

WAFHA HANNA KOURY CABRERA

CONTROLE GENÉTICO INESPECÍFICO DA SÍNTESE DE ANTICORPOS

Estudo dos genes envolvidos na resposta a eritrócitos heterólogos em camundongos bons e maus respondedores a antígeno somático de *Salmonellae*.

Tese de Mestrado apresentada
ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas.

CAMPINAS - S.P.

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Orientadora: Dra. Maria Siqueira

Trabalho realizado na Seção de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo.

Durante o curso de Pós-graduação e realização do presente trabalho, a autora foi bolsista das seguintes Organizações:

- Ministério das Relações Exteriores (Itamarati). Março 1976 a Julho 1978.

- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES). Agosto 1978 a Fevereiro 1979.

- Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Março 1979 a Julho 1979.

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Agosto 1979 a Novembro 1980.

Minha profunda gratidão:

À Dra. Maria Siqueira, pela amizade, orientação e oportunidade de trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Imunologia, na pessoa do Professor Humberto de Araujo Rangel, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Dr. Guido Biozzi, pela amizade, sugestões e orientações dadas.

Aos Drs. Humberto de Araujo Rangel, Maria Brazil Esteves, Dária Repka e Antonio Carlos Corsini, pela amizade, estímulo e pelas críticas e sugestões dadas ao presente trabalho.

Ao Dr. Hércio Passos e a Osvaldo Augusto Sant'Anna pela amizade, companheirismo e colaboração dada a este trabalho.

À Olga Célia Ibañez, pela sua inestimável ajuda e presença.

Aos professores, colegas, amigos e técnicos da Seção de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo, e do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Campinas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, irmãs e sobrinhos, pela dedicação, estímulo e carinho com que sempre me cercaram.

Ao Sr. Silva e tia Maria, pelo conforto e carinho oferecidos ao meu filho.

Aos meus pais (*in memoriam*).

À Miguel e a Paulo.

ABREVIACÕES USADAS NESTE TRABALHO

b	=	Inclinação
BF	=	Fibringnio bovino
BGG	=	Gamaglobulina bovina
BSA	=	Soro albumina bovina
CE	=	Eritrócitos de galinha
DNP	=	Dinitrofenol
DNP-PLL	=	Dinitrofenil-Poli-L-Lisina
f	=	Antígeno flagelar de <i>Salmonellae</i>
F	=	Geração
H	=	Bom respondedor
h^2	=	herdabilidade
H-2	=	Complexo principal de histocompatibilidade
H/f	=	Linhagem boa respondedora, Seleção III
HGG	=	Gamaglobulina humana
hte	=	Eritrócitos heterólogos
H/hte	=	Linhagem boa respondedora, Seleção contra Eritrócitos Heterólogos
HR	=	Hipersensibilidade Retardada
HuE	=	Eritrócitos humanos
H/s	=	Linhagem boa respondedora, Seleção IV
Ir	=	Gene da resposta imune
L	=	Mau respondedor
L/f	=	Linhagem m respondedora, Seleção III

L/hte	=	Linhagem mã respondedora da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos
L/s	=	Linhagem mã respondedora da Seleção IV
n	=	número de loci
N.A.	=	Não analisado
N.S.	=	Não significativa
P	=	Nível de significância
PBS	=	Salina tamponada
PE	=	Eritrócitos de pombo
r	=	Coefficiente de correlação
R	=	Resposta de Seleção
RG	=	Resposta de Seleção por geração
RGG	=	Gamaglobulina de coelho
RT	=	Resposta de Seleção no limite de seleção
s	=	Antígeno somático de <i>Salmonellae</i>
S	=	Diferencial de Seleção
SE	=	Eritrócitos de carneiro
SG	=	Diferencial de Seleção por geração
V	=	Variância
VP	=	Variância fenotípica total
\bar{X}	=	Média

S U M Á R I O

	pag.
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	14
II.2 - Antígenos e Imunização	15
II.2.1 - Eritrócitos heterólogos	15
II.2.2 - <i>Salmonella</i>	16
II.2.3 - Proteínas heterólogas	18
II.2.3.1 - Gamaglobulina bovina	18
II.2.3.2 - Gamaglobulina de coelho	19
II.3 - Determinação do Título de Aglutininas	19
II.3.1 - Determinação do título de aglutininas contra eritrócitos heterólogos.....	19
II.3.2 - Determinação do título de aglutininas contra antígenos f e s de <i>Salmonella typhimurium</i>	20
II.3.3 - Determinação do título de aglutininas contra proteínas heterólogas	21
II.4 - Análise Genética.....	21
II.5 - Análise Estatística	23
III - RESULTADOS	24
III.1 - Cinética da resposta de anticorpos contra várias do- ses de eritrócitos de carneiro em camundongos da Se- leção IV	24
III.2 - População inicial da Seleção contra Eritrócitos Hete- rólogos	27

III.2.1 - Geração F ₀	27
III.2.2 - Avaliação da resposta de aglutininas <u>con</u> tra eritrócitos humanos do tipo A Rh ⁺ , na geração F ₁	32
III.3 - Divergência entre as linhagens produzidas pelos a- casalamentos seletivos contra eritrócitos heterólo <u>o</u> gos	34
III.3.1 - Geração F ₄	37
III.3.2 - Geração F ₅	41
III.4 - Cálculo da herdabilidade	43
III.5 - Correlação entre as respostas dos camundongos da seleção contra Eritrócitos Heterólogos, contra os antígenos SE e antígenos f e s de <i>Salmonella typhi</i> <i>murium</i>	50
III.6. - Resposta dos camundongos das linhagens H/hte e L/hte contra antígenos não relacionados com os de seleção	52
IV - DISCUSSÃO	55
V - RESUMO E CONCLUSÕES	63
VI - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	65

I - INTRODUÇÃO

A regulação genética da resposta imunológica é feita através de genes de atuação específica (genes Ir) e genes com atuação não específica (Benacerraf & Katz, 1975; Biozzi et al, 1975).

Os primeiros estudos do controle genético da resposta imune foram desenvolvidos em cobaias, linhagem Hartley, cruzadas ao acaso, revelando que esses animais diferem individualmente na sua capacidade de desenvolver Hipersensibilidade Retardada (HR) acompanhada de produção de anticorpos contra Dinitrofenil-Poli-L-Lisina (DNP-PLL) e que essa diferença é herdada segundo padrões mendelianos simples (Kantor et al, 1963).

Estudos posteriores revelaram que a capacidade de responder ao DNP-PLL é controlada por um único gene Ir dominante, o qual é responsável tanto pelo desenvolvimento de HR específica como pela produção de anticorpos anti-DNP (Levine et al, 1963; Levine & Benacerraf, 1965).

Através do emprego de diferentes polímeros, outros ge-

nes Ir com as mesmas características foram identificados na cobaia, isto é, a resposta a cada um desses polímeros é controlada por um gene autossômico dominante específico (Benacerraf et al, 1971; Bluestein et al, 1971).

No camundongo, o uso de antígenos com heterogeneidade restrita, tais como polímeros ramificados com número limitado de aminoácidos, demonstraram que a capacidade de responder a esses antígenos está sob o controle de genes autossômicos dominantes, situados na região I do complexo H-2 (McDevitt & Chinitz, 1969; Benacerraf & McDevitt, 1972; Green, 1974; Benacerraf & Katz, 1975).

O controle da resposta imunológica através dos genes Ir específicos foi caracterizado como um fenômeno biológico geral através da identificação de genes semelhantes ligados ao complexo principal de histocompatibilidade em várias outras espécies de animais e pela determinação crescente de antígenos sob o controle de genes Ir. Em todas as experiências, o uso de: a) antígenos com poucos componentes ou de estrutura simples (polímeros sintéticos simples de aminoácidos); b) dose limite de antígenos naturais complexos; e c) aloantígenos que diferem muito pouco dos componentes próprios do receptor; foi muito importante para a detecção dos genes Ir. Todos esses antígenos tem em comum a presença de somente alguns epitopos distintos para o desencademe

amento da resposta imune (Gunter et al, 1972; Armerding et al, 1974; Dorf et al, 1975).

A principal função dos genes Ir específicos é regular a interação e diferenciação das células que atuam na resposta imunológica (Katz & Benacerraf, 1976; Rosenthal & Shevach, 1973).

O controle genético inespecífico da resposta imunológica, se faz ao nível da produção quantitativa de anticorpos e vem sendo estudado em linhagens de camundongos selecionados de acordo com a resposta elevada ou baixa contra antígenos naturais complexos. O emprego destes antígenos em dose imunogênica ótima permite o seu reconhecimento por todos os indivíduos de uma população, evitando interferência de genes de ação específica (Biozzi et al, 1971).

Em 1943, Scheibel, utilizando como antígeno o toxóide diftérico, conseguiu, após cinco gerações de cruzamentos seletivos onde animais bons e maus produtores de anticorpos foram cruzados entre si, obter duas populações de cobaias boas e más respondedoras. Como a seleção foi obtida em poucas gerações, Scheibel sugeriu que poucos genes estivessem envolvidos no processo (Scheibel, 1943).

Um fenômeno análogo foi observado no camundongo por

Sobey e Magrath em 1965, que selecionaram uma linhagem de camundongos que respondia mal a soro albumina bovina (BSA). Na sexta geração de seleção, 88% dos camundongos haviam perdido quase totalmente a capacidade de sintetizar anticorpos anti-BSA. Pela análise genética, os autores sugerem um modelo de regulação envolvendo 2 a 3 loci (Sobey & Magrath, 1965; Sobey et al, 1966).

Estudos feitos em camundongos da linhagem de Sobey, mostraram que esses camundongos respondiam tão bem quanto animais normais, quando imunizados com BSA em doses menores do que as utilizadas durante o processo seletivo. Por outro lado doses superiores a 500 μ g induziam tolerância muito mais facilmente nesses animais, indicando que a indução de tolerância é também submetida à regulação genética (Hardy & Rowley, 1968).

Um estudo mais aprofundado do controle da resposta quantitativa de anticorpos a antígenos naturais complexos vem sendo feitas nas linhagens de camundongos selecionados por Biozzi e colaboradores (Biozzi et al, 1968), e em outras linhagens que surgiram posteriormente, todas elas obtidas através de cruzamentos seletivos de camundongos bons (H) e maus (L) respondedores contra antígenos naturais complexos (Siqueira et al, 1976; Passos et al, 1977).

Existem atualmente descritas cinco seleções genéticas

independentes de camundongos (Seleções I,II,III,IV e V), onde o caráter selecionador foi a quantidade de anticorpos produzida contra dose ótima dos antígenos naturais complexos. Em todas as gerações, animais que apresentavam altos títulos de anticorpos foram acasalados entre si para a produção das linhagens boas respondedoras (linhagem H), bem como os que apresentavam títulos baixos de anticorpos, para a produção das linhagens más respondedoras (linhagem L) (Biozzi et al, 1971; Feingold et al, 1976; Siqueira et al, 1976; Passos et al, 1977).

A Seleção I, iniciada em 1965 e a mais amplamente estudada, foi obtida usando como antígenos selecionadores eritrócitos heterólogos (eritrócitos de carneiro (SE) e pombo (PE)) (Biozzi et al, 1971).

A Seleção II foi desenvolvida utilizando-se somente SE (Feingold et al, 1976).

As Seleções III e IV foram realizadas segundo a resposta contra antígenos flagelar (Seleção III) e somático (Seleção IV) de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella oranienburg* (Siqueira et al, 1976).

A Seleção V foi obtida utilizando-se proteínas heterólogas, isto é, soro albumina bovina (BSA) e gamaglobulina de coe-

lho (RGG) (Passos et al, 1977).

As Seleções I e II foram desenvolvidas no Departamento de Imunogenética do Instituto Curie de Paris. As Seleções III e IV foram realizadas na Seção de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo. A Seleção V foi obtida no Departamento de Imunologia da Escola Paulista de Medicina, e atualmente está sendo mantida na Seção de Imunologia do Instituto Biológico.

Nas cinco seleções estudadas, a resposta individual contra dose ótima dos antígenos selecionadores, foi avaliada no tempo da produção máxima de anticorpos. Essas condições experimentais foram previamente estabelecidas em grupos de camundongos albinos, cruzados ao acaso (Biozzi et al, 1971; Siqueira et al, 1976; Passos et al, 1977).

Em cada seleção, o emprego alternado em gerações consecutivas de dois antígenos selecionadores com estrutura semelhante e sem reatividade cruzada, teve como finalidade evitar a interferência específica de anticorpos maternos passivamente transferidos à progênie.

Foram bastante semelhantes os parâmetros imunogenéticos obtidos nas Seleções I, II, III e IV apesar das diversas origens de suas populações iniciais, da natureza dos antígenos selecionadores

e dos vários processos de imunização e de determinação dos títulos de anticorpos.

Em cada uma das seleções, as linhagens boa e má respondedoras divergiram progressivamente e a separação máxima entre as linhagens, limite de seleção, foi atingida entre as gerações F_{13} - F_{16} , para as Seleções I,II,III,e IV e na geração F_6 para a Seleção V. Uma vez atingido o limite de seleção, a continuidade do processo seletivo não alterou as diferenças entre as linhagens indicando homozigose dos alelos "bons respondedores" nas linhagens H e dos alelos "maus respondedores" nas linhagens L (Biozzi et al, 1971; Feingold et al, 1976; Siqueira et al, 1976; Passos et al, 1977).

Para as Seleções I a IV, a diferença máxima entre as respostas das linhagens boas e más respondedoras (RT) foi de 6,3 a 7,8 \log_2 , o ganho por geração (RG) foi de 0,40 a 0,49 e o diferencial de seleção por geração (SG) foi de 2,0 a 2,5.

Um parâmetro importante avaliado também foi a herdabilidade (h^2) que é próxima de 0,20 nas cinco seleções, sugerindo que esse valor é uma constante imunogenética da resposta de anticorpos.

