

SILVIA COLLETTA BARRETO DA COSTA ORTIZ

**ESTUDO SOBRE A GENÉTICA DA RESISTÊNCIA
EM CAMUNDONGOS LIVRES DE PATÓGENOS
ESPECÍFICOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada no Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. JULIA KEIKO SAKURADA

CAMPINAS
SÃO PAULO
1996

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Silvia Colletta Barreto da Costa
Ortiz

e aprovada pela Comissão Julgadora

2/12/96

Julia Keiko Sakurada

9400924

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Or8e

Ortiz, Silvia Colletta Barreto da Costa

Estudo sobre a genética da resistência em camundongos livres de patógenos específicos infectados por *Trypanosoma cruzi* / Silvia Colletta Barreto da Costa Ortiz. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Julia Keiko Sakurada.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Tripanossoma cruzi. 2. Genética. 3. Imunidade natural. 4. Susceptibilidade a doença. I. Sakurada, Julia Keiko. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/unicamp
	Or8e
V.	Ex.
TOMBO BC/	29429
PROC.	284/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/05/97
N.º CPD	

CM-00096674-4

LOCAL E DATA: Campinas, 02 de Dezembro de 1996

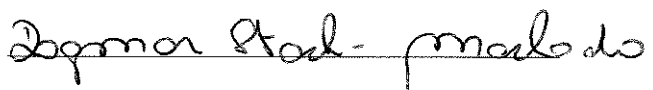
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

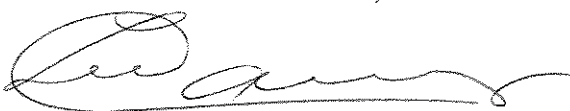
Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada



Profa.Dra. Dagmar Stach-Machado

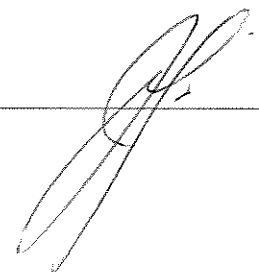


Prof.Dr.Irineu J.B. Camargo



SUPLENTE:

Prof.Dr.Humberto A.Rangel



Todos nós vemos as coisas de maneira diferente e cada um de nós vê a mesma coisa de um modo diferente em momentos diferentes, de forma que o significado das coisas muda constantemente.

O pensamento é basicamente constituído de duas partes, uma positiva e outra negativa. Sem estas duas partes é impossível pensar, pois pensar é comparar. Comparar uma coisa com outra, uma idéia com outra, um juízo com outro, e assim por diante.

Todo o raciocínio implica em comparação e escolha, mas o pensamento, além dos dois lados que permitem a comparação ou o raciocínio, é dividido em três partes distintas, uma parte motora ou automática, uma parte emocional e uma parte intelectual. Cada parte desta tem uma função definida.

Vemos então que para criar, para construir, para descobrir, para inventar, para mudar; enfim para Fazer alguma coisa é necessário Atenção, para manter a Atenção é necessário Esforço e para fazer Esforço é necessário Vontade.

E a Vontade não existe sem o foco, sem o objetivo, sem a Concentração ou, em outras palavras, sem o Amor, porque o Amor nada mais é do que a Dedicção Completa, a Entrega Total.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus Pais, Florinda e Joaquim Barreto da Costa Jr. que com carinho e dedicação ensinaram-me a respeitar e valorizar cada acontecimento da minha vida, dando-me a melhor herança que um filho recebe de seus Pais : A Educação.

Ao meu marido, Antonio Carlos B. Ortiz, que através do amor e do apoio fortaleceu-me na disciplina e determinação para a conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos Carlos e Victor , que com sorriso puro de criança alegraram meu caminho nos momentos em que a solidão e a saudade fizeram parte parte de sta jornada.

A Profa. Dra. Julia K. Sakurada, minha orientadora, que acolheu-me para a concretização desta tese.

Ao Prof. Dr. Humberto de A. Rangel, Mestre e orientador, que mostrou-me o caminho a ser percorrido.

Ao Prof. Dr. Jean Louis Guénet, Professor e Co-Orientador que com sua amizade e competência proporcionou-me ampliar não apenas meus conhecimentos, mas também a observação científica necessária para seguir na área da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Augusto Santana, meu particular Muito Obrigada, pois fui a procura de um Professor e encontrei um Amigo, uma pessoa de quem tenho orgulho de ter tido o prazer de conhecer.

A Profa. Dra. Dagmar Starch-Machado, que recebeu-me de maneira carinhosa e com muita atenção dedicou seus esforços para que eu pudesse concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Irineu J.B. Camargo, Mestre sereno que com bom humor e delicadeza deu-me serenidade nos momentos finais deste trabalho.

*Agradeço particularmente aos meus amigos, por serem da maneira com
são..., Mestres na amizade... Doutores no respeito..., e que estavam ao meu lado
nos momentos mais difíceis dando-me apoio e força para continuar na
caminhada.*

*Meu agradecimento particular para algumas pessoas que marcaram esta
caminhada por lealdade a um sentimento de amizade, carinho e respeito,
agradecendo também a todas aquelas pessoas que de alguma forma ajudaram-me
a chegar até o final.*

*Regina Vinagre, com muito profissionalismo, respeito e amizade deu-me
condições de dividir minhas atividades para também dedicar-me à pesquisa, pois
sorrindo e brincando formamos um grande time do qual jamais esqueerei.*

*Cristina Colombari, com seu olhar meigo cheio de ternura estava sempre
ao meu lado, ajudando-me no laboratório, na representação dos meus interesses,
no incentivo diário através de uma ligação que surgiu do respeito profissional e
que transpôs a amizade.*

*Marcia Costa Rocha, que traz em seu coração uma força muito grande,
um potencial de lutar com amor por seus ideais, ensinou-me a buscar esta força,
não deixando que eu jamais esmorecesse...*

Aos meus amigos Jussimara Sartori e Francisco de Assis Silva que além de terem ajudado durante os experimentos e nos exames de controle sanitário dos animais, representam uma amizade pura que brotou da essência maior que é o Amor pela ciência e pelo Ser Humano que faz ciência. Vocês representam os amigos que ganhei no Cemib/Unicamp e no Departamento de Micro e Imunologia.

A todos vocês fica meu agradecimento comovido.

Este trabalho foi realizado no CEMIB/UNICAMP, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia/ UNICAMP e Instituto Pasteur de Paris. À todas as pessoas envolvidas em cada etapa deste trabalho o meu muito obrigada.

O apoio financeiro para a realização deste trabalho contou com a participação das Instituições Financiadoras FAPESP, FAEP/ UNICAMP e do convênio CNPq / Brasil - INSERM/ França, sem as quais a qualidade da pesquisa teria sido prejudicada.

-Índice

INTRODUÇÃO:	3
OBJETIVOS:	15
MATERIAIS E MÉTODOS:	17
<i>Animais:</i>	18
<i>Parasita:</i>	19
<i>Infecção Experimental:</i>	19
<i>Extração de DNA a partir de células esplênicas</i>	20
<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	21
<i>Marcadores polimórficos para a caracterização das linhagens isogênicas</i>	23
<i>Marcadores polimórficos para as linhagens segregantes</i>	24
 RESULTADOS:	25
<i>Determinação do Grau de Susceptibilidade de diferentes linhagens:</i>	26
<i>Análise dos DNAs dos Animais Resistentes:</i>	31
<i>Análise do Genoma das Linhagens Parentais:</i>	31
<i>Distribuição Parental dos Animais Segregantes:</i>	33
 DISCUSSÃO	34
 CONCLUSÕES:	42
 RESUMO:	44
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	46
 APÊNDICE:	55

-Introdução

INTRODUÇÃO:

A Doença de Chagas é uma infecção generalizada, de natureza endêmica e evolução essencialmente crônica, causada por um protozoário hemoflagelado da Família Tripanosomatidae - *Trypanosoma cruzi*. Foi descrita por Carlos Chagas em 1909 decorrente de uma epidemia de paludismo ocorrida na cidade de Lassance, norte do Estado de Minas Gerais - Brasil.

Sabe-se que a doença de Chagas representa um problema sócio-econômico que pode ser diminuído pelas melhorias das condições habitacionais e de educação sanitária das populações (POWELL & WASSOM, 1993). Como tentativa de eliminar o vetor animal a Organização Mundial de Saúde (OMS) e diferentes órgãos de Saúde Pública da América Latina e em particular do Brasil, vem investindo em programas de prevenção da doença para o extermínio do vetor nas regiões endêmicas através de controles químicos e biológicos. A OMS estima de 16 `a 18 milhões o número de indivíduos infectados na América Latina, permitindo uma população de risco em torno de 90 milhões de pessoas (MONCAYO-MEDINA, 1987).

No Brasil ocorre uma grande migração da população de zonas rurais para zonas urbanas modificando as distribuições zoogeográficas da endemia, com um aumento do número de indivíduos portadores ao redor das grandes cidades. Além disso, a contaminação por transfusão sangüínea tem sido um novo problema na área da saúde na América Latina. Foram descritos casos de doença de Chagas em fase aguda também nos Estados Unidos da América do Norte e Canadá por condições transfusionais em indivíduos imunossuprimidos (GRANT *et al.*, 1989 ; NICKERSON *et al.*, 1989).

O parasita é habitualmente transmitido ao homem e a mamíferos selvagens como o Tatú e o Gambá habitualmente através de um inseto hematófago, da Família

Reduviidae, Ordem Kinetoplastida, podendo-se citar os gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, *Diptalogaster* dentre os mais comuns, a depender da região infestada pelo inseto. Durante seu ciclo evolutivo apresentam três formas distintas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, assim denominadas pela presença ou não de flagelo. Em seguida à penetração, através da pele lesada no ato da picada, as formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* entram na circulação assumindo o seu habitat intracelular no hospedeiro vertebrado. Apesar do *T. cruzi* ser essencialmente um parasita intracelular, ele é encontrado na circulação sangüínea e nos fluídos tissulares.

Os parasitas multiplicam-se dentro de macrófagos adquirindo a forma de amastigotas. A lise dessas células libera as formas tripomastigotas na circulação sangüínea. Nesse estágio estas formas poderão ser transferidas a outro inseto que ingira o sangue do hospedeiro infectado e irão diferenciar-se dentro do tubo digestivo do inseto na forma de epimastigotas. Uma grande proporção das formas parasitárias diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas infectantes e o ciclo poderá recomeçar. No homem os parasitas circulantes são raros no decorrer da doença, a não ser na fase de parasitemia que ocorre entre o 7º e o 14º dia (ANDRADE & ANDRADE, 1955)

Sendo o *T. cruzi* um parasita intracelular que caracteriza-se pela destruição de tecido liso do músculo cardíaco e/ou do sistema digestivo (esôfago e intestino), e tendo seu ciclo de vida extremamente complexo, tentou-se estabelecer uma correlação entre a cepa do parasita e a patologia da doença. O maior número possível de caracteres foram considerados para a padronização das cepas do *T. cruzi*, como o tropismo tissular, a virulência, a morfologia do parasita e os tipos de lesões histopatológicas provocadas no hospedeiro (ANDRADE & ANDRADE, 1966).

