

NOTA PRÉVIA

INSERÇÃO DE DNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* NO GENOMA DE CÉLULA HOSPEDEIRA DE MAMÍFERO POR MEIO DE INFECÇÃO

Antonio R.L. Teixeira, Zulmira Lacava, Jaime M. Santana
e Helena Luna

Observamos a cromatina de formas amastigotas de T. cruzi associada a cromossomos de macrófagos metafásicos obtidos em diversos períodos da infecção aguda. O estudo imunocitogenético demonstrou que o material genético inserido naqueles cromossomos era produto do T. cruzi. Pelo teste de hibridização in situ com sonda biotinilada de DNA de T. cruzi, foi confirmada a inserção de DNA do protozoário nos cromossomos murinos. A inserção seletiva de ³H-DNA do protozoário em alguns cromossomos sugere que podem ocorrer rearranjos transxenogênicos em infecções de mamíferos pelo T. cruzi.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Macrófago. Transxenogene.

Em trabalhos recentes^{9, 10}, mostramos que a administração de nitroarenos tripanocidas em coelhos infectados com *T. cruzi* não desativa as lesões da Doença de Chagas crônica. A presença de miocardite destrutiva em coelhos tratados com nitroarenos, e nos quais as parasitemias haviam desaparecido, reforça o papel da auto-imunidade, e deixa dúvida quanto à importância da persistência do parasito na progressão das lesões. Em vista dessas observações, postulamos que o *T. cruzi* intracelular poderia inserir seu DNA no genoma da célula hospedeira infectada. Nesse trabalho, descrevemos a inserção seletiva de DNA do protozoário em cromossomos da célula hospedeira.

MÉTODOS E RESULTADOS

Imunocitogenética: Esses estudos foram realizados em grupos de 25 camundongos BALB/c, 2 a 15 dias após a infecção, via ip, com 10⁵ formas tripomastigotas de *T. cruzi* do estoque Berenice. Macrófagos peritoneais metafásicos colhidos da cavidade peritoneal foram submetidos ao estudo imunocitogenético^{3, 5}. Usou-se IgG anti-*T. cruzi* de camundongos hiperimunes⁶ conjugada ao isotiocianato de fluores-

ceína. A análise das preparações mostrou genoma do parasito entre os cromossomos (Figura 1). Um achado peculiar consistiu na associação de cromatina de formas amastigotas com cromossomos de macrófagos

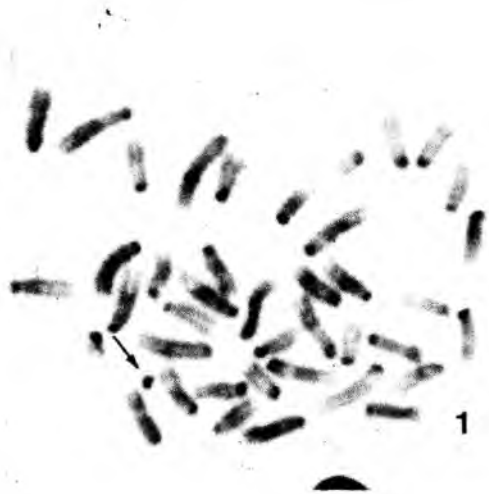


Figura 1 - Metáfase de macrófago peritoneal de camundongo infectado com *Trypanosoma cruzi*. A seta mostra DNA densamente empacotado de forma amastigota de *T. cruzi* associado a regiões teloméricas de dois cromossomos. Lâmina corada pelo Giemsa. 1000X.

Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências da Saúde e Departamentos de Genética e Morfologia e de Biologia Celular, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Endereço para correspondência: Dr. Antonio R. L. Teixeira. Laboratório de Imunologia/FCS/UnB. Caixa Postal 15-3121, 70910 Brasília, DF.