A herdabilidade de um caráter métrico é a proporção da

variância fenotípica total (VP) que é atribuível aos efeitos médios dos genes (variância aditiva). A função mais importante da herdabilidade é ser uma medida da variabilidade genética disponível para ser transmitida aos descendentes, ou seja, ela expressa a confiabilidade do valor fenotípico como indicação do valor reprodutivo.

A variância genotípica (variância aditiva + variância de dominância) e a variância ambiental foram próximas de 50% nas gerações F_0 das Seleções I a IV, enquanto que na Seleção V o componente genético foi maior. Esses valores destacam a importância da interação dos fatores genéticos e ambientais na regulação quantitativa da resposta de anticorpos a todos os antígenos estudados (Biozzi et al, 1980).

A partir da análise genética dos híbridos F_1 resultantes dos cruzamentos das linhagens H e L homozigotas, assim como dos segregantes F_2 e dos retrocruzamentos, foi possível estimar o número médio de loci envolvido em cada seleção. Assim, para as Seleções I, II, III e IV o número de loci independentes foi de respectivamente 10, 3, 6 e 3 e de 2 para a seleção V (Biozzi et al, 1980).

Um outro aspecto relevante, analisado nas cinco seleções, foi o de que o efeito seletivo não se restringiu aos anti

genos selecionadores, operando também ao nível da resposta de anticorpos contra muitos imunógenos naturais não relacionados aos de seleção tais como: eritrócitos heterólogos, bactérias, vírus, aloantígenos, proteínas e haptenos (Biozzi et al, 1979).

O efeito inespecífico não foi uniforme, sendo dependente da seleção, da natureza do antígeno selecionador, do esquema de imunização, do número dos loci envolvidos e ainda da natureza dos antígenos testados. Assim, em alguns casos, a diferença entre o comportamento das linhagens H e L foi semelhante à obtida com os antígenos de seleção (efeito inespecífico total ou 100%), em outros casos foi menor (efeito inespecífico parcial) e em alguns casos não houve mesmo diferença (Biozzi et al, 1979).

A amplitude do efeito inespecífico foi muito grande para as Seleções I e III, limitada para a Seleção V e intermediária para as Seleções II e IV.

Nas Seleções III (obtida contra o antígeno flagelar (f) de *Salmonellae*) e IV (obtida contra o antígeno somático (s) de *Salmonellae*), a modificação da resposta imune ao antígeno de seleção f ou s foi acompanhada por efeito paralelo e equivalente na resposta ao antígeno associado s ou f em ambas as seleções (Siqueira et al, 1977).

O efeito inespecífico foi total em ambas as seleções,

para os antígenos f e s de *Salmonella anatum*, e também para o hapteno Dinitrofenol (DNP) quando conjugado a *Salmonella typhimurium*.

Vários outros antígenos, que também não apresentam reatividade cruzada com os antígenos de seleção, foram testados nas duas seleções (Seleção III e Seleção IV).

Conforme mencionado anteriormente, a seleção III apresentou um efeito inespecífico bastante acentuado para a maioria dos antígenos testados. Para os antígenos gamaglobulina de coelho (RGG) e gamaglobulina bovina (BGG), a diferença entre as linhagens (H/f - L/f) foi equivalente àquela observada para o antígeno selecionador. Essa diferença foi intermediária para soro albumina bovina (BSA), gamaglobulina humana (HGG), eritrócitos de carneiro (SE) e eritrócitos humanos (HuE). Uma diferença menor entre as linhagens foi observada contra fibrinogênio bovino (BF) (Biozzi et al 1979; Sant'Anna, 1979).

Dentre todos os antígenos testados, a resposta contra eritrócitos de pombo (PE), constituiu-se em uma importante exceção, com as linhagens H/f e L/f apresentando níveis equivalentes de anticorpos.

Na Seleção IV, onde o efeito inespecífico para a maioria dos antígenos testados foi menos intenso do que na Seleção

III, a diferença entre as linhagens H/s e L/s contra BGG e BSA foi cerca de 50% daquela observada para o antígeno selecionador. Para os antígenos HGG e BF, a diferença não foi significativa.

Um comportamento atípico nesta seleção foi verificado nas respostas primárias e secundárias das linhagens H/s e L/s contra RGG, sendo evidente uma inversão total, com quase completa ausência de resposta dos animais H/s e níveis bastante elevados de anticorpos nas linhagens L/s.

Em relação à resposta contra eritrócitos heterólogos, a Seleção IV evidenciou uma pequena separação contra PE, enquanto que para HuE e SE, a linhagem mã respondedora apresentou níveis de anticorpos semelhantes ou pouco mais altos do que os da linhagem boa respondedora.

A produção de aglutininas anti-SE foi analisada em vários estágios do processo seletivo da Seleção IV. Diferenças não significantes entre os títulos de aglutininas produzidas pelas linhagens H/s e L/s foram observadas nas gerações F_4 , F_{12} e F_{14} , enquanto que nas demais gerações analisadas, observou-se uma pequena superioridade da linhagem L/s (Sant'Anna, 1979).

Este fato é intrigante quando comparado com o comportamento da Seleção I, obtida pela resposta contra eritrócitos he

terólogos (SE e PE), cujas linhagens boa e má respondedoras se diferenciam amplamente na resposta aos antígenos somático (s) e flagelar (f) de *Salmonella typhimurium*.

Esse comportamento excepcional da Seleção IV possibilita o estudo do lote de genes envolvidos no controle inespecífico da síntese de anticorpos. Durante a seleção através do antígeno somático de *Salmonellae* (Seleção IV), aparentemente não teriam sido envolvidos os genes que interferem ao nível da resposta contra eritrócitos de carneiro e humano.

No sentido de verificar se as pressões seletivas induzidas por diferentes antígenos podem envolver lotes gênicos diferentes e independentes, nos propuzemos a realizar uma seleção de linhagens boa e má respondedoras contra eritrócitos heterólogos (hte, carneiro e humano), usando como população inicial segregantes F_2 interlinhagens H/s e L/s da Seleção IV.

Essas novas linhagens foram também analisadas contra vários imunógenos não relacionados com os de seleção, anteriormente analisados nas linhagens da Seleção IV.

Estudos comparativos destes resultados foram feitos, buscando esclarecer os mecanismos genéticos que atuam no controle poligênico do caráter "síntese quantitativa de anticorpos" e que podem ser diferentemente afetados segundo o antígeno selecionador.

OBJETIVOS

- Verificar a possibilidade de selecionar camundongos bons e maus respondedores contra dose imunizante ótima de eritrócitos heterólogos (SE e HuE), usando como população inicial segregantes F_2 entre as linhagens H/s e L/s da Seleção IV.
- Fazer análise genética do processo seletivo que atuou nas novas linhagens selecionadas.
- Verificar o envolvimento dos genes selecionados, na resposta das linhagens a imunógenos não relacionados imunologicamente com os de seleção.
- Analisar comparativamente a atuação inespecífica dos genes envolvidos na presente seleção com aqueles envolvidos na Seleção IV, que controlam a resposta contra o antígeno s de *Salmonellae*.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 - População inicial e cruzamentos seletivos da seleção contra Eritrócitos Heterólogos

A população inicial, constituída de segregantes F_2 das linhagens H/s e L/s da Seleção IV, foi obtida de acordo com o seguinte esquema de cruzamento:

Oito camundongos da linhagem H/s (4 ♂ e 4 ♀), foram cruzados com 8 camundongos da linhagem L/s (animais da geração F_{22}). Dos híbridos F_1 resultantes foram feitos 20 acasalamentos ao acaso, evitando consanguinidade, o que permitiu a constituição de uma população inicial (geração F_0) de 122 animais (57 ♂ e 65 ♀).

Os cruzamentos seletivos foram realizados levando em consideração o caráter fenotípico "quantidade de aglutininas produzidas" contra eritrócitos heterólogos, sendo cruzados entre si os animais que apresentavam os títulos mais altos de aglutininas para a formação da linhagem boa respondedora (H/h_{te}) e aqueles que apresentavam os títulos mais baixos para obtenção da linha-

gem mã respondedora (L/hte).

Eritrócitos de carneiro (SE) e eritrócitos humanos do tipo A Rh⁺ (HuE), antígenos selecionadores, foram alternados a cada geração a fim de evitar a interferência específica dos anticorpos maternos transferidos passivamente. Esses dois antígenos não apresentam reatividade cruzada no camundongo.

Em cada geração foram feitos aproximadamente sete acasalamentos por linhagem.

Os animais foram desmamados aos 25 dias de idade e a imunização foi feita cerca de 30 a 40 dias após o desmame. Durante todo processo seletivo foram evitados acasalamentos entre irmãs.

II.2 - ANTÍGENOS E IMUNIZAÇÃO

II.2.1 - Eritrócitos Heterólogos.

Eritrócitos de carneiro (SE), humanos (HuE), pombo (PE) e galinha (CE) foram colhidos assepticamente em solução de Álsever. Após três lavagens em salina fisiológica (NaCl 0,15 M), as suspensões de SE e HuE foram estandarizadas espectrofotometrica

mente (Coleman) em comprimento de onda de λ 545 m μ , para uma concentração final de $2,5 \times 10^9$ SE e de 5×10^8 HuE.

As concentrações das suspensões de PE e de CE, (5×10^8), foram determinadas por contagem das células em câmara de Malassez.

As doses de imunização foram de 5×10^8 células para SE, e 10^8 células para HuE, PE e CE. Os camundongos receberam uma única dose por via intravenosa, num volume de 0,2 ml em salina fisiológica, sendo sangrados 5 e 14 dias após a imunização, período de aparecimento do máximo de anticorpos (Biozzi et al, 1971; Siqueira et al, 1977).

II.2.2 - *Salmonella*

A *Salmonella* utilizada foi *Salmonella typhimurium* (I,IV,XII - i; 1,2).

Amostra de *Salmonella*, estocada a 4°C em meio agar-peptona, foi plaqueada em agar simples e incubada a 37°C por 48 horas. Uma colônia lisa foi então transferida para tubo em U contendo meio semi-sólido, a fim de isolar microorganismos móveis. Esses microorganismos foram transferidos para caldo simples, e posteriormente para garrafa de Roux. Após 20 horas de crescimen-

to, as bactérias foram ressuspensas em salina fisiológica e mortas pela adição de formalina a 1,5% ou pela adição de 4 volumes de etanol, e assim mantidas por três dias para obtenção de antígenos flagelar (f) e somático (s) respectivamente (Edwards & Ewing, 1964).

Após a comprovação da esterilidade, pela ausência de crescimento de bactérias em placa de agar simples por 7 dias a 37°C, as suspensões foram centrifugadas e lavadas uma vez em salina, em seguida ressuspensas em salina formolada a 1% ou em salina contendo 20% de etanol.

Testes de toxicidade foram feitos, inoculando-se 6 camundongos, por via intraperitoneal, com o dobro da dose utilizada nas imunizações. Os animais foram observados durante uma semana.

As suspensões dos antígenos f e s, utilizados para a dosagem de anticorpos, foram estandarizadas espectrofotometricamente (Coleman), em comprimento de onda de λ 550m μ , usando cubas de vidro de 19 x 50 mm, de acordo com o padrão de referência previamente estabelecido (Siqueira et al, 1976).

A dose de antígeno ótima foi de $3,3 \times 10^8$ germes para *Salmonella typhimurium*, inoculados duas vezes, com oito dias de

intervalo, num volume de 0,5 ml de salina fisiológica, por via intraperitoneal. Os animais foram sangrados pelo plexo venoso retro-orbital 13 dias após a última inoculação, tempo de aparecimento do máximo de anticorpos (Siqueira et al, 1976).

II.2.3 - Proteínas Heterólogas

II.2.3.1 - Gamaglobulina Bovina

Gamaglobulina bovina (BGG) foi purificada a partir de soro normal, por precipitação com sulfato de sódio na concentração de 18%, seguida de cromatografia em DEAE-Celulose em tampão fosfato 0,01M pH 8,0. A pureza do conteúdo proteico foi verificada por Imunoelektroforese.

Os animais receberam três injeções de 1 mg de proteína precipitada com 1% de alumen de potássio, em um volume de 0,2 ml de salina (Kabat & Mayer, 1961). A primeira inoculação foi por via intravenosa, e as duas seguintes por via intraperitoneal, com um intervalo de 4 dias entre as injeções. As sangrias foram feitas pelo plexo venoso retro-orbital 5 e 10 dias após a última inoculação.

II.2.3.2 - Gamaglobulina de Coelho

Gamaglobulina de coelho (RGG), purificada de acordo com a técnica descrita no ítem anterior, foi diluída em salina na concentração de 50 mg/ml e aquecida a 70°C, por uma hora. O material agregado foi separado por centrifugação, lavado 3 vezes em salina fisiológica e o sedimento ressuspense em 3 ml de salina. O conteúdo proteico foi determinado pelo método do biureto (Weichselbaum, 1946), onde 0,1 ml do agregado foi dissolvido em 0,9 ml de NaOH 0,1M. A concentração final de proteínas foi ajustada para 10 mg/ml.

Cada camundongo recebeu duas doses de 1 mg de proteína em um volume de 0,1 ml de salina por via intraperitoneal, com um intervalo de 8 dias entre as injeções. Os animais foram sangrados 7 e 12 dias após a última inoculação, pelo plexo venoso retro-orbital (Passos et al, 1977).

II.3 - DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE AGLUTININAS

II.3.1 - Determinação do título de aglutininas contra eritrócitos heterólogos.

O título de aglutininas anti-SE, anti-HuE, anti-PE e anti-CE, foi determinado pela técnica de microhemaglutinação.

A 0,025 ml das diluições em série de soro foram adicionados 0,025 ml da suspensões de eritrócitos diluídos a 1/200. Como diluente foi utilizada salina tamponada (PBS) pH 7,2, contendo 0,1% de gelatina.

Os títulos de anticorpos foram expressos como \log_2 da recíproca da maior diluição do soro, que dá uma aglutinação positiva. A leitura da reação foi feita após 24 horas de incubação, a 4°C.

II.3.2 - Determinação do título de aglutininas contra antígenos f e s de *Salmonella typhimurium*.