Diferentes cepas do *T. cruzi* tais como a “Y” (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953), “CL” (BRENER & CHIARI, 1963), “Berenice” (CHAGAS, 1909), entre outras cepas, possuem características que diferem umas das outras. Estudando a ação tissular, observaram que a cepa “Y” tende a parasitar as células do sistema mononuclearfagocítico e o miocardio sendo altamente virulenta. Em relação à morfologia da cepa, esta apresenta formas delgadas, com cinetoplasto bastante afastado da extremidade posterior, flagelo curto, núcleo de localização mediana e alongado. A mensuração do parasita foi estimada em 22,6 μ , observada por BRENER & CHIARI, 1963.

Além das lesões histopatológicas fundamentais inerentes a todos os processos inflamatórios de origem parasitária, KÖEBERLE (1968) demonstrou que não são as proteínas do parasita que determinam o estado alérgico, mas sim a neurotoxina liberada após a desintegração das leishmanias destruindo o sistema nervoso periférico. Nos protozoários da classe Flagellata a ação patogênica exercida pelo *T. cruzi* está ligada diretamente à sua enorme capacidade de multiplicação. Por outro lado, os parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* atuam freqüentemente como antígenos, dando lugar à formação de anticorpos de natureza variada (ORTIZ, 1985).

Provavelmente, no decorrer da história evolutiva, o parasita tenha desenvolvido os mecanismos de escape ao sistema de defesa do hospedeiro definitivo para evitar a lise pelo complemento. As formas epimastigotas não infectantes, desenvolvidas no inseto, são extremamente sensíveis ao sistema lítico do complemento do hospedeiro vertebrado. Por outro lado, as formas metacíclicas infectantes são resistentes à lise pelo complemento. O *T. cruzi* secreta uma hemolisina ativa a um pH ácido capaz de formar um poro na membrana celular. Com uma elevação do pH inativa a hemolisina e impede a saída do parasita do fagossomo (ANDREWS & WHITLOW, 1988). Foi mostrado que esta hemolisina purificada assemelha-se imunologicamente ao C9 humano e

também com a perforina de camundongos. Esta proteína conduz à formação de poros na membrana em pH ácido, sendo responsável pelo escape do parasita do fagossomo, podendo ser envolvida na patologia da fase crônica da doença provocando severas miocardites, megaesofagos e megacólon. Além desses mecanismos outras características do parasita, como a formação do complexo antígeno-anticorpo de superfície “capping” e posteriormente o “shedding” , que é a expulsão dos complexos formados, contribuem para a sua sobrevivência no hospedeiro infectado, impedindo a ativação do sistema lítico da resposta imune, sendo conhecido como mimetismo molecular do parasita (HONTEBEYRIE-JOSKWICZ, 1991). Em estudos particularmente em mamíferos as respostas celular e humoral do organismo do hospedeiro são complexas devido a especificidade dos antígenos tripanossomais com relação aos mecanismos vinculados ao sistema complemento, sabe-se que as aves não desenvolvem a infecção pelo parasita por possuírem uma intensa atividade lítica do complemento sendo capaz de lisar as formas tripomastigotas *in vivo* imediatamente após a sua inoculação (TEIXEIRA, 1980).

Pode-se caracterizar duas fases da doença de Chagas a - *fase aguda* -, correspondendo ao desenvolvimento do parasita, caracterizada pela infecção generalizada (febre, astenia, adenopatia, esplenomegalia, entre outros sintomas) e a - *fase crônica* - evidenciada pela diminuição significativa do número de parasitas circulantes e por apresentar infiltrados inflamatórios granulomatosos, preferencialmente nos músculos cardíaco e esquelético e no sistema nervoso periférico (cardiopatias, mega-síndromes do esôfago e cólon). No homem, caracteriza-se por uma cardiopatia responsável por morte súbita, representando um grande número de casos de cardiopatias na América do Sul. A patologia tardia é atribuída à destruição do tecido cardíaco e/ou nervoso, pelas reações imunes e, mais recentemente, pelas auto-imunes (ANDRADE & ANDRADE, 1979).

Vários pesquisadores nos últimos anos demonstraram convincentemente que as células T possuem um papel importante na doença de Chagas experimental, através do controle da parasitemia mediada por linfócitos CD4⁺ e / ou CD8⁺ durante a fase aguda da infecção. Células T CD4⁺ e / ou CD8⁺ podem contribuir para promover a doença crônica (MINOPRIO *et al.*, 1987; TARLETON, 1990; RIBEIRO dos SANTOS *et al.*, 1991 e SUN, J. & TARLETON, R.L., 1993). Para explorar a participação da imunidade mediadas por células foram estudados diferentes órgãos linfóides de camundongos com o objetivo de caracterizar as interações regulatórias do sistema imunológico (CAMARGO *et al.*, 1991 e TARLETON, 1991). A ativação em larga escala de linfócitos ocorre depois da infecção precoce e é acompanhada por funções efetoras não específicas (MINOPRIO *et al.*, 1988 e MINOPRIO *et al.*, 1989). Em camundongos, as características de uma infecção auto-imune, ocorre por uma grande ativação policlonal de todas as populações linfocitárias, em particular de linfócitos T (CD4⁺ CD8⁺) ou linfócitos B (CD5⁺); também por uma hipergamaglobulinemia e um aumento de auto-anticorpos, em particular da classe IgG, ocorre uma hiper-expressão de antígenos da Classe II do complexo principal de histocompatibilidade murino; é também uma patologia representada por um grande número de infiltrados e com destruição dos tecidos na presença de linfócitos auto-reativos (MINOPRIO *et al.*, 1989 e MINOPRIO *et al.*, 1991). No caso da infecção por hemoflagelados, a resposta em camundongos vem sendo estudada para o desenvolvimento de modelos aplicáveis ao homem (HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, 1991).

A susceptibilidade a uma doença é usualmente um complexo traço genético. Estudos em humanos têm sugerido que fatores genéticos influenciam fortemente a resposta do hospedeiro à infecção por patógenos, podendo ser demonstrado em populações distintas susceptibilidade à infecções em áreas endêmicas decorrida de uma herança familiar. O desafio tem sido dessecar *in situ* o fenótipo monogenético, na funcionalidade ou na genética, entretanto isto é difícil de estudar em humanos, portanto

a herança genética e os mecanismos da resistência ou susceptibilidade tem sido analisados em modelos animais, usando linhagens de camundongos isogênicos (MALO & SKAMENE, 1994)

O modelo murino para a doença de Chagas experimental tem sido também largamente usado para estudos da fase aguda. Diferentes linhagens de camundongos isogênicos e heterogênicos têm sido empregadas para o entendimento da resistência natural ao *T. cruzi* (PIZZI *et al.*, 1949; KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976).

É conhecido que fatores ligados ao hospedeiro como idade (CULBERTSON & KESSLER, 1942) e o sexo (HAUSCHKA, 1947), influenciam na resistência. A variação da resistência em linhagens isogênicas de camundongos pode variar de altamente resistentes, como a linhagem C57BL/6, até altamente susceptíveis, como a linhagem A/J, isto ocorre também no homem sugerindo uma base genética para a resistência natural (MALO & SKAMENE, 1994)

Resistência e susceptibilidade são geralmente medidas por uma escala quantitativa, pelo tempo de sobrevivência ou pela densidade da patogenicidade da doença no organismo atingido. Em animais de laboratório o desafio é definir fases distintas da infecção. Linhagens resistentes e susceptíveis podem ser cruzadas na caracterização do modelo de herança envolvida. Se a resistência a um patógeno é atribuída a alelos de um único locus, linhagens recombinantes de camundongos isogênicos ("recombinant inbred strains"- RIS) são criadas a partir de linhagens parentais resistentes e susceptíveis. Em particular RIS derivadas de cruzamentos recíprocos entre linhagens de camundongos isogênicos A/J e C57BL/6 apresentam um valioso modelo para análise de susceptibilidade e resistência para muitas doenças infecciosas, causadas por vírus, bactérias ou protozoários. Isto tem sido útil na identificação dos genes através de estudos dos cromossomos destes modelos (MALO & SKAMENE, 1994).

Fatores genéticos do hospedeiro e do parasita são importantes no desenvolvimento de várias doenças. TRISCHMANN, 1978 estudou a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) em nove linhagens de camundongos isogênicos: C57BL/10, DBA/1, SJL, BALB/c, CBA, AKR, C3H/He, DBA/2 e A tentando verificar se existe relação entre o grau de resistência à cepa Brazil do *T. cruzi* e alguma população de células linfóides. Os linfócitos da linhagem C57BL/10 foram depletados por irradiação, por inoculação de sílica via intraperitonal impedindo a ação de macrófagos e uma esplenectomia também foi feita nos camundongos. Desafiaram com *T. cruzi* obtendo como resultado uma alta parasitemia, sugerindo que a resposta imune celular tem um papel no controle da parasitemia. Um outro experimento foi feito usando BALB/c nude, também desafiados com a cepa Brazil, demonstrando que os animais apresentavam uma alta parasitemia reforçando a relação timo-dependente na resposta celular. TRISCHMANN & BLOOM, 1982 demonstraram que a existência de linhagens resistentes e susceptíveis à infecção por *T. cruzi* sugere bases genéticas para a resistência natural a este parasita, tendo uma influência de múltiplos genes. Os autores mostraram que o locus H-2 do camundongo não é o determinante primário da resistência, embora não possa ser descartada sua participação numa resposta secundária.

Estudos sobre a genética da resistência enfocam a influência dos locus H-2 de haplótipo *k* na susceptibilidade da linhagem de camundongos C3H/An, e do haplótipo *b* na resistência da linhagem C57BL/10 verificadas pela taxa de mortalidade na infecção pelo *T. cruzi* (TRISCHMANN & BLOOM, 1982). Outros experimentos comprovam que linhagens de camundongos que expressam um “background” genético de C57BL/10 e o haplótipo H-2^{d, q ou y2} são resistentes à infecção pela cepa Brazil do *T. cruzi*, enquanto aqueles que expressam o haplótipo H-2^k são susceptíveis (POWELL & WASSON, 1993).

Em experimento com híbridos (C3H/An X C57BL/6) também foi verificado que os animais eram mais resistentes que os parentais, sendo que aqueles de haplótipo H-2^k e H-2^{k/b} eram mais susceptíveis que aqueles de haplótipo H-2^b. O cruzamento entre duas linhagens susceptíveis C3H/An e A/J originou híbridos F1 mais resistentes que os parentais. Quando cruzadas duas linhagens resistentes DBA/J e C57BL/6J foi observado 100% de sobrevivência em F1 e 99% em F2. Isto demonstra não ocorrer a heterogenicidade totalmente em F2, sugerindo que diferentes genes afetam a resistência nessas linhagens parentais (TRISCHMANN & BLOOM, 1982).

Linhagens de camundongos foram classificadas de acordo com sua parasitemia quando desafiadas com cepa Peru, segundo WRIGHTSMAN *et al.*, 1982. Desse modo as linhagens utilizadas apresentaram características de susceptibilidade em C3H/HeJ, BALB/c e CBA/N, consideradas de alta parasitemia e as linhagens C57BL/6 e DBA/2J denominadas de baixa parasitemia. Experimentos com híbridos provenientes do acasalamento das linhagens citadas mostraram que a baixa parasitemia era hereditária, sugerindo que esse grau de resistência é dominante.

Estudos abordando o envolvimento dos genes do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e a produção de anticorpos, entre outros, estão sendo relacionados com o grau de resistência ou susceptibilidade observada em diferentes linhagens de camundongos. Para que se possa estudar a resistência ao *T. cruzi* em linhagens de camundongos isogênicos resistentes e susceptíveis, dispomos de algumas técnicas largamente utilizadas para o mapeamento gênico do camundongo utilizado com modelo.

