003).

A comparação estatística entre os animais híbridos de 1ª geração (B6AF1), e a linhagem parental isogênica de fenótipo susceptível (A/Uni) confirma estes achados. Após a administração de um inóculo com 10^4 formas de tripomastigotas, o valor de X^2 foi igual a 24,24 e $p=8,49E-07$, demonstrando existir uma diferença acentuada entre estas duas populações, indicando que o fenótipo resistente está sendo transmitido para a progênie. O período de observação superior a 30 dias, permite concluir que os mecanismos envolvidos com o controle da doença aguda estão preservados nos animais B6AF1, possibilitando a sua sobrevivência.

Paralelamente, estes resultados quando comparados aos achados de Graefe et al. (2003) permitem supor que, nas linhagens isogênicas, alelos recessivos podem ser responsáveis pela susceptibilidade murina ao *T. cruzi*.

Os animais híbridos de segunda geração (B6AF2), oriundos dos acasalamentos realizados na forma de *intercross*, entre indivíduos híbridos F1, quando

desafiados, com a dose discriminatória, mostraram que as regiões do genoma importantes para a sobrevivência, foram dissociadas, permitindo a análise do padrão de herança (Fortin et al., 2001a e 2001b).

A estratégia de se empregar acasalamentos programados entre linhagens isogênicas com fenótipos distintos já foi utilizada, em diferentes momentos, na investigação da resistência e susceptibilidade a patógenos (Mock et al., 1993 e 1994). O uso desta estratégia, consorciado a marcadores moleculares, permite a identificação no genoma dos animais, de regiões em desequilíbrio na frequência dos alelos oriundos de cada parental isogênico original (Moen et al. 1997; Prows & Horner, 2002; Iraqi et al. 2000).

Com este delineamento, foram identificados genes importantes para a resistência a diferentes agentes como o vírus murino de Theiler (vírus da encefalomielite murina) responsável pela esclerose múltipla em camundongos (Azoulay et al., 1994; Bureau et al., 1993; Bureau et al., 1992; Fitte et al., 1995); bactérias (Kramnik et al. 1998; Fortin et al., 2001a, Trezena et al. 2002) e protozoários (Anexo 6) como a *Leishmania*, *Plasmodium* e *T. congolense* (Stevenson & Lyanga, 1982; Fortin et al., 1997; Fortin et al., 2002; Fortin et al., 2001b; Roberts et al., 1997; Roberts et al, 1999; Kemp et al., 1997).

Entretanto, na investigação experimental, com o objetivo de analisar a resistência de camundongos, após a inoculação com a cepa Y do *T. cruzi*, este protocolo é inédito.

Uma avaliação inicial, considerando o número de animais que sobreviveram (43%), permite afirmar que, a resistência não obedece a um padrão de herança monogênico, uma vez que neste caso esperar-se-ia um total de 75% de sobrevivência, equivalentes a 145 animais do total inoculado. Estes dados corroboram os relatos de Wrightsman et al. (1982), que sugerem uma herança com múltiplos genes, influenciando a resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Brasil do *T. cruzi*. Apesar das diferentes cepas, o delineamento experimental realizado, até esta etapa do trabalho, é semelhante à desenvolvida por estes autores,

sugerindo que os achados com a cepa Brasil podem ser estendidos para outras linhagens do parasita.

A análise estatística realizada, comparando o número de sobreviventes obtidos com este grupo experimental, e o nível de resistência encontrado com os isogênicos originais C57BL/6/Uni, apresentou um valor de $X^2 = 40,34$ com $p = 2,13e-10$, sugerindo fortemente que, o fenômeno da resistência obedece a um padrão de herança poligênico e que, os alelos foram dissociados na produção dos animais híbridos F2, conforme resultados previamente indicados na literatura (Wrightsmann et al., 1982).

Entretanto, apesar de não haverem sido demonstrados formalmente em trabalhos anteriores, estes resultados não são surpreendentes. A existência de linhagens isogênicas, que apresentam um padrão intermediário de resistência sugere que os vários alelos, importantes para a sobrevivência dos animais, foram segregados e fixados de maneira diferente nestas linhagens, durante o processo de isogenia. Por outro lado, este gradiente de linhagens denuncia que, os mecanismos associados ao fenômeno da resistência são bastante complexos (Guénet & Bonhomme, 2003; Lipodová et al., 2000; Fortin et al., 2002).

No presente trabalho, a partir dos resultados encontrados com um *genome wide scan*, foram identificadas regiões importantes para a sobrevivência, presentes nos cromossomos 7, 11,14,17 e 19 com desequilíbrio na frequência esperada para alguns dos marcadores (TAB. 16) (Passos et al., 2002).

Para tanto, todos os cromossomos foram investigados pela técnica da PCR, inicialmente a uma distância de 30 cM, sendo posteriormente investigada em intervalos menores nas regiões em desequilíbrio, conforme descrito por Iraqi et al., (2000); Kemp et al., (1997); Clapcott et al. (2000).

Os resultados encontrados apontam para a existência de genes, com funções pertinentes a um mecanismo de resistência ao *T. cruzi*, localizados próximos às regiões marcadas com os *primers* *D7mit82*, *D7mit301*, *D11mit 83*, *D14mit265*, *D17mit176* e *D19mit19*.

Assim, com o intuito de averiguar se os cromossomos identificados, já foram descritos como importantes na resistência a patógenos, foi realizado um levantamento de genes candidatos na página do *Jackson Laboratory*.

A avaliação do cromossomo 7 demonstrou que, aparentemente, existe uma única correlação entre este cromossomo e a defesa contra patógenos, observada com o gene *Hamp*, que tem ação antimicrobiana e está situado na posição de 11cM, portanto, acima das regiões identificadas nos animais B6AF2, com os *primers* *D7mit82*, *D7mit301*. Entretanto, uma busca por possíveis candidatos, relacionados à resistência ao *T. cruzi*, demonstrou genes que exercem importantes funções imunológicas, distribuídos ao longo deste cromossomo. Atividades de proteólise; citocinas; proliferação de células T; resposta celular; loci menores de histocompatibilidade; auto-imunidade e apoptose são alguns dos exemplos de genes existentes neste cromossomo que, além de participarem da resposta imune, podem estar exercendo influência na Doença de Chagas experimental (Vidal et al., 1998; Theophilipoulos, 2002; Eksi et al., 1996; Havelkova, 1999; Roggero et al., 2002).

A investigação da presença de genes situados no cromossomo 11, que possam estar influenciando a sobrevivência dos camundongos B6AF2, não revelou qualquer alelo, já descrito, como participante de mecanismos de resistência a Tripanossomatídeos, que possa ser candidato a justificar os resultados encontrados na genotipagem destes animais. Entretanto, a existência de genes envolvidos com a atividade de citocinas próximo à região marcada com o *primer* *D11mit83* (16cM), não permite que seja descartada, uma associação entre esta região e genes que participam do mecanismo de resistência à cepa Y do *T. cruzi*. Por outro lado, Trezena et al (2002) identificaram duas regiões (17cM e 37cM) envolvidas com a produção de anticorpos contra antígenos somáticos de *S. typhimurium*.

A análise do cromossomo, como um todo, revela regiões que contêm genes cuja expressão influencia a resposta imune, com atividades de proteólise; citocinas; resposta celular e receptores para moléculas relacionadas ao fenômeno da morte celular programada ou apoptose (Hsu et al., 2002; Kobayashi, 1992; Yagami-Hiromasa, 1995; Schoenhaut et al., 1992; Deftos et al., 2000; Bouma et al., 2002).

A região candidata do cromossomo 14, identificada com os híbridos F2, é também sugestiva de participar no controle da infecção pelo *T. cruzi*, embora nenhuma regulação da resposta imune, tenha sido descrita nesta região. Este fato não é novo, uma vez que, já foram citadas na literatura, regiões cromossômicas envolvidas tanto com a resistência, como com a susceptibilidade a patógenos, sem quaisquer antecedência ou sugestão de participação de moléculas conhecidas do sistema imune (Graefe et al., 2003).

O cromossomo 17 possui o locus H2, fundamental por conter genes importantes para a resposta imune, como aqueles responsáveis pela apresentação de antígenos; envolvidos com a produção de citocinas; susceptibilidade de linhagens isogênicas a doenças auto-imunes ou para outros eventos imunológicos, importantes no controle da infecção causada por parasitas intracelulares, como a apoptose. Além disso, já se demonstrou o envolvimento deste cromossomo no determinismo genético murino da resistência à *Leishmania major*; no controle da infecção pelo *T. congolense* e no controle da formação de cistos, na infecção experimental com o *Toxoplasma gondii* (Roberts et al., 1997; Brown, 1995; McLeod et al., 1989; Kemp et al., 1997; Bolland., 2002 ; Yang, 1997; Lipodová et al., 2000, Lipodová et al., 2002).

A proximidade das regiões identificadas com os animais híbridos de segunda geração, entre o locus que confere a resistência à *L. major* neste cromossomo na posição de 23cM, e o marcador *D17mit176* com 22cM, sugere que, o gene *Lmr1* (*leishmaniasis resistance 1*) é candidato a também exercer influência na resistência ao *T. cruzi*, uma vez que, trata-se de duas espécies diferentes porém, que dividem o mesmo gênero.

A despeito destas considerações e dada a importância de regiões presentes neste cromossomo para a resposta imune, é também possível que, um novo gene ainda não identificado e mapeado, esteja ocupando uma posição diferente, situada pouco acima. Neste caso, sugere-se a inclusão do gene *tycr-1* (*Trypanosoma cruzi resistance 1*), como relacionado com a resistência à cepa Y do *T. cruzi*. Uma estratégia desenhada com modelos animais, programadamente acasalados para recombinarem nesta região, poderá contribuir na elucidação deste fato. Esta alternativa é aceitável e

se justifica, uma vez que já se conhecem, da literatura, resultados positivos, decorrentes desta estratégia. Kemp et al.(1997), utilizando acasalamentos entre animais das linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6, identificaram e relacionaram o alelo *Tir3*, localizado no cromossomo 1, como importante na resistência de camundongos à infecção com o *T. congolense*. Posteriormente, utilizando linhagens AIL (*Advanced Intercross Line*), estes autores identificaram outros três genes (*Tir3a*, *Tir3b*, e *Tir3c*) relacionados à resistência de camundongos na infecção com aquele parasita, que se distribuíam pelo mesmo cromossomo 1, nas posições de 59cM, 71cM e 93cM respectivamente, contribuindo com a expressão do gene *Tir3*, localizado na posição de 81,6 cM (Iraqi et al., 2000).

Não obstante estas considerações, o cromossomo 17 apresenta na posição de 18,2cM o gene *Tir1*, também relacionado à resistência ao *T. congolense*. Este fato reforça a necessidade de se investigar mais detalhadamente este cromossomo, com uma estratégia que permita individualizar estas regiões (Kemp et al., 1997).

O cromossomo 19 também demonstrou exercer influência na resistência à cepa Y do *T. cruzi*, na posição correspondente a 26cM, nos animais B6AF2 que sobreviveram. Uma busca por possíveis candidatos, já identificados nesta região, indicou a presença de 3 genes descritos, envolvidos com o fenômeno da morte celular programada, nas posições de 20cM (*Pdcd4*), 23cM (*Tnfrsf6*) e 24cM (*Jak2*) (www.jax.org). Na resposta imune, a apoptose é um importante processo na estratégia de defesa, participando da eliminação de células infectadas (Bogdan and Röllinghoff, 1999; Diefenbach et al., 1998) e o gene *Fas*, que ocupa a posição de 23cM, tem sido destacado devido a sua participação tanto na inflamação, quanto no fenômeno de apoptose (O'Connell, 2001). Além disso, os cromossomos identificados neste trabalho, com os animais recombinantes de segunda geração (B6AF2), apresentaram regiões com genes envolvidos na morte celular programada.

Por outro lado, além da análise mais cuidadosa das regiões identificadas, é igualmente importante, no esclarecimento da infecção chagásica derivada da cepa Y do *T. cruzi*, a produção de um novo modelo animal derivado de acasalamentos programados, uma vez que a resistência pode ser transmitida.

O desenvolvimento de estratégias que possibilitassem a investigação individual de genes, remonta ao princípio do século passado quando Little cria o primeiro modelo congênico para o locus H2 (Mobraaten & Sharp, 1999).

