

ANTONIO CARLOS CORSINI

Células de Atividade Supressora e Exaustão do Potencial B e T: dois fenômenos relacionados com a Imunodepressão na infecção do camundongo pelo Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei - Plimmer & Bradford, 1889.

Tese Apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Sebastião Prigenzi

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo
1978

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Isaura Martins Corsini (in Memoriam)
e Zaíra Girardi Benedini, minhas avós;
aos meus pais Antonio e Maria ; ã
Glorinha minha esposa, e ainda uma vez,
ã Cristina, ao Carlos e ã Isabela ,
nossos filhos.

"... for he who has once seen the intimate beauty of nature cannot tear himself away from it again. He must become either a poet or a naturalist and, if his eyes are good and his powers of observation sharp enough, he may well become both".

Konrad Lorenz.

AGRADECIMENTOS

Ao assumir a responsabilidade de formalizar meus agradecimentos, reconheço a possibilidade de manter no anônimo pessoas que nem por isso tenham deixado de contribuir para a concretização desta tese. Ainda uma vez repito que este não é trabalho individual mas coletivo. Trata-se do esforço conjunto de inúmeras pessoas.

Também, embora possa parecer estranho aos não iniciados em pesquisas biológicas, aponho o meu agradecimento aos camundongos, os mais sacrificados, visto que pagaram sua contribuição com a própria vida.

Mas, não poderia deixar de citar a Sra. Jackie Welstead Hunter, que iniciou-me em muitas técnicas e cuja dedicação ao trabalho manual ensinou-me aquiescer muitas das minhas ansiedades intelectuais.

A Dra. Brigitte Alice Askonas, que dispozo seu laboratório ensinou-me, com todo seu rigor metódico e sua brilhante inteligência e argúcia na interpretação dos resultados experimentais, as trilhas a serem palmeadas, agora, no estudo de nossos problemas.

Lembraria a Dra. Bridget M. Ogilvie, Christine E. Clayton e John T. Kenshead; aquela, por ter acrescentado muitas e valiosíssimas observações ao nosso trabalho; estes, pelo companheirismo de tanto tempo.

Acrescento os Professores-Doutores Humberto de Araújo Rangel e Luiz Sebastião Prigenzi pela responsabilidade de que assumiram na minha orientação para o Doutorado.

Os senhores João Magalhães Filho e Manoel Josino da Costa, valiosíssimos na minha ausência do país.

Tampouco poderia deixar de formalizar o agradecimento a meus filhos que muitas vezes contribuíram com o sacrifício de seus folguedos e o silêncio nos meus afazeres para a consecução de uma idéia, ou o arremate de uma frase.

Minha esposa foi sem dúvida a pedra angular da estrutura que mantivemos em Londres.

Muitas pessoas decifraram meus manuscritos, outras artisticamente datilografaram os originais. Embora no anonimato agradeço a todas elas.

E agora as Instituições. Formalizo meus agradecimentos: ao Conselho Nacional de Pesquisas - CNPq, pela valiosa ajuda prestada na forma de Bolsa de Estudos. A Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, que possibilitou a minha saída com a manutenção dos indispensáveis vencimentos; ao Instituto de Previdência dos Municipiários de Campinas-IPMC, que manteve-me ligado a seu Serviço Médico sem prejuízo de funções durante minha estada no exterior; e, ao Departamento de Microbiologia e Imunologia que subdividiu meus encargos didáticos aos meus colegas de trabalho.

Finalmente, realço o "National Institute for Medical Research-Mill Hill", parte do "Medical Research Council" britânico que acolheu-me como um de seus membros.

E, se generalizar posso, permitam-me agradecer a um bom povo e aquelas solícitas pessoas, particularmente a família do Sr. L. J. C. Maurer, pela acolhida fraterna que nos deram e sobretudo pela experiência que nos fizeram viver, para jamais esquecermos a Inglaterra e, de longe, mantermos uma saudade imensa, quase melancolia, dos dias que lá vivemos.

Agradecemos o auxílio prestado ao Curso de Pós-Gra
duação em Imunologia pelas seguintes Instituições:

- Universidade Estadual de Campinas.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- Conselho Nacional de Pesquisas.
- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do En
sino Superior.
- Organização Mundial da Saúde (Divisão Imunologia).
- Biblioteca Regional de Medicina.

"There is no more difficult task than to make
the old new and the familiar interesting".

William Barclay.

Í N D I C E

	PÁGINA
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 - Animais	7
2.2 - Tripanosoma	7
2.3 - Clones do Parasita	7
2.4 - Infecção dos camundongos	8
2.5 - Parasitemia	8
2.6 - Separação dos Tripanosomas por gradiente de Ficol-Hipaque	9
2.7 - Imunização dos camundongos	9
2.8 - Irradiação	9
2.9 - Colheita de células da cavidade peritoneal ...	10
2.10- Células da medula óssea	10
2.11- Contagem de células e viabilidade celular	10
2.12- Marcação das Igs de superfície por imunofluorescência	11
2.13- Determinação do número de macrófagos pelo vermelho neutro	11
2.14- Culturas de células esplênicas	12
2.15- Cultura de células esplênicas e ativação por Fitohemaglutinina (FHA)	12
2.16- Cultura de células esplênicas e ativação por Lipopolissacáride (LPS)	12
2.17- Manutenção das culturas	13
2.18- Reação mista de linfócitos (R.M.L.)	13
2.19- Incorporação da ³ H-Timidina	13
2.20- Produção de imunoglobulinas (Igs)	14
2.21- Absorção das Igs marcadas com ³ H-Leucina com Tripanosomas	14
2.22- Determinação da radioatividade das amostras ..	15

2.23-	Determinação da proporção IgM/IgG-IgA	15
2.24-	Determinação da quantidade de Igs circulantes.	15
2.25-	Depleção de macrófagos	15
2.26-	Depleção dos linfócitos T.	16
2.27-	Separação dos linfócitos com lã de "nylon" ...	17
2.28-	Determinação do número de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) da medula óssea- Till & McCulloch (1961)	18
2.29-	Hipersensibilidade retardada ao Dinitrofluorobenzeno (DNFB)	19
2.30-	Captação da proteína iodada pelos macrófagos da cavidade peritoneal	19
2.31-	Timectomia	20
2.32-	Células formadoras de placas	20
2.33-	Capacidade de ligação do antígeno (C.L.A.) ...	20
2.34-	Pesquisa de Igs e C ₃ nas hemácias	20
2.35-	Técnicas hematológicas	21
3 -	RESULTADOS	22
3.1 -	Parasitemia	22
3.2 -	Alterações celulares no baço dos animais infectados	23
3.2.1 -	Incorporação da ³ H-Timidina pelas células esplênicas dos camundongos infectados	23
3.2.2 -	Células Ig +, Ig - e blastos no baço dos animais infectados	23
3.2.3 -	Número de MØs no baço dos animais infectados	25
3.3 -	Produção e caracterização das Igs no baço dos camundongos infectados	26
3.4 -	Verificação da especificidade das Igs produzidas pelas células esplênicas dos camundongos infectados	27