A determinação do título de aglutininas, contra antígenos f e s de *Salmonella typhimurium* dos soros individuais, foi feita por aglutinação em tubos de vidro (8 x 20), num volume final de 0,2 ml, sendo 0,1 ml de diluições seriadas do soro em salina e 0,1 ml de antígeno f ou s de *Salmonella*. As concentrações ótimas de *Salmonella* para as reações foram determinadas, empregando-se diluições seriadas do soro hiperimune de camundongo, sendo de $1,4 \times 10^9$ germes/ml para o antígeno flagelar e de $0,9 \times 10^9$ germes/ml para o antígeno somático (Bandieri, 1973).

As leituras das reações foram feitas após 2 e 48 horas

a 37°C, para as aglutinações flagelar e somática respectivamente.

II.3.3 - Determinação do título de aglutininas contra proteínas heterólogas.

O título de aglutininas dos soros individuais foi determinado por hemaglutinação passiva, com eritrócitos de carneiro ou camundongos tratados com glutaraldeídos e sensibilizados com BGG ou RGG respectivamente (Avrameas et al, 1969).

As reações foram feitas pela técnica de microhemaglutinação em placas, onde a 0,025 ml de diluições em série dos soros adicionou-se igual volume de uma suspensão de eritrócitos, sensibilizados com BGG ou RGG, numa diluição de 1/250. Como diluente foi empregado PBS, contendo 0,1% de gelatina. As reações foram lidas após 24 de incubação a 4°C.

II.4 - ANÁLISE GENÉTICA

A Resposta de Seleção (R) é uma função do Diferencial de Seleção (S). Em cada linhagem, R é a diferença entre a média dos títulos de aglutininas produzidas por duas gerações consecutivas, e S é a diferença entre a média dos títulos de aglutininas

dos pais selecionados e a média global da geração da qual eles provieram (Falconer, 1960).

A fim de balancear a contribuição de cada casal para a geração seguinte, os valores de S foram ponderados de acordo com o número de filhotes de cada casal, pela equação:

$$MP = \frac{\sum (\bar{X}P \times NF)}{NT}$$

onde MP é a média ponderada dos pais selecionados, $\bar{X}P$ é a média dos títulos de cada casal, NF é o seu número de filhos e NT, o número total de animais produzidos por todos os pares selecionados. Os valores de R e S das gerações sucessivas foram acumulados e a herdabilidade do caráter investigado (h^2) foi medida pela razão de R/S (Falconer, 1960).

No sentido de eliminar os efeitos ambientais, que afetam paralelamente as linhagens boa (H) e má (L) respondedoras, a Resposta de Seleção (R) foi também calculada através da divergência entre as linhagens ($\bar{X}H - \bar{X}L$), em cada geração. O valor de S foi então calculado como a soma dos valores de S das gerações correspondentes das duas linhagens, H/hte e L/hte. O valor médio de h^2 , obtido durante as cinco gerações de acasalamentos seleti-

vos, foi medido pela inclinação da regressão linear, calculada pelos quadrados mínimos de R/S.

O significado de h^2 calculado desta forma, corresponde à "herdabilidade realizada" segundo Falconer, ou ao " h^2 em senso estrito", segundo Bodmer e Cavalli-Sforza (Falconer, 1960; Bodmer & Cavalli-Sforza, 1976).

II.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das médias (\bar{X}), desvios padrão (s) e variância (V) se acham expressos como \log_2 da diluição do soro.

Nos testes de significância, os valores de probabilidade foram determinados pela distribuição de "t" de Student, e estabeleceu-se como estatisticamente significativos os níveis de $P < 0,05$.

A correlação entre as respostas aos diferentes imunógenos foi estabelecida pela regressão linear dos quadrados mínimos dos valores da resposta de anticorpos do mesmo animal a dois antígenos diferentes.

III - RESULTADOS

III.1 - Cinética da resposta de anticorpos contra várias doses de eritrócitos de carneiro em camundongos da Seleção IV

Em várias gerações do processo seletivo, camundongos bons (H/s) e maus (L/s) respondedores da Seleção IV, imunizados com 5×10^8 eritrócitos de carneiro, dose ótima previamente estabelecida (Biozzi et al, 1971), apresentaram níveis semelhantes de aglutininas.

A fim de verificar se este comportamento seria devido às condições experimentais utilizadas, como dose do antígeno e tempo de determinação dos anticorpos, foram realizados ensaios variando-se esses elementos.

Diferentes grupos de 10 camundongos das linhagens H/s e L/s foram imunizados endovenosamente, com doses crescentes de 10^4 a 10^7 SE, em volume de 0,2 ml de salina. Os animais foram sangrados aos 5, 8, 13 e 20 dias após a imunização. Os resultados constam da tabela I.

TABELA I - Cinética da resposta de aglutininas de camundongos da Seleção IV (linhagens H/s e L/s), contra doses crescentes de eritrócitos de carneiro (SE).

LINHAGEM	Dose de SE**	TÍTULO DE AGLUTININAS (\log_2)*			
		Dias 5	Após 8	a 13	Imunização 20
H/s	10^4	2,44 \pm 1,13	2,44 \pm 1,01	1,11 \pm 0,33	1,78 \pm 0,67
	10^5	2,56 \pm 2,30	3,89 \pm 2,09	2,56 \pm 1,67	2,78 \pm 1,20
	10^6	2,11 \pm 1,27	5,67 \pm 0,89	3,22 \pm 1,99	2,33 \pm 1,50
	10^7	5,90 \pm 1,60	6,40 \pm 0,70	4,80 \pm 2,39	4,20 \pm 2,35
L/s	10^4	2,25 \pm 1,16	2,88 \pm 1,25	2,38 \pm 1,06	2,13 \pm 0,64
	10^5	2,88 \pm 0,99	2,88 \pm 1,13	3,00 \pm 1,41	2,88 \pm 1,36
	10^6	3,66 \pm 1,30	4,50 \pm 1,93	4,25 \pm 2,12	3,63 \pm 1,77
	10^7	5,88 \pm 1,13	4,63 \pm 1,41	5,13 \pm 2,59	5,25 \pm 3,33

* Média do título de aglutininas de 10 animais por grupo.

**Uma única injeção intravenosa, no volume de 0,2 ml.

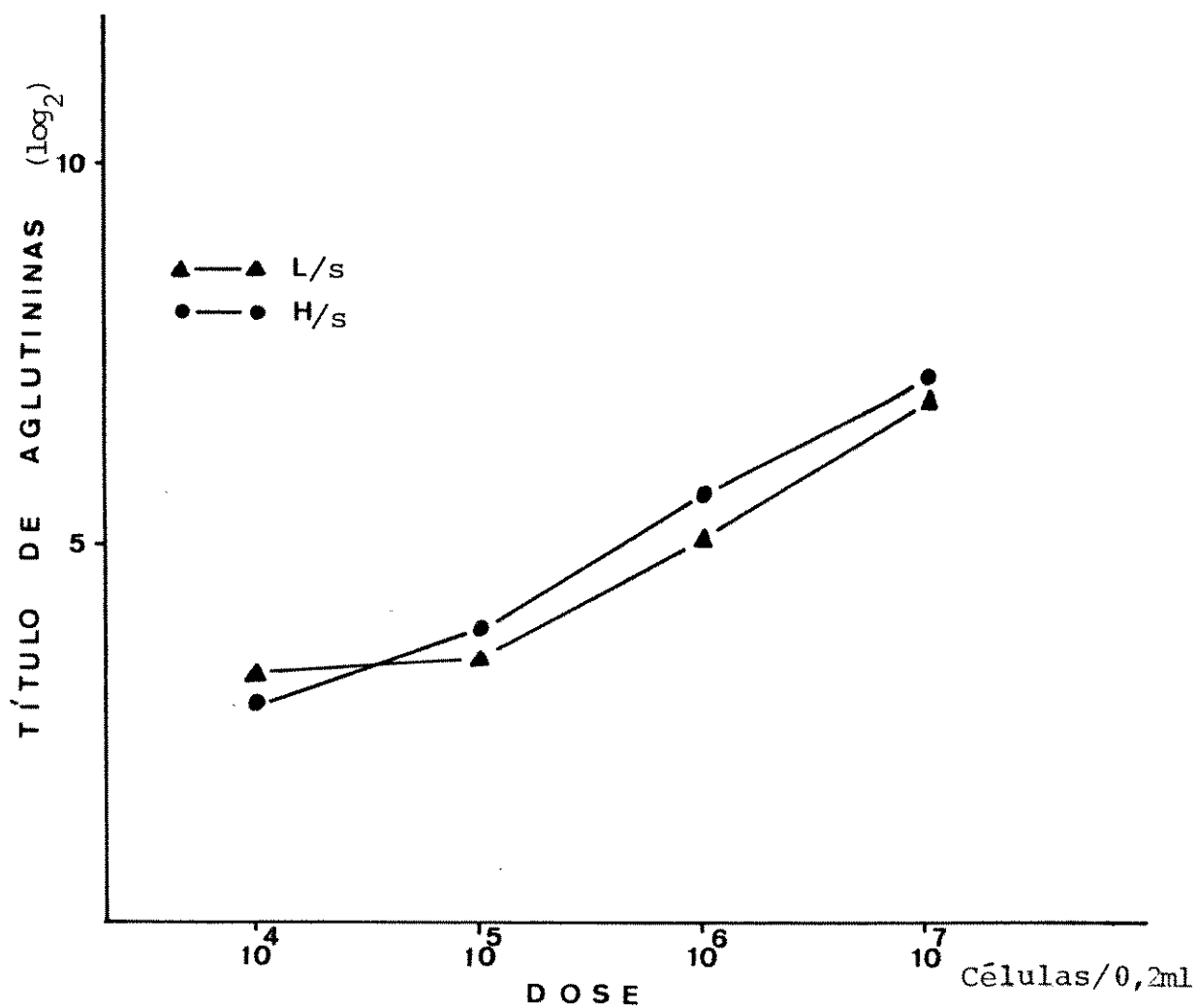


FIGURA 1 - Resposta máxima de aglutininas contra doses crescentes de eritrócitos de carneiro dos camundongos das linhagens H/s e L/s.

A figura 1 mostra as curvas de resposta máxima das linhagens H/s e L/s contra as diferentes doses, indicando um comportamento semelhante destas duas linhagens contra as doses de 10^4 a 10^7 eritrócitos.

Afastada a possibilidade das condições experimentais estarem interferindo no comportamento das linhagens H/s e L/s em relação a SE, foi então iniciada uma nova seleção de camundongos contra eritrócitos heterólogos (SE e HuE), tomando como F_0 uma população de segregantes F_2 (H/s x L/s, Seleção IV), obtidos conforme descrito em material e métodos.

III . 2 - População inicial da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos.

III.2.1 Geração F_0

122 camundongos, segregantes F_2 de H/s x L/s, foram imunizados com 5×10^8 SE dose ótima de imunização (Biozzi et al, 1971). Os títulos de aglutininas foram determinados 5 e 14 dias após a imunização.

A figura 2 ilustra a distribuição de frequência dos títulos máximos de aglutininas da população e as respostas máximas individuais da geração F_0

Os títulos de aglutininas da população F_0 se distribuíram no intervalo de 3 a 12 \log_2 ($\bar{X} = 7,98 \pm 1,64$ $V=2,7$). Os valores da variância (V) nos indicam uma heterogeneidade da resposta dos animais a eritrócitos de carneiro, possibilitando a escolha dos animais com fenótipos extremos.

Dezesseis dias após a imunização com SE, esses mesmos animais receberam 2 injeções intraperitoneais, com 8 dias de intervalo, de *Salmonella typhimurium* ($3,3 \times 10^8$ germes, dose ótima de imunização). Os animais foram sangrados 13 dias após a última inoculação.

A resposta aos antígenos de *Salmonella* (f e s) foi acompanhada durante todo processo seletivo, não sendo levada em consideração na escolha dos animais com fenótipos extremos, que constituíram os cruzamentos seletivos.

A distribuição de frequência dos títulos de aglutininas contra os antígenos flagelar e somático de *Salmonella typhimurium* da população F_0 , e as respostas individuais estão representadas nas figuras 3 e 4 respectivamente.

Os títulos de aglutininas da população F_0 se distribuíram no intervalo de 7 a 14 \log_2 ($\bar{X}=10,73 \pm 1,29$ $V=1,70$), para o antígeno f, e de 4 a 12 \log_2 ($\bar{X}= 7,88 \pm 1,87$ $V=3,81$), para o antígeno s.