Mais tarde, uma outra sistemática para a produção deste tipo de modelo foi introduzida e, como consequência, um conjunto de linhagens congênicas, carregando diferentes genes H, foram produzidas, permitindo a análise individual desse locus, bem como a sua participação em fenômenos biológicos, de trato complexo, como o observado na infecção chagásica (Trischmann, 1986).

Posteriormente novas linhagens congênicas foram produzidas com o propósito de se estudar outras regiões do genoma dos animais, relacionadas à resistência a parasitas intracelulares (Potter et al., 1983).

Entretanto, estes camundongos apresentam a quase totalidade do genoma de uma linhagem isogênica, razão pela qual, somente são obtidos, com um marcador que permita acompanhar a herança codificada por um gene, não sendo eficientes em um estudo mais detalhado de doenças decorrentes de uma herança poligênica (Demant & Hart, 1986). Desta forma, outros modelos como as linhagens recombinantes isogênicas foram desenvolvidas e colaboraram para o aprofundamento na investigação de doenças multifatoriais como a hipertensão, câncer, diabetes e asma, entre outras, que dependem da combinação de fatores ambientais e genéticos. Assim, a análise genética de doenças com características fenotípicas complexas como estas, derivadas de um evento inicial de comportamento estocástico, somente pode ser realizada com modelos animais desenvolvidos para a investigação de doenças de trato complexo (Matesic et al., 1999).

Por esta razão, o uso de camundongos geneticamente modificados para o estudo de doenças humanas complexas, ampliou-se significativamente nos últimos anos, revolucionando a pesquisa biomédica e possibilitando a investigação genética da patogenia da doença, influenciando a intervenção terapêutica. Entretanto, para que o novo modelo atue como ferramenta, é fundamental que sejam considerados tanto o fenótipo, como a composição genética das linhagens empregadas em sua construção (Stassen et al., 1996).

Entre esses novos modelos, as linhagens recombinantes isogênicas (RIS), desempenham um papel importante no esclarecimento de heranças relacionadas a um trato genético complexo (Melvold, 1986),

Segundo Melvold (1986), as linhagens RIS são obtidas a partir de misturas ao acaso do genoma de duas linhagens isogênicas parentais, fixadas com o acasalamento entre dois indivíduos F1, na forma de *intercross*, por 20 gerações.

Como consequência, a série de linhagens recombinantes resultante portará os alelos de ambas as linhagens isogênicas originais, em homozigose, porém distribuídos de maneira diferente entre cada linhagem recombinante originada (Melvold, 1986).

Por meio deste modelo, foi possível estudar as bases genéticas relacionadas a vários eventos biológicos, como a resposta proliferativa diferencial de células do baço estimuladas com *lps* (Matesic et al., 1999) e a participação do cromossomo 11 no controle da infecção por *L. major* (Mock et al., 1993).

Atualmente, as linhagens RIS disponíveis estão genotipadas com centenas de marcadores e a composição de cada uma delas pode ser examinada, para a identificação daquelas que contêm as regiões de interesse, possibilitando avaliar a influência dessas regiões no fenótipo de indivíduos submetidos a testes de infecção experimental (Prows & Horner, 2002).

Neste trabalho, com o propósito de se comparar com outros modelos animais, os resultados obtidos com a população F2, linhagens recombinantes isogênicas BXA1, BXA2, BXA4 e BXA7 oriundos do *Jackson Laboratory* foram inoculadas com a dose discriminatória de parasitas.

Cumprе ressaltar, que a composição genética destes camundongos, deriva de uma combinação ao acaso entre os genomas das duas linhagens parentais originais de fenótipos claramente distintos para a resistência e susceptibilidade à cepa Y do *T. cruzi*. Por esta razão, a inoculação dos animais, com a dose discriminatória de parasita, é altamente seletiva, possibilitando uma correlação entre as regiões previamente identificadas como importantes para a resistência, e a sobrevivência dos animais.

Os resultados obtidos demonstram que, as linhagens recombinantes BXA1 e BXA7 que apresentam uma maior sobrevivência, têm uma correlação com 4 das 5 regiões previamente identificadas. Neste grupo, cerca de 50% dos indivíduos permaneceram vivos após 30 dias de infecção e a análise estatística, comparando estas duas linhagens, apresentou um valor de X^2 igual a 0,85 com $p = 0,35494$, demonstrando que o comportamento existente entre elas é similar e se deve a regiões do genoma preservadas durante o processo de obtenção destes modelos.

Por outro lado, um nível de resistência menor foi observado com os animais da linhagem BXA2 (23%) e BXA4 (18%). Esses resultados sugerem que esta discreta divergência decorre de uma provável dissociação diferenciada nos genes envolvidos com a sobrevivência dos animais, sugerindo o comprometimento de uma possível interação epistática entre eles, influenciando na capacidade desses camundongos controlarem o *T. cruzi*, à semelhança do que ocorre na infecção com outros patógenos (Roberts et al., 1999).

Paralelamente, nestas linhagens de menor sobrevivência, não se observa uma correspondência com os marcadores utilizados na análise do cromossomo 17. Apesar de não ser o único a determinar a sobrevivência dos animais, este cromossomo já foi relatado como importante na resistência de murinos a outras infecções causadas por parasitas intracelulares, como *L. major* e *P. chabaudi* (Roberts et al., 1999; Stevenson & Lyanga, 1982).

Os dados obtidos com os modelos recombinantes isogênicos, corroboram os achados da literatura, que indicam ser o controle da infecção pelo *T. cruzi*, dependente de múltiplos genes presentes no genoma dos animais que podem, à semelhança de outros patógenos, estar sob o efeito de interações epistáticas (Roberts et al., 1999), bem como confirmam os achados com os animais F2, os quais sugerem a influência dos cromossomos 7, 11,14,17 e 19 no fenômeno da resistência à cepa Y daquele parasita (Passos et al., 2002).

A despeito dos importantes resultados obtidos com o uso das linhagens recombinantes isogênicas na investigação de doenças de trato complexo, apenas com estes modelos, não é possível uma análise de todas as variáveis existentes em

mecanismos genéticos que apresentam um padrão poligênico, como a resistência e susceptibilidade a patógenos (Fortin, 2001a).

Esta constatação estimulou o desenvolvimento de um outro modelo animal, capaz de facilitar a análise da importância de genes, que influenciam tratos complexos em heranças de padrão poligênico. Por meio de linhagens recombinantes congênicas, o controle genético de uma doença complexa pode ser dissecado em seus componentes individuais (Moen et al., 1997).

Segundo Demant & Hart (1986), as linhagens congênicas recombinantes são formadas a partir de retro-acasalamentos entre híbridos F1 com uma das linhagens parentais isogênica originais, seguidas de cruzamentos consangüíneos por 20 gerações, sem o uso de seleção. Como consequência, cada linhagem formada será homozigota para alelos distribuídos ao acaso, oriundos de cada parental, sendo, porém diferente a proporção entre eles, em função do número de retro-acasalamentos realizados.

Com o uso de um *genome wide scan* e linhagens recombinantes congênicas, Kramnik et al. (1998) demonstraram que a susceptibilidade à tuberculose é um evento poligênico, e que estes modelos animais podem auxiliar na compreensão da interação entre os diferentes mecanismos que são ativados no curso de uma infecção.

Posteriormente, com um protocolo semelhante ao descrito por Demant & Hart (1986), Fortin et al (2001a) desenvolveram um conjunto constituído de trinta e sete linhagens recombinantes congênicas derivadas de A/J e C57BL/6. Com estes modelos, os autores identificaram no cromossomo 13, o gene *Lgn1* envolvido com a susceptibilidade de camundongos à infecção com *Legionella pneumophila*, demonstrando que estes camundongos são importantes ferramentas para estudos genéticos de heranças monogênicas e poligênicas de trato genético complexo (Fortin et al., 2001a e 2001b).

No presente trabalho foram produzidas algumas linhagens recombinantes congênicas, com base no protocolo descrito por Demant e Hart (1986), com algumas modificações.

O interesse em se observar o comportamento isolado de regiões do genoma, importantes para a sobrevivência, após a inoculação com a cepa Y do *T. cruzi*, conduziu ao desenvolvimento de um novo modelo animal com fenótipo resistente, apesar de sua composição genética ser predominantemente susceptível. Em função da seqüência de retro-acasalamentos entre uma fêmea F2 resistente, e um macho da linhagem susceptível, uma forte dissociação das regiões envolvidas com a sobrevivência foi observada. Como conseqüência, a obtenção de animais resistentes ao *T. cruzi* foi bastante dificultada, como é de se esperar, considerando-se que uma das aplicações das linhagens recombinantes congênicas é a investigação de genes não ligados influenciando um determinado fenótipo (Stassen et al., 1996; Moen et al., 1997).

O emprego de um único animal F2 resistente, para a produção da linhagem, apresenta a importante vantagem de selecionar exclusivamente os mecanismos determinantes para a resistência presentes neste animal. Além disso, a interpretação é facilitada quando se exclui a influência de mecanismos intermediários, não essenciais à sobrevivência das “famílias” originadas.

Por outro lado, a dissociação, após o segundo retro-acasalamento, dos genes não ligados, que participam do fenômeno da resistência, exigiu um ajuste na dose de parasita administrada, razão pela qual a sobrevivência nesta linhagem acontece somente com um inóculo com 10^3 tripomastigotas. Mesmo assim, estes resultados são bastante significativos porque este inóculo é 100 vezes superior àquele suportado pela linhagem isogênica original de fenótipo susceptível.

A investigação dos cromossomos, previamente identificados, demonstrou que alguns deles permanecem nestes animais reforçando a sua influência na resistência. Além disso, o protocolo realizado possibilitou que genes, não relacionados nos animais F2 em função de um rigor estatístico, mas que também participam da resistência porém “mascarados” por genes “mais fortes”, pudessem mostrar a sua importância, fato este esperado com o uso de linhagens recombinantes congênicas (Mock et al., 1993, Fortin et al., 2001a e 2001b).

Entretanto, isto somente foi possível devido à inserção do *T. cruzi* como fator de seleção, no desenvolvimento deste modelo, que se assemelha, em parte, ao que foi utilizado por (Fortin et al., 2001a) na identificação do gene Lgn1 no cromossomo 13 e na produção de uma linhagem congênica de camundongo, portadora de um intervalo genômico que foi introduzido de forma a possibilitar a investigação do Lupus Eritematoso Sistêmico (Morel et al., 1996).

É importante acrescentar que a ausência de uma correspondência integral entre os *primers* empregados nos animais F2 e estes congênicos, não implica na exclusão de genes situados próximos aos marcadores. É provável que uma análise destes cromossomos com novos *primers* esclareça este aspecto. Isto explicaria uma possível influência de algumas regiões do cromossomo 7, não detectadas com os marcadores empregados, na resistência destes animais. Todavia é razoável supor que estes eventos aconteçam nas diferentes famílias AcB6, uma vez que, mesmo programas sofisticados, utilizados no projeto genoma humano, para a contagem de genes, falham por não conseguirem “enxergar” todos os genes que compartilham a mesma posição de genes em um cromossomo.

Uma outra abordagem é a perda destas regiões observadas com a administração de altas doses do parasita. Esta hipótese traduz uma importante vantagem, posto que a re-inserção do cromossomo 7 nestes modelos congênicos recombinantes permitirá a análise da participação deste cromossomo no comportamento do camundongo frente à dose discriminatória original. Acrescenta-se a estas considerações, o fato destes animais ainda estarem em processo de isogenia.

Um outro aspecto a ser ressaltado é a importância destes animais como uma nova ferramenta. Assim, embora as tecnologias empregadas na produção de novos modelos como *knockouts* e transgênicos (Knight & Abbott, 2002, Niemann & Kues, 2000) sejam poderosas, o protocolo utilizado neste trabalho é o único capaz de permitir o desenvolvimento de um modelo como este, uma vez que são desconhecidas as seqüências de bases na composição destes genes, bem como o número de genes necessários à sobrevivência dos animais. Contudo, o mapeamento

detalhado destes animais recombinantes congênicos resistentes constituirá importante apoio ao uso de tecnologias de manipulação genômica para as mais diversas aplicações.