3.5 - Relação entre incorporação da ^3H -Timidina e a produção de Igs	28
3.6 - Níveis séricos de Igs durante a infecção	29
3.7 - Resposta das células esplênicas dos camundongos infectados ao LPS	29
3.8 - Efeito da depleção dos macrófagos e células T das populações esplênicas dos camundongos infectados e a resposta ao LPS	31
3.9 - Efeito da depleção dos MØs e células T na produção de Igs nas culturas das células esplênicas dos camundongos infectados em resposta ao LPS	34
3.10- Inibição da estimulação das células esplênicas normais pelo LPS por macrófagos provenientes de camundongos infectados	36
3.11- Captação da proteína iodada (^{125}I) por MØs da cavidade peritoneal de camundongos infectados por <u>T. brucei</u>	37
3.12- Resposta das células esplênicas dos camundongos infectados à Fitohemaglutinina (FHA)	39
3.13- Reação mista de linfócitos (R.M.L.) entre células esplênicas provenientes de camundongos normais e infectados versus células esplênicas irradiadas provenientes de camundongos - BALB/C normais	41
3.14- Reação mista de linfócitos (R.M.L.) entre células esplênicas T provenientes de camundongos normais e infectados versus células esplênicas irradiadas provenientes de camundongos - BALB/C normais	41
3.15- Hipersensibilidade retardada ao DNFB em camundongos infectados	43
3.16- Efeito da depleção das células T "in vivo" e a resposta das células esplênicas ao LPS e a FHA	45

3.17- Exaustão da memória B e T em camundongos infectados com <u>T. brucei</u>	48
3.18- Quadro sanguíneo periférico dos camundongos infectados por <u>T. brucei</u>	55
3.19- Pesquisa de anticorpos e C ₃ nas hemácias	56
3.20- Verificação da celularidade e do número de MØs na medula óssea (M.O.) dos animais infectados.	58
3.21- Determinação do nº de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) na M.O. de animais infectados	58
4 - DISCUSSÃO	62
5 - CONCLUSÕES	78
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

A B R E V I A Ç Õ E S

- 1) - Ab : Anticorpo.
- 2) - Ag : Antígeno.
- 3) - A.T.C. : Ácido tricloroacético.
- 4) - C : Complemento.
- 5) - C.F.P. : Células Formadoras de Placa.
- 6) - C.L.A. : Capacidade de Ligação do Antígeno.
- 7) - DIP-DNP-lis : α N - (3,5 diiodo - 4- hidroxifenacetil-E, N - (2,4 - dinitrofenil) - lisina.
- 8) - DNCB : Dinitroclorobenzeno.
- 9) - DNFB : Dinitrofluorobenzeno.
- 10) - DNP - Ficol : Dinitrofenil - Ficol.
- 11) - DNP - HGG : Dinitrofenil-Gamaglobulina Humana.
- 12) - DNP - KLH : Dinitrofenil-Hemocianina "Keyhole Limpet".
- 13) - FHA : Fitohemaglutinina.
- 14) - HMS : Hemocianina Maia squinado.
- 15) - IgA : Imunoglobulina A.
- 16) - IgG : Imunoglobulina G.
- 17) - IgM : Imunoglobulina M.
- 18) - Igs : Imunoglobulinas.
- 19) - IP : Intraperitoneal.
- 20) - IUDR : Iododeoxiuridina.

- 21) - IV : Intravenoso.
- 22) - K.G. : Solução de Krebs-Ringer Fosfato com glicose.
- 23) - KLH : Hemocianina "Keyhole Limpet".
- 24) - LAC : "Laboratory Animal Centre".
- 25) - LPS : Lipopolissacáride.
- 26) - 2-ME : 2-Mercaptoetanol.
- 27) - M.M.E. : Meio Mínimo Essencial.
- 28) - M.O. : Medula Óssea.
- 29) - MØs : Macrófagos.
- 30) - N.F. : Não feito.
- 31) - PPD : "Protein Purified Derivative" (Mycobacterium tuberculosis).
- 32) - R.M.L. : Reação Mista de Linfócitos.
- 33) - R.H.R. : Reação de Hipersensibilidade Retardada.
- 34) - S.F.V. : Soro Fetal de Vitelo.
- 35) - SDS : Sodio Duodecil Sulfato.
- 36) - SMF : Sistema Mononuclear Fagocitário.
- 37) - SSBH : Solução Salina Balanceada de Hanks.
- 38) - S.P.F. : "Specific Pathogen Free".
- 39) - T.F. : Tampão Fosfato.
- 40) - TRITC : Isotiocianato de Tetrametilrodamina.
- 41) - U.F.C. : Unidades Formadoras de Colonias.

1 - INTRODUÇÃO

A Doença do Sono na espécie humana e a Nagana no gado bovino são ambas causadas por tripanosomas africanos da ordem Salivaria e transmitidos por moscas tsé - tsé do gênero Glossina (Hoare, 1972).

Tres espécies de tripanosomas estão envolvidas: T. brucei, T. vivax e T. congolense visto que outras espécies - T. rhodesiense e T. gambiense - podem ser consideradas para efeitos práticos, como sub-espécies do T. brucei (Hoare, 1972; Ormerod, 1976).

A tripanosomíase africana segundo a Organização Mundial da Saúde (Dorozynski, 1976; de Raadt, 1976) afeta aproximadamente 10 milhões de indivíduos e se estende endemicamente por 10 milhões de Km² muitos dos quais são férteis porém abandonados.

As infecções por estes tripanosomas africanos caracterizam-se por picos parasitêmicos causados por tripanosomas antígenicamente diferentes (Brown & Williamson, 1962; Williamson & Brown, 1974). Este fato, pensa-se é o responsável pela prolongada infecção do hospedeiro uma vez que, embora ocorra a formação de anticorpos contra o parasita, em cada pico parasitêmico o organismo cada vez se defronta, virtualmente, com tripanosomas diferentes (de Raadt, 1974; Afchain et al., 1975; Cox, 1977).

Este fenômeno de variação antigênica é um dos mecanismos através dos quais os parasitas evadem as defesas desenvolvidas pelo hospedeiro (Lourie e Connor, 1937; Gray, 1965a, 1965b, 1975; Gray & Luckins, 1976; Doyle, 1976; Soughate, 1976).

Os trabalhos de Vickerman & Luckins (1969), Cross (1975) e Taylor & Cross (1977), demonstraram que cada variante antigênica constitui uma população de tripanosomas com uma nova glicoproteína de superfície de peso molecular 65.000. A síntese desta glicoproteína ocorre mesmo "in vitro" na ausência de constituintes do hospedeiro, confirmando portanto as predições de Vickerman (1969, 1974).

Este fato contraria pois a hipótese inicial de Desowitz (1970) que a variação antigênica se daria pela incorporação de proteínas do hospedeiro adsorvidas à superfície do parasita.

Os tripanosomas reverterem a um tipo antigênico básico após a passagem pelo vetor e as subsequentes variantes aparecem em sequência predeterminada (Cox, 1976, 1977). Cross (1975) e Cross & Johnson (1976), sugerem que os tripanosomas expressam um gen de cada vez para a síntese da glicoproteína.

Uma vez que mesmo em populações provenientes de um único parasita (clones) a sequência no aparecimento das variantes antigênicas é predeterminada, pensa-se que os tripanosomas, não existem como populações mistas com relação ao antígeno de superfície (Cox, 1977).

No entanto, Van Miervenne et al. (1976) demonstraram que os clones rapidamente se tornam antigenicamente heterogêneos e que em toda população existem alguns poucos indivíduos que não possuem o mesmo antígeno de superfície apresentado pela maioria. Estes indivíduos estariam pois em vantagem sobre os demais quando a resposta imunológica do hospedeiro se torna efetiva, eliminando a maioria dos parasitas, permitindo assim o desenvolvimento da nova variedade antigênica.