O mapa genético é uma representação gráfica do arranjo linear dos genes localizados nos cromossomos com uma estimativa da distância entre os mesmos. O

estabelecimento de cada mapa, não importando a espécie, é baseado no fato de que os genes são posicionados ao longo do comprimento do cromossomo. Em caso de cruzamento, a probabilidade para dois genes serem separados por um cross-over define a distância que os separa. Isto é refletido na seleção de uma unidade no mapa, o centiMorgan (cM), é a distância entre dois loci com 1 % de chance de produzir uma recombinação de gametas depois de uma meiose (GUÉNET & MONTAGUTELLI, 1994).

O estabelecimento do mapa de camundongos iniciou-se em 1915 quando foi descrito uma mutação responsável pelo albinismo - locus (*C*) e geneticamente associada a outra mutação implícita dentro da coloração da pelagem, a mutação *pink eyes* - locus (*P*) (GUÉNET & MONTAGUTELLI, 1994). Até 1991 mais de 1600 genes já haviam sido localizados dentre os 2500 que já foram identificados em 19 autossomos e os cromossomos sexuais X e Y (GUÉNET, 1991). Em humanos a densidade de marcadores está em torno de 800 genes mapeados, podendo ser considerados como “homólogos” aos de camundongos, tendo uma mesma função ou codificando seqüências semelhantes do DNA (GUÉNET, 1995).

A partir de 1980 começaram os estudos sobre os fragmentos generalizados de amostras de DNA de diferentes organismos que exibiam polimorfismo na presença de endonuclease de restrição. Essas amostras eram submetidos a eletroforese, revelados em gel de agarose e identificados por uma hibridização. Mais recentemente outras técnicas têm sido descritas e que baseiam-se também na análise da variação estrutural ao nível do DNA. A mais avançada e vantajosa é o método de PCR (“polymerase chain reaction”), pois requer uma quantidade pequena de DNA permitindo a amplificação do fragmento desejado em poucas horas (GUÉNET & MONTAGUTELLI, 1994).

PCR é um método *in vitro* de sintetizar ácidos nucleicos pelo qual um segmento particular de DNA pode ser replicado especificamente. Isto envolve dois “primers”, que são seqüências conhecidas de nucleotídeos, que ladeiam o fragmento de DNA que será amplificado em ciclos repetidos de alta denaturação do DNA, pareamento dos “primers” com as seqüências complementares na presença da enzima DNA polymerase. O resultado é um acúmulo exponencial de um específico fragmento, aproximadamente 2^n , onde n é o número de ciclos da amplificação. O gene da β -globina humana foi a primeira seqüência de DNA amplificada por PCR (SAIKI *et al*, 1985). A alta especificidade do método juntamente com a presença da enzima termoestável *Taq* DNA polymerase, purificada a partir de uma bactéria *Thermus aquaticus*, permite dizer que é um método ideal para isolar fragmentos do genoma. A utilização do método tem várias aplicabilidades como - Diagnóstico de desordens genéticas; - Detecção de seqüências de ácidos nucleicos de organismos patogênicos; - Identificação genética de indivíduos; - Análise de mutações de oncogenes ativados; - Geração de seqüências específicas de DNA de dupla fita para uso em probes; - Geração de probes específicos para gene não clonados por amplificação seletiva de seguimentos particulares de cDNA; - Geração de bibliotecas de cDNA a partir de pequenas quantidades de mRNA; - Geração de grandes quantidades de DNA para seqüenciamento; - Análise de mutações (deleções, inserções e estudo de mutações pontuais); - Exploração de seqüências de DNA contíguas para uma seqüência conhecida de DNA (SAIKI *et al*, 1985; SAMBROOK, FRITSCH & MANIATS, 1989; LOVE *et al.*, 1990; GUÉNET, 1991; MONTAGUTELLI, SERIKAWA & GUÉNET, 1991; GUÉNET & MONTAGUTELLI, 1994).

O mais conhecido uso do PCR é amplificar pequenas seqüências, menos de 300 pb (pares de bases) em geral, cujo polimorfismo pode ser confirmado pelo comprimento ou pela sua própria seqüência, e revelados em gel de agarose após eletroforese. A seqüência exibindo o comprimento do polimorfismo é denominada

“microsatélites” (marcador polimórfico) que são compostos de repetições curtas de 1 a 4 bases: $(T)_n$, $(CA)_n$, $(CT)_n$, $(CAG)_n$, etc., onde T, C, A e G representam respectivamente os nucleotídeos Timidina, Citosina, Adenina e Guanina. Estes microsatélites são considerados marcadores polimórficos moleculares ideais porque são usualmente encontrados numa região não codificada e portanto diferentes, não alterando o fenótipo. Tem aproximadamente 10^5 cópias com repetições de C-A (Citosina-Adenina), distribuídos ao longo do genoma podendo processar um grande número de DNAs polimórficos (GUÉNET, 1991).

Através de estudos sobre a localização dos genes da resistência em hospedeiros resistentes e susceptíveis à doenças causadas por agentes infecciosos, esta pesquisa buscou contribuir para uma análise genética da doença de Chagas, através das informações da localização da resistência hereditária, produzindo um modelo que contribua para a compreensão da interação parasita - hospedeiro.

Tendo o conhecimento do parasita e sua patologia, a disponibilidade de linhagens de camundongos para a produção de animais segregantes entre as linhagens resistente e susceptível, possibilitou-nos triar o mapa genômico do camundongo, na procura por determinar regiões que confirmam a resistência ao modelo utilizado.

- **Objetivos**

OBJETIVOS:

Tendo em vista a possibilidade de utilizar animais controlados genética e sanitariamente, e uma cepa virulenta do parasita livre de vírus murino, este trabalho teve como principal objetivo contribuir para uma análise genética da resistência à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* através da:

- Determinação do grau de susceptibilidade ao *Trypanosoma cruzi* em diferentes linhagens isôgenicas de camundongos mantidas em condições controladas de modo a evitar a interferência de patógenos naturais;
- Produção de híbridos entre as linhagens resistente e susceptível verificando a resistência em F1 e nos animais segregantes F2;
- Identificação entre os animais resistentes, do(s) cromossomo(s) nos quais estaria ocorrendo uma maior frequência de genes do parental resistente.

- Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS:

Animais:

Os animais usados para os experimentos foram obtidos da Colônia de animais SPF (Specific Pathogen Free) do Centro de Bioterismo - CEMIB/UNICAMP, Campinas/ São Paulo. Os animais provenientes deste Centro são mantidos desde 1987 tendo amostras de animais testadas há cada 2 meses para ectoparasitas, endoparasitas, bactérias patogênicas e vírus, apresentando resultados negativos. Durante a fase de experimentação animais sentinelas foram mantidos juntamente com os animais em experimento, testados utilizando metodologia indicada por GILLIOLI *et al.*, 1996, os quais permaneceram negativos.

A idade dos animais na fase da inoculação variou entre 8 a 12 semanas de ambos os sexos. Foram utilizados os parentais C57BL/6 e CBA, para a obtenção das linhagens híbridas (C57BL/6 x CBA) F1, e (CBA x C57BL/6) F1 representadas pelas respectivas siglas **(B6C)F1** e **(CB6)F1**; bem como as linhagens C57BL/6 e A/J para a obtenção de (C57BL/6 x A/J) F1, e (A/J x C57BL/6) F1 representadas pelas respectivas siglas **(B6A)F1** e **(AB6)F1**. As linhagens híbridas foram acasalados para a produção das linhagens segregantes (C57BL/6 x A/J) F2 e (A/J x C57BL/6) F2, sendo também denominadas com as respectivas siglas **(B6A)F2** e **(AB6)F2**. Foi utilizada a terminologia internacional para o experimento, na qual a primeira linhagem listada representa o membro materno do cruzamento.

Parasita:

Foi utilizado o estoque Y_{2Tc} (RANGEL *et al.*, 1994), parasitas da cepa “Y” original que foram semeados em cultura de células LLCMK2, repicados por dez vezes consecutivas, sendo em seguida inoculados 10⁵ tripomastigotas sangüícolas em camundongos SPF da linhagem CBA/J mantidos em unidades isoladoras do tipo Trexler. As formas tripomastigotas sangüícolas foram obtidas através do sangramento pelo plexo braquial de camundongos da linhagem CBA, durante o pico parasitêmico (em torno do 7º dia após a infecção) sendo coletado em solução estéril de citrato de sódio à 3,8 %. O número de parasitas foi determinado pelo método modificado de BRENER, 1968. Os camundongos inoculados com o estoque do parasito apresentaram resultados negativos na pesquisa por “Mouse Antibody Production Test” (Map test), para qualquer dos vírus murinos indicados por GILLIOLI *et al.*, 1996.

Infecção Experimental:

Grupos de animais foram inoculados por via intraperitonal com diferentes doses do parasita partindo de 1, 10, 10², 10³, 10⁴ e 2 x 10⁵ formas do *T. cruzi* do estoque Y_{2Tc}, conforme indicações presentes nos resultados. A infecção foi monitorada através de parasitemias diárias e a mortalidade acompanhada por um período de 30 dias a depender da dose do inóculo do parasita. No caso dos animais (AB6) F2 e (B6A) F2 esses receberam marcação auricular antes da infecção para que pudessemos acompanhá-los, sendo os animais susceptíveis (S) sacrificados *in extremis* e os resistentes (R), após 45 dias de observações. Os baços dos animais sacrificados F2 foram congelados e armazenados em “container” de Nitrogênio líquido até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA a partir de células esplênicas:

O DNA das células esplênicas foi extraído segundo o método descrito por MONTAGUTELLI *et al.*, 1991.

A técnica consiste em macerar o baço com 2 ml de PBS esteril. Nesta suspensão de células esplênicas adicionou-se 2 ml de tampão TRIS/HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 1% pH 8,0, e as amostras foram incubadas em banho-maria à 55° C por 1 hora. Após este período adicionou-se 80 µl de Proteinase K (20 mg/ml) nas amostras e essas incubadas à 55° C por toda a noite. Uma alíquota de 100 µl de RNase (10 mg/ml), foi acrescentada e incubada à 37° C por 30 minutos.

Após o período de incubação foram adicionados 4 ml de uma solução fenólica em tampão TRIS 0,5 M pH 8,0 em cada tubo (V/V); agitado, lentamente, por 15 a 20 minutos no agitador de bandeja, e centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4° C. Ao sobrenadante foram adicionados 4 ml da solução fenólica, agitado por 15 a 20 minutos no agitador de bandeja, lentamente, centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos. Foram acrescentados 2 ml da solução fenólica e 2 ml de clorofórmio diluído em álcool isoamílico ao sobrenadante, agitado por 30 minutos a 1 hora e centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 4 ml de clorofórmio diluído em álcool isoamílico. Novamente agitou-se por 15 a 20 minutos e centrifugou-se à 3000 rpm por 15 minutos.

Após a centrifugação, o DNA extraído foi dialisado, à 4° C por 48 horas com uma troca de tampão TRIS 10mM e EDTA 0,5 mM pH 8,0 durante toda a noite mantidos sob agitação. Utilizou-se na diálise a relação 1 ml de solução de DNA para 100 ml de tampão de diálise.