Uma outra possibilidade, além da re-introdução controlada de segmentos congênicos nestes animais, é o acasalamento programado entre indivíduos resistentes das diferentes famílias, recompondo gradualmente a resistência. Para tanto, dois protocolos estão sendo empregados e deverão contribuir. Primeiramente, o número de indivíduos resistentes em cada família, está sendo expandido, com o propósito de se investigar a participação das regiões envolvidas na resistência, por família. Um segundo enfoque, aborda um arranjo entre as regiões, identificadas em cada família, obtendo animais portadores de diferentes combinações destas regiões.

Com o propósito de fazer uma prospecção inicial acerca da validade deste modelo para estudos com o *T. cruzi*, foram realizados testes preliminares comparativos entre animais recombinantes congênicos resistentes e as linhagens originais de fenótipo resistente e susceptível.

O ensaio realizado com macrófagos peritoniais, oriundos das linhagens A/Uni, C57BL6/Uni e AcB6, não apresentou diferenças significativas na qualidade da infecção, uma vez que foram encontrados parasitas no interior das células de todas as linhagens. Esta baixa variabilidade no número de parasitas demonstra não haver dependência de receptores de superfície específicos para a penetração do parasita, independentemente da resistência ou susceptibilidade da linhagem.

Com base na revisão sobre a patogênese da Doença de Chagas realizada por Engman & Leon (2002), que relata o envolvimento das células musculares incluindo as cardíacas, como as mais afetadas, tecidos cardíacos, das linhagens utilizadas neste trabalho, foram submetidos à análise histológica e os resultados demonstraram comportamentos diferentes para cada linhagem.

Nas amostras oriundas de animais da linhagem susceptível, observou-se uma cardite intensa, com infiltrados inflamatórios ao redor de fibras lesadas, demonstrando um comprometimento do tecido (Soares et al., 2001a e 2001b).

A mesma análise, quando realizada para animais resistentes, demonstrou uma preservação do tecido cardíaco indicando que, nesta linhagem, a reação inflamatória é menos intensa.

As amostras de animais congênicos, quando comparadas às linhagens originais, apresentaram perfis similares àqueles observados na linhagem resistente (C57BL/6/Uni), indicando que os eventos biológicos, relacionados à sobrevivência, estão preservados, sugerindo um mecanismo comum de resposta.

Estes resultados corroboram os relatos de Graefe et al. (2003), que observaram que o infiltrado parasitário varia entre os animais susceptíveis, com uma distribuição tecidual diferenciada, sugerindo que o tropismo de uma dada linhagem de *T. cruzi* depende fortemente da constituição genética do hospedeiro.

Atualmente está disponível uma grande quantidade de linhagens “geneticamente definidas”, tais como isogênicas, congênicas, coisogênicas, recombinantes, híbridas, mutantes, *knockout* e transgênicas, entre outras, possibilitando a investigação de diferentes aspectos em doenças que acometem os seres humanos (Guénet, 1991 e 1995; Guenet & Bonhomme, 2003). Entretanto, na análise de doenças com características fenotípicas complexas, as dificuldades na identificação das relações entre genes presentes no genoma do hospedeiro, requereram o desenvolvimento de novos modelos animais derivados de acasalamentos programados como as linhagens AIL (*Advanced Intercross Lines*), RIS (*Recombinant Inbred Strain*) e RCS (*Recombinant Congenic Strain*), as quais atuam como ferramentas úteis na compreensão de eventos genéticos de expressão gênica variável (Darvasi & Soller, 1995; Bailey, 1971; Taylor, 1978; Demant & Hart, 1986; Stassen et al., 1996)

A importância do modelo, ora em desenvolvimento, é endossada pela analogia que guarda por exemplo com pesquisas do vulto do Projeto Genoma Humano, no que tange ao interesse em genes que influenciam doenças comuns multigênicamente controladas, uma vez que a homologia entre o genoma dos camundongos de laboratório e do homem é da ordem de 99%. Assim, a continuidade de um programa para o desenvolvimento de um modelo congênico, resistente à

infecção experimental com a cepa Y do *T. cruzi*, permitirá um maior entendimento nas relações parasita-hospedeiro nas diversas áreas de investigação científica, favorecendo o prognóstico, otimizando a terapia, aproximando-se de uma medicina personalizada muito importante no tratamento da Doença de Chagas (Lipoldová et al., 2002).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A realização de experimentos de infecção experimental, envolvendo as linhagens resistente e susceptível à cepa Y de *T. cruzi*, permite concluir que:

1. O fenômeno da resistência obedece a um padrão dominante e poligênico;
2. A resposta obtida com a inoculação dos animais RIS, com a cepa Y, não obedece a um padrão de herança monogênico;
3. Existe um comportamento diferenciado entre as linhagens C57 BL 6/Uni e A/Uni, no que diz respeito à infecção pela cepa Y de *T. cruzi*;
4. Os cromossomos 7, 11, 14 , 17 e 19 apresentam regiões importantes para a sobrevivência dos animais infectados com altas doses do parasita;
5. A segregação das regiões presentes nos cromossomos envolvidos com a resistência, à cepa Y, influencia a capacidade dos animais resistirem à dose discriminatória original;
6. O acasalamento programado permite o desenvolvimento de um modelo animal resistente;
7. O modelo congênico, em desenvolvimento, representa uma ferramenta valiosa para o estudo de fenômenos complexos como a resistência à Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILLON, J.C., HERMOSILLA, T., MOLINA, M.C., MORELLO, A., REPETTO, Y., ORN, A., FERREIRA, A. - *Trypanosoma cruzi*: H2 complex and genetic background influence on the humoral immune response against epimastigotes. **Int. J. Parasitol.** 30(9): 981- 4, 2000.
- ALVES, A.M., DE ALMEIDA, D.F. von KRULUGER, W.M. - Genomic variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. **Parasitol. Res.** 82(5): 410 – 415, 1996.
- ANDERSSON J., ÖRN, A., SUNNEMARK, D. - Chronic murine Chagas disease: the impact of host and parasite genotypes. **Immunology Letters** 86(2): 207-212, 2003a.
- ANDERSSON, J., ENGLUND, P., SUNNEMARK, D., DAHLSTEDT, A., WESTERBLAD, H., NENNESMO, I., ORN, A., LUNDBERG, I.E. - CBA/J mice infected with *Trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. **Muscle Nerve.** 27(4): 442 - 8, 2003b.
- ANDRADE, L.O., MACHADO, C.R., CHIARI, E., PENA, S.D. MARCELO, A.M. - *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp. Parasitol.** 100(4): 269 -75, 2002.
- ANDRADE, V., BARRAL-NETTO, M., ANDRADE, S.G. - Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. of Med. Biol. Res.** 18(4): 499 - 506, 1985.
- ANDREWS, N.W. - From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. of Med. Biol. Res.** 27: 471 - 475, 1994.
- ARAUJO, Z., HEREMANS, H., STORDEUR, P., WISSING, M., GOLDMAN, M., CASTES, M., CARLIER, Y. - IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 gene expression in BCG-Leishmania vaccination of *Trypanosoma cruzi* - infected mice. **Vaccine.** 18: 1822 -1829, 2000.
- AZOULAY, A., BRAHIC, M., BUREAU, J.F. - FVB Mice transgenic for the H-2D gene become resistant to persistent infection by Theiler's Virus. **J. Virol.** 4049-4052, 1994.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M., GOMES, J.A., ROCHA, M.O., MOREIRA, M.C., LEMOS, E.M., LUZ, Z.M., PEREIRA, M.E., COFFMAN, R.L., DIAS, J.C., CANÇADO,

- J.R., GAZINELLI, G., CORRÊA-OLIVEIRA, R. - IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz. J. of Med. and Biol. Res.** 31(1): 127 - 131, 1998.
- BAILEY, D.W. - Recombinant inbred strains, an aid to finding, identify linkage and function of histocompatibility and other genes. **Transplantation.** 11: 325 - 327, 1971.
- BAILEY, D.W. - Recombinant inbred strains and bilineal congenic strains. **The Mouse in Biom. Res.** 1: 223 - 239, 1981.
- BARNABÉ, C., BRISSE, S., TIBAYRENC, M. - Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. **Parasitology.** 120(5): 513 - 526, 2000.
- BECK, J.A., LLOYD, S., HAFEZPARASAT, M., LENNON-PIERCE, M., EPPIG, J.T., FESTING, F.W. FISCHER, M.C. - Genealogies of inbred strains. **Nature Genetics.** 24: 23 - 25, 2000.
- BECKMAN, J.S. - Rat gene mapping using PCR - analyzed micro satellites. **Genetics.** 131: 701-721, 1992.
- BIOZZI, G., MOUTON, D., SANT'ANNA, O.A, PASSOS, H.C, GENNARI, M., REIS, M.H., FERREIRA, V.C., HEUMANN, A.M., BOUTHILLIER, Y., IBANEZ, O.M., STIFFEL, C., SIQUEIRA, M. - Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Current Topics in Microbiology and Immunology.** 85: 31 - 98, 1979.
- BLEBY, J. - The training of laboratory animal specialists. IN: ROTCHILD, H. (ED.). **Regional / International Scientific Meeting. Laboratory Animal Science: Laboratory Animal Studies in the quest of Health and knowledge.** Proceedings. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1986, p.86 - 93.
- BOGDAN, C., RÖLLINGHOFF, M. - How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages? **Parasitology Today.** 15(1): 22 -28, 1999.
- BOLLAND, S. - Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in Fc gamma RIIB(-/-) mice **J. Exp Med.** 195 (9): 1167 -74, 2002.
- BORGES, M., DA SILVA, A. C., SERENO, D., OUAISSI, A. - Peptide-based analysis of the amino acid sequence important to the immunoregulatory function of *Trypanosoma cruzi* Tc52 virulence factor. **Immunology.** 109(1): 147 - 55, 2003.

- BOUMA, G., KAUSHIVA, A., STROBER, W. - Experimental colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses. **Gastroenterology**. 123(2): 554 - 65, 2002.
- BRENER, Z. - Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.** 18: 247 – 291, 1980.
- BRISSE, S., DUJARDIN, J-C., TIBAYRENC, M. - Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 111(1): 95 -105, 2000.
- BRISSE, S., HENRIKSSON, J., BARNABÉ, C., DOUZERY, E.J., BERKVEN, D., SERRANO, M., DE CARVALHO, M.R., BUCK, G.A., DUJARDIN, J.C., TIBAYRENC, M. - Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* base on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infect Genet Evol.** 2(3): 173 - 83, 2003.
- BRITTO, C., CARDOSO, M.A., RAVEL, C., SANTORO, A., PEREIRA, J.B., COURA, J.R., MOREL, C.M., WINCKER P. - *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. **Exp. Parasitol.** 81(4): 462 – 471, 1995.
- BROWN, C.R. - Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. **Immunology**. 85: 419 - 428, 1995.
- BUREAU, J.F., MONTAGUTELLI, X., BIHL, F., LEFEVRE, S., GUÉNET, J-L., BRAHIC, M. - Mapping loci influencing the persistence of Theiler's virus in the murine central nervous system. **Nat. Gen.** 5: 87-91, 1993.
- BUREAU, J.F., MONTAGUTELLI, X., LEFEVRE, S., GUÉNET, J-L., PLA, M., BRAHIC, M. - The interaction of two groups of murine genes determines the persistence of Theiler's virus in the central nervous system. **J. Virol.** 66: 4698 - 4704, 1992.
- CLAPCOTT, S.J., TEALE, A.J., KEMP, S.J. - Evidence for genome imprinting of the major QTL controlling susceptibility to Trypanosomiasis in mice. **Parasite Immunol.** 22(5): 259 - 63, 2000.
- CLARKE, A.R., HOLLSTEIN, M. - Mouse models with modified p53 sequences to study cancer and aging. **Cell Death Differ.** 10(4): 443 - 50, 2003.