Recentemente, Le Ray et al. (1978) utilizando-se da mesma técnica de Van Miervenne et al. (1976), demonstraram que mesmo as formas metacíclicas salivares do *T. brucei* já apresentam diferenças antigênicas entre elas, permitindo portanto a instalação da infecção no hospedeiro mesmo na vigência de anticorpos contra algumas formas metacíclicas, visto que a população infectante é antigenicamente heterogênea.

Assim sendo, a variação antigênica dos tripanosomas salivares africanos tem um papel importante na evasão das defesas do hospedeiro permitindo, portanto, a ocorrência de infecções crônicas e usualmente fatais (Cohen, 1974, 1975, 1976; Terry, 1974; Hudson et al. 1976).

O estudo dos mecanismos através dos quais os parasitas evadem as defesas do hospedeiro é de importância não só acadêmica mas também prática, uma vez que o conhecimento destes me

canismos poderá permitir o desenvolvimento de estratégias e táticas de combate a estas doenças. Assim sendo, o tema tem despertado, novamente, as atenções dos pesquisadores (Ciba Symposium, 1974; Cohen, 1974, 1975, 1976; Hudson et al., 1976; Corsini et al., 1977; Eardley & Jayawardena, 1977).

Na tripanosomíase africana outros mecanismos além da variação antigênica, provavelmente, também estariam em ação visto que é sobejamente conhecida a imunodepressão dos animais infectados a antígenos solúveis ou particulados (Greenwood, 1974; Goodwin, 1974; Hudson et al., 1976; Corsini et al., 1977; Eardley & Jayawardena, 1977).

Esta imunodepressão tem sido demonstrada em infecções agudas e rapidamente letais em animais de laboratórios (Goodwin, et al., 1972; Freeman et al., 1973; Urquhart et al., 1973; Murray et al., 1974a, 1974b; Hudson et al., 1976), e também em experimentos realizados "in vitro" quando células esplênicas de animais infectados foram imunizados com hemácias de carneiro (Eardley & Jayawardena, 1977).

No caso da espécie humana e do gado bovino, embora a infecção seja de decurso mais crônico, a imunodepressão provavelmente também contribui para a morte do hospedeiro (Greenwood, 1974; Ackerman & Seed, 1976).

Uma outra característica da tripanosomíase africana é a ocorrência de grande aumento das imunoglobulinas (Igs) circulantes, particularmente IgM, nos animais infectados (Mattern et al., 1961; Houba, et al., 1969; Luckins, 1976).

Além do grande aumento das Igs circulantes, Murray et al. (1974b) e Hudson et al. (1976) verificaram um rápido aumento do número basal de células formadoras de placa do tipo IgM contra hemácias de carneiro logo nos primórdios da infecção, seguido então de uma severa imunodepressão da resposta a antígenos não relacionados com os tripanosomas.

Curiosamente, Eardley & Jayawardena (1977) demonstraram "in vitro" também um aumento do número de células formadoras de placa anti-hemácias de carneiro quando células esplênicas provenientes de camundongos com até 2 dias de infecção foram misturadas com células esplênicas normais. Caso as células

provissem de camundongos com 3 dias de infecção verificava-se severa imunodepressão, sugerindo neste último caso a existência de mecanismos supressores.

Os fenômenos de aumento de Igs circulantes e imunodepressão provavelmente estariam relacionados uma vez que Hudson et al. (1976) demonstraram na tripanosomíase africana experimental, uma possível correlação entre ativação policlonal do sistema linfóide, os fenômenos de hipergamaglobulinemia e a imunodepressão a antígenos timo dependentes e independentes, a exemplo do que ocorreria na malária (Greenwood, 1974; Greenwood & Vick, 1975; Fakunle & Greenwood, 1976).

Todos estes trabalhos sugerem pois que a resposta imunológica mediada pelos linfócitos B estaria profundamente comprometida na vigência da infecção por T. brucei.

Por outro lado, embora trabalhos iniciais de Freeman et al. (1973), Urquhart et al. (1973), Murray et al. (1974b) revelassem que reações de hipersensibilidade retardada em camundongos infectados com T. brucei não estavam alteradas, Greenwood (1974) verificou que as reações intradérmicas ao PPD, Oidomicina e os testes cutâneos ao DNCB estão diminuídas nas infecções humanas por T. gambiense. Da mesma maneira, Allt et al. (1971) referem-se à proteção conferida pela infecção por T. brucei contra o desenvolvimento da neurite alérgica em coelhos.

Estes fatos sugerem, pois, que não somente as respostas mediadas por linfócitos B estariam alteradas na tripanosomíase africana, mas também aquelas mediadas por células T.

A demonstração da existência de células T de atividade supressora na tripanosomíase africana experimental do camundongo por Jayawardena & Waksman (1977), Corsini et al. (1977), Eardley & Jayawardena (1977), fenômeno este ausente nos camundongos "nu/nu", reforça a evidência de que não somente a imunidade humoral mas também a imunidade mediada por células estaria alterada nesta infecção.

Também é conhecida a participação do Sistema Monoclear Fagocitário na história natural das infecções por protozoários. Assim sendo, Murray et al. (1974a), Greenwood et al. (1971b), Loose et al. (1972) demonstraram uma maior atividade

deste sistema, quando medida através da curva de depuração do carbono coloidal em camundongos experimentalmente infectados.

Fenômenos que poderiam interferir na captação e processamento dos antígenos pelos macrófagos, a exemplo do que ocorre na malária, poderiam também ocorrer na tripanosomíase africana e conseqüentemente, alterar algumas funções mais especializadas dos macrófagos nos fenômenos de homeostasia da resposta imune (Greenwood et al., 1971b; Loose et al., 1972; Greenwood, 1974; Slijivic & Watson, 1977; Capron et al., 1977; Humphrey, 1974; Warren & Weidanz, 1976; Corsini et al., 1977).

Visto que tres células envolvidas na resposta imune: MØs e linfócitos B e T, estão comprometidas na vigência da infecção por T. brucei (Corsini et al., 1977; Eardley & Jayawardena, 1977; Askonas et al., 1978; Mayor - Withey et al., 1978); os fenômenos de colaboração celular na resposta imune poderão estar alterados (Humphrey, 1974; Capron et al., 1977), ainda mais considerando a desorganização do tecido linfóide nesta parasitose (Goodwin, 1970; Humphrey, 1974; Murray et al., 1974b), participando assim nos fenômenos da gênese de células imunopressoras e na expressão final da imunodepressão.

Também tem sido descrita por vários autores a ocorrência de anemia nos animais infectados com tripanosomas do complexo brucei (Jennings et al., 1972; Woo & Kobayashi, 1975; Chi et al., 1975; Anosa & Isoun, 1976; Iked et al., 1977; Clayton et al. (em preparação), White et al. (em preparação); assim também como alterações nos demais elementos do sangue periférico e na histologia da medula óssea (Goodwin, 1970; Jennings et al., 1972; Clayton et al. (em preparação), White et al. (em preparação).

A existência de síndromes hemolíticas cujas causas são atribuídas à ocorrência de anticorpos (alo ou auto- anticorpos) e/ou Complemento (C) na superfície das hemácias (Mollison, 1975; Dacie & Worlledge, 1975; Lachmann, 1975) poderiam, quiçá, contribuir para a gênese da anemia neste parasitose.

Estes fatos revelam o profundo impacto da infecção por T. brucei também nos órgãos linfóides primários e, recentemente, Mayor-Withey et al. (1978) descreveram as profundas alterações celulares na vigência da infecção por T. brucei, tanto do

baço quanto da medula óssea, em camundongos com diferentes dias de infecção.