Para a determinação do grau de pureza, as amostras do DNA foram diluídas na relação 1/50 em água destilada e as concentrações obtidas através da relação

260 / 280 nm de absorbância, as quais ficaram entre 1,8 e 2,0 µg/ml. (SAMBROOK *et al.*, 1989).

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”):

O método de PCR foi realizado segundo as indicações fornecidas por LOVE *et al.*, 1990 e INNIS & GELFAND, 1990. A técnica compreende três fases: Denaturação, Pareamento e Polimerização que constitui um ciclo. A reação total de PCR perfaz de 35 a 40 ciclos.

O utilização desse método é devido a vantagem de replicar *in vitro* uma pequena quantidade de DNA em poucas horas, denaturando o duplo filamento de DNA, através da elevação da temperatura quebrando as ligações que mantém unidas as cadeias. Após a denaturação ocorre pareamento de bases nitrogenadas denominadas de “primers”, ou marcadores polimórficos, que são seqüências conhecidas de nucleotídeos que ladeiam o fragmento de DNA que será amplificado em ciclos repetitivos. A fase de pareamento das bases é dependente da temperatura da reação e concentrações de sais presentes no meio, principalmente o MgCl₂. A concentração de íons magnésio livres na solução dará a especificidade de cada “primer” utilizado. Usa-se nessa fase temperatura de 55° C por 1 minuto, podendo ser variada pelo comprimento e concentração do “primer” utilizado. A temperatura é reduzida levando os elementos primários a unirem-se a uma das extremidades da cadeia alvo.

A enzima *Taq* polimerase desencadeia a formação de novas cadeias de DNA a partir dos nucleotídeos presentes na reação. Quando a temperatura é novamente elevada, as novas cadeias separam-se e o processo reinicia. Nessa fase ocorre a réplica do fragmento de DNA igual ao original do “primer” que foi utilizado. Sendo o tempo

de duração do ciclo importante para a duplicação do fragmento. A repetição da reação aumenta exponencialmente a quantidade de DNA.

A reação de PCR foi efetuada segundo o método de MONTAGUTELLI *et al.*, 1991, onde 20 ng/μl das amostras do DNA foram acrescidas a 25 μl da mistura de TRIS 200 mM pH 8,4 ; KCl 1 M ; Tween 20 2% ; dNTPs 4 mM; *Taq* Polimerase (Amersham) 5,0 U/ μl ; “primers” 500 μg /ml. A concentração de íons Magnésio foi ajustada para 20,40,60,80 mM de acordo com a titulação preliminar do “primer” a ser usado, seguindo a descrição por LOVE *et al.*, 1990.

Após a homogenização dos reagentes em Vortex, procedeu-se a aplicação em placas de microtitulação (Falcon 3911), e cada orifício foi coberto com óleo mineral (Sigma) para não ocorrer evaporação das amostras no processo da obtenção do produto de PCR. As amostras foram submetidas a amplificações em aparelho Termociclor LEP PREM III TM, segundo as condições abaixo citadas:

Primeiro ciclo ocorre à 94°C por 3 minutos. A partir do segundo ciclo a reação se processa dentro do seguinte esquema: 94°C por 1 minuto e 30 segundos; 55°C por 1 minuto (a temperatura de 55°C pode ser variada a depender do “primer” que está sendo utilizado na reação e da concentração de íons magnésio) e 72°C por 30 segundos. Este ciclo é repetido por 38 vezes. Finalizando a amplificação do fragmento de DNA a temperatura usada foi de 72°C por 3 minutos, e abaixando para 4°C no final dos ciclos. Após o término do PCR, colocou-se em cada orifício 2,5 μl de Azul de Bromofenol (1/10 do volume).

A análise dos produtos do PCR foi realizada utilizando-se a eletroforese em gel de agarose 4 %, Agarose Nusieve (3%) e Agarose Sigma Tipo II (1%) , em tampão Tris Acetato 10 mM , 2 mM EDTA pH 8,0 e 9,0 μl de Etileno Bromide; o mesmo tampão foi usado para a corrida, aplicando-se à 100 Volts por 45 a 70 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989). A leitura da banda de migração do DNA amplificado foi

realizado em aparelho de Ultra Violeta e fotografadas em câmara polaróide para análises posteriores.

Marcadores polimórficos para a caracterização das linhagens isogênicas:

Os marcadores listados a seguir são polimórficos para as linhagens C57BL/6, BALB/c, A/J, DBA/2 , CBA e C3H/He. Esses Marcadores polimórficos foram utilizados para a análise do genoma das linhagens parentais.

Tabela 1: Marcadores Polimórficos utilizados para discriminar as linhagens parentais

CROMOSSOMO	“primer” (locus)	cM
1	(# 119) <i>Crp</i>	72 cM
3	D3 Mit 49	31,5 cM
7	(# 19) <i>Ngfg</i>	22 cM
12	(# 134) <i>Igh</i>	73 cM
14	(#29) <i>Plau</i>	1 cM
16	D16 Mit 5	34,3 cM
17	D17 Mit 16	7,5 cM

cM= centiMorgans: unidade representativa da distância do locus até o centrômero.

Marcadores polimórficos para as linhagens segregantes:

Foram utilizadas as informações de DIETRICH *et al.*, 1994, para a escolha de marcadores que apresente polimorfismo entre as linhagens A/J e C57BL/6. Este polimorfismo é dado pela diferenciação do número de pares de base amplificados, após a reação de PCR. Os marcadores utilizados para as ampliações do DNA dos animais F2 estão apresentados na Tabela II cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Jean Louis Guénet do Laboratório de Genética de Mamíferos do Instituto Pasteur de Paris.

Tabela II: Marcadores Polimórficos utilizados na presente investigação

CROMOSSOMO	"primer" / cM (locus)	Nº PARES DE BASE A/J / C57BL/6
1	D1Mit3 / 8,16 cM	185 / 160
	D1Mit7 / 42,84 cM	122 / 105
2	D2Mit7 / 25,62 cM	144 / 147
4	D4Mit14 / 67,32 cM	
	D4Mit15 / 33,33 cM	
	D4Mit37 / 48,18 cM	
	D4Mit89 / 17,49 cM	
8	D8Mit4 / 12,54 cM	200 / 157
10	D10Mit14 / 64,64 cM	182 / 192
13	D13Mit13 / 26,1 cM	138 / 148
15	D15Mit5 / 18,2 cM	114 / 98
16	D16Mit4 / 26,64 cM	147 / 132
	D16Mit5 / 34,32 cM	132 / 156
19	D19Mit1 / 41,86 cM	142 / 121
	D19Mit10 / 34,06 cM	194 / 152
	D19Mit19 / 23,92 cM	116 / 142
	D19Mit40 / 17,94 cM	102 / 112
	D19Mit42 / 1,87 cM	184 / 178
	D19Mit56 / 1,87 cM	130 / 139
	D19Mit59 / c	139 / 199

cM= centiMorgans: unidade representativa da distância do locus até o centrômero; c= está localizado na região do centrômero. **Nota:** Encontram-se descritos no Apêndice alguns marcadores polimórficos entre as linhagens A/J e C57BL/6 e o mapeamento dos cromossomos analisados nessa pesquisa.

-Resultados

RESULTADOS:

Determinação do Grau de Susceptibilidade de diferentes Linhagens:

Os dados da tabela III mostram que as linhagens C57BL/6 e CBA iniciaram mortalidade quando inoculadas com dose igual ou superior a 10^4 parasitas, enquanto que as linhagens A/J e C3H/He apresentaram alto índice de mortalidade quando inoculadas na dose igual ou inferior de 10^2 formas de *T.cruzi*. Em vista desses resultados as linhagens C57BL/6 e CBA foram consideradas resistentes e as linhagens A/J e C3H/He, susceptíveis. Entre as linhagens resistentes e susceptíveis não houve diferenças significativas no nível da parasitemia. O nível do pico de parasitemia situou-se em torno do 7º ao 9º dia e o número de parasitas circulantes foi $\log 4,7 \pm 0,3$ a $5,8 \pm 0,2$ parasitas /ml a depender da dose inoculada. O dia do pico e o dia da mortalidade foram inversamente proporcionais a dose empregada. Pode-se observar que duas linhagens CBA e C3H/HeP com o mesmo haplótipo apresentam posições polares não havendo portanto relação entre a resistência ou susceptibilidade do animal e o haplótipo H-2 neste caso.

Tabela III: Níveis de Parasitemia e Mortalidade de Diferentes Linhagens de Camundongos desafiados em diferentes doses do estoque Y_{2TC}

LINHAGEM	H-2*	N	DOSE	D.PICO	LOG(N+1)	DMM	% M
C57BL/6	b	5	10^4	7	$4,7 \pm 0,3$	>30	0
		5	10^5	7	$5,0 \pm 0,4$	>30	0
		5	2×10^5	4	$5,0 \pm 0,3$	$12,6 \pm 2,7$	60
CBA	k	5	10^3	8	$5,4 \pm 0,2$	>30	0
		5	10^4	7	$5,6 \pm 0,2$	$12,7 \pm 0,5$	60
		5	10^5	7	$5,8 \pm 0,2$	$13 \pm 1,0$	80
A/J	a	5	1	11	$4,6 \pm 0,5$	>30	0
		5	10^1	9	$5,0 \pm 0,5$	$23 \pm 1,0$	80
		5	10^2	8	$5,6 \pm 0,3$	$19 \pm 0,2$	100
		5	10^3	7	$5,4 \pm 0,3$	$16 \pm 1,0$	100
C3H/HeP	k	5	10^1	12	$5,6 \pm 0,3$	$16 \pm 3,0$	60
		4	10^2	12	$5,6 \pm 0,2$	$23 \pm 6,0$	75
		5	10^3	9	$5,6 \pm 0,2$	$18 \pm 0,0$	100

N = Número de animais usado no experimento; D PICO = Dia do Pico de Parasitemia; Log (N+1)= Logaritmo de (N+1) onde N é o número de parasitas/ml ; DMM = Dia Médio de Morte; % M = Porcentagem de Mortalidade; * = Haplótipo H-2 do CPH (Complexo de Histocompatibilidade Maior do Camundongo).

Considerando que na experiência anterior, quando utilizada uma dose de 10^5 formas tripomastigotas sangüícolas os animais puderam ser discriminados em resistentes e susceptíveis. Procuramos investigar o comportamento dos híbridos (AB6) F1, (B6A) F1, (CB6) F1 e (B6C) F1 frente a esta dose para verificar se o caráter da resistência é dominante ou susceptível. Os dados da tabela IV mostram que houve mortalidade entre os híbridos (AB6) F1, (B6A) F1 e que 100% dos animais (CB6) F1 e (B6C) F1 sobreviveram. Os resultados mostram também que apresentaram pico de parasitemia entre o 5º e 6º dia com nível de parasitas circulantes entre $\log 5,4 \pm 0,4$ e $5,8 \pm 0,3$.

