

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

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

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Prof. 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 conseqüência, 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 conseqüências 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 consangüíneos, 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 consangüíneas 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; Mouliá, 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 homocigotos 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 (10⁵ 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 10⁴ 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 fenómeno 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 carácter 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

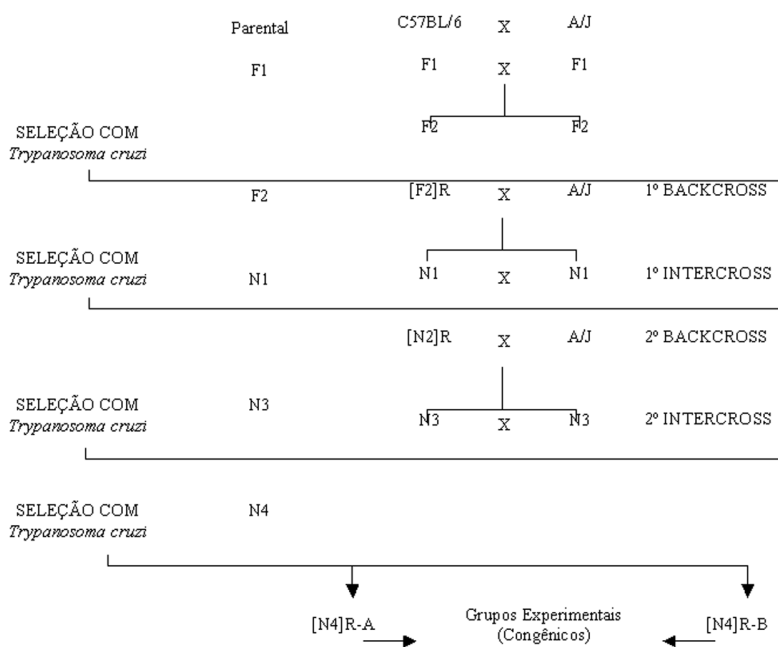


Figura 2 - Representação Esquemática da Obtenção do Modelo Congênico

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. **Biociência 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. **Biociência e Desenvolvimento** (9) p. 96 - 100.
- GOLDENBERG, S. & KRIEGER, M.A. (1997). Doença de Chagas **Biociência e 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. & REINAUD, 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^s Haplotype in Survival of Mice after Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity.** 44(2); p. 351-354