Em resumo, fenômenos de variação antigênica, altos níveis de Igs circulantes, maior atividade do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) (Murray, 1974); ativação policlonal do sistema linfóide, alteração da histologia dos órgãos linfóides primários e secundários, alterações qualitativas e quantitativas da citologia linfóide primária e secundária; células de atividade supressora e imunodepressão, são todos fenômenos verificados na tripanosomíase africana.

Considerando que em qualquer sistema imune a resposta em determinado momento é a resultante de um balanço entre mecanismos facilitadores e supressores que nas infecções poderia culminar com a eliminação do parasita (Turk & Belehu - 1974), na tripanosomíase africana os fenômenos acima referidos poderiam estar correlacionados com a sobrevivência do parasita no hospedeiro mesmo na vigência da resposta imune.

Nosso trabalho se propõe a estudar através de experimentos realizados "in vivo" e "in vitro" as alterações do sistema linfóide decorrentes da infecção por *T. brucei* em camundongos, procurando correlacionar fenômenos de exaustão do potencial B e T e os mecanismos de supressão mediados por macrófagos e linfócitos T com o fenômeno da imunodepressão dos animais infectados.

Tais fenômenos poderão contribuir para a evasão do parasita da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro permitindo, portanto, a manutenção do binômio hospedeiro - parasita em benefício deste último.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS.

Camundongos (CBA/H x C57 B1/6) F₁, CBA/H , CBA/N e BALB/C, criados em condições livres de patógenos (" Specific Pathogen Free - S.P.F."), e mantidos em condições de mínima contaminação no "National Institute for Medical Research-Mill Hill"; foram utilizados com 5 - 8 meses de idade. Camundongos "nu/nu", mantidos nas mesmas condições e utilizados com 4 meses de idade, foram obtidos do "Laboratory Animal Centre - (L.A.C.) - England", a partir de uma colônia heterogênica de camundongos BALB/C.

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, porém para as infecções com T. brucei deu-se preferência a camundongos fêmeas.

2.2 - TRIPANOSOMA.

Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei raça S42 foi obtido da "Brunel University" através de gentileza do Dr. K. M. Hudson. Uma amostra de referência foi obtida após 2 passagens em camundongos CBA/H letalmente irradiados e mantida em N líquido.

2.3 - CLONES DO PARASITA.

Clones do parasita foram obtidos mediante a técnica descrita por Walker (1970). Os parasitas após passagem por camundongos letalmente irradiados (900 rads), foram diluídos de maneira a obtermos um único parasita em 0,2 ml de Krebs glicose (KG): Krebs-Ringer Fosfato com 0,2% de glicose. Diluições prévias das alíquotas continham 10% de soro de cavalo.

Este volume final foi injetado intraperitonealmente (I.P.) em camundongos irradiados os quais foram sacrificados após 4 dias de infecção. O volume total do sangue obtido por punção cardíaca foi injetado I.P. em outros camundongos irradiados.

dos até que fosse obtida uma população conveniente para criopreservação. Capilares de vidro contendo alíquotas do sangue infectado foram selados pelo calor e conservados em N líquido (Clayton, 1978).

2.4 - INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.

Em todos os experimentos os camundongos foram infectados com 200 parasitas do clone NIM 2 obtido por Christine Clayton (Clayton, 1978).

O capilar retirado do N líquido foi deixado 30 min. em um "becker" com água. Após este período, o conteúdo foi aspirado em 1 ml de solução Krebs-glicose e 0,25 ml injetado em camundongos CBA/H ou (CBA x C57 B1)F₁ letalmente irradiados.

Após 3 - 4 dias de infecção os camundongos foram sangrados por punção cardíaca, o sangue colhido em heparina (10 u/ml) e conservado em banho de gelo. Diluições contendo 10⁴ parasitas/ml (vide abaixo) foram preparadas em KG - 10% soro de cavalo e conservadas em banho de gelo até o momento da inoculação em camundongos. Suspensões finais contendo 10³ parasitas/ml foram preparadas em KG sem soro e 0,2 ml destas suspensões injetadas I.P. em camundongos F₁.

Sempre foi realizada a passagem prévia por camundongos irradiados antes da infecção experimental (Clayton, 1978).

2.5 - PARASITEMIA.

A parasitemia foi determinada contando-se o número de parasitas existentes numa gota de sangue obtida por punção da cauda. Desprezando-se sempre a primeira gota, coletou se sangue sobre uma lâmina em quantidade suficiente para cobrir o campo de uma lamínula 20 x 20 mm e em seguida examinou-se a preparação sob objetiva de 40x. Os resultados foram convertidos em parasitas/ml de sangue usando-se uma curva de calibração obtida pela contagem dos parasitas em hemocitômetro após diluição do sangue em KG-heparina (Clayton, 1978).

2.6 - SEPARAÇÃO DOS TRIPANOSOMAS POR GRADIENTE DE FICOL-HIPAQUE.

Os tripanosomas obtidos no pico parasitêmico de animais irradiados foram separados em gradiente de Ficol- Hipaque (Boyum, 1966) mediante a colocação de 1 ml de sangue diluído a 1:2 em RPMI - 10% SFV sobre 2 ml da mistura de Ficol- Hipaque (Ficol 14% - 12 vol.; Hipaque 32,8% - 5 vol.). A preparação foi centrifugada a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos e os parasitas colhidos da interface foram lavados 2x em RPMI - 10% SFV.

2.7 - IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS.

Camundongos (CBA x C57 B1)F₁ com 3 - 4 meses de idade foram imunizados com 100 µg de proteína (KLH, HGG, DNP-KLH, DNP-HGG) precipitadas pelo alumen, inoculadas I.P. juntamente com 10⁹ organismos de Bordetella pertussis. Estes animais foram utilizados 2 meses após a imunização.

A dose de reforço foi feita com a injeção I.V. (veia da cauda) de 10 µg do antígeno correspondente ou nas experiências de memória B, com 50 µg de DNP - Ficol (gentileza do Dr. Gerry Klaus).

2.8 - IRRADIAÇÃO.

Toda a irradiação dos animais foi feita utilizando-se uma fonte de cobalto 60 (⁶⁰Co) fabricada pela "Canadian Atomic Energy". A quantidade de radiação utilizada variou para cada experimento:

2.8.1 - infecção dos camundongos com tripanosoma (passagem prévia) : 900 rads.

2.8.2 - transferência de células (estudo da memória B e T) : 660 rads.

2.8.3 - potencial da medula óssea (Till-McCul -

logh) : 750 rads.

2.8.4 - irradiação dos camundongos post-timectomia : 950 rads.

2.8.5 - reação mista de linfócitos : 1500 rads.

Os camundongos foram irradiados em recipientes apropriados para se evitar a movimentação dos animais e, conseqüentemente, haver variação na quantidade de radiação recebida. Células esplênicas foram irradiadas em tampão fosfato (T.F.) contendo 5% de soro fetal de vitelo (S.F.V.) em banho de gelo.

2.9 - COLHEITA DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL.

Camundongos sacrificados por deslocamento cervical foram inoculados I.P. com 3 ml de T.F. - 1% SFV contendo 10 u/ml de heparina.

Após massagem abdominal, o exsudato foi colhido com uma seringa de 5 ml com agulha.

2.10 - CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.

As células da medula óssea foram coletadas de ambos os femures dos animais sacrificados por deslocamento cervical.

Após o isolamento do femur, as medulas foram colhidas com uma seringa de 1 ml, lavadas em Meio Mínimo Essencial (M.M.E.) com 5% SFV e mantidas em banho de gelo.