- CORSINI, A.C., COSTA, M.G., OLIVEIRA, O.L., CAMARGO, I.J., STELINI, A., JR. - Susceptibility of inbred strain mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 22(4): 192 - 6, 1980a.
- CORSINI, A.C., OLIVEIRA, O.L., COSTA, M.G. - Unimpaired delayed type hypersensitivity reactions in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Z Parasite nkd**. 61(2):179 – 85, 1980b.
- COURA, J.R., DE CASTRO, S.L.A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 97(1): 3 – 24, 2002.
- COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C.V., FERNANDES, O., VALENTE, S.A.S., MILES M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **TRENDS in Parasitology**. 18(4):171-176, 2002.
- CUNHA-NETO, E. Novos conhecimentos na patogênese da doença de Chagas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 2(9):19-22, 1999.
- DARVASI, A., SOLLER, M. Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. **Genetics**. 141: 1199-1207, 1995.
- DEFTOS, M.L., HUANG, E., OJALA, E.W., FORBUSH, K.A., BEVAN, M.J. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. **Immunity**. 13(1):73-84, 2000.
- DEMANT, P. Histocompatibility genes and their use in genetic control of laboratory mice. **IN: A. Spiegel, S. Erichsen and a sollereld (eds). Animal quality and models in biomedical research**. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 298 – 306, 1980.
- DEMANT, P., HART, A.A.M. Recombinant congenic strains - a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. **Immunogenetics**. 24: 416-422, 1986.
- DEVERA, R., FERNANDES, O.F., COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 98(1):1-12, 2003.
- DIAS, J.C.P., SILVEIRA, A.C., SCHOFIELD, C.J. -The impact of Chagas disease control in Latin América. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 97(5):603-612, 2002.
- DIEFENBACH, A., SCHINDLER, H., DONHAUSER, N., LORENZ, E., LASKAY, T., MACMICKING, J., ROLLINGHOFF, M., GRESSER, I., BOGDAN, C. – Type

- 1 interferon (IFN- α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**. 8(1):77-87, 1998.
- DI MARCO, S., MOISAN, J., MARIE-LINDA, B., SKAMENE, E., RADZIOCH, D. Recombinant congenic strains of mice: a new tool for the genetic dissection of efficacy and toxicity of adjuvant. **Vaccine**. 21(9):832-835, 2003.
- DUDLEY, M.E., SUNDBERG, J.P. & ROOPENIAN, D.C. Motif-primed polymerase chain reaction-based allelotype of sarcomas induced by 3-methylcholanthrene in interspecific hybrid mice. **Oncogene**. 11: 517-524, 1995.
- ENGMAN, D.M., LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Tropica**. 81(2):123-132, 2002.
- EKSI, S., WASSON, D.L., POWELL, M.R.-Host genetics and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice: profiles and compartmentalization of IL-12, -4, -5, -10, and IFN-gamma-producing cells. **J. Parasitol**. 82(1):59-65, 1996.
- EPPIG, T.J. & GUENTER, E. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Rules for Nomenclature of Mouse and rat Strains. 2003.
- ESAKI, K. Qualitative characters in genetic monitoring **IN: ICLAS manual for genetic monitoring of inbred mice**. Edited by: Tatsuyi Nomura, Kozabuno Esaki, Takeshi Tomita. University of Tokyo Press, 1984.
- FESTING, M.F.W. Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem. **Ilar News**. 25: 6-10, 1982.
- FESTING, M.F.W. Introduction to laboratory animal genetics **IN: The UFAW Handbook on the care & management of laboratory animals**; Ed. Trevor B. Poole; Sixth Edition, 5: 58-84, 1987.
- FESTING, M.F.W. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. **Neurobiol Aging**. 20(2):237-44, 1999.
- FITTE, L., AUBERT, C., MULLER, U., HUANG, S., AGUET, M., BRAHIC, M., BUREAU, J.F.-Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon or interferon receptors. **J. Exp. Med**. 81: 2069-2076, 1995.
- FOGO, A.B. Animal models of FSGS: Lessons for pathogenesis and treatment. **Semin Nephrol**. 23(2):161-71, 2003.

- FOOT, S.J., BURT, R.A., BALDWIN, T.M., PRESENTE, A., ROBERTS A.W., LAURAL Y.L., LEW A.M., MARSHALL, V.M. Mouse loci for malaria-induced mortality and the control of parasitaemia. **Nature Genetics**. 17: 380-381, 1997.
- FORTIN, A., BELOUCHI, A., TAM, M.F., CARDON, L., SKAMENE, E., STEVENSON, M.M., GROS, P.-Genetic control of blood parasitaemia in mouse malaria maps to chromosome 8. **Nature Genetics** 17: 382-383, 1997.
- FORTIN, A., DIEZ, E., ROCHEFORT, D., LAROCHE, L., MALO, D., ROULEAU, G.A., GROS, P., SKAMENE, E. Recombinant Congenic Strains Derived from A/J and C57BL/6J: A Tool for Genetic Dissection of Complex Traits. **Genomics**. 74: (1) 21-35, 2001a.
- FORTIN, A., CARDON, L.R., MIFONG, T., SKAMENE, E., STEVENSON, M.M., GROS, P. Identification of a new malaria susceptibility locus (char4) in recombinant congenic strain of mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 98(19):10793-10798, 2001 b.
- FORTIN, A., STEVENSON, M.M., GROS, P. Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice. **Genes and Immunology**. 3: 177-186, 2002.
- GIRONES, N., FRESNO M.-Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology**. 19(1):19-22, 2003.
- GODARD, A.L.B., GUÉNET, J-L.-Genética de camundongos: modelos animais de doenças humanas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 2(9):96-100, 1999.
- GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A.-Doença de Chagas: Novas perspectivas no diagnóstico imunológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 1(1):26-27, 1997.
- GRAEFE, S.E.B., MEYER, B.S., MULLER-MYHSOK, B., RÜSCHENDORF, F., DROSTEN, C., LAUE, T., STEEG, N"RNBERG, P., FLEISCHER, B.-Murine susceptibility to Chagas' disease maps to chromosomes 5 and 17. **Genes and Immunity**. 4: 321-325, 2003.
- GUARNER, J., BARTLETT, J. ZAKI, S.R., COLLEY, D.G., GRIJALVA, M.J., POWELL, M.R. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(2):152-8, 2001.
- GUBBELS, E., POORT-KEESON, R., HILGERS, J.-Genetically contaminated BALB/c nude mice. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 122: 86-88, 1985.

GUÉNET, J-L.-La cartographie des gènes chez la souris. **Annales de l'Institut Pasteur** 3: 205-227, 1991.

GUÉNET, J-L.-Animal models of human genetic disease. **IN: Gene Target**. Edited by M.A vega, 149-166, 1995.

GUÉNET, J-L., BONHOMME, F. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. **TRENDS in Genetics**.19(1):24-31, 2003.

GUHL, F., JARAMILLO, C., CARRANZA, J.C., VALLEJO, G.A.-Molecular Characterization and Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Archives of Medical Research**. 33(4):362-370, 2002.

GWATKIN, D.R., GUILLOT, M.-The Burden of Disease Among the Global Poor. The World Bank, Washington, USA. 2000.

_____ <http://martin.parasitology.mcgill.ca/incidence.htm>

_____ <http://www.jax.org>

_____ <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/chagas.html>

HAVELKOVA, H. T-cell proliferative response is controlled by loci Tria4 and Tria5 on mouse chromosomes 7 and 9. **Mamm Genome**. 10(7):670-4, 1999.

HEDRICH, H.J. Overview of the state of the art in genetic monitoring. **IN: Melby, E. C. and Balk, M. W. (ed): The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biomedical research**. Academic Press, Inc. (London), 1983.

HEDRICH, H.J.-Genetic monitoring of inbred strains of rats. Gustav Fischer Verlag. New York. 1992.

HIRST, S.I., STAPLEY, L.A.-Parasitology: The Dawn of a New Millenium. **Parasitology Today**. 16(1):1-3, 2000.

HIYAMA, K., HAMANO, S., NAKAMURA, T., NOMOTO, K., TADA, I.-IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**. 87(4):269-74, 2001.

- HSU, H.C., MOUNTZ, J.D., WILLIAMS, R.W., SHELTON, B.J., YANG, P.A., MATSUKI, Y., XU, X., DODD, C.H., LI, L., GEIGER, H., ZHANG, H.G., VAN-ZANT, G.-Age-related changes in thymic T-cell development is associated with genetic loci on mouse chromosome 1, 3 and 11. **Mech. Aging Develop.** 123(8):1145-58, 2002.
- IRAQI, F., CLAPCOTT, S.J., KUMARI, P., HALEY, C.S., KEMP, S.J., TEALE, A.J.-Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. **Mamm. Genome.** 11(8): 645 – 8, 2000.
- KAHAN, B., AVERBACH, R., ALTER, B.J.-Histocompatibility and is enzyme differences in commercially supplied “BALB/c” mice. **Science.** 217: 379-381, 1982.
- KEMP, S.J., IRAQI, F., DARVASI, A., SOLLER, M., TEALE, A.J.-Localization of genes controlling resistance to trypanosomiasis in mice. **Nat Gent.** 16(2):194-6, 1997.
- KIERSZENBAUM, F.-What are T cell subpopulation really doing in Chagas’ disease? **Parasitol. Today.** 11: 6 – 7, 1995.
- KIERSZENBAUM, F., FRESNO, M., SZTEIN, M.B.-The *Trypanosoma cruzi* membrane lipoprotein AGC10 inhibits human lymphocyte activation by a mechanism preceding translating of both, interleukin-2 and its high-affinity receptor subunits. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 125(1-2):91-101, 2002.
- KNIGHT, J ABBOTT, A.-Mouse genetics: Full house. **Nature** 417: 785-786, 2002.
- KOBYASHI, M.-Cloning and expression of murine IL-12. **J. Immunol.** 148(11): 3433-40, 1992.
- KONDO, Y., MORI, M., KURAMOTO, T., YAMADA, J., BECKMANN, J.S., CHAZZOTTES, D.S., MONTAGUTELLI, X., GUÉNET, J-L., SERIKAWA, T. DNA segments mapped by reciprocal use of micro satellite primers between mouse and rat. **Mamm. Genom.** 4: 571-576, 1993.
- KRAMNIK, I., DEMANT, P., BLOOM, B.B.-Susceptibility to tuberculosis as a complex genetic trait: analysis using recombinant congenic strains of mice. **Norvatis Found Symp.** 217: 120-31, 1998.
- KROPF, S.P., AZEVEDO, N., FERREIRA, L.O.-Biomedical Research and Public Health in Brazil: The Case of Chagas’ Disease (1909-50). **Social History of Medicine.** 16(1):111-129, 2003.

- LAMOREUX, M.L.-The inbred mouse in pigmentation research: significance of a congenic developmental system. **Pigment Cell Res.** 13(6):421-30, 2000.
- LAUCELLA, S.A, DE TITTO, E.H, SEGURA, E.L. Epitopes common to *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues are recognized by sera from Chagas' disease patients: prognosis value in Chagas' disease. **Acta Trop.** 62 (3):151-62, 1996a.
- LAUCELLA, S.A, ROTTENBERG, M.E, DE TITTO E.H. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ver. Argent. Microbiol.** 28(2):99-109, 1996b.
- LAURIA-PIRES, L, BOGLIOLO A.R, TEIXEIRA, A.R.-Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derives from Chagas disease patients II. Suzie and RFLP characterizations. **Exp. Parasitol.** 82(2):182-90, 1996.
- LEON, J.S., ENGMAN, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **International Journal for Parasitology.** 31(5-6):554-560, 2001.
- LEON, J.S., GODSEL, L.M., WANG, K., ENGMAN, D.M.-Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. **Infect. Immun.** 69(9):5643-9, 2001.
- LIPODOVÁ, M., SVOBODOVÁ, M., HAVELKOVÁ, H., KRULOVÁ, M., BADALOVÁ, J., NOHÝNKOVÁ, VOLF, P., DEMANT, P. Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. **Genes Immun.** 1(3):200-6, 2000.
- LIPODOVÁ, M., SVOBODOVÁ, M., HAVELKOVÁ, H., KRULOVÁ, M., BADALOVÁ, J., NOHÝNKOVÁ, E., HART, A.A.M., SCHLEGEL, D., VOLF, P., DEMANT, P.- Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis. **Immunogenetics.** 54: 174-183, 2002.
- LOVE, M.J., KNIGHT, A.M., MCALEER, M.A. & TODD, J.A.- Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed micro satellites. **Nucl. Ac. Res.** 18: 4123-4130, 1990.
- LOVELL, D.P., TOTMAN, P., BIGELOW, S. W., NEBERT, D.W., HOFFMAN, H. A., GREIG, J.B., FESTING, M.F.- An investigation of genetic variation within a series of congenic strains of mice. **Lab. Anim.** 18(3):291-7, 1984.
- MACEDO, A.M., PENA, S.D.J.- Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology Today.** 14(3):119-124, 1998.

- MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P. & PENA, S.D.J. (2002) - Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. 5 March.
<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004118.htm>.
- MATESIC, L.E., DE MAIO, A., REEVES, R.H. - Mapping Lipopolysaccharide Response Loci in Mice Using Recombinant Inbred and Congenic Strains. **Genomics**. 62: 34-41, 1999.
- MARTINS, G.A., VIEIRA, L.Q., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. - Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infect Immun**. 67(8):3864-71, 1999.
- MCCARTHY, L., HUNTER, K., SCHALKWYK, L., RIBA, L., ANSON, S., MOTT, R., NEWLL, W., BRULEY, C., BAR, I., RAMU, E., HOUSMAN, D., COX, R., LEHRACH, H. Efficient high-resolution mapping of mouse interspersed repetitive sequence PCR products, toward integrated genetic and physical mapping of the mouse genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 92: 5302-5306, 1995.
- McLEOD, R., SKAMENE E., BROWN, C.R., EISENHAUER, P.B., MACK, D.G. Genetic regulation of early survival and cyst number after oral *Toxoplasma gondii* infection of AXB / BXA recombinant inbred and B10 congenic mice. **J. immunol**. 143: 3031-3034, 1989.
- MEDAWAR, P.B. -The immunology of transplantation. Harvey Lect. 52, 144-176, 1958.
- MELVOLD, R.W. - Inbred, congenic, recombinant-inbred and mutant mouse strains. **IN: Genetics and Molecular Immunology**. (3° Ed.) 3(106.1): 106.20, 1986.
- MENDES, R.P. - Doença de Chagas. **IN: Terapêutica de Doenças Infecciosas e Parasitárias**. (2° Ed.). Rio de Janeiro. Editora de Publicações Científicas Ltda. (1994) p. 301 – 306.
- MILES, M.A. - The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 71: 217-225, 1977.
- MILES, M.A. - Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**. 272: 819-821, 1978.

- MINÓPRIO, P.M., CHEIK, M.C.E., MURPHY, E., HONTEBEYRIE-JOSCKOWICZ, M., COFFMAN, R., COUTINHO, A., O'GARRA, A. - Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent. **J Immunol.** 151: 4200 – 4208, 1989.
- MOBRAATEN, L.E., SHARP, J.J. - Evolution of Genetic Manipulation of Laboratory Animals. **IN: 50 Years of Laboratory Animal Science. AALAS.** (1999). 17: 129-135.
- MOCK, B., BLACKWELL, J., HILGERS, J., POTTER, M., NACY, C. - Genetic control of *Leishmania major* infection in congenic, recombinant inbred and F2 population of mice. **Eur. J. Immunogenet.** 20(5):335-348, 1993.
- MOCK, B.A., HOLIDAY, D.L., CERRETI, D.P., DARNELL, S.C., O'BRIEN, A.D., POTTER, M. - Construction of a series of congenic mice with recombinant chromosome 1 regions surrounding the genetic loci for resistance to intracellular parasites (Ity, Lsh, and Bcg), DNA repairs responses (Rep-1), and the cytoskeletal protein vinilin (Vil). **Infect Immun.** 62(1):325-8, 1994.
- MOEN, C.J.A., STOFFERS, H.J., HART, A.A.M., WESTERHOFF, H.V., DEMANT, P. - Simulation of the distribution of parental strains' genomes in RC strains of mice. **Mammalian Genome.** 8: 884-889, 1997.
- MOREL, C.M. - Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **European Molecular Biology Organization.** 4: 35-38, 2003.
- MOREL, L., YU, Y., BLENMAN, K.R., CALDWELL, R.A., WAKELAND, E.K. Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. **Mammalian Genomes.** 7: 335-339, 1996.
- MOULIA, C., Le BRUN, N., RENAUD, F. - Mouse-Parasite Interactions: from gene to population. **Adv. in Parasitol.** 38: 119 - 167, 1996.
- MOUTIER, R. - Biochemical differences as a means of genetic control for inbred strains of laboratory animals. **IN: Defining the Laboratory Animal. Nation. Acad. Scien. Washington, D.C.** 169 – 178, 1971.
- MUÑOZ, S, LORCA, M, MUNOZ, P, SOLARI, A. - Highly homogeneous *Trypanosoma cruzi* populations in a low endemic region for Chagas disease importance in the pathogenesis of chagas disease in Chile. **Rev. Med. Chil.** 122(11):1231-8, 1994.

- MURAILLE, E., DE TREZ, C., BRAIT, M., DE BATSELIER, P., LEO, O., CARLIER, Y.- Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. **J. Immunol.** 170(8):4237-41, 2003.
- NABORS, G.S., TARLETON, R.L. - Differential control of IFN- γ and IL2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 146 :3591, 1991.
- NICKELL, S.P., SHARMA, D. - *Trypanosoma cruzi*: Roles for Perforin-Dependent and Perforin-Independent Immune Mechanisms in Acute Resistance. **Experimental Parasitology.** 94: 207-216, 2000.
- NIEMANN, H., KUES, W.A. Transgenic livestock: premises and promises. **Anim. Reprod Sci.** 60(61):277-293, 2000.
- O'CONNELL, J. - Role of Fas-Fas L in inflammatory diseases. **Exp. Rev. Mol. Med.** 10 December, <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003969h.htm> (2001).
- OLIVEIRA, M.A.P., SANTIAGO, H.C., LISBOA, C.R., CERAVOLLO, I.P., TRINCHIERI, G., GAZINELLI, R.T., VIEIRA, L.Q. - *Leishmania sp*: Comparative Study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in Their Ability to Initialize IL-12 and IFN - γ Synthesis. **Experimental Parasitology.** 95: 96-105, 2000.
- PASSOS, L.A.C. & ALVES, D.P. Isoladores. IN: **Manual para técnicos em Bioterismo.** De Luca, R.R, Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merusse, J.L.B., Neves, S.P.(Eds). 2° ed. São Paulo (1996) p. 27 –34.
- PASSOS, L.A.C., SAKURADA, J., GUARALDO, A.M.A., ORTIZ, S.C.B.C., RANGEL, H.A., GUÉNET, J-L. - Chagas: Fenômeno da Resistência. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** (5): 26-31, 2002.
- PEIRCE, J. - Looking al Old Tools in New Ways: Using Knockouts as Congenics to Study QTLs. **Genome Research.** 11(9):1469-1471, 2001.
- PIAZZA, R.M.F., ANDRADE-JR, HF., UMEZAWA, E.S., KATZIN, A.M., STOLF, A.M.S. - In situ immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. **Acta Tropica.** 57(4):301-306, 1994.
- PONTES-DE-CARVALHO, L., SANTANA, C.C., SOARES M.B.P., OLIVEIRA, G.G.S., CUNHA-NETO, E., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. - Experimental Chronic Chagas´ Disease Myocarditis is an Autoimmune Disease Preventable by Induction of Immunological Tolerance to Myocardial Antigens. **Journal of Autoimmunity.** 18: 131-138, 2002.

- POTTER, M., O'BRIEN, A.D., SKAMENE, E., GROS, P., FORGET, A., GONGSHAVN, P.A., WAX, J.S. - A BALB/c congenic strain of mice that carries a genetic locus (Ityr) controlling resistance to intracellular parasites. **Infect. Immune.** 40(3):1234-5, 1983.
- POTTER, M., MUSHINSKI, E.B., WAX, J.S., HARTLEY, J., MOCK, B.A. Identification of two genes on chromosome 4 that determine resistance to plasmacytoma induction in mice. **Cancer Res.** 54(4):969-75, 1994.
- PRATA, A. - Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases.** 1(2):92-107, 2001.
- PROWS, D.R., HORNER, M.L. - Parental genetic contributions in the AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. **Mammalian Genome.** 13: 127-133, 2002.
- PUEL, A., GROOT, P.C., LATHROP, M.G., DEMANT, P., MOUTON, D. - Mapping of genes controlling quantitative antibody production in Biozzi mice. **J. Immunol.** 154: 5799 – 5805, 1995.
- RANGEL, H.A., VERIMAUD, L., CAMARGO, I.J.B., GIGLIOLI, R. SAKURADA, J.K. Murine virus contaminant of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 36(5):423 – 431, 1994.
- RASSI JR., A., RASSI, S. G., RASSI, A. - Sudden death in Chagas' disease. **Arq. Bras. Cardiol.** 76(1):86-96, 2001.
- READY P.D., MILES, M.A. - Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. **Trans R Soc Med Hyg.** 74: 238-242, 1980.
- REED, S.G, BROWNELL C.E, RUSSO, D.M, SILVA J.S, GRABSTEIN, K.H, MORRISSEY, P.J.- IL -10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 153 (7):3135-40, 1994.
- REMME, J.H.F., BLAS, E., CHITSULO, L., DESJEUX, P.M.P., ENGERS, H.D., KANYOK, T.P., KAYONDO, J.F.K., KIOY, D.W., KUMARASWAMI, V., LAZDINS, J.K., NUNN, P.P., ODUOLA, A., RIDLEY, R.G., TOURE, Y.T., ZICKER, F., MOREL, C.M. - Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology.** 18(10):421-426, 2002.
- ROBERTS, L.J., BALDWIN, T.M., CURTIS, J.M., HANDMAN, E., FOOTE, S. J. Resistance to *Leishmania major* is Linked to the H2 Region on Chromosome 17 and to Chromosome 9. **J. Exp. Med.** 185(9):1705-1710, 1997.

- ROBERTS, L. J., BALDWIN, T. M., SPEED, T. P., HANDMAN, E., FOOTE S. J. Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control *Leishmania major* infection. **Eur Immunol.** 29 (9):3047-3050, 1999.
- ROGGERO, E., PEREZ, A., TAMAC-KAZAKU, M., PIAZON, I., NEPOMNASCHY, I., WIETZERBIN, J., SERRA, E., REVELLI, S., BOTTASSO, O.- Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.** 128(3): 421-428, 2002.
- ROGNER, U.C., AVNER, P. - Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. **Nat Rev Immunol.** 3 (3):243-52, 2003.
- RUSSEL, R.J., FESTING, M.F.W., DEENY, A.A.. & PETERS, A.G.- DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice. **Lab. Anim. Scien.** 43: 460 – 465, 1993.
- SACHS, J.D. - Macroeconomics and Health: Investing in Health for Economic Development. Report of the Commission on Macroeconomics and Health. WHO, Geneva, Switzerland. 2001.
- SACHS, J.D. - The essential ingredient. **New Sci.** 175: 52-55, 2002.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. **IN: Molecular Cloning - A Laboratory Manual** - (2° Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. P. 1 - 59, 1989.
- SANT'ANNA, O.A., FERREIRA, V.C.A., REIS, M.H. - Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of salmonellae. **Journal of Immunogenetics.** 9: 191-205, 1982.
- SCHOENHAUT, D.S., CHUA, A.O., WOLITZKY, A.G., QUINN, P.M., DWYER, C.M., McCOMAS, W., FAMILLETTI, P.C., GATELY, M.K., GUBLER, U. Cloning and expression of murine IL-12. **J.Immunol.** 148(11):3433-40, 1992.
- SERIKAWA, T., KURAMOTO, T., HILBERT, P., MORI, M., YAMADA, J., DUBAY, C.J., LINDPAINTER, K., GANTEN, D., GUÉNET, J-L., LATHROP, G.M., BECKMAN, J.S. – Rat gene mapping using PCR-analyzed micro satellites. **Genetics.** 131: 701-721, 1992.
- SILVER, L.M. – Mouse Genetics concepts and applications. Oxford University Press, England. 1 – 362, 1995.
- SIROVÁ, M.,RIHOVÁ, B., RIHA, I., LEIPNER, C. - IL-2 and IL-3 production in high and low IgG-responding strains of mice. **Immunol Letters.** 37: 91-96, 1993.