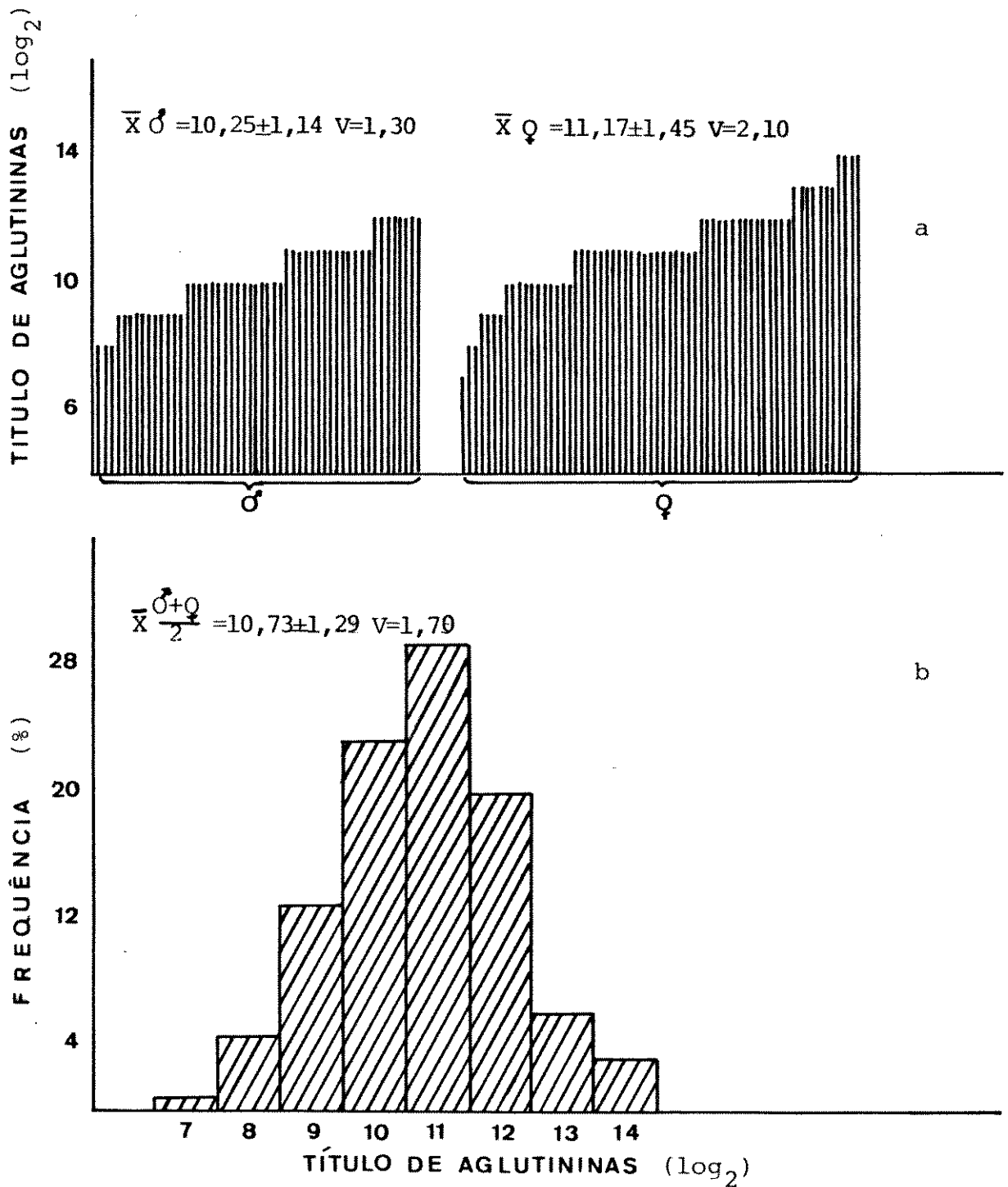


FIGURA 3 - a - Resposta individual de aglutininas contra dose ótima imunizante de *Salmonella typhimurium* (antígeno f) (geração F_0).

b - Distribuição de frequência de resposta individual contra dose ótima imunizante de *Salmonella typhimurium* (antígeno f) (geração F_0).

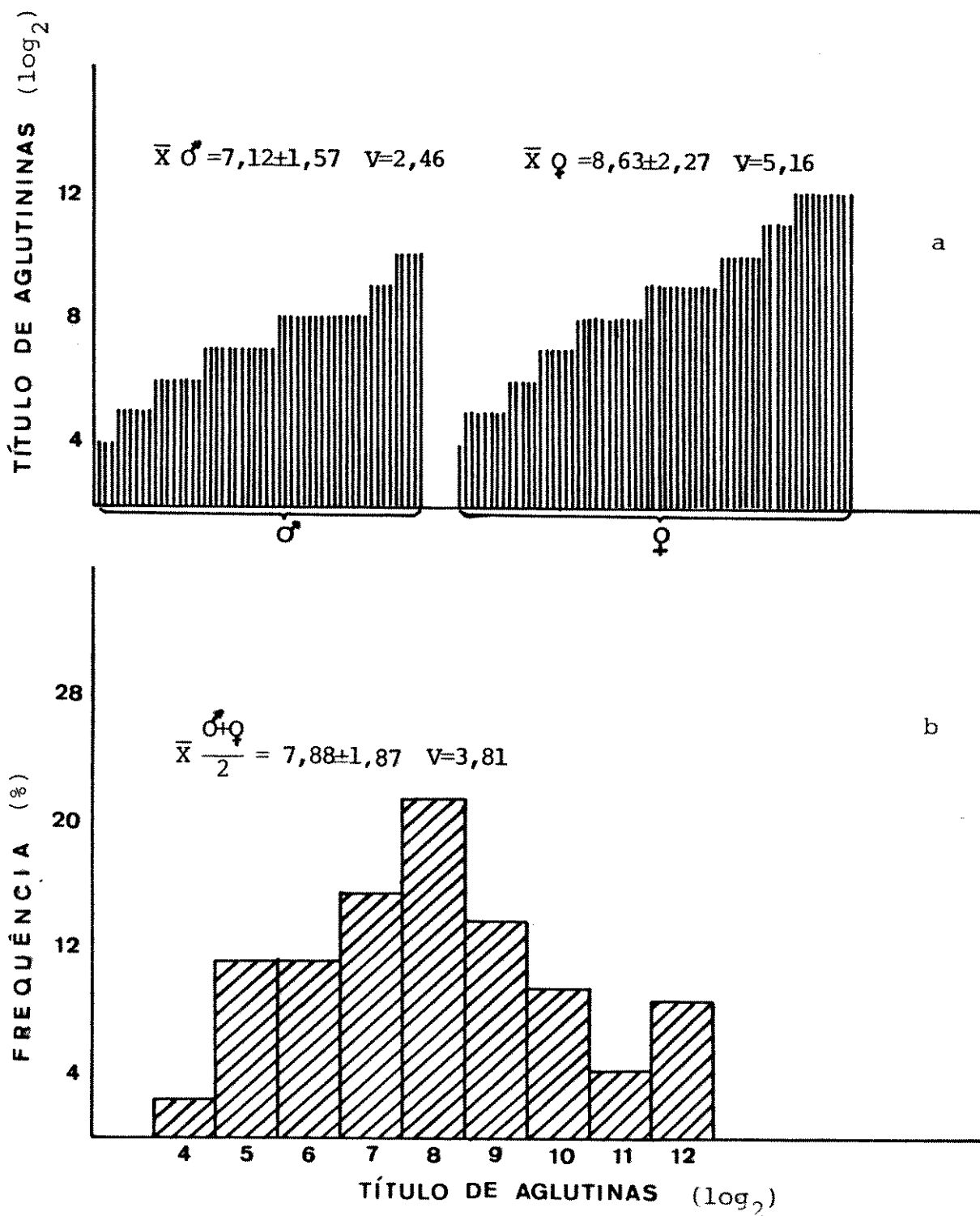


FIGURA 4 - a -Resposta individual de aglutininas contra dose ótima imunizante de *Salmonella typhimurium* (antígeno s) (geração F_0).

b -Distribuição de frequência de resposta individual contra dose ótima imunizante de *Salmonella typhimurium* (antígeno s) (geração F_0).

III.2.2 - Avaliação da resposta de aglutininas contra eritrócitos humanos do tipo A Rh⁺, na geração F₁.

A população F₁, resultante dos cruzamentos seletivos da geração F₀ da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos, constituída de 114 camundongos (72 da linhagem boa (H/hte) e 42 da linhagem mã (L/hte) respondedoras), foi imunizada com 10⁸ HuE (dose ótima de imunização). Os animais foram sangrados 5 e 14 dias após a imunização e as aglutininas determinadas por microhemaglutinação.

O título médio de aglutininas anti HuE foi de 7,84 log₂ para a linhagem boa produtora e de 7,04 para a linhagem mã produtora (0,1 < P < 0,05).

A alternância de antígenos durante o processo seletivo é necessária, para evitar a interferência dos anticorpos maternos transferidos passivamente. Entretanto, para que os dados obtidos nas várias gerações possam ser comparados, é necessário que haja uma equivalência de resposta aos dois antígenos.

Para essa verificação, a avaliação da resposta inicial contra HuE foi feita pela análise dos resultados combinados das duas linhagens (H/hte e L/hte), da geração F₁.

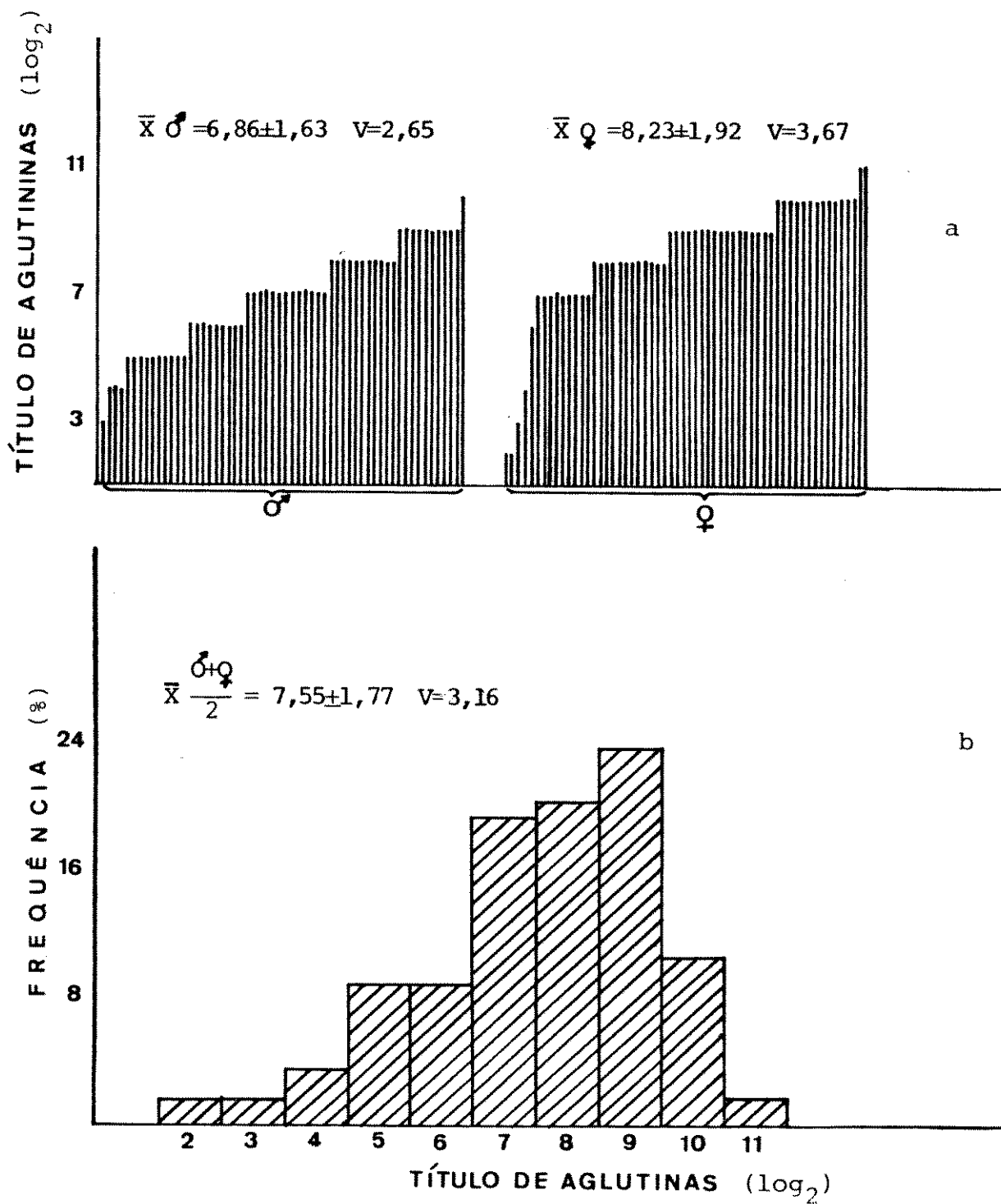


FIGURA 5 - a- Resposta máxima individual de aglutininas contra dose ótima imunizante de eritrócitos humano (geração F_1).

b- Distribuição de frequência da resposta máxima individual contra dose ótima imunizante de eritrócitos humano (geração F_1).

A distribuição de frequência dos títulos de aglutininas da população total F_1 (H/hte + L/hte) e as respostas individuais, constam da figura 5. Os títulos de aglutininas se distribuíram no intervalo de 2 a 11 \log_2 ($\bar{X} = 7,55 \pm 1,92$ $V=2,65$).

III.3 - Divergência entre as linhagens produzidas pelos acasalamentos seletivos contra eritrócitos heterólogos.

A separação das linhagens produzidas pelos acasalamentos seletivos de animais bons e maus produtores de anticorpos, contra eritrócitos heterólogos (SE e HuE), está representada na figura 6, onde se expressam as médias dos títulos máximos de aglutininas de cada uma das linhagens, nas cinco gerações estudadas.

O efeito de seleção já é evidente em F_1 , e torna-se altamente significante a partir de F_2 , onde a diferença entre as linhagens é de $2,41 \log_2$, apresentando pequenas variações nas demais gerações até F_5 .

Na tabela II estão representados os valores médios dos títulos de aglutininas (\log_2) nas gerações sucessivas (F_1 a F_5).