Recebido para publicação em 28/03/91.

metafásicos. Os testes de imunofluorescência identificaram cromatina do *T. cruzi* em cromossomos. Esse achado foi documentado nas mesmas metáfases coradas, posteriormente, pelo Giemsa. Entretanto, esse achado não foi encontrado em macrófagos controles, colhidos de camundongos normais.

Auto-radiografia e cariotipagem: Em vista desse achado, marcamos o *T. cruzi* em cultura de células musculares de fetos de camundongos com ^3H -timidina. O nucleotídeo foi incorporado ao DNA das formas amastigotas intracelulares, e as formas tripomastigotas emergentes (10^5 tripomastigotas = 3.5×10^4 cpm) foram usadas para infectar camundongos. A seguir, foram feitas preparações citogenéticas com as células peritoneais desses camundongos infectados. As lâminas contendo macrófagos metafásicos foram submetidas a auto-radiografias. Após 9 a 21 dias de incubação as lâminas reveladas mostraram grânulos indicativos de emissão de partícula radioativa, contida apenas no ^3H -DNA inserido em cromátides de cromossomos dos macrófagos (Figura 2). Esse achado foi observado apenas nas auto-radiografias de preparações citogenéticas de animais infectados, e não foi observado nas preparações controle, obtidas de camundongos normais, não-infectados.

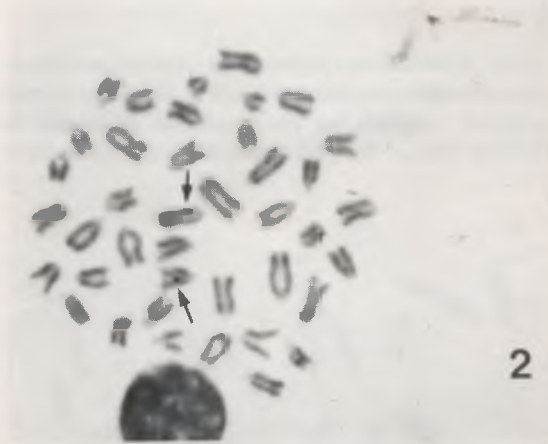


Figura 2 – Auto-radiografia de macrófago metafásico colhido da cavidade peritoneal de camundongo BALB/c infectado com 10^5 tripomastigotas do estoque Berenice de *T. cruzi*, marcadas com ^3H -timidina. As setas mostram grânulos resultantes da redução do sal de prata da emulsão fotográfica, pelo ^3H -DNA de *T. cruzi* inserido no cromossomo. Preparação corada pelo Giemsa. 1000X.

As bandas G e C dos cromossomos de macrófagos metafásicos, submetidos a auto-radiografias, foram obtidas conforme descrição da literatura¹². A cariotipagem dos cromossomos de 52 metáfases mostrou, consistentemente, inserções preferenciais de DNA de *T. cruzi* nos cromossomos 3, 6 e 11, posto que visualizadas, respectivamente, em 23 (44,2%), 14 (26,9%) e 22 (42,3%) das metáfases analisadas.

Hibridização *in situ*: Um pool de fragmentos de DNA total de formas de cultivo do estoque Berenice de *T. cruzi*, após clivagem com endonuclease Klu-I, foi usado como sonda. A marcação da sonda com

biotina-11 dUTP foi feita pela técnica de “nick-translation”, de acordo com protocolo da Boehringer-Mannheim. A purificação da sonda foi obtida em coluna de Sephadex G-50¹¹.

As preparações citogenéticas foram tratadas com RNase (100 ug/ml) por 1 h, a 37°C. Após três rinsagens em 2xSSC, as preparações foram desnaturadas em solução de formamida a 70%, durante 2 min, a 70°C. A sonda biotilada foi diluída para concentração de 10 ng/ μl em meio de hibridização¹¹ e desnaturada a 100°C por 5 min. Após resfriamento, 20 μl da sonda desnaturada foi depositada sobre lâmina, recoberta com laminula e incubada a 37°C, durante a noite, em câmara úmida.