- SORAES, M.B.P., SILVA-MOTA, K.N., LIMA, R.S., BELLINTANI, M.C., PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Dissociation between Inflammation and Tissue Parasitism. **American Journal of Pathology**. 159 (2):03-709, 2001a.
- SOARES, M.B.P., PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.** 73 (4):547-559, 2001b.
- STASSEN, A.P.M., GROOT, P.C., EPPIG, J. T., DEMANT, P. - Genetic composition of the recombinant congenic strains. **Mammalian Genome**. 7: 55-58, 1996.
- STEVENSON, M.M., LYANGA, J.J. - Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. **Infection and Immunity**. 38 (1):80-88, 1982.
- TARLETON, R.L. - Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal for Parasitology**. 31(5):549-553, 2001.
- TAYLOR, B.A. Recombinant inbred strains: using gene mapping. **IN: Origins of Inbred Mice**, Morse HC (eds), Academic Press, New York, p. 423-438, 1978.
- TEIXIERA, A.T. **Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos**. Ed. Universidade de Brasília, 1987, p.15-89.
- TEIXEIRA, M.M., GAZZINELLI, R.T., SILVA, J.S. - Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **TRENDS in Parasitology**. 18 (6):262-265, 2002.
- THEOPHILOPOULOS, A.N. - A genetic analysis of lupus. **Allergy**. 72:67-74, 2002.
- TIBAYRENC, M., WARD, P., MOYA, A., AYALA, F.J. - Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**. 83 (1):115-119, 1986.
- TIBAYRENC, M. - Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Advances in Parasitology**. 36: 47-115, 1995.
- TIBAYRENC, M., AYALA, F.J. - Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Microbes and Infection**. 1: 465-472, 1999.
- TREZENA, A.G., SOUZA, C.M., BORREGO, A, MASSA, S., SIQUEIRA, M., DeFRANCO, M., SANT'ANNA, O.A.- Co-localization of quantitative trait loci

- regulating resistance to *Salmonella typhimurium* infection and specific antibody production phenotypes. **Microbes and Infection**. 4: 1409-1415, 2002.
- TRISCHMANN, T., TANOWITZ, H., WITTNER, M., BLOOM, B.- *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Experimental Parasitology**. 45 (2):160-168, 1978.
- TRISCHMANN, T.M., BLOOM, B.R. - Genetics of Murine Resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**. 53(2):546-551, 1982.
- TRISCHMANN, T.M. - Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental chagas' disease. **The Journal of Immunology**. 130 (40):1953-1957, 1983.
- TRISCHMANN, T.M. - Single locus in BXH-2 mice responsible for inability to control early proliferation of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 46 (3):658-62, 1984a.
- TRISCHMANN, T.M. - Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Parasite Immunology**. 6: 561-570, 1984b.
- TRISCHMANN, T. M. - *Trypanosoma cruzi*: early proliferation and host resistance in inbred stains of mice. **Exp Parasitol**. 62 (2):194-201, 1986.
- TROUILLER, P., OLLIARO, P., TORREELE, E., ORBINSKI, J., LAING, R., FORD, N. - Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**. 359 (9324):2188-22194, 2002.
- URBINA J.A. - Specific treatment of chagas disease: Current status and new developments. **Current Opinion in Infections Diseases**. 14 (6):733-741, 2001.
- URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Opinion in Infections Diseases**. 8(4):287-295, 2002.
- URBINA, J.A, PAYARES, G., SANOJA, C., LIRA, R., ROMANHA, A.J. - In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 21: 27-38, 2003.
- URBINA, J.A, PAYARES, G., SANOJA, C., MOLINA, J., LIRA, R., BRENER, Z., ROMANHA, A.J.- Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 21: 39-48, 2003.

- VERA-CRUZ J.M., MAGALLON-GASTELUM E., GRIJALVA G., RINCON, A.R., RAMOS-GARCIA C., ARMENDARIZ-BORUNDA J. - Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitol Res.** 89 (6):480-6, 2003.
- VIDAL, S., KONO D.H., THEOPHILOPOULOS, A.N.- Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Fas lpr mice. **J. Clin. Invest.** 101 (3):696-702, 1998.
- VYSE, T.J., TODD, J.A.- Genetic Analysis of Autoimmune Disease. **Cell.** 85: 311-318, 1996.
- WANDERLEY, D.M & CORRÊA, F.M. - Epidemiology of *Chagas'* heart disease. **Rev. Paul. Med.** 113(2): 742-9, 1995.
- WHO – Global defense against the infectious disease threat. Ed. Mary Kay Kindhauser. World Health Organization, Geneva, 2003.
- WIZEL, B., GARG,N. TARLETON, R.L.- Vaccination with *Trypanosoma* Surface Antigen 1-Encoding Plasmid DNA Confers Protection against Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity.** 66 (11):5073-4081, 1998.
- WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S.M., WATSON, J. - Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infection and Immunity.** 36(2):637-644, 1982.
- WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S.M., WATSON, J.D., MANNING, J.E.- Role of the H-2 Haplotype in Survival of Mice After Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity.** 44(2):351-354, 1984.
- WRIGHTSMAN, R., DAWSON, B.D., FOUTS D.L., MANNING, J.E.- Identification of Immunodominant Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Surface Atigen-1 Protein That Mask Protective Epitopes. **The Journal of Immunology.** 153: 3148-3154, 1994.
- WRIGHTSMAN, R.A., MILLER, M.J., SABORIO, J.L., MANNING, J.E. - Pure Paraflagellar Rod Protein Protects Mice against *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity.** 63(1):122-125, 1995.
- WRIGHTSMAN, R.A., MANNING, J. E. - Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific response and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine.** 18: 1419-1427, 2000.

- WRIGHTSMAN, R.A., LUHRS, K.A., FOUTS, D., MANNING, J. E.- Paraflagellar rod protein-specific CD8+cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. **Parasite Immunology**. 24(8):401-412, 2002.
- YAGAMI-HIROMASA, T. - A metalloproteinase-desintegrin participating in myoblast fusion . **Nature**. 377 (6550):652-6, 1995.
- YANG, X. - Ax, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. **Cell**. 89 (7):1067-76, 1997.
- ZHANG, L., TARLETON R.L. - Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur. J. Immunol**. 26: 102 – 109, 1996.

ANEXO 1

Extração de moléculas de DNA de alto peso molecular a partir do baço das linhagens isogênicas padrão.

Preparo das soluções:

SARCOSYL 1%

Reagente	Solução de uso
EDTA 0,5M	20 ml
Sarcosyl 10%	10 ml
água destilada	70 ml

RNase

Misturar 0,04 g do produto original em 3,9 ml de H₂O destilada.

Adicionar os seguintes reagentes:

40 µl de Tris 1,0 M pH 7.4

12 µl de NaCl 5,0 M

48 µl de água

Deixar em ebulição por 15 min./100 °C

PROTEINASE-K: Solução estoque - 2,0 mg/ml

Pesar 16,7 mg do produto original e dissolver em:

Sarcosyl 1%, (EDTA 0,1 M - 8,35 ml)

Proteinase-K: Solução de uso - Colocar 250 µl para 4,0 ml de Sarcosyl.

FENOL SATURADO

Juntar aos 250 ml de fenol:

Tris 1,0 M - 2,5 ml

NaCl 5,0 M - 0,5 ml

EDTA 0,5 M - 0,5 ml

ANEXO 2

TAMPÃO SET:

SDS 0,5%, EDTA 5 mM e Tris 50 mM - pH 7,4

TAMPÃO DE LISE:

Tris 50 mM - pH 8,0 - EDTA 100 mM - pH 8,0 e Sarcosyl 1%

CLOROFÓRMIO

Adicionar 1/25 de álcool isoamílico

TAMPÃO DE DIÁLISE:

Tris 10 mM - pH 7,4; EDTA 1 mM – pH 8,0

Tampões para eletroforese de DNA.

Tampão TAE 50 X:

Tampão utilizado no preparo do gel e no sistema de eletroforese.

Tris 2 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,5 M

TBE 10 X:

Tampão utilizado no preparo do gel e no sistema de eletroforese.

Tris 0,89 M; Ácido Bórico 55 g - EDTA 0,5 M

ANEXO 3

Tampão de reação - A tabela abaixo resume seu preparo e a estocagem dos principais reagentes. Os volumes apresentados são suficientes para 20 amostras.

Tabela : Condições de estocagem e volumes utilizados no preparo do tampão de reação

Solução estoque	Volume utilizado	Estocagem
	µl	
Tris 200 mM, pH 8.4	31,3	temperatura ambiente
Tween 20 - 2%	31,3	temperatura ambiente
KCL 1M	31,3	temperatura ambiente 4°
MgCl ₂ *(20mM,40mM,60mM ou 80mM)	31,3	
Primer A	6,25	4°
Primer B	6,25	4°
4 mM dNTPs	31,3	-20 °C
Taq Polymerase 4,5 a 5,0 UI/µl	3,15	-20 °C

Após o preparo, a mistura A é rapidamente homogeneizada em Vortex e centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos.

*** É importante verificar a sua concentração antes do uso**

ANEXO 4

Reação de PCR

As soluções de reação, para cada um dos *primers* utilizados, foram preparadas como indicado nas tabelas abaixo.

Tampão básico para diluição das amostras

Tampão 10 X (sem MgCl ₂)	Volume utilizado
Tris-HCl 1 M pH 8,0	1,0 ml
KCl 1 M	5,0 ml
Tween 20	0,1 ml
água	3,9 ml
Volume final	10 ml

Preparo do tampão de reação. Volume suficiente para a diluição de 15 amostras de DNA.

Reagentes	Volume utilizado
Tampão 10 X	37,5 µl
dNTPs (4 mM)	7,5 µl
MgCl ₂ (*)	30,0 µl
Primer R	5,25 µl
Primer F	5,25 µl
Taq Polymerase	1,5 µl
água	213 µl
volume final	300 µl

(*) MgCl₂ 10 mM; 15 mM ou 20 mM

ANEXO 5

Teste de acasalamento para coloração de pelagem (Linhagem albina X DBA/2)

Genótipo da linhagem DBA/2	Genótipo linhagens albinas	Genótipo e fenótipo dos animais F1
DBA/2	A	marrom
	<i>c/c a/a b/b D/D</i>	<i>C/c a/a b/b D/d</i>
	AKR	preto
	<i>c/c a/a B/B D/D</i>	<i>C/c a/a B/b D/d</i>
	BALB/c	marron-agouti
<i>C/C a/a b/b d/d</i> X	<i>c/c A/A b/b D/D</i>	<i>C/c A/a b/b D/d</i>
	DDK	preto-agouti
	<i>c/c A/A B/B D/D</i>	<i>C/c A/a b/b d/d</i>
	HRS	cinza-amarelo
	<i>c/c A/A b/b D/D</i>	<i>C/c A/a b/b d/d</i>

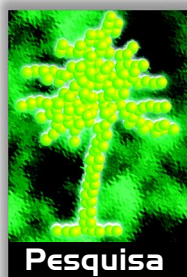
E. Kozaburo, cap II Iclas Nomura (Esaki, 1984).

ANEXO 6

CROMOSSOMOS ENVOLVIDOS COM A RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A PROTOZOÁRIOS

DOENÇA	PROTOZOÁRIO	CROM.	POS. (cM)
Tripanosomíase africana	T. congolense	1	59, 82, 71 e 93
		5	44
		17	18,2
Malária	P. chabaudi	3	62
		8	45
		9	53
		17	19
Leishmaniose	L. major	1	81
		3	49
		4	1
		5	28
		6	29
		8	25
		9	23
		10	65
		11	2 e 39
		16	32
		17	7 e 23
		18	24
Tripanosomíase americana (R)	T. cruzi	7	25 e 46
		11	16
		14	48
		17	22
Tripanosomíase americana (S)	T. cruzi	19	26
		5	Entre 45 e 52
		13 (?)	71
		17	Entre 16 e 22,3

CHAGAS: Fenômeno da Resistência
Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento
(5): p. 26-31, 2002.



CHAGAS

Fenômeno da Resistência

Foto cedida pelos autores

Identificação de regiões do Genoma importantes no controle da doença

Luiz Augusto Corrêa Passos

Responsável pelo Laboratório de Genética e
Criopreservação
CEMIB/UNICAMP – S.P.

Júlia Keiko Sakurada

Profa. Dra. do Departamento de Microbiologia e
Imunologia
Membro do Conselho Científico do CEMIB/
UNICAMP – S.P.

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profa. Dra. do Departamento de Parasitologia
Diretora do CEMIB/UNICAMP – S.P.

Silvia Colleta Barreto da Costa Ortiz

Diretora do Centro de Bioterismo – FM/USP – S.P.

Humberto de Araújo Rangel

Prof. Dr. do Departamento de Microbiologia e
Imunologia
Pesquisador do CEMIB/UNICAMP – S.P.