Para a inoculação nos animais recipientes, as suspensões foram preparadas em meio M.M.E. sem soro e 0,25 ml das suspensões de células em número apropriado, foram inoculadas I.V. pela veia da cauda.

2.11 - CONTAGEM DE CÉLULAS E VIABILIDADE CELULAR.

As células, tanto das suspensões celulares quanto das culturas, foram contadas utilizando-se um hemocitômetro-

de Neubauer e diluições em ácido acético 1%.

A viabilidade celular foi determinada pela diluição em solução de azul-tripán preparada segundo Alex Matter (comunicação pessoal): 1 ml da solução de azul-tripán contendo 2 mg/ml foi adicionado a 0,25 ml de NaCl a 4,25%. As soluções e es toques de azul-tripán e NaCl são conservadas a 4°C.

2.12 - MARCAÇÃO DAS Igs DE SUPERFÍCIE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.

Seguiu-se as determinações da técnica descrita anteriormente por Askonas et al. (1976). As células foram sus pendidas em meio RPMI - 1640 - 10% SFV tamponado com HEPES 0,03 M pH 7,2 contendo 10 mM de NaN_3 . Após 3 lavagens neste meio, 3×10^6 células em 0,1 ml foram expostas durante 30 min. em ba nho de gelo, a 50 μg de Ig de coelho anti-Ig de camundongo (IgG IgM) conjugada ao isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC).

Após exposição ao anti-soro, as células foram lavadas 3x a 4°C e preparados esfregaços sobre lamínas de mi croscópio utilizando-se de uma pena de escrever (George Roe tents - comunicação pessoal). Os esfregaços foram fixados durante 5 min. em álcool absoluto e a montagem final foi feita utilizan do-se uma mistura de glicerol-tampão fosfato (1:9) pH 7,2 entre lâmina e lamínula colada com esmalte para unha.

2.13 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE MACRÓFAGOS PELO VERMELHO NEUTRO.

O número de macrófagos ($M\phi$ s) existentes nas sus pensões celulares foi estimado de acordo com a técnica descrita por Cohn & Wiener (1963). Aproximadamente 3×10^7 células (100 μl da suspensão de células) foram incubados durante 5 min. a tempe ratura ambiente com 10 μl de uma solução de vermelho neutro, re centemente preparada, contendo 1 mg/ml em solução de sacarose 0,25 M.

Após a incubação, determinou-se o número de cé lulas que captaram o corante num hemocitômetro de Neubauer.

2.14 - CULTURAS DE CÉLULAS ESPLÊNICAS.

Suspensões de células esplênicas foram preparadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (vide abaixo) por desagregação dos baços usando-se pinças dente de rato, em meio RPMI - 1640 (Gibco - Biocult, "Scotland") suplementado com 10 ou 20% de soro fetal de vitelo (Gibco - Biocult), Penicilina - 100 UI/ml, Estreptomicina - 100 µg/ml e Glutamina - 60 mg/ml.

Os agregados celulares foram separados por de cantação inclinando-se a placa durante 2 min. As suspensões foram lavadas 1x e conservadas em banho de gelo até o momento do uso em 2 - 4 ml do meio acima descrito. Todas as culturas foram preparadas o mais rapidamente possível para se evitar perda da viabilidade celular. Usualmente utilizou-se "pool" de células esplênicas provenientes de 2 animais.

2.15 - CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS E ATIVAÇÃO POR FITOHEMAGLUTININA (FHA).

Culturas de alta densidade, 4×10^6 células esplênicas, foram preparadas em 2 ml de RPMI - 1640 com 10% SFV utilizando-se frascos "bijou" "Sterilin" ("Sterilin-England"). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa contendo uma atmosfera saturada de vapor de água e 5% CO₂/ar.

Fitohemaglutinina (Wellcome Laboratories) foi adicionada na quantidade de 0,5 µg/ml.

2.16 - CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS E ATIVAÇÃO POR LIPOPOLISSACÁRIDE (LPS).

Culturas de baixa densidade, 6×10^5 células esplênicas, foram preparadas em 3 ml de RPMI - 1640 com 20% SFV e 2-Mercaptoetanol a 5×10^{-5} M, nas mesmas condições acima descritas.

Foram utilizadas placas de Petri de 35 mm ("Sterilin-England" ou "Falcon - USA") e conservaram-se as mesmas condições descritas anteriormente.

Lipopolissacáride de E. coli (LPS - Difco, De

troit, Michigan W - 055 BS) foi adicionado na quantidade de 10 µg/ml.

Quando foram utilizadas culturas de alta densidade para o estudo da estimulação pelo LPS, empregou-se a mesma densidade celular, frascos e meio de cultura acima descritos para a fitohemaglutinina.

2.17 - MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.

As culturas acima descritas, obedeceram a técnica descrita por Mishell & Dutton (1967). Estas culturas foram mantidas trocando-se metade do meio de cultura cada 2 dias para as culturas de alta densidade (2×10^6 células/ml), e cada 3 dias para as culturas de baixa densidade (2×10^5 células/ml).

2.18 - REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS - (R.M.L.).

Culturas de alta densidade, contendo 5×10^6 células esplênicas de camundongos (CBA x C57) F₁ normais ou infectados, e igual número de células esplênicas de camundongos - BA1B/C previamente irradiadas (1500 rads) - células alvo-, foram estabelecidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Utilizou-se frascos plásticos "bijou" "Sterilin" e de 2 ml de RPMI 1640 - 10% SFV.

Frascos em duplicata receberam no 2º dia de cultura 1 µCi de ³H-timidina de atividade específica 1µCi/mMol. As culturas foram coletadas 24 horas após a adição da ³H-timidina e processadas conforme a descrição abaixo.

Idêntico procedimento foi feito com as culturas das células esplênicas separadas em colunas de lã de "nylon" (células T).

2.19 - INCORPORAÇÃO DA ³H-TIMIDINA.

Seguiu-se as determinações da técnica descrita por Askonas et al. (1976). Duplicatas de 10^5 células viáveis, em tubos plásticos "Sterilin", mantidas em estufa nas mesmas condições descritas para as culturas, foram "pulsadas" durante 4 ho

ras com $1\mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina de atividade específica $1\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ ("The Radiochemical Centre, Amersham - England"), em $250\ \mu\text{l}$ de RPMI 1640 - 10% SFV.

As células foram coletadas em círculos de papel de fibra de vidro (Watman), lavadas 3 x com T.F., 3x com ácido tricloacético (ATC) a 10%, 3x com álcool absoluto e 1x com éter. Após secagem na temperatura ambiente as amostras foram recolhidas em frascos para a determinação da radioatividade.

2.20 - PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS (Igs).

A produção de Igs foi determinada pelo "pulso" de 4×10^5 células viáveis durante 4 horas (nas mesmas condições descritas anteriormente para as culturas) com $10\mu\text{Ci}$ de ^3H -leucina de atividade específica $50\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ ("The Radiochemi cal Centre, Amersham-England"), em $250\ \mu\text{l}$ de meio EDM livre de leucina contendo 10% S.F.V.

Após 4 horas, o "pulso" foi interrompido pela adição de $20\ \mu\text{l}$ de leucina 0,1 M, as células centrifugadas, e a quantidade de Igs no sobrenadante determinada pelo método descrito por Askonas et al. (1976).

Em resumo: as Igs secretadas foram precipitadas por um soro de coelho anti-Ig (IgG - IgM) de camundongo na presença de Ig não marcadas de camundongo. O controle foi feito pela precipitação concomitante de Ig de coelho por um soro de cabra anti - Ig de coelho. A radioatividade detectada no controle foi subtraída daquela verificada na reação experimental.