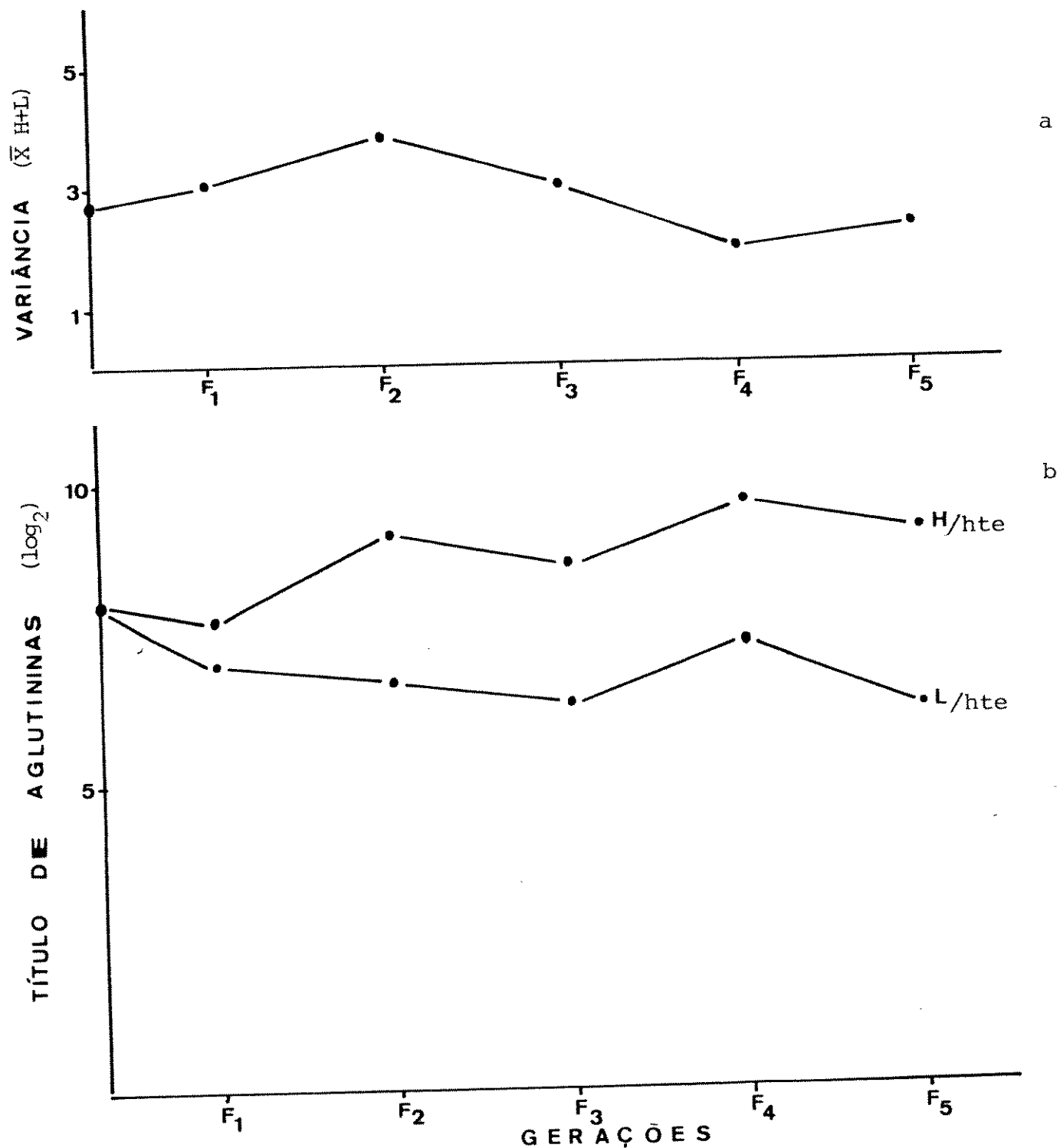


FIGURA 6- a - Média das variâncias das linhagens H/hte e L/hte nas cinco gerações estudadas.

b - Média dos títulos máximos de aglutininas em cinco gerações consecutivas de acasalamento seletivo para boa(H) e mã (L) resposta contra doses ótimas de SE (gerações pares) e HuE (gerações ímpares). $F < 0,001$ a partir de F₂.

TABELA II - Valores médios dos títulos de aglutininas das linhagens boa (H/hte) e mã (L/hte) produtoras de anticorpos, contra eritrócitos heterólogos (SE e HuE) (\log_2)

GERAÇÃO *	TÍTULOS MÉDIOS		$\bar{X}_H - \bar{X}_L$	Nível de Significância
	H/hte	L/hte		
F ₁	7,84	7,04	0,80	0,1 < P < 0,05
F ₂	9,07	6,66	2,41	< 0,001
F ₃	8,59	6,26	2,33	< 0,001
F ₄	9,57	7,33	2,24	< 0,001
F ₅	9,12	6,21	2,91	< 0,001

* As gerações pares foram imunizadas com eritrócitos de carneiro, e as gerações ímpares foram imunizadas com eritrócitos humanos A Rh⁺.

Uma pequena superioridade na resposta das fêmeas foi verificada, porém, este efeito foi corrigido usando como média final a média aritmética dos valores médios dos machos e das fêmeas.

III.3.1 - Geração F₄

A geração F₄, constituída de 93 camundongos (39 H/hte e 54 L/hte), foi imunizada com eritrócitos de carneiro. A distribuição de frequência dos títulos máximos de aglutininas para as linhagens H e L, está representada na figura 7.

Os títulos de aglutininas distribuíram-se no intervalo de 5 a 11 log₂ (\bar{X} = 7,33 ± 1,54) na linhagem L/hte, e de 7 a 12 log₂ (\bar{X} = 9,57 ± 1,18) na linhagem H/hte. A diferença entre as linhagens foi de 2,24 log₂.

Esses animais foram também imunizados com *Salmonella typhimurium*, 16 dias após a imunização com SE. A distribuição de frequência dos títulos de aglutininas nas duas linhagens, contra os antígenos f e s de *Salmonella*, está representada nas figuras 8 e 9 respectivamente.

Os títulos de aglutininas das linhagens H e L distri-

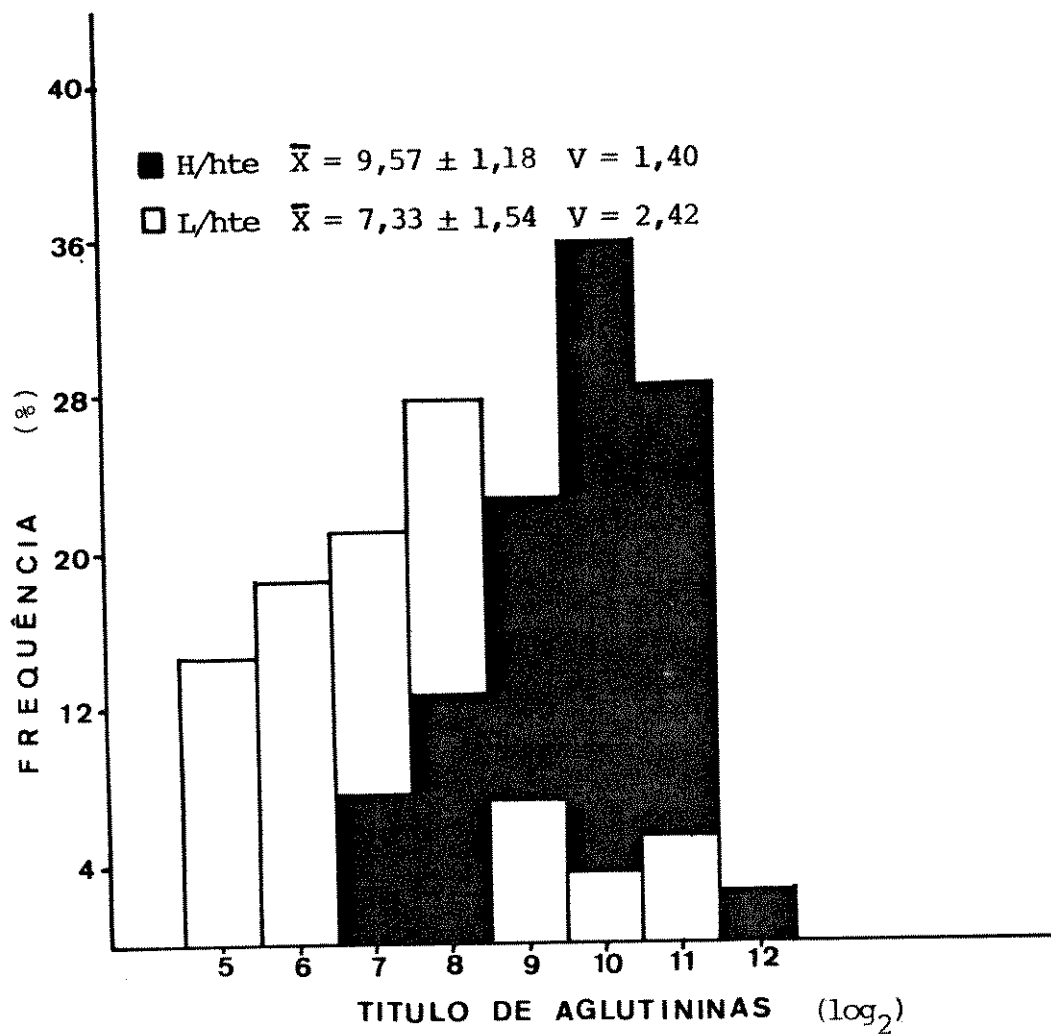


FIGURA 7 - Distribuição de frequência dos títulos máximos de aglutininas das linhagens H/hte e L/hte (geração F_4), imunizadas com eritrócitos de carneiro.

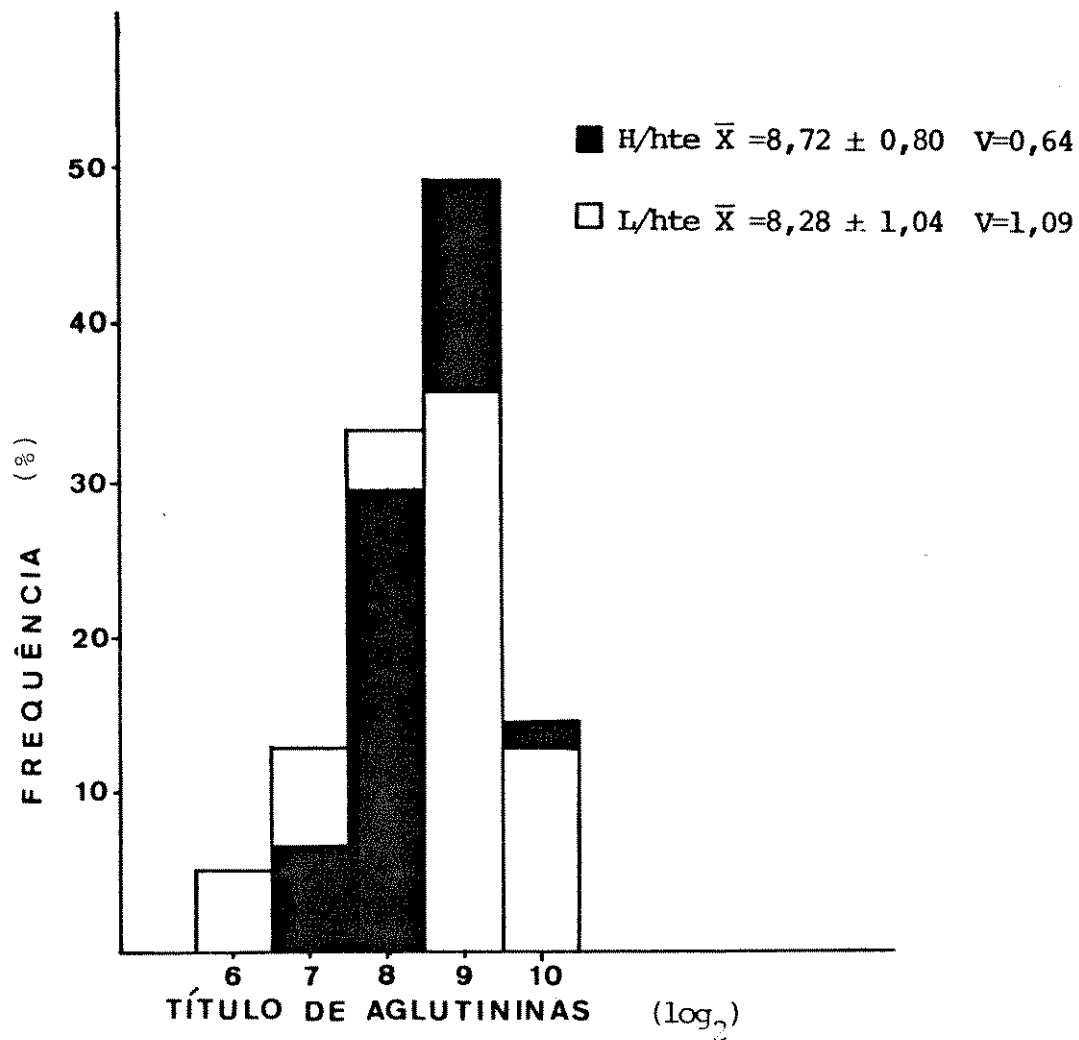


FIGURA 8 - Distribuição de frequência dos títulos de aglutininas das linhagens H/hte e L/hte (geração F_4) contra o antígeno f de *Salmonella typhimurium*.