Jean Louis Guenet

Unité de Génétique des Mammifères
Institut Pasteur – França

Resenha histórica

O crescimento da pesquisa científica, revelando importantes descobertas na área da saúde, se iniciou há pouco mais de um século, quando epidemias varriam constantemente os continentes, dizimando as populações ou acarretando alterações profundas em suas concepções e conduta.

Embora a utilização de animais, como modelo experimental, tenha sido concebida na Grécia antiga, o impulso definitivo para a sua utilização somente ocorreu no século XVII, com a “Revolução Científica” que promoveu uma mudança de atitude frente à vida, transferindo a confiança e fé depositadas no cu-

randeirismo para os serviços médicos (Parascandola, 1994).

A investigação científica sempre foi um fator decisivo para a confiança na terapêutica médica. Confiávamos porque sabemos que antes de experimentados pela primeira vez no ser humano, uma droga, um procedimento ou uma simples recomendação, foram investigados em várias espécies de animais de laboratório, sendo atualmente exigido que os protocolos sejam desenvolvidos em condições que não provoquem dor ou sofrimento desnecessários.

No século XX, os mamíferos, especialmente camundongos e ratos, foram eleitos, devido aos seus parâmetros biológicos, os principais modelos para uso em pesquisa nas diversas áreas (Paton, 1984). Em decorrência de características particulares, foram estabelecidas, como referência para o teste de drogas e procedimentos, o uso de 5 espécies: camundongo, rato, hamster, cobaio e coelho (Rothschild, 1994).

O pós-guerra, da década de 50, desencadeou um acentuado avanço nas pesquisas, aumentando a utilização de animais de laboratório. Em sua obra de 1984, Willian Paton relaciona, de forma clara, o número de animais utilizados e a melhoria na qualidade de vida das populações. Segundo o autor, entre 1890 e 1980, o número de experimentos que utilizavam animais saltou de pouco mais de 1000 para



Figura 1: Estante ventilada para a manutenção de animais em condições sanitárias e de ambiente controladas

mais de 1.000.000, anualmente. Os benefícios decorrentes deste uso se estendem desde a descoberta da vacina tifóide até o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e a biotecnologia na década de 80.

Além do aumento do número de experiências com animais, também foi decisiva a criação de uma Ciência, pluridisciplinar, voltada para o estudo dos modelos animais, reunindo especialistas das mais diferentes áreas. Como consequência, dispomos hoje em dia, de modelos animais padronizados do ponto de vista sanitário, genético e de ambiente e de equipamentos (Figura 1) que permitem manter esses animais em condições controladas, eliminando a interferência de fatores alheios ao delineamento experimental e aumentando a sensibilidade e a confiabilidade dos resultados experimentais.

A década de 60 cristalizou nos países desenvolvidos, esta nova mentalidade, com consequências sobre todo o sistema de produção e cuidados com os modelos animais (Beall e cols 1971; Dillehay e cols 1990; Menendez, 1985). Desta forma, os animais de laboratório passaram a ser padronizados conduzindo ao estabelecimento de diferentes linhagens de camundongos tais como isogênicas, heterogênicas, recombinantes isogênicas, congênicas e mutantes entre outras, cada uma delas atuando como “ferramentas” essenciais para o entendimento de fenômenos biológicos.

Origens dos camundongos atualmente utilizados na experimentação biomédica

Os camundongos utilizados tiveram a sua origem há cerca de 1 milhão de anos, da derivação de 4 subespécies: *domesticus* (oeste europeu); *molossinus* (Japão); *musculus* (leste europeu, Rússia e norte da China) e *castaneus* (oeste da Ásia, sudoeste da Ásia e sul da China).

Recolhidos em cativeiro, repre-

sentantes do roedor silvestre europeu e leste asiático, constituem-se hoje nos mais próximos ancestrais (aproximadamente 200 anos) dos camundongos utilizados na pesquisa biomédica (Silver, 1995). Uma vez no cativeiro, os animais puderam ser acasalados programadamente, obtendo-se linhagens com características genéticas diferentes umas das outras, o que contribuiu sobremaneira para a pesquisa biomédica, com reflexos no desenvolvimento científico.

Por aceitarem bem acasalamentos endogâmicos absolutamente consanguíneos, camundongos e ratos, acasalados entre irmãos por várias gerações, formam populações de animais muito homogêneas do ponto de vista genético (Godard, & Guenet, 1999).

Algumas destas linhagens consanguíneas foram determinantes para muitos dos benefícios da medicina atual. George Snell, por exemplo, realizou acasalamentos entre linhagens possuidoras de MHC diferentes e obteve um modelo animal que foi fundamental à compreensão científica dos mecanismos envolvidos na rejeição de tecidos transplantados.

Observa-se que, enquanto algumas linhagens são dizimadas pela infecção causada por um determinado patógeno, outras não o são, indicando que o “background” genético está diretamente relacionado ao fenômeno da resistência. Moulia e cols (1996) citam como exemplo as infecções promovidas por agentes como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Leishmania* sp, onde a noção de modelo animal é ainda mais complexa, pois os mecanismos genéticos importantes neste determinismo podem envolver mais que um gene.

A observação de que a infecção por *T. cruzi*, em diferentes linhagens isogênicas, apresenta desde uma alta susceptibilidade até uma forte resistência (Trischmann, 1984), justifica o interesse

em se buscar novos modelos que auxiliem o entendimento de doenças causadas por protozoários.

Doença de Chagas

A doença de Chagas está entre os principais problemas de saúde da América do Sul, comprometendo a qualidade de vida das populações carentes. No início da década de 90, estimava-se um total de 17 milhões de pessoas infectadas (WHO, 1991) e em meados desta mesma década, levantamentos apontaram para um total de 16 milhões e outras 90 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção pelo *T. cruzi* (Wanderley & Corrêa, 1995), (Wizel e cols, 1998).

Apesar dos recentes sucessos na interrupção da transmissão vetorial, em alguns países como o Brasil, resta ainda infectado, um contingente de cerca de 6 milhões de pessoas, com uma população de risco em torno de 20 milhões de habitantes (Goldenberg & Krieger, 1997).

O agente causal da doença, *T. cruzi*, é um parasito intracelular, que possui um ciclo biológico complexo e apresenta várias cepas distintas (Brenner e cols, 1980), com alta capacidade de adaptação fisiológica e uma ampla variabilidade genética, inclusive relacionada à severidade da doença (Macedo & Pena, 1998).

Este protozoário infecta vários tipos celulares e tem a capacidade de evadir-se do vacúolo parasitóforo inicialmente produzido, proliferando lentamente, imerso no citoplasma das células, o que dificulta a ação da resposta imune e de drogas. Após uma curta fase aguda caracterizada por uma alta parasitemia, grande disseminação e uma importante imunossupressão (Minoprio e cols, 1989), o hospedeiro consegue controlar as formas circulantes ou tripomastigotas, entrando em uma fase crônica que se caracteriza por um parasitismo tecidual e uma parasitemia dificilmente detectável (Soares e cols, 2001). Isto resulta em dificuldade no esta-

belecimento de protocolos eficientes para o tratamento na fase crônica da doença e ressalta a importância de estudos que visem a favorecer a manipulação imunológica durante a fase aguda da infecção (Costa e cols, 1998).

Nos seres humanos, a principal causa de morbidade e mortalidade é o comprometimento cardíaco, que ocorre em cerca de 30% dos indivíduos infectados, representando atualmente, cerca de 2 milhões de pessoas (Cunha Neto, 1999). Os mecanismos relativos à resistência ao estabelecimento desta cardiopatia chagásica, são ainda assunto de intenso debate, havendo, entretanto, o consenso da importância da constituição genética do indivíduo, no desenvolvimento da doença.

Os ensaios laboratoriais necessários à compreensão destes mecanismos genéticos, são, por razões óbvias, realizadas em modelos animais definidos geneticamente.

Aspectos genéticos da resistência à infecção pelo *T.cruzi*.

No início dos anos 80, pesquisadores investigando a resistência ao *T.cruzi*, em camundongos de diferentes linhagens isogênicas, concluíram que o controle da parasitemia e a capacidade de sobreviver à fase aguda da infecção dependiam de fatores genéticos, ainda não identificados, relacionados à constituição genética do parasito (Macedo & Pena, 1998; Andrade e cols, 1985) e do hospedeiro (Eksi e cols, 1996; Moulia, 1996).

Com relação ao hospedeiro, os resultados obtidos por Trischmann, indicaram ser o Complexo Maior de Histocompatibilidade (H2), presente no cromossomo 17, importante para a resistência, conforme pode ser observado, analisando-se o comportamento de camundongos isogênicos das li-

nhagens C57BL/6 e DBA/2 e seus respectivos híbridos F1 e F2 após desafio com o parasito.

Conclusão semelhante foi obtida por Wrightsman e cols (1984) realizando experimentos com as linhagens C57BL/10, C57BL/6 e BALB/c.

A realização de ensaios, utilizando linhagens recombinantes isogênicas (Bailey, 1971), abriu nova discussão acerca da importância de mecanismos genéticos no fenômeno da resistência ao *T.cruzi*. Este modelo animal é desenvolvido a partir de duas linhagens isogênicas acasaladas por pelo menos 20 gerações e, como consequência, os animais derivados serão homozigotos em todos os alelos, sendo entretanto, ora de uma linhagem isogênica parental original, ora da outra. Trabalhando com linhagens recombinantes isogênicas (BXH-2) derivadas do fenótipo resistente (C57BL/6) e susceptível (C3H/HeJ), Trischmann identificou que esses recombinantes eram mais susceptíveis à infecção pelo parasito, quando comparados às linhagens parentais isogênicas originais. Tal fato conduziu à hipótese da ocorrência de uma mutação, durante o processo de obtenção daquela linhagem recombinante, a qual estaria relacionada à incapacidade dos animais controlarem a proliferação do *T. cruzi*.

Desta forma, postulou-se a hipótese da resistência ser um fenômeno de caráter poligênico, com a participação de genes localizados fora do Complexo Maior de Histocompatibilidade (Trischmann, 1984; Wrightsman e cols, 1984).

Estes achados estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, que teve como principal objetivo, identificar as regiões cromossômicas envolvidas com a resistência à cepa Y2 de *T. cruzi*. Para tanto, foram utilizados camundongos, oriundos de diferentes programas de acasalamento que, depois de infectados, foram analisados pela reação de polimerase em cadeia

(PCR), com marcadores moleculares para microsatélites, presentes em amostras de DNA dos indivíduos que resistiram à infecção.

Análise da resistência à infecção experimental pelo *T.cruzi*.

Animais isogênicos, experimentalmente infectados, apresentam um comportamento diferenciado. Camundongos da linhagem A/J morrem, ainda na fase aguda da infecção, com um inóculo constituído de baixas quantidades de parasito (como por exemplo 10^1 formas sanguíneas de tripomastigotas), enquanto animais C57BL/6 podem sobreviver com doses elevadas, como por exemplo 10^5 formas de parasitas. A existência de linhagens isogênicas, que exibem fenótipos intermediários, sugere que o determinismo genético da resistência ao parasito está sob o efeito de um controle complexo e que, a capacidade de animais inoculados resistirem à infecção é função da expressão de genes oriundos de diferentes regiões do genoma dos animais. A identificação destas regiões, seguida de sua análise, poderá contribuir significativamente para a compreensão do fenômeno da resistência.

Identificação dos cromossomos e das regiões relacionadas à resistência.

Determinação da dose discriminatória

Inicialmente, animais oriundos das linhagens isogênicas de fenótipo resistente (C57BL/6) e susceptível (A/J) foram desafiados com diferentes doses de parasito, a fim de se determinar a dose discriminatória.

O ensaio foi realizado inoculando-se grupos de animais, de ambas as linhagens, com 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 formas de tripomastigostas.