2.21 - ABSORÇÃO DAS Igs MARCADAS COM ^3H -LEUCINA COM TRIPANOSOMAS.

As amostras dos "pulsos" de ^3H -leucina ($250\ \mu\text{l}$), foram absorvidas em banho de gelo com $10^3 - 10^5$ parasitas durante 30 min. e a quantidade de Igs estimada da mesma maneira descrita anteriormente.

2.22 - DETERMINAÇÃO DA RADIOATIVIDADE DAS AMOSTRAS.

As amostras dos "pulsos", tanto da ^3H -timidina quanto da ^3H -leucina, foram quantificadas utilizando-se a técnica descrita por Askonas et al. (1976).

As amostras foram colocadas em frascos de vidro de 10 ml próprios para a análise cintilográfica, juntamente com 10 ml de líquido de cintilação, e a radioatividade determinada em contador Beckman.

2.23 - DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO IgM/IgG-IgA.

Para se determinar a proporção de IgM/IgG- IgA secretada pelas células esplênicas o método seguiu as especificações descritas por Askonas & Parkhouse (1971).

Após a precipitação das Igs secretadas conforme Askonas et al. (1976), os precipitados foram lavados 3x, dissociados e reduzidos em SDS a 1,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e ditioteitol 0,05M durante 15 min. em banho maria de água fervente.

Após alquilação com iodoacetamida 0,1M, a radioatividade das cadeias μ , γ e α foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.24 - DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE Igs CIRCULANTES.

A quantidade de Igs circulantes foi medida por imunodifusão simples radial em ágar, utilizando-se de soros específicos anti-IgM e anti-IgG segundo a técnica descrita por Mancini et al. (1965).

Diversas diluições de IgG_{2a} e IgM de camundongo (purificadas) foram utilizadas como padrão, e não foram verificadas reações cruzadas. Os soros de 3 - 4 camundongos infectados foram testados em diferentes diluições.

2.25 - DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS.

Os macrófagos das suspensões celulares esplênicas foram

parcialmente eliminados pelo método do ferro carbonil. Ferro carbonil - ("Koch - Light Laboratories - England") - autoclavado, e no momento do uso lavado 3x com RPMI 1640 - 10% SFV, foi adicionado a 2×10^7 células esplênicas em 2 ml de RPMI 1640 - 10% SFV em frascos "bijou" "Sterilin" na quantidade de 20 mg/frasco.

A suspensão foi incubada em banho maria a 37° C sob ligeira agitação. Após a incubação passou-se um magneto para a remoção das células contendo a limalha de ferro. O rendimento deste método é de 80% do número inicial de células com uma depleção efetiva de 90% dos macrófagos.

2.26 - DEPLEÇÃO DOS LINFÓCITOS T.

Para a obtenção de suspensões celulares "depletadas" de células T, $1,5 \times 10^7$ células esplênicas em 1 ml (vol. final) de RPMI 1640 sem soro, foram tratadas em tubos plásticos "Sterilin" com 100 μ l (diluição 1:2 em T.F.) de um soro anti-Thy 1 - 2 produzido em camundongos AKR contra timócitos de camundongos C₃H.

O soro anti θ havia sido previamente absorvido com agarose e hemácias de camundongos e utilizou-se de soro de coelho diluído 1:3 em T.F. como fonte de Complemento (C).

Após a incubação em estufa durante 30 min. nas mesmas condições utilizadas para as culturas, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em T.F. - 5% SFV para a remoção das células mortas e obtenção de uma suspensão com viabilidade de 85 - 90% (Parish et al., 1974).

Com esta técnica, 35% das células esplênicas são mortas pelo soro anti-Thy 1 - 2 e o rendimento final é de 50% do número inicial de células.

Nos experimentos de transferência de células de memória, a depleção das células T foi feita utilizando-se de um soro anti-T produzido em cabras contra timócitos de camundongos C₃H.O anti-soro assim produzido e convenientemente absorvido com células da medula óssea e células fetais hepáticas singeneicas, foi utilizado na diluição final de 1:40 em RPMI sem soro. Suspensões celulares continham 5×10^6 células/ml.

Como fonte de C utilizou-se de soro de coelho, previamente absorvido com agarose (80 mg/ml), na diluição final de 1:10.

As células também foram incubadas durante 30 min. a 37° C e sofreram o mesmo tratamento descrito anteriormente para a eliminação das células mortas (Parish et al. 1974).

O rendimento desta técnica foi também de 50% do número inicial de células com mortalidade das células esplênicas de 35%.

2.27 - SEPARAÇÃO DOS LINFÓCITOS COM LÃ DE "NYLON".

Populações de linfócitos T foram separadas segundo a técnica descrita por Julius et al. (1973). Suspensões celulares esplênicas preparadas da maneira convencional e suspendidas em T.F. - 5% SFV foram lavadas 1x e ressuspendidas em NH₄Cl - 0,83% durante 5 min. para a lise das hemácias. Habitualmente usou-se 5 - 6 animais normais e 3 animais infectados para 40 ml de NH₄Cl - 0,83%.

Após este tratamento, as células foram lavadas 3x em grande vol. (10 ml) de Solução Salina Balanceada

de Hanks-(SSBH). Suspensões contendo 2×10^8 células em 1 ml de T.F. contendo 5% SFV foram colocadas cuidadosamente sobre uma coluna de lã de "nylon".

A lã de "nylon" antes do uso havia sido lavada 9x com água destilada e, após a secagem, manuseada apenas com luvas para se evitar a gordura da pele.

Para as colunas, 0,6 gr da lã de "nylon" foram comprimidas em uma seringa de 10 ml, autoclavada, encharcada com T.F. - 5% SFV, e mantida 30 min. em estufa até o momento do uso.

Após 45 min. em estufa, nas mesmas condições para o cultivo de células, as células foram colhidas com 20 ml de T.F. - 5% SFV, gota a gota, durante aproximadamente 10 min.; centrifugadas a 240 g, ressuspendidas em 1 ml de T.F. - 5% SFV, e recolocadas sobre uma outra coluna idêntica a anterior.

Após 30 min., as células foram recolhidas da mesma maneira descrita anteriormente, lavadas 1x em SSBH, e ressuspendidas em RPMI 1640 - 10% SFV.

Usualmente obtem-se 10 - 15% do número inicial de células com menos de 5% de contaminação por células B (determinação por imunofluorescência) - Askonas et al. (1978).

2.28 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS - (U.F.C.) NA MEDULA ÓSSEA - TILL & McCULLOGH (1961).

O número de Unidades Formadoras de Colonias na medula óssea dos animais foi determinado segundo a técnica descrita por Till & McCulloch (1961).

Células viáveis da medula óssea - 0,3 ou $0,5 \times 10^5$ em 0,25 ml - foram injetadas I.V. em camundongos - (CBA x C57) F_1 , previamente irradiados com 750 rads (^{60}Co). A pós 8 dias, os camundongos recipientes foram sacrificados, e os baços fixados em Bouin.

Determinou-se o número de nódulos existentes nos baços utilizando-se uma lupa (8x).

2.29 - HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA AO DINITROFLUORO BENZENO (DNFB).

Camundongos foram sensibilizados ao DNFB mediante a aplicação numa área do abdomen previamente depilada, de 50 μl de uma solução acetona - óleo de oliva (1:1) contendo 10 mg/ml de DNFB. Após 5 dias aplicou-se na orelha esquerda do animal 5 μl da mesma solução como dose desencadeante.