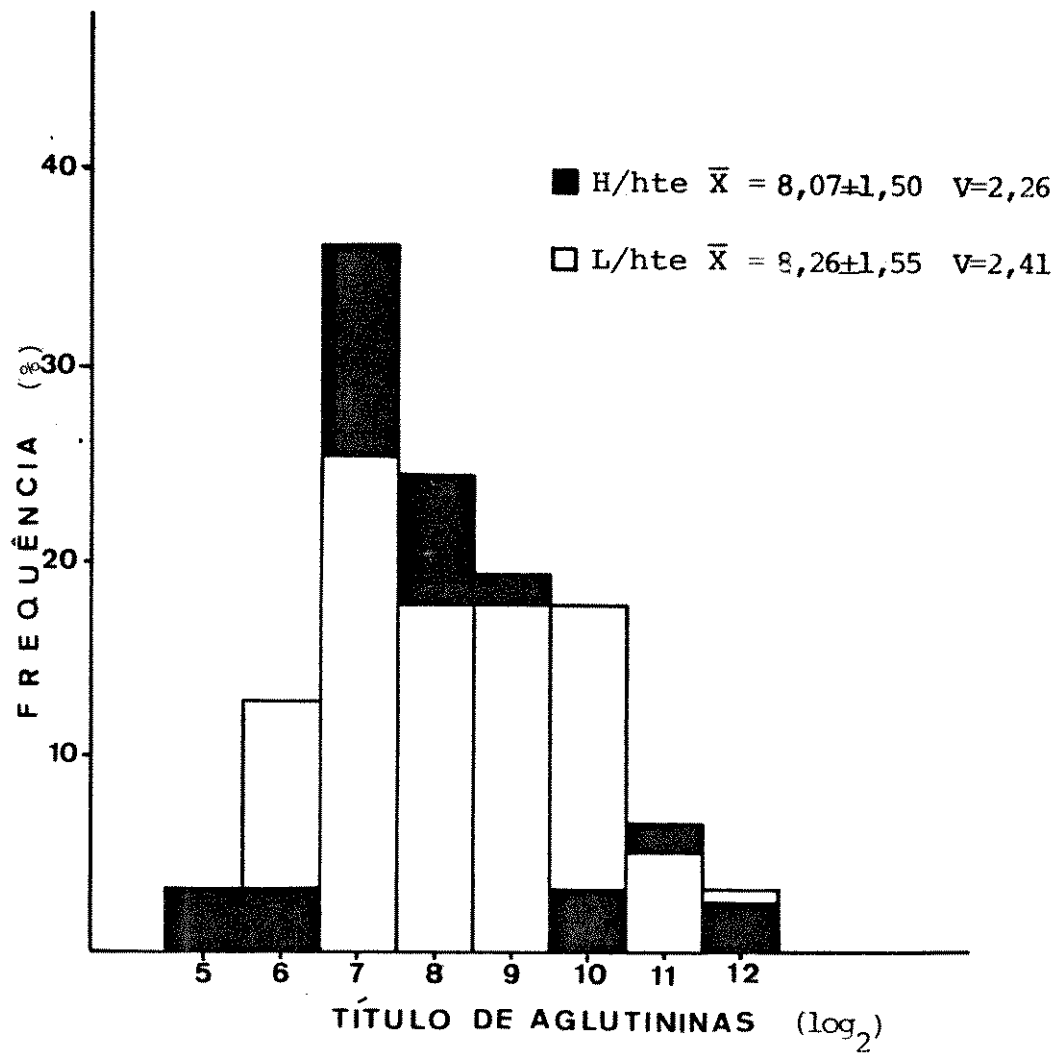


FIGURA 9 - Distribuição de frequência dos títulos de aglutininas das linhagens H/hte e L/hte (geração F_4) contra o antígeno s de *Salmonella typhimurium*.

buíram-se no intervalo de 6 a 10 \log_2 ($\bar{X}=8,72\pm 0,30$, linhagem H), e 7 a 10 \log_2 ($\bar{X}=8,28\pm 1,04$, linhagem L) para o antígeno f.

Os títulos de aglutininas para o antígeno s se distribuíram no intervalo de 5 a 12 \log_2 ($\bar{X}=8,07\pm 1,50$, linhagem H), e de 6 a 12 \log_2 ($\bar{X}=8,26\pm 1,55$, linhagem L).

A diferença de resposta entre as linhagens H/hte e L/hte, para os dois antígenos (f e s), não foi significativa.

III.3.2 - Geração F_5

Constituída de 143 camundongos (90 H/hte e 53 L/hte), a geração F_5 foi imunizada com eritrócitos humanos. A distribuição de frequência dos títulos máximos de aglutininas, para as duas linhagens, está representada na figura 10.

Os títulos de aglutininas distribuíram-se no intervalo de 5 a 12 \log_2 ($\bar{X}=9,12\pm 1,34$) na linhagem H/hte, e de 2 a 10 \log_2 ($\bar{X}=6,21\pm 1,61$) na linhagem L/hte. A diferença entre as linhagens foi de 2,91 \log_2 .

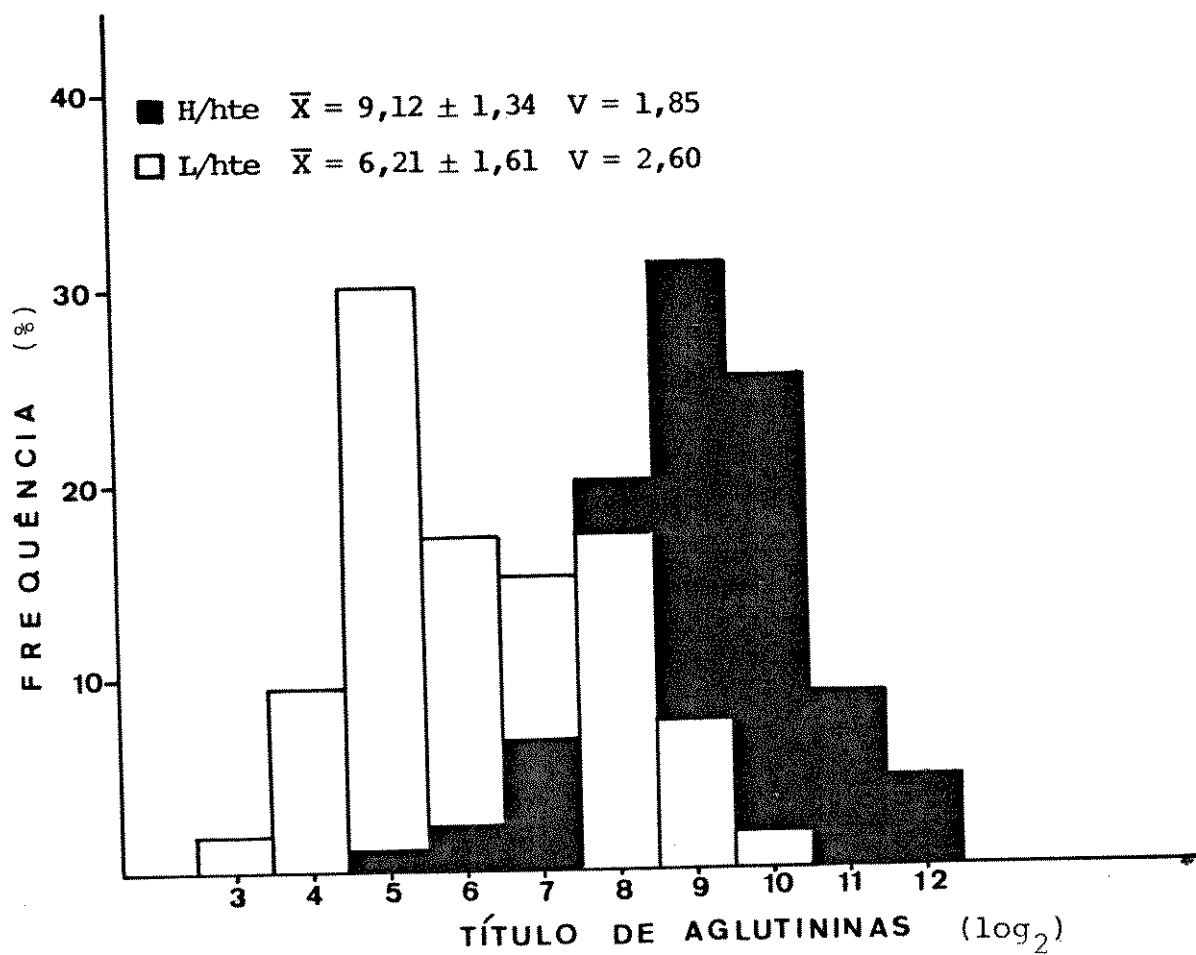


FIGURA 10 - Distribuição de frequência dos títulos máximos de aglutininas das linhagens H/hte e L/hte (geração F_5), imunizadas com eritrócitos humano.

III. 4 - Cálculo da herdabilidade

O cálculo da herdabilidade (h^2) é dado pela razão entre os valores acumulados da Resposta de Seleção (R) e do Diferencial de Seleção (S), obtidos nas gerações sucessivas ($h^2 = R/S$).

Uma vez que eritrócitos de carneiro e humanos foram alternados em cada geração, esse cálculo só pode ser feito se os dois antígenos produzirem, no camundongo, resposta equivalentes de anticorpos.

A comparação da resposta da população inicial, imunizada com SE, com a resposta da população semelhante (soma de bons e maus respondedores da F_1), imunizada com HuE (ítems III.2.1 e III.2.2), mostrou equivalência da resposta aos dois antígenos. O mesmo fato ocorreu durante o processo seletivo, demonstrado pela comparação das respostas de aglutininas das gerações pares (imunizadas com SE), com a das gerações ímpares (imunizadas com HuE). Os dados obtidos estão resumidos na tabela III.

Em todas as populações comparadas, o valor da razão é próximo de 1, portanto, os dois eritrócitos usados produzem respostas equivalentes de aglutininas tanto em camundongos normais,

TABELA III - Equivalência na resposta de aglutininas contra eritrócitos de carneiro e humano, nas cinco gerações estudadas.

CAMUNDONGOS	Nº de Animais	Antígeno	X dos Títulos	
			\log_2	$\bar{X}SE/\bar{X}HuE$
População Inicial				
F ₀	122	SE	7,98 ± 1,64	1,06
Pop. Equivalente				
F ₁	114	HuE	7,55 ± 1,77	
Linhagem H				
F ₂ + F ₄	84	SE	9,30 ± 1,61	1,06
F ₃ + F ₅	139	HuE	8,78 ± 1,71	
Linhagem L				
F ₂ + F ₄	98	SE	7,02 ± 1,31	1,13
F ₃ + F ₅	100	HuE	6,23 ± 1,61	
			$\bar{X}^* = 1,08 \pm 0,05$	

* Valor médio das comparações, nas várias populações.

como em camundongos selecionados, durante as diversas gerações.

Os resultados obtidos nas gerações sucessivas puderam, portanto, ser diretamente comparados sem correção, e acumulados, para o cálculo de R, S e h^2 .

A tabela IV expressa os dados detalhados das 6 gerações estudadas; valores médios, desvios padrão e a média ponderada dos pais selecionados em cada geração.

O cálculo da herdabilidade (h^2), nas linhagens isoladas, está sujeito a flutuações erráticas dos títulos, que ocorrem paralelamente nas linhagens H e L (figura 6), sendo por isso o h^2 calculado a partir da divergência entre as linhagens um dado mais confiável.

Na tabela V, R e S são calculados na divergência entre as linhagens, pela adição dos valores acumulados de R e S obtidos nas gerações correspondentes, das linhagens H/hte e L/hte.

Na figura 11a, que relaciona os valores de R acumulados e as gerações, a inclinação da reta mede a divergência média das linhagens por geração (RG), que foi causada pelo diferencial de seleção médio por geração (SG), figura 11b. A inclinação da regressão linear dos quadrados mínimos dos valores acumulados de R

sobre o de S, é a melhor medida da herdabilidade, constatada nas cinco gerações de acasalamentos seletivos: $h^2 = 0,19$, figura 11c.

TABELA IV - Cálculo do Diferencial de Seleção acumulado (S), Resposta à Seleção acumulada (R) e de herdabilidade (h^2) nas linhagens H/hte e L/hte durante 5 gerações de acasalamentos seletivos.

Linha- gem	Gera- ção	Número de camundongos	Título médio da geração	Número de casais	Média pon- derada dos pais sele- cionados	S acumulado	R acumulado	h^2 (R/S)	$\bar{x} h^2$
	F ₀	122	7,98+1,64	8	10,06	2,05	-	-	
	F ₁	72	7,84+1,79	10	9,20	3,41	- 0,14	- 0,07	
H/hte	F ₂	45	9,07+1,20	7	9,90	4,24	1,09	0,32	0,16
	F ₃	49	8,59+2,01	6	9,30	4,95	0,61	0,14	+1
	F ₄	39	9,57+1,18	10	10,20	5,58	1,59	0,32	0,18
	F ₅	90	9,12+1,34	-	-	-	1,14	0,20	
	F ₀	122	7,98+1,64	5	5,6	2,38	-	-	
	F ₁	42	7,04+1,66	7	5,8	3,62	0,94	0,39	0,12
L/hte	F ₂	44	6,66+2,63	8	5,4	4,88	1,32	0,36	+1
	F ₃	47	6,26+1,24	9	5,1	6,04	1,72	0,35	0,29
	F ₄	54	7,33+1,54	7	5,7	7,67	0,65	0,11	
	F ₅	53	6,21+1,61	-	-	-	1,77	0,23	

TABELA V - Cálculo da herdabilidade (h^2) através da divergência entre as linhagens H/h_{te} e L/h_{te} da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos.