Tabela IV: Determinação do Grau de Susceptibilidade dos Híbridos (C57BL/6 x CBA) F1 , (CBA x C57BL/6) F1 , (C57BL/6 x A/J) F1 e (A/J x C57BL/6) F1

HÍBRIDOS	N	DOSE	D.PICO	LOG(N+1)	DMM	% M
(AB6) F1	5	10^5	5	$5,8 \pm 0,3$	$12 \pm 0,0$	20
(B6A) F1	5	10^5	6	$5,7 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	100
(B6C) F1	5	10^5	6	$5,4 \pm 0,3$	>30	0
(CB6) F1	5	10^5	5	$5,4 \pm 0,4$	>30	0

N = Número de animais usado no experimento; D PICO = Dia do Pico de Parasitemia; Log (N+1)= Logaritmo de (N+1) onde N é o número de parasitas/ml ; DMM = Dia Médio de Mortalidade; % M = Porcentagem de Mortalidade

Os dados apresentados na tabela IV sugeriram que poderia haver uma diferença entre os híbridos (AB6) F1 e (B6A) F1. Por esta razão utilizamos um número maior de animais, duas doses diferentes do parasita e também a observação quanto ao sexo para investigar o comportamento desses híbridos.

Os dados da tabela V mostram que quando se utiliza 10^4 formas Y_{2Tc} há uma nítida influência do fator sexo no nível de mortalidade tanto para (B6A) F1 como para (AB6) F1. Esta diferença de comportamento entre os sexos praticamente desaparece quando se utilizou uma dose 10 vezes superior. Pode-se observar que as fêmeas (B6A)F1 e (AB6) F1 em dose de 10^4 formas tiveram um nível de mortalidade igual ao parental C57BL/6 quando estudado na mesma dose.

Tabela V: Comportamento dos híbridos (AB6) e (B6A) F1 frente a diferentes doses do parasita.

HÍBRIDOS	N	SEXO	DOSE	DMM	% M
(AB6) F1	7	M	10^4	16±4,0	100
	6	F	10^4	>30	0
	7	M	10^5	17±5,5	71,4
	7	F	10^5	14,2±0,4	71,4
(B6A) F1	7	M	10^4	22±4,1	71,4
	8	F	10^4	>30	0
	6	M	10^5	17,5±4,0	50,0
	8	F	10^5	24±5,0	37,5

N = Número de animais usado no experimento; DMM = Dia Médio da Mortalidade;
% M = Porcentagem de Mortalidade

A análise do comportamento dos segregantes (AB6) F2 e (B6A) F2 (tabela VI) mostra que, de um modo geral, as fêmeas foram mais resistentes que os machos quando utilizadas as doses de 10^3 e 10^4 parasitas. Quando utilizada dose de 10^5 formas não sugerem diferenças significativas entre os machos e fêmeas. A depender da dose inoculada o pico de parasitemia variou entre o 8º e 9º dia da infecção com um log de $3,2\pm2,9$ à $5,6\pm0,3$ parasitas circulantes /ml. Os dados sugerem uma diferença de comportamento entre os segregantes (AB6) F2 e (B6A) F2 quanto aos machos, que em dose de 1000 formas de *T.cruzi* diferem na taxa de mortalidade, sendo mais resistentes os animais (B6A) F2.

Tabela VI: Grau de Susceptibilidade dos animais (AB6)F2 e (B6A)F2 ao *T.cruzi*

SEGREGANTES	N	SEXO	DOSE	D.PICO	LOG(N+1)	DMM	% M
(AB6)F2	9	F	10^3	8	$5,2\pm0,3$	$27,2\pm6,1$	22,2
	9	M	10^3	8	$5,3\pm0,2$	>30	0
	26	F	10^4	7	$4,7\pm0,3$	$22,8\pm2,9$	38,4
	24	M	10^4	8	$5,3\pm0,2$	$22,5\pm3,8$	58,3
	25	M	10^5	nd	nd	$19,7\pm2,7$	76
	22	F	10^5	nd	nd	$20,5\pm2,1$	72
(B6A)F2	14	F	10^3	9	$5,6\pm0,3$	$27,9\pm4,5$	21,4
	14	M	10^3	9	$5,3\pm0,4$	$23,5\pm6,7$	42,8
	24	F	10^4	6	$5,2\pm0,2$	$20,9\pm4,4$	33,3
	30	M	10^4	8	$3,2\pm2,9$	$18,9\pm5,5$	56,6
	21	M	10^5	nd	nd	$16,5\pm2,6$	95
	29	F	10^5	nd	nd	$17\pm3,5$	89

N = Número de animais usado no experimento; D PICO = Dia do Pico de Parasitemia; Log (N+1)= Logaritmo de (N+1) onde N é o número de parasitas/ml; DMM = Dia Médio de Mortalidade; % M = Porcentagem de Mortalidade; nd = não demonstrado.

Análise dos DNAs dos Animais Segregantes:

Análise do Genoma das Linhagens Parentais:

Para a análise do genoma dos parentais das linhagens de camundongos A/J e C57BL/6 e dos híbridos (A/J x C57BL/6) F1 foram utilizados os marcadores polimórficos indicados na Tabela I, que são também discriminantes para as demais linhagens de camundongos isogênicos que serviram como padrões comparativos. Usou-se o marcador de peso molecular ϕ X DNA/ HAE III, que define o número de pares de bases amplificados dos fragmentos de DNA a partir de 1353 até 72 pares de bases. Os resultados obtidos utilizando animais das linhagens C57BL/6, BALB/c, A/J, DBA/2, CBA e C3H/He da empresa francesa IFFA CREDO e as linhagens C57BL/6, A/J e híbridos (AB6) F1 oriundos da Colônia de Fundação do Centro de Bioterismo - CEMIB / UNICAMP, mostraram ser similares ao descritos na literatura para o tamanho dos fragmentos amplificados; comprovando assim que essas linhagens não apresentavam contaminação genética.

Na figura 1 está representada a eletroforese de produtos de amplificação dos fragmentos de DNA, para analisar as linhagens parentais usadas nesta pesquisa. A amplificação foi feita pelo método de PCR à 55° C sendo a concentração de íons magnésio de 1,5 mM usada para os seguintes marcadores: Cromossomo 1 (72 cM) locus (#119) *Crp*; Cromossomo 12 (73 cM) locus (#134) *Igh* e Cromossomo 3 (31,5 cM) D3 Mit 49. O marcador de peso molecular usado foi o ϕ X DNA/ HAE III. Para as linhagens parentais houve formação de banda de migração simples igual as linhagens-padrão e para o híbrido analisado encontrou-se a formação de bandas duplas que indicam a heterozigose representada pelos parentais.

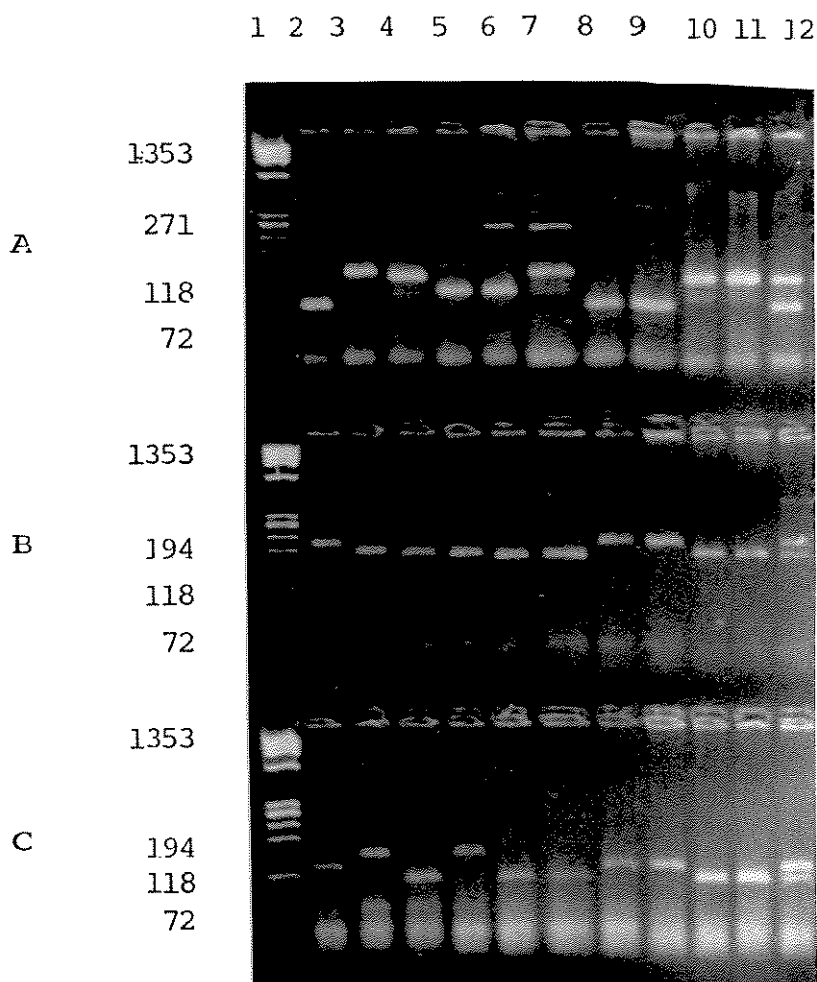


Fig. 1: Eletroforese dos produtos de amplificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose. A- Cromossomo 1, locus (#119) Crp (72 cM); B- Cromossomo 12, locus (#134) Igh (73 cM); C- Cromossomo 3, locus D3 Mit 49 (31,5 cM); Canais: 1 - ϕ X DNA/ HAE III; 2 - C57BL/6; 3 - BALB/c; 4 - A/J; 5 - DBA/2; 6 - CBA/J; 7 - C3H/He; 8 - C57BL/6; 9 - C57BL/6; 10 - A/J; 11 - A/J; 12 - (A/J X C57BL/6) F1. **Nota:** Os canais de números 02 a 07 contém as amostras provenientes da IFFA CREDO e nos canais de 08 a 12 representam os animais utilizados nesta pesquisa oriundos do CEMIB / UNICAMP.

Distribuição da frequência gênica parental nos animais segregantes:

Para efetuar os experimentos foram coletados baços dos camundongos resistentes e susceptíveis num total de 71 baços retirados, 33 eram provenientes de (B6A) F2 e 38 baços de (AB6) F2. Apenas os animais segregantes (AB6) F2 e (B6A) F2, que se mostraram resistentes ou susceptíveis às doses de 10^4 e 10^5 parasitas foram selecionados para o presente experimento. O DNA desses animais foi obtido segundo metodologia descrita em Materiais e Métodos e foram analisados com diferentes marcadores indicados na Tabela II. Para cada marcador polimórfico testados os parentais A/J e C57BL/6 apresentaram migração de banda simples A e B respectivamente e os heterozigotos banda dupla de migração correspondente aos parentais.

Os dados apresentados nas Tabelas VII, VIII, IX e X mostraram que não foi encontrado um aumento significativo da frequência gênica do parental C57BL/6 nos diferentes cromossomos estudados, entre eles os cromossomos 1, 2, 4, 8, 10, 13, 15, 16 e 19, escolhidos inicialmente por apresentarem polimorfismo entre as linhagens parentais A/J e C57BL/6 e por estarem a disposição no laboratório de Genética de Mamíferos do Instituto Pasteur de Paris por ocasião do desenvolvimento desta pesquisa.

Para cada marcador polimórfico testado está representado o locus correspondente, sua distância no cromossomo; a totalização de animais usados, e a frequência gênica expressada através das amostras de DNA das linhagens segregantes.

Tabela VII: Frequência dos padrões eletroforéticos A, B, ou AB nos produtos amplificados por PCR com DNA de camundongos da linhagem (C57BL/6 X A/J) F2 Resistentes.