A imunocoloração foi feita após rinsagem das lâminas em banhos de 50% formamida em 2x SSC. O primeiro anticorpo antibiotina foi depositado na lâmina, recoberta com laminula e incubada por 45 min, a 37°C. Após três rinsagens, usou-se o segundo anticorpo (anti-IgG conjugado a fluoresceína). A contra-coloração dos núcleos interfásicos e dos cromossomos foi feita com iodeto de propídio. A observação foi feita com auxílio de um microscópio Axiophot da Zeiss, com sistema de amplificação de sinais em campo escuro, e fonte de luz ultravioleta HBO-50.

A hibridização *in situ* sobre cromossomos, com sonda de DNA biotilado de *T. cruzi*, mostrou a presença de DNA complementar à sonda. Os pontos fluorescentes, indicativos do DNA forasteiro, foram observados no núcleo de macrófagos interfásicos e metafásicos colhidos de camundongos infectados (Figura 3). Por essa técnica, 42% das metáfases tinham um ou mais pontos fluorescentes do DNA de fita única, complementar. Esses achados não foram

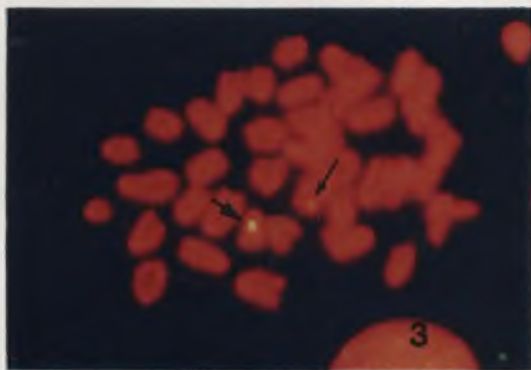


Figura 3 – Localização de DNA biotilado de *Trypanosoma cruzi* em cromossomo de macrófago murino, aos 11 dias da infecção, pela técnica de hibridização *in situ*. (Vide métodos p.). As setas mostram pontos fluorescentes indicativos do DNA complementar localizado pela sonda molecular. Contracoloração alaranjada dos cromossomos pelo iodeto de propídio. 1000X.

encontrados em macrófagos controles, colhidos de camundongos normais.

DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos a presença de cromatina de formas amastigotas de *T. cruzi* entre os cromossomos de macrófagos de camundongos com infecção aguda. Testes de imunofluorescência direta mostraram que os materiais associados aos cromossomos dos macrófagos eram produtos do *T. cruzi*. A confirmação desse achado foi obtida com estudos auto-radiográficos, nos quais os macrófagos eram colhidos de camundongos infectados com *T. cruzi* marcado com ^3H -timidina. Em adição, a inserção de DNA de *T. cruzi* no genoma da célula hospedeira foi demonstrada pelo teste de hibridização *in situ* com sonda biotilada de DNA complementar. Este teste mostrou alta sensibilidade para detecção do DNA homólogo inserido, pois 42% das 84 metáfases analisadas apresentavam uma ou mais inserções. Esse achado deve ser considerado em relação a um possível significado biológico desse fenômeno.

A cariotipagem de cromossomos metafásicos mostrou inserções seletivas do DNA de *T. cruzi* nos cromossomos 3, 6 e 11. Um dos possíveis mecanismos para a seletividade apreciada seria a presença de sítios frágeis identificados nas regiões B dos cromossomos 3 e 6⁴. A correlação potencial entre sítios frágeis e rearranjos de genes tem recebido extraordinária atenção. Consideramos, ainda, que a atenção deve ser voltada para seqüências idênticas de oligonucleotídeos (TTAGGG) existentes nas regiões teloméricas de *Trypanosoma* sp, as quais hibridizam cruzadamente, com telômeros de cromossomos humano e murino^{1 7}. Existe a possibilidade de que tais seqüências homólogas favoreçam rearranjos gênicos (transxenogene, do gr. *xenos* = forasteiro) em espécies filogeneticamente distantes.