Para se evitar os erros decorrentes da medida da espessura da orelha dos animais, empregou-se a técnica descrita por Vadas et al. (1975) para a verificação da hipersensibilidade retardada.

Após 10 horas da aplicação da dose desencadeante os animais receberam 2 μCi de ^{125}I UDR (iododeoxiuridina) de atividade específica 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ("The Radiochemical Centre - Amersham - England") em 0,2 ml de T.F. injetados I.P..

Após 12 horas da injeção, os animais foram sacrificados, as orelhas cortadas e a radioatividade detectada em cada uma delas medida em contador gama (Packard).

2.30 - CAPTAÇÃO DA PROTEINA IODADA PELOS MACRÓFAGOS DA CAVIDADE PERITONEAL.

Hemocianina de Maia squinado (HMS) - 150 μg , foram marcados com ^{125}I segundo o método da cloramina descrito por Hunter & Greenwood - (1962).

Em 0,2 ml de T.F. foram injetadas I.P. 6,9 x 10^6 contagens/min. de proteína marcada juntamente com 80 μg de

HMS. Após 45 min., os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal colhido conforme descrição anterior. A radioatividade ligada as células foi determinada em contador gama (Packard).

2.31 - TIMECTOMIA.

Camundongos com 1 mes de idade foram timectomizados por toracotomia supra-esternal mediante técnica empregada pela Sra. Mary Holman (comunicação pessoal) no "National Institute for Medical Research-Mill Hill - London"; irradiados com 950 rads, reconstituídos com células fetais hepáticas singeneicas e utilizados 3 - 4 meses depois.

2.32 - CÉLULAS FORMADORAS DE PLACAS (C.F.P.).

Células Formadoras de Placas foram determinadas mediante a técnica de Jerne et al. (1974), segundo descrição de Dresser (1978), utilizando-se soro de coelho anti-IgG_{2a} de camundongo para a revelação das placas indiretas (IgG).

2.33 - CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DO ANTÍGENO (C.L.A.).

O título do soro dos animais experimentais, medido através da capacidade de ligação do antígeno foi determinado após análise pela técnica de Farr (1958), utilizando-se como hapteno 10^{-8} M de α N - (3,5 diiodo - 4 - hidroxifenacetil-E, N - (2,4 - dinitrofenil) - lisina marcada com ¹²⁵I (DIP-DNP-lis), segundo descrição de Askonas & Williamson (1972).

2.34 - PESQUISA DE Igs E C₃ NAS HEMÁCIAS

Pesquisa de IgM, IgG, IgA e C3 nas hemácias dos camundongos infectados foi feita por aglutinação, empregando-se os anti-soros específicos anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA e anti-C3, cedidos por gentileza do Dr. Gerry Klaus.

2.35 - TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS.

Os esfregaços foram preparados pela técnica usual e corados pelo Giemsa. Os estudos histoquímicos também foram feitos pelas técnicas usuais do "sudan-black," estearase ácida e fosfatase ácida segundo descrição de Dacie et al. (1975).

3 - RESULTADOS

3.1 - PARASITEMIA.

Camundongos fêmeas, as quais são mais resistentes à infecção do que os machos, infectadas com 200 parasitas I.P. apresentaram uma infecção de decurso fatal.

O pico parasitêmico ocorreu no 7º dia de infecção e foi controlado pelos animais que permaneceram com baixa parasitemia até o 18º dia de infecção quando a 2ª onda parasitêmica começou a se manifestar. A mortalidade manifestou-se a partir do 18º dia atingindo 100% no 21º. A fig. 1 representa os resultados obtidos com grupos de no mínimo 7 animais.

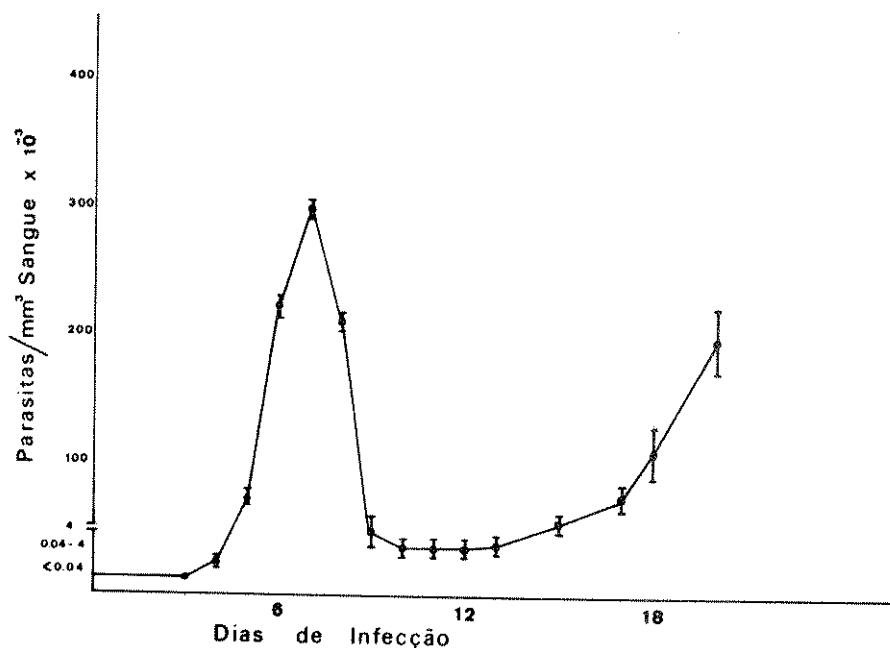


FIGURA 1 - CURSO DA PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei

Curso da infecção por T. brucei S 42 em camundongos fêmeas (CBAxC57)F₁. Os animais foram infectados com 200 parasitas (clone NIM 2). Os resultados expressam as médias aritméticas ± d.p.. Cada ponto até o dia 12 representa pelo menos 14 animais. Pontos posteriores representam 7 animais.

3.2 - ALTERAÇÕES CELULARES NO BAÇO DOS ANIMAIS INFECTADOS.

Os camundongos infectados apresentaram uma acentuada esplenomegalia que se manifestou a partir do 5º dia de infecção. Os baços atingiram tamanho máximo por volta do 7º dia apresentando, habitualmente, o dobro do número de células dos animais normais.

Visando quantificar o aumento da população celular no baço dos animais infectados e caracterizar os tipos de células presentes em diferentes dias da infecção, determinou-se:

3.2.1 - INCORPORAÇÃO DA ³H-TIMIDINA PELAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Células esplênicas viáveis (1×10^5) imediatamente após o sacrifício do animal e em diferentes dias de infecção foram "pulsadas" durante 4 horas com ³H-timidina,

Os resultados expressos na fig. 2 mostram que ocorreu um grande aumento na incorporação da ³H-timidina nos dias 5, 12 e 18 de infecção e uma drástica redução no 7º dia. Também na fig. 2 estão representados os resultados obtidos com o "pulso" das células esplênicas com ³H-leucina. (Vide item 3.3).

3.2.2 - CÉLULAS Ig +, Ig - E BLASTOS NO BAÇO DOS ANIMAIS INFECTADOS.

Visando caracterizar as populações celulares no baço dos animais infectados, as células foram coradas em diferentes dias da infecção para Igs de superfície com Ig de coelho anti-Ig de camundongo conjugada a rodamina.

Determinou-se igualmente a proporção de células blásticas - caracterizadas como linfócitos maiores que os linfócitos médios e grandes usuais (acima de 12μ) presentes

no baço dos animais infectados.