GERAÇÃO	S ACUMULADO	R ACUMULADO	h^2	$\bar{X} h^2$
F ₁	4,43	0,8	0,18	
F ₂	7,03	2,41	0,34	
F ₃	9,12	2,33	0,26	0,24 ± 0,06
F ₄	10,99	2,24	0,20	
F ₅	13,25	2,91	0,22	

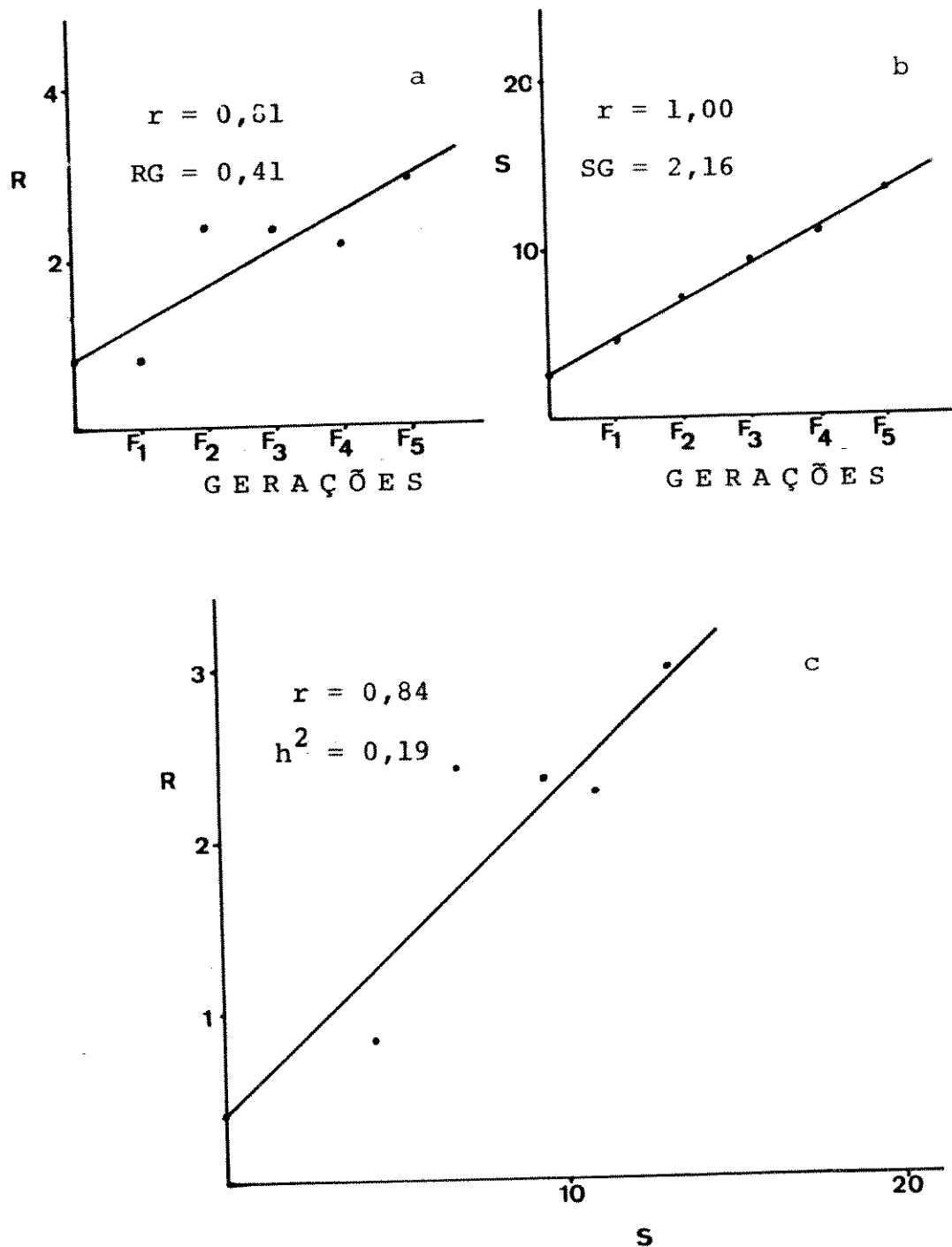


FIGURA 11 - Cálculo da resposta à seleção acumulada (R) e do diferencial de seleção (S) a partir da divergência interlinhagens, durante 5 gerações de acasamentos seletivos. A herdabilidade média (h^2) é calculada pela regressão de R acumulado/ S acumulado. r = Coeficiente de correlação.

III.5 - Correlação entre as respostas dos camundongos da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos, contra os antígenos SE e antígenos f e s de *Salmonella typhimurium*.

Os camundongos das gerações pares da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos foram imunizados com SE e *Salmonella typhimurium*, sendo determinado o título individual de anticorpos para cada antígeno.

O grau de associação entre as respostas anti-SE x anti-s, anti-SE x anti f e anti-s x anti-f foi determinado, através do coeficiente de correlação linear. Os valores encontrados estão representados na tabela VI.

Nenhuma correlação foi encontrada entre a resposta aos antígenos f e s de *Salmonella* e SE, enquanto que nas respostas aos antígenos f e s de *Salmonella* foi verificada uma correlação constante.

TABELA VI - Correlação entre as respostas dos camundongos das gerações F₀, F₂ e F₄ aos antígenos f e s de *Salmonella typhimurium* e Eritrócitos de Carneiro.

RESPOSTA DE ANTICORPOS	INCLINAÇÃO*				COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO*				P**
	F ₀	F ₂	F ₄	F ₄	F ₀	F ₂	F ₄	F ₄	
Anti-SE x Anti-s	0,1	0,07	0,08	0,08	0,1	0,1	0,04	0,04	N.S.
Anti-SE x Anti-f	0,19	0,02	0,08	0,08	0,28	0,03	0,1	0,1	N.S.
Anti-s x Anti-f	0,34	0,78	0,67	0,67	0,52	0,52	0,40	0,40	<0,001

* Calculados pela regressão linear dos quadrados mínimos.

** Nível de significância.

*** Não significante.

III.6 - Resposta dos camundongos das linhagens H/hte e L/hte contra antígenos não relacionados com os de seleção.

Camundongos da geração F_4 foram divididos em grupos, e imunizados com gamaglobulina bovina (grupo A), gamaglobulina de coelho (grupo B), eritrócitos de pombo (grupo C) e eritrócitos de galinha (grupo D).

Esses mesmos antígenos foram anteriormente testados em camundongos da geração F_{22} , Seleção IV, o que nos permitiu fazer uma análise comparativa entre os nossos resultados e aqueles obtidos na geração F_{22} da Seleção IV. Para comparação, os animais da Seleção IV foram divididos nos grupos A', B', C' e D', conforme imunização com BGG, RGG, PE e CE respectivamente. Os dados obtidos estão representados na tabela VII.

Os animais dos grupos A, B e C foram imunizados posteriormente com SE (16 dias após a última inoculação de BGG, RGG ou PE), e *Salmonella typhimurium* (16 dias após a inoculação com SE). A correlação entre as respostas individuais, apresentada aos vários antígenos, foi calculada (tabela VIII).

TABELA VII - Resposta dos animais das linhagens H/hte e L/hte (Seleção contra eritrócitos heterólogos, geração F_4), e dos animais das linhagens H/s e L/s (Seleção IV, geração F_{22}) contra antígenos não relacionados com os de seleção.

ANTÍGENO	GRUPO	LINHAGEM	Nº de ANIMAIS	Tit. de Aglut.		P*
				\bar{X}	$\bar{X}_H - \bar{X}_L$	
BGG	A	H/hte	10	5,6 \pm 1,8	0,2	N.S.
		L/hte	10	5,4 \pm 2,5		
	A'	H/s	12	6,7 \pm 1,7	3,1	<0,001
		L/s	12	3,6 \pm 0,8		
RGG	B	H/hte	10	12,9 \pm 1,8	1,9	0,01 < P < 0,02
		L/hte	10	10,9 \pm 0,7		
	B'	H/s	14	3,6 \pm 3,3	-6,4	<0,001
		L/s	14	10,0 \pm 1,9		
PE	C	H/hte	10	13,9 \pm 0,8	4,6	<0,001
		L/hte	10	9,1 \pm 1,4		
	C'	H/s	14	10,4 \pm 1,6	1,5	0,01 < P < 0,02
		L/s	14	8,9 \pm 1,3		
CE	D	H/hte	25	7,6 \pm 1,4	1,8	<0,001
		L/hte	17	5,8 \pm 1,3		
	D'	H/s	14	7,4 \pm 1,0	0,5	N.S.
		L/s	14	6,9 \pm 1,4		

* Nível de Significância

TABELA VIII - Correlação das respostas dos camundongos H/hte e L/hte aos antígenos RGG, BGG e PE, com as respostas anti-SE e anti antígeno s de *Salmonella typhimurium*.

GRUPO	Nº de CAMUNDONGOS	ANTÍGENO INICIAL	CORRELAÇÃO COM AS RESPOSTAS INDIVIDUAIS					
			r	b	P	r	b	P
			Anti-SE	anti-s	<i>Salmonella typhimurium</i>			
A	19	BGG	0,11	0,21	N.S.	0,01	0,02	N.S.
B	17	RGG	0,47	0,48	0,1 < P < 0,05	0,12	0,11	N.S.
C	18	PE	0,73	1,32	< 0,001	-0,42	-0,51	N.S.

r = Coeficiente de correlação.

b = Inclinação.

N.S. = Não significante.

P = Nível de Significância.

IV - DISCUSSÃO

Em todas as seleções genéticas bidirecionais de camundongos obtidas de acordo com a quantidade de anticorpo produzida contra antígenos naturais complexos, descritas até o momento, independentemente do número de gerações requeridas para a obtenção da homozigose e do número de loci selecionados, a diferença máxima de resposta entre as linhagens boas e más respondedoras esteve sempre ao redor de $6 \text{ a } 8 \log_2$ para os antígenos selecionadores (Biozzi et al, 1979).

Os processos seletivos, no entanto, afetaram diferentemente o controle genético inespecífico da resposta imune, isto é, a intensidade da resposta das linhagens selecionadas contra antígenos não relacionados com aqueles de seleção. A intensidade e a amplitude do efeito inespecífico variou nas diferentes seleções, e aparentemente foi proporcional ao número de loci envolvidos na seleção.

Assim, nas Seleções I e III, onde o número de loci selecionados foi de 10 e 6 respectivamente, o efeito inespecífico foi

muito grande na Seleção IV, com 3 loci selecionados, o efeito foi menor, enquanto na Seleção V, com 2 loci envolvidos, este efeito foi bastante restrito (Biozzi et al, 1979; Biozzi et al, 1980).

Fazendo uma análise comparativa dos resultados da Seleção I (seleção contra eritrócitos de carneiro e pombo) com os resultados da Seleção IV (Seleção contra antígeno somático de *Salmonellae*) verificamos que, a Seleção I está bastante separada para os antígenos f e s de *Salmonellae*, enquanto a Seleção IV não está separada para eritrócitos de carneiro (Siqueira et al, 1977; Sant'Anna et al, 1979).

Aparentemente, a pressão seletiva atuante na Seleção I comprometeu um lote de genes envolvidos na resposta anti-eritrócitos de carneiro e anti-antígenos s e f de *Salmonellae*, assim como a resposta a outros numerosos antígenos, enquanto que o lote de genes comprometidos pela Seleção IV, envolvidos na resposta anti-antígenos s e f de *Salmonellae*, apresenta envolvimento parcial na resposta a alguns dos antígenos testados, porém não atua na resposta anti-eritrócitos de carneiro.

A análise genética da resposta dos híbridos F_1 , dos segregantes F_2 e retrocruzamentos das linhagens boas e más respondedoras das Seleções I, III e IV permitiu a determinação do número de genes envolvidos na resposta secundária anti-f e anti-s de *Salmonellae* e na resposta primária anti-eritrócitos de carneiro. Os resultados constam da tabela seguinte, elaborada a partir dos tra

balhos de, Biozzi et al, 1979, Sant'Anna et al, 1979 e Ferreira, 1979.

SELEÇÃO	RESPOSTA SECUNDÁRIA Anti-f <i>Salmonellae</i>		RESPOSTA SECUNDÁRIA Anti-s <i>Salmonellae</i>		RESPOSTA PRIMÁRIA Anti-SE	
	$\bar{X}H - \bar{X}L$	nº de Loci*	$\bar{X}H - \bar{X}L$	nº de Loci	$\bar{X}H - \bar{X}L$	nº de Loci
	I	4,13	2,6	3,31	0,6	7,83
III	6,23	6,1	5,89	2,6	3,30	N.A.
IV	6,51	2,0	6,52	3,0	-0,50	N.A.

* Estimativa do nº de loci calculada a partir da análise de F₂ e dos retrocruzamentos.

N.A. Não analisados

Antígeno de seleção

As linhagens boas e más respondedoras das Seleções III e IV mostraram o mesmo grau de separação, para os antígenos de seleção (f ou s) e para os antígenos associados (s ou f), durante todo o processo seletivo. A análise genética dos híbridos, entretanto, mostrou que o número de loci, envolvidos na resposta anti-s, foi cerca de 3 nas Seleções III e IV, enquanto que para a resposta anti-f, 2 loci na Seleção IV foram suficientes para produzir a diferença máxima H - L. Na Seleção III, no entanto, foi calculado, em relação à resposta anti - f, um número total de 6 loci selecionados; aparentemen-

te, 2 loci comuns às Seleções III e IV, são muito importantes para a resposta anti-f. Os loci suplementares presentes na Seleção III além de participarem na resposta anti-f, podem estar também envolvidos com a resposta diversificada da Seleção III, para uma gama muito ampla de antígenos não relacionados aos de seleção (Biozzi et al, 1979; Sant'Anna et al, 1979). Esses mesmos loci, aparentemente não aumentaram a diferença H - L na Seleção III, talvez devido a uma ação homeostática entre os genes envolvidos, mas contribuíram para a maior homogeneidade destas linhagens, em relação às respostas anti-f e anti-s de *Salmonellae*, como indica a tabela seguinte, que resume as variâncias obtidas nas linhagens, híbridos e segregantes (Ferreira, 1979).

LINHAGEM	Variância da Resposta		Variância da Resposta	
	Secundária Seleção III	anti-f Seleção IV	Secundária Seleção III	anti-s Seleção IV
H	0,55	0,71	0,66	1,13
L	0,62	0,91	1,38	1,53
F ₁	0,43	0,74	0,94	0,82
F ₂	1,37	2,20	2,40	2,92
Nº de Genes	6,1	2,0	2,6	3,1

Antígeno de Seleção

As diferenças entre as variâncias das Seleções III e IV, nas respostas anti-f, foram estatisticamente significantes, enquanto que nas respostas anti-s não o foram, exceto para a linhagem H, onde a Seleção III apresenta maior homogeneidade.

As variâncias das respostas anti-s foram iguais nos animais provenientes das Seleções III e IV, indicando que os 3 loci que atuam nessa resposta, são comuns às duas seleções. A Seleção I teve 2,6 loci envolvidos na resposta anti-f, mas, aparentemente, não há identidade completa entre esses loci e os envolvidos nas Seleções III e IV, uma vez que a diferença de comportamento entre as linhagens H e L da Seleção I, foi menor. Por outro lado, em relação à resposta anti-s, o locus envolvido, parece ser muito importante para esta resposta, sendo suficiente para promover um efeito inespecífico de cerca de 50% (H-L = 3,31), na Seleção I (Biozzi et al, 1979)

A resposta da Seleção IV ao antígeno f, no entanto, mostrou-se mais heterogênea do que a da Seleção III (variâncias significativamente maiores da IV), tanto nas linhagens como nos híbridos F_1 e nos segregantes F_2 , indicando que, ao nível destes outros genes envolvidos na Seleção III (provavelmente 3 ou 4), as linhagens da Seleção IV são ainda heterogêneas (Ferreira, 1979).