Acreditamos que rearranjos transxenogênicos poderiam levar à expressão de antígenos do parasito codificados pelo DNA compartilhado. Seria de se esperar, portanto, que a expressão de proteínas codificadas pelos genes dos cromossomos 3, 6 e 11 poderia ser modificada. Sabe-se que o gene que codifica a expressão da cadeia β do receptor do linfócito T está presente no locus B do cromossomo 6; os genes da cadeia pesada da miosina e da α -actina de músculo esquelético estão presentes nos cromossomos 11 e 3, respectivamente⁸. Curiosamente, algumas lesões auto-imunes da Doença de Chagas parecem estar relacionadas à citotoxicidade do linfócito T contra miosina de músculo esquelético é de coração.

Por outro lado, existe também a possibilidade de que os genes da célula hospedeira sejam incorporados

no genoma do *T. cruzi*. A este respeito, descreveu-se a presença de antígenos da célula hospedeira que aparecem na membrana do *T. cruzi* e são liberados no meio exterior². As próximas investigações orientadas para o conhecimento da complexidade das reações auto-imunes devem abordar esses aspectos da genética molecular dos genes transfectados. Este trabalho descreve, pela primeira vez, a inserção de material genético de um protozoário patogênico no genoma de uma célula de mamífero.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi chromatin was observed in macrophage chromosome spreads obtained at different periods of infections in BALB/c mice. Immunofluorescent studies showed that genetic materials associated with the chromosomes were *T. cruzi* products. In situ hybridization showed the protozoan DNA insertion in the host cell genome. In addition, selective ^3H -DNA insertion in chromosomes 3, 6 and 11 was observed, which suggested that transxenogene rearrangement may take place in *T. cruzi* infections of mammals.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Macrophage. Transxenogene.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Dra. Evani Viegas-Pequignot, Laboratoire de Mutagenèse et Structure Chromosomique de l'Institut Curie, Paris, pela orientação técnico-científica na realização da hibridização *in situ*. Agradecemos a Spartaco Astolfi Filho e Cesar M. Sá, do Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pelas discussões e apoio no preparo de sondas de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. Human telomers contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Research* 17: 4611-4627, 1989.
2. Chess A, Acosta AM, Sethi JK, Santos-Buch GA. Reversible acquisition of a host cell surface antigen by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 40: 299-302, 1983.
3. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Journal of Heredity* 63: 69-72, 1972.
4. Djalali M, Adolph S, Steinbach P, Winking H, Hammeister H. A comparative mapping study of fragile sites in the human and murine genomes. *Human Genetics* 77: 157-162, 1987.
5. Harper ME, Sanders GF. Localization of single copy DNA sequences on G-banded chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 83: 431-439, 1981.
6. Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira ARL. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically

- infected with *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity 57: 2640-2644, 1989.
7. Rudenko G, Van der Ploeg HT. Transcription of telomere repeats in protozoa. EMBO Journal 8: 2633-2638, 1989.
 8. Searle AG. Mouse chromosome mapping. Genomics 1: 3-18, 1987.
 9. Teixeira ARL, Córdoba JC, Souto Maior IC, Solorzano EAC. Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benzonidazole. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 43: 146-158, 1990.
 10. Teixeira ARL, Silva R, Cunha-Neto E, Santana JM, Rizzo LV. Malignant, non-Hodgkin's lymphoma in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitro-arenes. Journal of Comparative Pathology 103: 37-48, 1990.
 11. Viegas-Pesquignot E, Dutrillaux B, Magdelenat H, Coppey-Moisan M. Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by *in situ* hybridization with biotinylated probes: enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 582-586, 1986.
 12. Viegas-Pequignot E, Lin LZ, Dutrillaux B, Apiou F, Panlin D. Assignment of human desmin gene to band 2g35 by non-radioactive *in situ* hybridization. Human Genetics 83: 33-36, 1989.