LOCUS	DISTÂNCIA	N	FREQUÊNCIA		
			A	AB	B
D1 Mit 3	8,16 cM	19	4	10	5
D1 Mit 7	42,84 cM	19	2	11	6
D2 Mit 7	25,62 cM	18	4	12	2
D4 Mit89	17,49 cM	4	1	2	1
D4 Mit 15	33,33 cM	4	1	0	3
D4 Mit 14	67,32 cM	4	0	4	0
D8 Mit 4	12,54 cM	nr			
D10 Mit 14	64,64 cM	4	0	1	3
D13 Mit 13	26,10 cM	4	1	2	1
D15 Mit 5	18,20 cM	4	0	3	1
D16 Mit 4	26,64 cM	4	3	0	1
D16 Mit 5	34,32 cM	4	3	0	1
D19 Mit 56	1,87 cM	19	3	9	7
D19 Mit 42	1,87 cM	19	6	11	2
D19 Mit 40	17,94 cM	19	3	9	7
D19 Mit 19	23,94 cM	16	2	3	11
D19 Mit 10	34,06 cM	19	3	8	8
D19 Mit 1	41,86 cM	19	4	8	7

Nota:

A= Animal Homozigoto, igual ao parental A/J, para o locus em questão.

B= Animal Homozigoto, igual ao parental C57BL/6, para o locus em questão.

AB= Animal Heterozigoto para o locus em questão.

nr= Não realizado.

N= Número de amostras de DNA.

Tabela VIII: Frequência dos padrões eletroforéticos A, B, ou AB nos produtos amplificados por PCR com DNA de camundongos da linhagem (A/J X C57BL/6) F2 Resistentes.

LOCUS	DISTÂNCIA	N	FREQUÊNCIA		
			A	AB	B
D1 Mit 3	8,16 cM	25	7	12	6
D1 Mit 7	42,84 cM	26	4	14	8
D2 Mit 7	25,62 cM	26	1	14	11
D4 Mit89	17,49 cM	13	5	4	4
D4 Mit 15	33,33 cM	13	4	1	8
D4 Mit 14	67,32 cM	13	6	3	4
D8 Mit 4	12,54 cM	26	9	14	3
D10 Mit 14	64,64 cM	12	5	4	3
D13 Mit 13	26,10 cM	11	2	7	2
D15 Mit 5	18,20 cM	13	3	7	3
D16 Mit 4	26,64 cM	13	5	6	2
D16 Mit 5	34,32 cM	13	4	7	2
D19 Mit 56	1,87 cM	26	5	10	11
D19 Mit 42	1,87 cM	26	7	14	5
D19 Mit 40	17,94 cM	26	5	12	9
D19 Mit 19	23,94 cM	17	5	9	3
D19 Mit 10	34,06 cM	24	2	15	7
D19 Mit 1	41,86 cM	26	1	17	8

Nota:

A= Animal Homozigoto, igual ao parental A/J, para o locus em questão.

B= Animal Homozigoto, igual ao parental C57Bl/6, para o locus em questão.

AB= Animal Heterozigoto para o locus em questão.

N= Número de amostras de DNA.

Tabela IX: Frequência dos padrões eletroforéticos A, B, ou AB nos produtos amplificados por PCR com DNA de camundongos da linhagem (C57BL/6 X A/J) F2 Suceptíveis.

LOCUS	DISTÂNCIA	N	FREQUÊNCIA		
			A	AB	B
D1 Mit 3	8,16 cM	5	3	0	2
D1 Mit 7	42,84 cM	5	1	2	2
D2 Mit 7	25,62 cM	5	2	1	2
D19 Mit 56	1,87 cM	4	0	2	2
D19 Mit 42	1,87 cM	5	3	2	0
D19 Mit 40	17,94 cM	5	0	2	3
D19 Mit 19	23,94 cM	nr			
D19 Mit 10	34,06 cM	3	0	1	2
D19 Mit 1	41,86 cM	4	0	3	1

Nota:

A= Animal Homozigoto, igual ao parental A/J, para o locus em questão.

B= Animal Homozigoto, igual ao parental C57BL/6, para o locus em questão.

AB= Animal Heterozigoto para o locus em questão.

nr= não realizado

N= Número de amostras de DNA.

Tabela X: Frequência dos padrões eletroforéticos A, B, ou AB nos produtos amplificados por PCR com DNA de camundongos da linhagem (A/J X C57BL/6) F2 Suceptíveis.

LOCUS	DISTÂNCIA	N	FREQUÊNCIA		
			A	AB	B
D1 Mit 3	8,16 cM	16	8	5	3
D1 Mit 7	42,84 cM	17	8	9	0
D2 Mit 7	25,62 cM	16	2	4	10
D19 Mit 56	1,87 cM	17	3	8	6
D19 Mit 42	1,87 cM	17	2	11	4
D19 Mit 40	17,94 cM	17	1	11	5
D19 Mit 19	23,94 cM	nr			
D19 Mit 10	34,06 cM	17	2	9	6
D19 Mit 1	41,86 cM	17	5	9	3

Nota:

A= Animal Homozigoto, igual ao parental A/J, para o locus em questão.

B= Animal Homozigoto, igual ao parental C57BL/6, para o locus em questão.

AB= Animal Heterozigoto para o locus em questão.

nr= Não realizado.

N= Número de amostras de DNA.

-Discussão

DISCUSSÃO:

A investigação das bases genéticas da relação Parasita / Hospedeiro deve iniciar necessariamente pela determinação das características genéticas do parasita e do hospedeiro e das condições em que as experiências são realizadas.

É bem estabelecido que fatores genéticos e ambientais influenciam os resultados das pesquisas biomédicas (MELBY & BALK, 1983). RANGEL *et al.*, 1994, determinaram a importância do controle do estado sanitário dos animais na determinação do grau de resistência à infecção por *T.cruzi*. Não somente a bagagem genética, o sexo e as condições ambientais são fatores importantes para o desenvolvimento da doença no modelo utilizado como as condições microbiológicas do hospedeiro. Esses resultados confirmam que estoques da cepa “Y” do *T.cruzi*, que haviam sido mantidos por passagens em animais criados de modo convencional, sem barreiras, estavam contaminados com um coronavírus que alterava a resistência do animal à infecção aumentando a patogenicidade do parasito e/ou alterando a resposta imune do hospedeiro.

Procurando uma correlação entre as condições de manutenção dos biotérios brasileiros e a qualidade das pesquisas biomédicas, GILLIOLI *et al.*, 1996 fizeram um levantamento mostrando a prevalência de infecções virais causadas por coronavírus com alta incidência de vírus da hepatite murina MHV-3, agravadas por outras infecções parasitárias, bacterianas e também por outros vírus murinos, não muito diferentes das conhecidas no passado em outros países. A presença dessas viroses são sabidamente fator importante na interferência nos resultados experimentais em campos como teratologia, oncologia e imunologia. Os camundongos criados de modo convencional são susceptíveis a numerosas infecções naturais (FOSTER *et al.*, 1982), podendo interferir na infecção pelo parasita, conforme demonstrada por RANGEL *et al.*, 1996.

Tendo em vista a possibilidade de utilizar animais controlados genética e ambientalmente, e usando um estoque da cepa “Y” do *T.cruzi* livre de coronavírus esta pesquisa foi iniciada pela determinação do grau de susceptibilidade mostrando que infecções por *T.cruzi* (estoque Y_{2Tc}) em linhagens isogênicas de camundongos resultam em uma severa infecção aguda, com um aumento na parasitemia seguida de morte. Linhagens de camundongos foram estudadas podendo ser classificadas em dois grupos baseado na parasitemia, sendo um grupo considerado resistente porque sobrevive pelo menos parcialmente a uma dose de 10⁵ parasitas; e um outro grupo considerado susceptível porque sucumbe a uma dose 1000 vezes menor. Em nosso trabalho as linhagens A/J e C3H/HeP foram consideradas susceptíveis enquanto que as linhagens C57BL/6 e CBA foram resistentes (Tabela III). Esses dados diferem dos resultados obtidos por CORSINI *et al.*, 1980 que descreveram a linhagem CBA, como susceptível à cepa “Y” uma vez que sucumbia com uma dose 100 vezes menor de parasitas em relação ao determinado. Uma possível explicação para a discrepância em relação aos resultados da Tabela III seria que aqueles autores trabalharam com animais mantidos em condições convencionais, e conseqüentemente poderiam estar contaminados com um coronavírus. O coronavírus interage com o sistema imune do hospedeiro diminuindo a sua resistência frente ao *T.cruzi*. VERINAUD em 1996 mostrou que uma dose sub-letal do vírus associado a um estoque avirulento do *T.cruzi* levou os animais à morte com alterações nos órgãos linfóides primários, timo e medula óssea , modificando o grau de susceptibilidade do hospedeiro às infecções.

Os resultados de parasitemia da Tabela III mostraram que não existe uma relação direta com a mortalidade, visto que tanto os animais susceptíveis como os resistentes apresentaram mesmo nível de parasitas circulantes. Entretanto TRISCHMANN *et al.*, 1978, observaram uma correlação direta com a cepa Brasil e o nível de parasitemia onde camundongos resistentes apresentaram baixa parasitemia como o C57BL/6 e susceptíveis com alta parasitemia como, por exemplo, o C3H. WRIGHTSMAN *et al.*,

1982 observaram que com a cepa Peru a linhagem C57BL/6 também apresentou baixa parasitemia em relação a linhagem BALB/c com alta parasitemia, entretanto ambas as linhagens não sobreviveram a infecção com dose de 10^3 parasitas. O nível de parasitas circulantes e a resistência estão correlacionados com a cepa e o grau de virulência do parasita. A existência de linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por *T.cruzi* demonstrou ter uma base genética para a resistência natural pelo parasita. O modelo usado como hospedeiro pode apresentar um padrão de resistência ou susceptibilidade dependendo da cepa usada do parasita.

Em estudos correlacionados com o Complexo Principal de Histocompatibilidade Murino (H-2) na regulação da infecção foram estudados animais congênicos de C57BL/10 e C3H (TRISCHMANN *et al.*, 1978) e C57BL/10, C57BL/6, BALB/c e animais congênicos de animais resistentes e susceptíveis (WRIGHTSMAN *et al.*, 1982 e WRIGHTSMAN *et al.*, 1984). Os autores chegaram a conclusão de que o controle da parasitemia não está associada ao complexo H-2 e sim da resistência inata do animal, e que a regulação da infecção está relacionada à múltiplos genes.

Quando examinamos nossos resultados as linhagens CBA e C3H/HeP, as quais apresentam o mesmo haplótipo H-2^k, quando desafiadas com diferentes doses do parasito mostram-se opostas quanto ao grau de resistência à infecção por *T.cruzi*, onde CBA foi considerada resistente e C3H/HeP susceptível. Este resultado reforça a presença de genes da resistência estarem fora do complexo H-2.

WRIGHTSMANN *et al.*, 1982 sugerem, em estudo realizado com a linhagem recombinante (B X H-2) entre C57BL/6 e C3H/He, que acasalamentos entre parentais que apresentam alta parasitemia e baixa parasitemia tem sido um bom modelo para o estabelecimento de marcadores genéticos. Porém a relação entre o nível de parasitemia e a sobrevivência não ficou esclarecido nos híbridos.