A Seleção IV apresentou um efeito inespecífico total em relação a *Salmonella anatum* (não relacionada com os antígenos de seleção), e a conjugados DNP-*Salmonella*, e um efeito inespecífico muito restrito a outros antígenos não relacionados. Portanto, nesta seleção, os 3 loci envolvidos na resposta anti antígeno s de *Salmonellae*, devem ser primordiais para a resposta contra os antígenos de *Salmonellae*, mas aparentemente, não atuam na resposta an

ti eritrócitos de carneiro.

Nossa primeira preocupação seria, portanto, verificar a possibilidade de separar linhagens boas e más respondedoras contra eritrócitos de carneiro, a partir de segregantes F_2 entre as linhagens H e L da Seleção IV. A fim de se evitar, durante o processo seletivo, a interferência de anticorpos maternos transferidos passivamente à progênie, foram usados, alternadamente nas várias gerações, eritrócitos de carneiro e eritrócitos humanos do tipo A Rh⁺, antígeno para o qual a resposta das linhagens da Seleção IV é também semelhante.

Realmente, o sucesso desta seleção mostrou que os alelos de efeito "bom" e "mau", na resposta quantitativa de anticorpos anti-SE, estavam distribuídos aleatoriamente nas linhagens H/s e L/s. A análise da resposta a *Salmonella*, durante o processo seletivo contra eritrócitos heterólogos, mostrou ausência de correlação entre ambas as respostas, evidenciando que os genes envolvidos nesta seleção, não tiveram influência sobre a intensidade da resposta contra os antígenos de *Salmonella*.

O ganho médio por geração (RG), nas novas linhagens selecionadas, foi de 0,4, e a herdabilidade média (h^2) do caráter investigado, medido através da divergência entre as linhagens das cinco gerações estudadas, foi de $0,24 \pm 0,05$. Esses valores são mui

to semelhantes aos encontrados nas outras seleções de camundongos, analisadas até o momento.

Um cálculo preliminar do número de loci selecionados neste processo pode ser estimado, a partir dos valores da variância da população inicial (VF_0), da herdabilidade média realizada (h^2) e da separação entre as linhagens (RT), pela seguinte equação (Falconer, 1960):

$$n = \frac{(1/2 RT)^2}{2(VF_0 \times h^2)} = 1,64$$

Por esse cálculo preliminar, podemos admitir que até o momento, a Seleção contra Eritrócitos Heterólogos operou em alelos localizados em 1 a 2 loci, importantes para a resposta anti eritrócitos de carneiro e humanos.

O estudo destas linhagens, agora selecionadas, contra outros antígenos não relacionados com os de seleção, demonstrou que este pequeno número de loci, seguramente atua na resposta anti eritrócitos de pombo e galinha e aparentemente a RGG, como demonstram os resultados da correlação entre as respostas a estes antígenos e SE (Tabela VIII). Estes mesmos genes, entretanto, não tem efeito sobre a resposta aos antígenos f e s de *Salmonella* e BGG, não havendo correlação entre essas respostas e a resposta a SE (Tabelas VI e VIII).

Nossos resultados, portanto, são a primeira confirmação de que os genes do controle genético inespecífico atuam quantitativa e qualitativamente diferente, na resposta aos vários antígenos.

As pressões de seleção aparentemente conduzem, primordialmente, à seleção de genes inespecíficos essenciais à resposta diferencial de bons e maus respondedores de anticorpos, ao antígeno de seleção, ou a famílias de antígenos correlacionados. Essas famílias de antígenos, capazes de exercer pressões seletivas semelhantes, teriam como características, serem controladas geneticamente pelo mesmo lote de genes inespecíficos. Esse controle não implicaria em que os componentes de uma mesma família de antígenos tivessem necessariamente semelhança antigênica ou estrutural, mas que dependessem de fatores comuns durante seu processamento e formação dos seus respectivos anticorpos. A intensidade do efeito inespecífico, assim irá depender em cada seleção não só do número de loci envolvido, como também da importância destes, na resposta a outros antígenos não relacionados.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

- 1 - As linhagens H/s e L/s, obtidas usando como caráter selecionador a resposta elevada ou baixa contra antígenos de *Salmonellae* (Seleção IV), não se diferenciaram na resposta contra eritrócitos de carneiro e humanos. Tomando como população inicial segregantes F_2 entre as linhagens H/s e L/s, foi possível selecionar camundongos bons (H/hte) e maus (L/hte) respondedores contra eritrócitos de carneiro e humanos. Essas novas linhagens, por sua vez, apresentaram respostas semelhantes contra antígenos de *Salmonella*.
- 2 - A análise genética dos dados obtidos nas cinco gerações estudadas da Seleção contra Eritrócitos Heterólogos (SE e HuE), demonstrou que a separação entre as linhagens vem se desenvolvendo progressivamente. A "herdabilidade realizada" foi cerca de 0,2; o ganho por geração 0,4; e a pressão de seleção 2,2, valores muito semelhantes aos obtidos nas outras seleções de camundongos já descritas (Biozzi et al, 1979). O número de loci tornado homozigotos até o momento, foi cerca de 2, calculado a partir da herdabilidade e da variância da população inicial.

- 3 - Os genes selecionados atuam também, na resposta contra eritrócitos de pombo e de galinha, e possivelmente na resposta a RGG, porém, não tem nenhuma influência sobre a resposta contra os antígenos f e s de *Salmonella* e contra BGG. A intensidade do efeiito inespecífico, portanto, irá depender, em cada seleção, não só do número de loci envolvidos, como também da importância destes, na resposta a cada um dos antígenos testados.

- 4 - A pressão seletiva de um determinado antígeno, pode conduzir à seleção de genes essenciais à resposta diferencial de H e L a este antígeno, ou a família de antígenos, que seriam controlados pelo mesmo lote gênico.

VI - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 - ARMERDING, D., KATZ, D. & BENACERRAF, B. - Immune response genes in inbred rats. II. Segregation studies of the GT and GA genes and their linkage to the major histocompatibility locus. *Immunogenetics*, 1: 340, 1974.
- 2 - AVRAMEAS, S., TAUDOU, B. & CHUILLON, S. - Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetrazotized O-dianizidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochemistry*, 6:67, 1969.
- 3 - BANDIERI, A. S. - Seleção genética de linhagens de camundongos pela produção de anticorpos. Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina, 1973.
- 4 - BENACERRAF, B., BLUESTEIN, H. G., GREEN, I. & ELLMAN, L. - Specific immune response genes of guinea pigs. *Progress in Immunology*. First International Congress of Immunology. Amos B. (ed.), Academic Press, New York, P.478, 1971.
- 5 - BENACERRAF, B. & KATZ, D. H. - The histocompatibility-linked immune response genes. *Adv. Cancer Research*, 21:121, 1975.
- 6 - BENACERRAF, B. & KATZ, D. H. - The nature and function of histocompatibility-linked immune response genes. *Immunogenetics and Immunodeficiency*, B. Benacerraf (ed.), MTP Publishing Co., Lancaster, P.117, 1975.

- 7 - BENACERRAF, B. & McDEVITT, H.O. - Histocompatibility-linked Immune response genes. *Science*, 175:273, 1972.
- 8 - BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y. - Selection of lines of mice with high and low antibody response to complex immunogens. *Immunogenetics and Immunodeficiency*, B. Benacerraf (ed.) - MTP Publishing Co., Lancaster, P. 179, 1975.
- 9 - BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y. & DECREUSEFOND, C. - Sélèction artificielle pour la production d'anticorps chez la souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 115:965, 1968.
- 10 - BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y. & DECREUSEFOND, C. - Genetic regulation of the function of antibody producing cells. *Progress in Immunology*. First International Congress of Immunology. B. Amos (ed), Academic Press, New York, P.530, 1971.
- 11 - BIOZZI, G. MOUTON, D., SANT'ANNA, O. A., PASSOS, H.C., GENNARI, M., REIS, M.H., FERREIRA, V.C.A., HEUMANN, A. M., BOUTHILLIER, Y., IBAÑEZ, O. M., STIFFEL, C. & SIQUEIRA, M. - Genetics of immuneresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 85:31, 1979.
- 12 - BIOZZI, G., SIQUEIRA, M., MOUTON, D., SANT'ANNA, O. A., STIFFEL, C., ESTEVES, M. B. & BOUTHILLIER, Y. - La regulation polygenique non spécifique de la synthese des anticorps. *Ann. Inst.*

Pasteur, 128:393, 1977.

- 13 - BIOZZI, G., SIQUEIRA, M., STIFFEL, C., IBAÑEZ, O. M., MOUTON, D. & FERREIRA, V. C. A. - Genetic selections for relevant Immunological functions. *Progress in Immunology*. Four International Congress of Immunology, Immunology 80. M. Fougreau and J. Dausset (eds.) - Academic Press, London, P.433, 1980.
- 14 - BLUESTEIN, H. G., GREEN, I. & BENACERRAF, B. - Specific Immune response genes of the guinea pig. II. Relationship between the poly -L-lysine gene and the gene controlling responsiveness to copolymers of L-glutamic acid and L-alanine and L-glutamic acid and L-tyrosine in random bred Hartley guinea pigs. *J. Exp. Med.*, 134:471, 1971.
- 15 - CAVALLI-SFORZA, L. L. & BODMER, W. F. - *The Genetics of Human Populations*. Cap. 9 .W. H. Freeman and Company, San Francisco 1971.
- 16 - DORF, M. E., BALNER, H. & BENACERRAF, B. - Mapping of the immune response genes in the major histocompatibility complex of the rhesus monkey. *J. Exp. Med.*, 142:673, 1975.
- 17 - EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. - *Identification of Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, P.92, 1964.
- 18 - FALCONER, D. S. - *Introduction to Quantitative Genetics*. Cap. 11 , Ronald Press (ed.), New York, 1960.

- 19 - FEINGOLD, N., FEINGOLD, J., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y., STIFFEL, C. & BIOZZI, G. - Polygenic regulation of antibody synthesis to sheep erythrocytes in the mouse : A genetic analysis. *Eur. J. Immunol.*, 6:43, 1976.
- 20 - FERREIRA, V.C.A. - Analise genética do componente poligênico da síntese de anticorpos . Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina, 1979.
- 21 - GREEN, I. - Genetic control of Immune response. *Immunogenetics*, 1:4,1974.
- 22 - GUNTHER, R., RUDE, E. & SARK, O. - Antibody response in rats to the syntetic polypeptide (T,G)-A-L genetically linked to the major histocompatibility system. *Eur. J. Immunol.*, 2:151, 1972.
- 23 - HARDY, D. & ROWLEY, D. - The production of antibody to bovine serum in unresponsive (Sobey) mice. *Immunology*, 14:401, 1968.
- 24 - KABAT, E. A. & MAYER, M. M. - *Experimental Immunochemistry*. E. A. Kabat and M. M. Mayer (eds.) - Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, P. 871, 1961.
- 25 - KATZ, D. H. & BENACERRAF, B. - Genetic control of lymphocyte interaction and differentiation. *The Role of Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Response*. D. H. Katz & B. Benacerraf, (eds.). Academic Press, New York. P.355, 1976.

- 26 - KANTOR, F. S., OJEDA, A. & BENACERRAF, B. - Studies on artificial antigens. I Antigenicity of DNP-Poly_Lisine and DNP co polymer of lysine and glutamic acid in guinea pigs. *J. Exp. Med.*, 117:55, 1963.
- 27 - LEVINE, B. B., OJEDA, A. & BENACERRAF, B. Studies on artificial antigens. III. The genetic control of the immune response to hapten poly-L-Lisine conjugates in guinea pigs. *J. Exp. Med.* 118:953, 1963.
- 28 - LEVINE, B. B. & BENACERRAF, B. - The genetic control of the immune response to hapten polylysine conjugates in guinea pigs. *Science*, 147:517, 1975.
- 29 - McDEVITT, H. O. & CHINITZ, A. - Genetic control of antibody response. Relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. *Science* 163:1207, 1969.
- 30 - PASSOS, H. C., SIQUEIRA, M., REIS, M.H., FERREIRA, V. C. A., IBAÑEZ, O, M., SANT'ANNA, O. A. & BIOZZI, G. - Genetic control of immune response to protein antigens. I. Two way selective breeding for mice for quantitative antibody responsiveness to bovine serum albumin and Rabbit γ -globulin. *J. Immunol.*, 119: 1439, 1977.
- 31 - ROSENTHAL, A. S. & SHEVACH, E. M. - The function of macrophage in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement of histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138: 1194, 1973.

- 32 - SANT'ANNA, O. A. - Regulação poligênica não específica da síntese de anticorpos. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina, 1979.
- 33 - SANT'ANNA, O. A., BOUTHILLIER, Y., SIQUEIRA, M. & BIOZZI, G. - Differences in the genetic control of primary and secondary antibody responses. *Immunology*, 37: 849, 1979.
- 34 - SCHEIBEL, I. F. - Hereditary differences in the capacity of guinea pigs for the production of diphtheria antitoxin. *Acta path. microbiol. Scand.*, 20: 464, 1943.
- 35 - SOBEY, W. R. & MAGRATH, J. M. - Acquired Immunological unresponsiveness to bovine plasma albumin in mice. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18: 947, 1965
- 36 - SOBEY, W. R., MAGRATH, J. M. & REISNER, A. H. - Genetically controlled specific immunologic unresponsiveness. *Immunology*, 11: 511, 1966.
- 37 - SIQUEIRA, M., BANDIERI, A., REIS, M. S., SANT'ANNA O. A. & BIOZZI, G. - Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. *Eur. J. Immunol.*, 6: 241, 1976.
- 38 - SIQUEIRA, M., ESTEVES, M. B., IBAÑEZ, O. M., FERREIRA, V. C. A., SANT'ANNA, O. A., REIS, M. S. & BIOZZI, G. Nonspecific genetic regulation of antibody responsiveness in the mouse. *Eur. J. Immunol.*, 7: 195, 1977.

39 - WEICHSELBAUM, T. E. - An accurate and rapid metod for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *An. J. Clin. Path.*, 10: 40, 1946.