Todos os animais da linhagem A/J morreram com a dose de 10^1

Tabela 1: Regiões relacionadas com a resistência encontrada nos animais (B6A)F2

CROMOSSOMO	MARCADOR MOLECULAR	POSIÇÃO	Nº DE ANIMAIS TESTADOS	X ²	p
CROM. 7	D7Mit27	23	71	8,83	0,012088593
	D7Mit82	25	77	17,57	0,000152902
	D7Mit301	46,6	68	13,03	0,001481492
	D7Mit222	52,6	76	8,92	0,011556279
CROM. 11	D11Mit162	8	55	1,80	0,406569663
	D11Mit83	16	68	26,82	1,49742E-06
	D11Mit135	17	51	2,57	0,276840507
CROM. 14	D14Mit7	44	77	3,16	0,206403543
	D14Mit265	48	77	19,47	5,92487E-05
CROM. 17	D17Mit16	18	37	0,89	0,640218379
	D17Mit176	22	68	11,41	0,003326341
	D17Mit66	24	64	0,38	0,82902912
CROM. 19	D19Mit40	25	75	2,79	0,248246436
	D19Mit19	26	77	18,43	9,96062E-05
	D19Mit100	27	53	6,4	0,040839186

parasitos e por esta razão foram considerados susceptíveis. Entretanto, o uso da maior dose administrada (10^5 parasitos) conduziu à morte de 50% da população de animais da linhagem C57BL/6, que por esta razão foi considerada resistente.

Com base nestes resultados, durante todo o experimento foi utilizado um inóculo constituído de 10^4 formas de tripomastigota sanguícola, injetado intraperitonealmente. Observou-se que somente os animais com fenótipo resistente sobrevivem, diferentemente daqueles com fenótipo susceptível ou intermediário.

Análise da transmissão da resistência

Para uma melhor compreensão do mecanismo de herança, presente no fenômeno da resistência, foram realizados testes em animais híbridos F1, produto do acasalamento realizado entre camundongos isogênicos C57BL/6 de fenótipo resistente e A/J de fenótipo susceptível.

Uma vez que apresentam metade de cada um dos parentais isogênicos originais, resistentes e susceptíveis, estes animais são homogêneos, ou seja, têm a mesma composição genética.

A sobrevivência encontrada, após o desafio com a dose discriminatória de parasito, foi similar à observada na linhagem isogênica de fenótipo resistente, indicando que a resistência à fase aguda da

infecção podia ser transmitida e apresentava um caráter dominante.

Identificação das regiões relacionadas com a resistência.

A partir destes achados e com acasalamentos programados, foram produzidos animais recombinantes de segunda geração, (B6A)F2, (obtidos por “intercross” entre

Tabela 2 – Regiões cromossômicas comuns a (B6A)F2r e RIS*

Marcador Molecular	Posição	Linhagens Recombinantes Isogênicas			
		Grupo I		Grupo II	
		BXA1	BXA7	BXA2	BXA4
D7Mit82	25	B	B	A	A
D7Mit145	26,4	B	B	A	A
D11Mit83	16	A	A	B	A
D14Mit265	48	B	B	B	B
D17Mit176	22	B	B	B	A
D19Mit19	26	B	B	A	B

animais F1 resistentes). Estes animais foram desafiados e 43% sobreviveram, descartando a hipótese de uma herança monogênica para o fenômeno da resistência usando-se como referência os resultados observados na população de animais F1. Além disso, a análise estatística realizada com este grupo de animais F2, apresentou forte desvio do esperado (75% como alelo dominante e 25% como alelo recessivo) no valor do qui-quadrado: $\chi^2 = 40,34$ $p = 2,13 \times 10^{-10}$.

Não obstante estas considerações, ficou demonstrado que a recombinação genética, decorrente da segregação independente, dissociou fortemente os alelos envolvidos com a resistência, uma vez que o número de animais que sobreviveram foi inferior a 50% dos inoculados. Além disso, o número de indivíduos resistentes sugeria que o fenômeno era poligênico, fato comprovado posteriormente na avaliação genética destes animais.

Amostras de tecidos dos sobreviventes foram retiradas e processadas a fim de se extrair o

DNA para a definição da constituição genética de cada animal (genotipagem), com a reação de PCR, utilizando-se marcadores moleculares (primers) dirigidos para microssatélites polimórficos. Foram utilizados 147 primers, escolhidos de forma a cobrir todas as regiões do genoma, e capazes de reconhecer exclusivamente cada uma das linhagens parentais isogênicas originais de fenótipo resistente e susceptível.

Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 1 e indicam que as regiões, em desequilíbrio para o fenótipo resistente, estão presentes nos cromossomos 7, 11, 14, 17 e 19.

Comportamento de linhagens recombinantes isogênicas derivadas das linhagens parentais isogênicas originais frente ao *T.cruzi*.

A partir de uma busca realizada junto ao "genome informatics" do Jackson Laboratory (www.jax.org), foram escolhidas linhagens recombinantes isogênicas (BXA) para desafio nas mesmas condições dos

grupos anteriores.

O comportamento destes animais, após o desafio, permitiria estabelecer uma relação entre as regiões presentes neste grupo experimental e aquelas identificadas nos grupos anteriores.

Assim, os animais desafiados puderam ser separados em dois grupos, onde os animais do grupo I, que apresentaram uma mortalidade média de 40% foram considerados de maior sobrevivência, enquanto os animais do Grupo II, que apresentaram uma mortalidade média de 55% (BXA2) e 65% (BXA4), foram considerados de menor sobrevivência.

A comparação dos resultados encontrados nestes animais (BXA), com os observados anteriormente na população (B6A)F2r, revelou uma correspondência entre as regiões, conforme pode ser observado na Tabela 2.

O grupo de maior sobrevivência apresenta 4 regiões em correspondência àquelas identificadas na população (B6A)F2. Por outro lado, os animais do grupo II apresentam apenas 2 (linhagem BXA4) e 3 (linhagem BXA2) regiões das identificadas anteriormente.

Tais resultados sugerem, que estas regiões, apresentam genes capazes de interferir no fenômeno da resistência, os quais poderiam ser transmitidos através de acasalamentos programados, de forma a se produzir um novo modelo para a investigação da doença: uma linhagem congênica resistente.

A produção do modelo congênico para a resistência: uma nova ferramenta.

Animais albinos, provenientes de híbridos (B6A)F2, que sobreviveram ao desafio com 10^4 parasitos, foram retroacasalados com o parental susceptível. A progênie deste retroacasalamento (*backcross*) foi expandida (*intercross*) e desafiada (figura 2). Esta linhagem congênica, em desenvolvimento, mesmo apresentando uma grande participação do genoma da linhagem

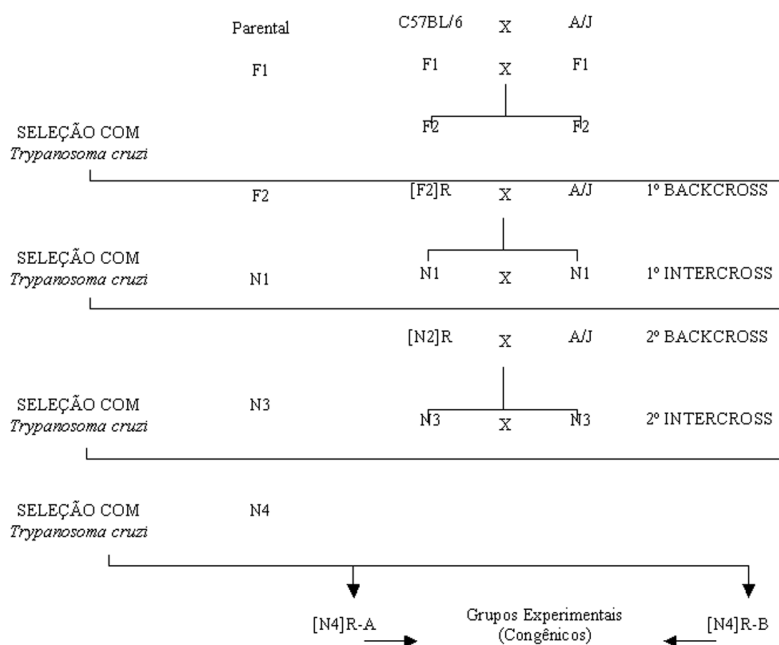


Figura 2 - Representação Esquemática da Obtenção do Modelo Congênico

susceptível, possui um nível de resistência superior, em pelo menos 100 vezes, ao padrão isogênico parental susceptível original.

O emprego deste novo modelo será de grande impacto na análise das diferenças genéticas e fisiopatológicas presentes nos animais resistentes e susceptíveis. A identificação de alvos preferenciais, para o desenvolvimento protocolos visando combater a doença, auxiliará aos cientistas e às sociedades que os congregam, no entendimento de doenças causadas por protozoários, resultando em benefícios para a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE V, BARRAL-NETTO M, ANDRADE SG; (1985); Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 18 (4); p. 499-506
- BAILEY, D.W. 1971, Recombinant inbred strains. **Transplantation**. v. 11 n.3, p. 325 -327.
- BEALL, J.R., TORNING, F.E. & RUNKLE, R.S. 1971. A laminar flow system for animal maintenance. **Lab. Anim. Scien.** v. 21, p. 206 - 212.
- BRENER, Z.; (1980); Immunity to *Trypanosoma cruzi*; **Adv. Parasit.** 18; p. 247 - 291
- COSTA F., FRANCHIN G., PEREIRA-CHIOCCOLA V.L., RIBEIRÃO M., SCHENKMAN S. & RODRIGUES M.M. (1998). Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**. 16(8); p. 768-774
- CUNHA NETO, E. (1999). Doença de Chagas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** (9) p. 20 - 22.
- DILLEHAY, D.L., LEHNER, N.D.M. & HUERKAMP, M.J. 1990. The effectiveness of a micro isolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Senday virus infections. **Lab. Anim. Scien.** v. 40, p.367 - 370.
- EKSI, S.; WASSON, D.L. & POWELL, M.R. (1996). Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: profiles and compartmentalization of IL-2; IL-4; IL-5; IL-10 and IFN-gamma-producing cells. **J. Parasitol.** 82(1); p. 59 - 65.
- GODARD, A.L. & GUENET, J.L. (1999). Genética de camundongos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** (9) p. 96 - 100.
- GOLDENBERG, S. & KRIEGER, M.A. (1997). Doença de Chagas **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** (3) p. 26 - 27.
- MACEDO, A. M. & PENA, S.D.J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**. 14(3) p. 119 - 124.
- MENENDEZ, R.C. 1985. Animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas. Cuba, La Habana Editorial. Ciencias Médicas. p 203.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S. & COUTINHO, A. (1989); Immunobiology of Murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and activation of TCR I T cells. **Immunol. Rev.** 112; p. 183 - 207
- MOULIA, C.; Le BRUN, N. & REAUD, F. (1996). Mouse-Parasite Interactions: from gene to population. **Adv. Parasitol.** 38, p. 119 - 167.
- PARASCANDOLA, J., B. 1994. The History of Animal Use in the Life Sciences **IN: The world congress on alternatives and animal use in the life sciences: education, research, testing.** Alan M. Goldberg and LFM Von Zutphen (Eds.). Mary Ann Liebert, Inc. publishers.
- PATON, W. 1984. Man and mouse. Animals in medical research. Oxford University Press. Oxford. ROTHSHIELD, M.A. 1990. Manual para técnicos de bioterismo. São Paulo, Epm, Finep. p. 220.
- SHIROISHI, T., & YONEKAWA, H. 1994. Genetic differentiation and geographical distribution of various subspecies of mice **IN: Genetics in wild mice - its applications to biomedical research.** Edited by - Kozuo Moriwaki. Japan Scientific Societies Press.
- SILVER, L.M. 1995. Mouse Genetics concepts and applications. Oxford University Press, England. 1 - 362
- SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L & RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. (2001). The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.** 73 (4); p. 547 - 559.
- TRISCHMANN, T. M. ; (1984); Single Locus in BXH-2 mice responsible for inability to control early proliferation of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 46; p. 658 - 662
- WANDERLEY, D.M. & CORRÊA, F.M. (1995); Epidemiology of *Chagas'* Heart Disease; **Rev. Paul. Med.** 113 (2); p. 742 - 749
- W.H.O. (1991); Control of Chagas Disease. **WHO**. 187; p.1
- WIZEL B., GARG N., TARLETON R.L. (1998); Vaccination with Trypomastigote Surface Antigen 1-Encoding Plasmid DNA Confers Protection against Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity**. 66 (11); p. 5073-5081
- WRIGHTSMAN R.A., KRASSNER S.M., WATSON J.D., MANNING J.E. (1984); Role of the H-2^a Haplotype in Survival of Mice after Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**. 44(2); p. 351-354