Seguindo a linha de cruzamentos de animais resistentes e susceptíveis para obtenção de híbridos, estudamos o grau de susceptibilidade à cepa “Y” frente a uma dose de 10^5 formas do estoque Y_{2Tc}, livre de vírus. Foram discriminados animais resistentes de susceptíveis mostrando que (AB6) F1 e (B6A) F1 apresentavam-se parcialmente susceptíveis, enquanto que (CB6) F1 e (B6C) F1 foram altamente resistentes (Tabela IV); sugerindo que a resistência depende de pelo menos um gene com caráter dominante. O fato das linhagens (CB6) F1 e (B6C) F1 serem mais resistentes que (AB6) F1 e (B6A) F1 sugere que houve uma somatória de genes da resistência provenientes de duas linhagens parentais.

Na tabela V resumindo à infecção de híbridos F1 inoculados com diferentes doses, observa-se que as fêmeas mostraram ser mais resistentes que os machos quando testadas com doses próximas a LD50%, porém com doses mais altas esta diferença foi anulada. Este dado confirma as observações de HAUSCHKA, 1947, indicando a influência do sexo na resistência onde fêmeas apresentaram uma baixa parasitemia, menor invasão tissular e maior taxa de sobrevivência que os machos.

Os nossos resultados mostraram que os segregantes (AB6) F2 e (B6A) F2 (Tabela VI) não diferiram significativamente à dose próxima a LD50% quando testadas com 10^5 formas apresentando uma sobrevivência de 15%, o que sugere a interferência de mais de um gene no fenômeno da resistência.

Muitos genes presentes em hospedeiros resistentes tem sido mapeados no CPH-H-2 que localiza-se no cromossomo 17. Assim, por exemplo, o envolvimento do complexo H-2 na leucemia viral está bem estabelecida, afim da correlação do haplótipo com a resistência adquirida do hospedeiro ter sido também descrita para, entre outras, *Ectromélie vírus*, *Salmonella typhimurium*, *Leishmania donovani*, *Citomegalovirus*, *Toxoplasma gondii* e camundongos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

(MAIDS) (TRISCHMANN et al, 1978; TRISCHMANN,1984; MALO & SKAMENE, 1994).

Para os estudos do controle genético da resistência na malária, diferentes linhagens isogênicas foram usadas para a análise da resposta à infecção por *Plasmodium chabaudi*, as linhagens resistentes B10.A e C57BL/6 e susceptível A/J foram cruzadas e a análise da descendência sugeriu que a resistência controlada por um único gene autossômico dominante, *Pchr*, foi encontrado fora do complexo H-2. Usando diferentes combinações das linhagens DBA/2J e C57BL/6J, resistentes a *P. chabaudi*, determinou que a resistência é controlada poligenicamente. Um gene principal responsável pela resistência inata do C57BL/6J foi mapeado no cromossomo 1 no locus *Mall* (MALO & SKAMENE, 1994).

Através do uso de técnicas moleculares, como o PCR, que permitem estudar fragmentos distintos de DNA, foram mapeados alguns agentes infecciosos, sendo localizados loci de camundongos resistentes para Vírus: *Cytomegavírus* - locus: *Cmv1* - Cromossomo: 6 (58cM); *Ectromelia* - locus: *Rmp2* - Cromossomo: 2 (não localizado) e locus: *Rmp3* - Cromossomo: 17 localizado no complexo H-2; para Bactérias: *Mycobacterium* spp.- locus: *Bcg* - Cromossomo: 1 (40,6cM); *Salmonella typhimurium* - locus: *Ity* - cromossomo: 1 (40,6cM), locus: *Lps* (semi-dominante) - Cromossomo: 4 (38cM) e Locus: *xid* - cromossomo: X (48cM) dois desses loci, *Ity* e *Lps*, estão envolvidos na fase precoce da resposta imune controlando a função dos macrófagos; para Protozoários: *Leishmania donovani* - locus: *Lsh* - cromossomo: 1 (40,6cM); *Leishmania mexicana* - locus: *Scl2* (semi-dominante) - cromossomo: 4 (23cM) (MALO & SKAMENE, 1994).

Mais recentemente PUEL et al., 1995 utilizando animais Biozzi bons e maus produtores de anticorpos, usaram estes animais como modelos obtendo-se segregantes

F2. Estudou-se *in vivo* genes imunomoduladores utilizando marcadores polimórficos de DNA e através do PCR detectaram os genes efetivos no controle da resposta quantitativa na produção de anticorpos. Através de uma análise de cosegregação esse modelos apresentaram regiões nos cromossomos 4, 6, e 8 que participam do controle poligênico na diferença entre altos e baixos produtores de anticorpos, mostrando a possibilidade de caracterizar genes responsáveis no controle genético da resposta imune.

No presente trabalho a tentativa de localização do gene da resistência foi iniciada pela demonstração de que os parentais utilizados nesta pesquisa correspondia ao padrão genético descrito na literatura. Através da técnica de PCR pode comprovar a identidade dos parentais utilizados no trabalho. Os dados obtidos, por esta técnica sensível, através dos marcadores polimórficos para os cromossomos: 1, 3, 7, 12, 14, 16 e 17 mostrou que as linhagens A/J e C57BL/6 não deferiram dos dados registrados na literatura, e nem das linhagens utilizadas como controles no Instituto Pasteur de Paris.

Os produtos de PCR do DNA dos híbridos F1 mostraram sempre um padrão heterozigoto AB com todos os marcadores testados. Seria de esperar portanto que na população dos animais F2 encontrássemos uma distribuição de frequência correspondente a 25% homozigoto para A (A/J), 50% heterozigoto AB, e 25% homozigoto para B (C57BL/6), devendo a população dos animais resistentes necessariamente diferir com significancia desta distribuição, concentrando a maior proporção de genes B e AB (PUDEL et al, 1995).

A análise dos animais segregantes (B6A) F2 e (AB6) F2 (Tabelas VII e VIII), utilizando marcadores polimórficos para os cromossomos 1, 2, 4, 8, 10, 13, 15, 16 e 19, não permitiu detectar uma concentração de genes B significativamente maior do que o

que seria esperado numa distribuição ao acaso. Também não foi encontrado uma concentração de genes A entre os animais susceptíveis desses híbridos (B6A) F2 e (AB6) F2 (Tabelas IX e X). Analisando os animais segregantes (B6A) F2 na região do marcador polimórfico D19 Mit 19 no cromossomo 19, sugere uma participação do controle poligênico na diferença entre resistentes e susceptíveis onde podemos observar uma frequência de 68% do gene B nesta posição, o que nos leva a pensar em uma cosegregação ou uma deriva genética.

Esses dados, embora preliminares, porque foram limitados aos marcadores disponíveis na época dos experimentos, permitem balizar as pesquisas futuras sugerindo que a busca deve ser concentrada nos outros cromossomos que não foram analisados no presente trabalho.

- Conclusões

CONCLUSÕES:

O presente trabalho nos permite as seguintes conclusões:

1) A determinação do comportamento de quatro linhagens de camundongos isogênicos SPF, utilizando um estoque de *T. cruzi* livre de vírus murinos, mostrou que A/J e C3H/HeP são linhagens susceptíveis enquanto C57BL/6 e CBA são consideradas resistentes.

2) A análise do comportamento dos híbridos (AB6) F1 e (B6A) F1 e dos segregantes (AB6) F2 e (B6A) F2, indica que o fenômeno da resistência depende de um ou mais genes com caráter dominante.

3) A análise da distribuição parental dos produtos de DNA amplificados pelo PCR não detectou uma concentração significativa do gene B nos cromossomos testados, sugerindo que os genes da resistência podem estar em um ou em mais de um dos cromossomos 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 17, 18, X e Y.

- Resumo

RESUMO:

Trabalhos descritos anteriormente evidenciam que vários genes estão envolvidos na regulação da resposta imune à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. O objetivo do presente trabalho foi identificar a região cromossomial que conferisse resistência ou susceptibilidade ao parasita, utilizando linhagens isogênicas de camundongos livres de patógenos específicos como modelo.

Foram avaliados os níveis de parasitemia e a taxa de mortalidade de animais inoculados com a cepa “Y” do *T. cruzi*. Desta maneira, as linhagens C57BL/6 e CBA foram caracterizadas como resistentes enquanto que, as linhagens A/J e C3H/HeP foram classificadas como susceptíveis à infecção pelo parasita.

Acasalamentos recíprocos entre as linhagens A/J (susceptível) e C57BL/6 (resistente) foram realizados para determinação do tipo de herança e para análise da resistência nos animais híbridos (F1) e segregantes (F2).

A análise dos DNAs dos animais resistentes e susceptíveis foi feita através do estudo dos marcadores polimórficos utilizando-se da técnica de PCR ("*Polymerase Chain Reaction*") nos cromossomos 1, 2, 4, 8, 10, 13, 15, 16, e 19 dos animais segregantes.

Os resultados obtidos não permitiram detectar uma concentração do gene da linhagem parental resistente (C57BL/6), ou da linhagem parental susceptível (A/J), significativamente maior do que seria esperado numa distribuição ao acaso. Entretanto, esses dados experimentais abrem novas perspectivas de pesquisa que permitem dar continuidade ao estudo da genética de resistência, investigando agora os cromossomos restantes.

-Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABRAHAMSOHN, I. and COFFMANN, R., 1995. AJ tolsine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. of Immunol.** **155**: 3955- 3963.
- ANDRADE, Z. & ANDRADE, S. 1955. A patologia da miocardite crônica chagásica. **Arq. Bras. Med.** **45**:278 - 283.
- ANDRADE, Z. & ANDRADE, S. 1966. Estudos histopatológicos comparativo das lesões produzidas por cepas do *T.cruzi* .**O Hospital**, **70 (5)**:1257 - 1278.
- ANDRADE, Z. & ANDRADE, S. 1979. Patologia In: BRENER,Z e ANDRADE,Z. - *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas- Rio de Janeiro, R.J. /Guanabara - Koogan , p.199 - 248
- ANDREWS, N.W. and WHITLOW, M.B. ,1988. Secretion by *Trypanossoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **33** : 249 - 256.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. 1963 . Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *T.cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5 (5)**: 220 -224
- BRENER, Z. 1968. In: Doença de Chagas 1a. Ed. R. CANÇADO (ed) , Belo Horizonte, **Cap.24**: 501-516.

- CAMARGO, I.J.B., ARAUJO, P. M. F., SAKURADA, J.K., STACH-MACHADO, D. and RANGEL, H. A., 1991.** Trypanosoma cruzi: Early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. **Experimental Parasitology 73:** 260-268.
- CHAGAS, C. 1909.** Nova Tripanosomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n.gen.n.sp., agente etiológico de uma entidade morbida do Homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:** 159-218.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. and STELINI Jr, A. 1980.** Suceptibility of Inbred Mice to *Trypanosoma cruzi* Strain Y. **Rev.Inst. Med. Trop. S. Paulo, 22 (4):** 192-196.
- CULBERTSON, J.T. & KESSLER, W.R. 1942.** Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology 28:** 155-158.
- DIETRICH, W.F., MILLER, J.C., STEEN, R.G., MERCHANT, M., DAMRON, D., NAHF, R., GROSS, A., JOYCE, D.C., WESSEL, M., DREDGE, R.D., MARQUIS, A., STEIN, L.D., GOODMAN, N., PAGE, D.C., & LANDER, E.S. 1994.** A Genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. **Nature Genetics 7:** 220-225.
- FOSTER, H.L., SMALL, J.D. and FOX, J.G. 1982.** In: The Mouse in Biomedical Research. Vol II Academic Press, New York.
- GILIOLI, R.; SAKURADA, J. K.; ANDRADE, L.A.G.; KRAFT, V.; MEYER, B. and RANGEL, H. A. 1996.** Virus Infection in Rat and Mouse Colonies Reared in Brazilian Animal Facilities. **Laboratory Animal Science, 46 (5):** 63-65.

- GRANT, I.H., GOLD, J.W.M., WITTNER, M., TANOVITZ, H.B., NATHAN, C.,
MAYER, K., REICH, L., WOLLNER, N., STEINHER, L., GHAVIMI, F.,
O'REILLY, R. & ARMSTRONG, D., 1989.** Transfusion-associated acute
Chagas disease acquired in United States. **Ann Intern. Med** **111**: 849.
- GUÉNET, J.L.** 1991. La Cartographie des genes chez la souris . **Annales de
L'Institut Pasteur / Actualités** **3**: 205 - 227 .
- GUÉNET, J.L & MONTAGUTELLI, X** .1994. The Contribution of Wild Specimens
to Establishment of the Mouse Genetic Map - **In**: MORIWAKI, K. et al (eds) -
Genetics in Wild Mice - Japan Sci.Soc.Press. Tokyo / S.Karger, Basel, p. 285 -
298
- GUÉNET, J.L.** 1995. Animal Models of Human Genetic Disease- **In**: VEGA, M.A.
(ed) Gene Targeting -CRC Press, Inc. Tokio - **Cap 6**: 149 - 166
- HAUSCHKA, T.S.** 1947. Sex of host as a factor in Chagas's disease. **Journal of
Parasitology** **33**: 399-404.
- HOFFAND, K.,** 1993. Kinetic analyses of antigen specife responses. **J. of Immunol.**
151: 7073- 7047.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.** 1991. Maladie de Chagas: L'interaction du
parasite *Trypanosoma cruzi* avec le systeme immunitaire de son hôte mammifere.
Annales de L'Institut Pasteur/ Actualités **3**: 222 - 236.

- KIERSZENBAUM, F. and HOWARD, J. G.** 1976. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozz high and low responder mice. **Journal of Immunology** **116**: 1208-1211.
- KÖBERLE, F.** 1968. Chagas'disease and Chagas'syndromes: The pathology of american tripanosomiasis. **Advanced Parasitology** **6**: 63-116.
- INNIS, M.A.; & GELFAND, D.H.** 1990. Optimization of PCRs- In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. - PCR protocols: A Guide to methods and applications. Academic Press, Inc. **Cap 1**: 3 - 12 .
- LOVE, J.M. ; KNIGHT, A.M. ; McALEER, M.A. and TODD, J.A.** 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using P.C.R.-analysed microsatellites - **Nucleic Acids Res-** **18 (14)**: 4123-4130
- MALO, D. & SKAMENE, E.** 1994. Genetic control of host resistance to infection - **Trends in Genetics**, **10 (10)**: 365 - 371.
- MELBY, E.C. JR and BALK, M. W.** 1983. In: The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biological research. Academic Press, New York.
- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSHOWICZ, M. ; PEREIRA, P. and COUTINHO, A.** 1987. Supression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatmente with anti- L₃T₄ antibodies. **J. Immunol.** **139**: 545-549.

- MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE, L. and HONTEHEYRIE- JOSHOWICZ, M.** 1988. Most B cell in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scand. J. Immunol. 28:** 553.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S. ; HEUSSER, C.; TANEGAWA, S. and COUTINHO, A.** 1989 a. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TcR T cells. **Immunol. Rev. 112:** 183.
- MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A., PEREIRA, P.; MOTA SANTOS, T. And COUTINHO, A.** 1989 b . Preferencial expansion of Ly-1B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocytes responses to murine T.cruzi infection. **International Immunology 1:** 176-184.
- MINIPRIO, P.; COUTINHO, A. SPINELLA, S. and HONTEBEYRIE- JOSKOWICZ, M.** 1991. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearanceand resistance to pathology in experimental Chagas' disease. **Int. Immunol. 3:** 425-435.
- MONCAYO-MEDINA, A.** 1987. **In:** Tropical disease research: A global partnership, eds J. MAURICE & A.M. PEARCE, p.87. World Health Organization, Geneva.
- MONTAGUTELLI, X; SERIKAWA, T. & GUéNET, J.L.** 1991. PCR- Analyzed microsatellites: Data concerning laboratory. **Mammalian Genome , 1 :** 225 - 259

- NICKERSON, P., ORR, P., SCHROEDER, M.L., SEKLE, L. & JOHNSTON, J.B.** 1989. Transfusion-associate *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Ann Intern. Med** **111**: 851.
- ORTIZ, Silvia.** 1985. In: Lesões histopatológicas verificadas na fase aguda e crônica da infecção chagásica, em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* - Monografia apresentada no Setor de Doenças Infecciosas e Autoimunes do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo/SP.
- PIZZI, T.; AGOSTIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGHEME, A.** 1949 . Estudios sobre inmunobiologia de las enfermedades parasitárias. I- Influência de la constitución genetica de las lauchas a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi* . **Bol. Inform. Parasit. Chil.** **4** : 48-49.
- POWELL, M. & WASSON, D.L.** 1993. Host Genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunology**, **15**: 215 - 221.
- PUEL,A.; GROOT, P.C.; LATHROP, M.G.; DEMANT, P. and MOUTON, D.** 1995. Mapping of genes controlling quantitative antibody production in Biozzi mice. **The Journal of Immunology** **154**: 5799-5805.
- RANGEL, H.A.; VERINAUD, L.; CAMARGO, I.J.B.; GILIOLI, R. and SAKURADA, J.K.** 1994. Murino Virus Contaminant of *Trypanosoma cruzi* Experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo**, **36 (5)**: 423-431

- RIBEIRO dos SANTOS, R. ; PIRMEZ, C. and SAVINO, W.** 1991. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic cardites. **Res. Immunol.** **142**: 134- 136.
- SAIKI, R.K.** 1990. Amplification of Genomic DNA - **In** : INNIS, M.A. ; GELFAND, D.H. ; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. - PCR PROTOCOLS: A Guide to methods and applications. Academic Press, Inc. **Cap.2**: 13 - 20.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATS, T.** 1989 - **In**: Molecular Cloning - A laboratory manual - 2 Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, New York). **Cap. 6**:1-59 ; **Cap. 14**: 1 -35.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V.** 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clín. Biol. (São Paulo)**, **20**: 191-201.
- SUN, J. and TARLETON, R. L.,** 1993. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infections. *The Am. J. Trop. Med.* 48: 161- 169.
- TARLETON, R. L.,** 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **144**: 717 - 724.
- TARLETON, R. L.,** 1991. The role of T cell subpopulations in experimental Chagas' disease. **Res. Immunol.** **142**: 130- 133.
- TEIXEIRA, A.R.L.** 1980. Patologia da doença de Chagas. **IBM**, **38 (3)**: 23-33.

- TRISCHMANN, T.M.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. and BLOOM, B.** 1978. *Trypanosoma cruzi* : Role of the Immune Response in the Natural Resistance of Inbred Strains of Mice. **Exp. Parasitology** , **45** : 160- 168 .
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R.** 1982. Genetics of murine Resistance to *Trypanosoma cruzi*.- **Infection and Immunity** , **35** (2): 546 - 551 .
- TRISCHMANN, T.M.** 1984. Single Locus in BXH-2 mice Responsible for Inability to Control Early Proliferation of *Trypanosoma cruzi* . **Infection and Immunity** **46** (3) : 658 - 662 .
- VERINAUD, L. M. C.,** 1996. Alterações da resposta imune à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, induzidas pela contaminação com um coronavírus murino. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Imunologia.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J.** 1982. Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infection and Immunity** , **36** (2):637 - 644 .
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. and MANNING, J.** 1984. Role of the H-2 Haplotype in Survival of Mice After Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, **44** (2): 351-354.

- Apêndice

APÊNDICE I:

Segundo a tabela de DIETRICH et al., 1994 encontram-se listados os cromossomos que possuem polimorfismo entre as linhagens A/J e C57BL/6. Este polimorfismo é dado pela diferenciação do número de pares de base amplificados, após a reação de P.C.R.

LOCUS POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS A/J E C57BL/6		
CROMOSSOMO	LOCUS	PARES DE BASE A/J X C57BL/6
1	D1 Mit 3	185 / 160
	D1 Mit 7	122 / 105
2	D2 Mit 6	124 / 132
	D2 Mit 7	144 / 147
	D2 Mit 14	130 / 142
3	D3 Mit 7	142 / 147
	D3 Mit 14	198 / 170
4	D4 Mit 2	172 / 187
	D4 Mit 9	210 / 206
	D4 Nds 2	Sonda
	D4 Mit 11	178 / 14
	D4 Mit 12	168 / 198
	D4 Mit 14	
	D4 Mit 15	
	D4 Mit 16	
	D4 Mit 37	
	D4 Mit 50	
	D4 Mit 89	
5	Não Pesquisado	

LOCUS POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS A/J E C57BL/6		
CROMOSSOMO	LOCUS	PARES DE BASE A/J X C57BL/6
6	D6 Mit 8	190 / 164
	D6 Rp 2	Sonda
	D6 Mit 86	
7	D7 Nds 4	
8	D8 Mit 4	200 / 157
	D8 Mit 14	167 / 142
9	D9 Mit 2	182 / 157
	D9 Mit 18	210 / 180
10	D10 Nds 1	148 / 127
	D10 Mit 2	132 / 124
	D10 Mit 10	128 / 180
	D10 Mit 14	182 / 192
11	Não Pesquisado	
12	D12 Mit 5	160 / 176

LOCUS POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS A/J E C57BL/6		
CROMOSSOMO	LOCUS	PARES DE BASE A/J X C57BL/6

13	D13 Nds 1	Sonda
	D13 Mit 3	188 / 159
	D13 Mit 7	145 / 140
	D13 Mit 10	156 / 150
	D13 Mit 11	155 / 145
	D13 Mit 13	138 / 148
14	Não Pesquisado	
15	D15 Ag 1	Sonda
	D15 Mit 5	114 / 98
	D15 Mit 11	94 / 106
16	D16 Mit 3	104 / 102
	D16 Mit 4	147 / 132
	D16 Mit 5	132 / 156
17	D17 Mit 2	220 / 230
	D17 Mit 3	130 / 128
	D17 Mit 10	148 / 157
	D17 Mit 18	242 / 246
	D17 Mit 20	170 / 180

LOCUS POLIMÓRFICOS ENTRE AS LINHAGENS A/J E C57BL/6		
CROMOSSOMO	LOCUS	PARES DE BASE A/J X C57BL/6
18	D18 Mit 4	188 / 210
	D18 Mit 9	160 / 170
	D18 Mit 17	188 / 213
19	D19 Mit 1	142 / 121
	D19 Mit 10	194 / 152
	D19 Mit 19	116 / 142
	D19 Mit 40	102 / 112
	D19 Mit 42	184 / 178
	D19 Mit 56	130 / 139
	D19 Mit 59	139 / 199

APÊNDICE II:

Encontram-se a seguir os mapeamentos dos cromossomos testados, sendo indicados a localização da região de micro satélite polimórficos para as linhagens parentais polares usadas nesta pesquisa segundo a tabela DIETRICH et al., 1994.