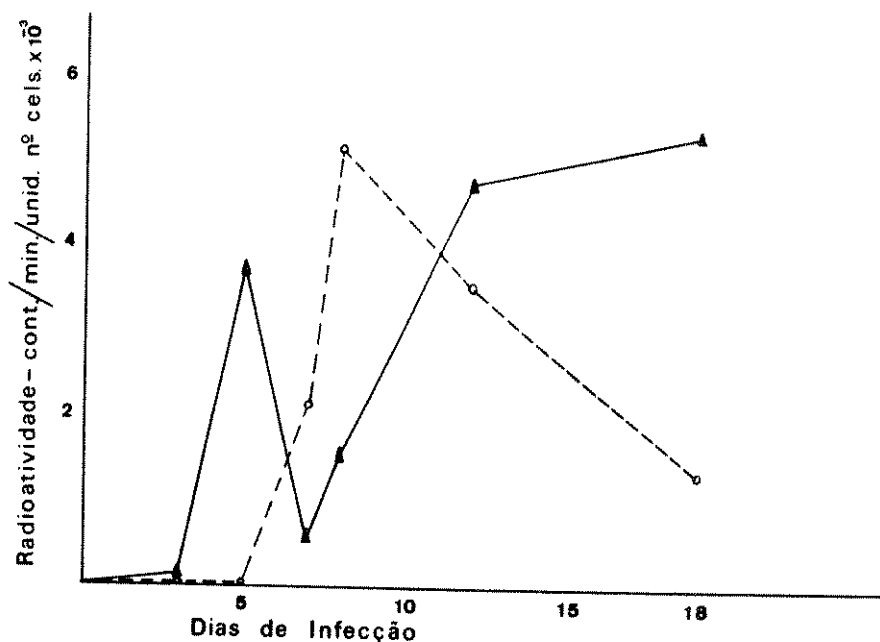


FIGURA 2 - INCORPORAÇÃO DA ^3H -TIMIDINA E FORMAÇÃO DE Igs PELAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Células esplênicas imediatamente após o sacrifício - dos animais foram "pulsadas" durante 4 horas com ^3H -timidina e ^3H -leucina para a produção de Igs.

(▲ - ▲) - Incorporação de ^3H -timidina/ 10^5 cels;

(o - o) - Incorporação de ^3H -leucina/ 4×10^5 cels.

Os resultados expressos na tabela 1 mostram que embora não tenha havido um aumento na proporção das células positivas para Igs no baço dos animais infectados, ocorreu, no entanto, um grande aumento na proporção das células blásticas tanto Ig+ quanto Ig-. Este aumento após 8 dias de infecção foi 7 vezes maior que o normal.

Os resultados mostraram também que ocorreu inicialmente, no 5º dia de infecção, um aumento dos blastos Ig- 2x maior que o aumento dos blastos Ig+, o que sugere então uma ativação inicial das células desprovidas de Igs na superfície da membrana celular.

TABELA 1 - CÉLULAS BLÁSTICAS NO BAÇO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS

Dias de Infecção	Cels. Ig. Positivas % Cels. Totais	Cels. Blásticas % Cels. Totais	
		Ig+	Ig-
0	47	3	4
5	48	9	23
8	53	20	20
12	52	22	17
18	45	20	22

3.2.3 - NÚMERO DE MØs NO BAÇO DOS ANIMAIS INFECTADOS.

O número de MØs presentes no baço dos animais infectados foi determinado mediante a coloração pelo vermelho neutro e os resultados expressos na fig. 3 mostram que a proporção dos macrófagos está aumentada de 3% para 12% a partir do 8º dia de infecção.

Este aumento relativo correspondente em números absolutos a um aumento de $2,7 \times 10^6$ MØs nos animais normais para $21,6 \times 10^6$ nos animais infectados.

Este aumento poderá na realidade ser maior do que o verificado, visto que os MØs poderão ficar associados aos debris do tecido esplênico na preparação das suspensões celulares.

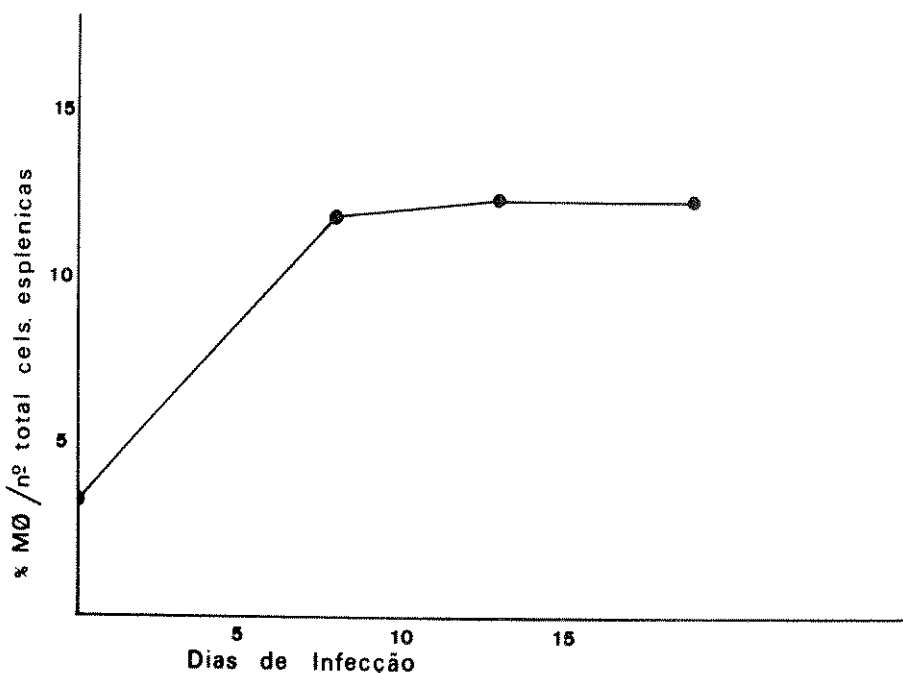


FIGURA 3 - PERCENTAGEM DE MØs NO BAÇO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS

3.3 - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS Igs NO BAÇO DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Visando quantificar e caracterizar as Igs produzidas no baço dos animais infectados, 4×10^5 células esplenicas viáveis no dia do sacrifício do animal e em diferentes dias de infecção, foram "pulsadas" durante 4 horas com ^3H -leucina.

As Igs secretadas foram precipitadas por um soro de coelho anti-Ig de camundongo e para a análise do tipo de Ig produzida, os precipitados após sofrerem dissociação, redução e alquilação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida.

Os resultados mostraram que ocorreu uma grande produção de Igs pelas células dos animais infectados a partir do 7º dia de infecção. O maior aumento verificado ocorreu no 8º

dia. Embora no 18º dia tenha ocorrido um decréscimo, a produção foi ainda 5x maior que o normal. Fig. 2.

Com relação ao tipo de Ig produzido os resultados mostraram que até o 5º dia de infecção não ocorreu alteração na relação IgM/IgG-IgA. Porém, no 8º e 12º dia de infecção a maior parte das Igs produzidas (40 - 80%) foi do tipo IgG-IgA; quantidade esta que embora decrescesse para 42% no 18º dia é ainda sensivelmente diferente da relação IgM-IgA normal. Tab. 2.

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS Igs NO BAÇO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Dias de Infecção	% do Total de Igs Produzidas	
	μ	$\gamma + \alpha$
0	> 95	< 5
5	> 95	< 5
8	35	65
12	21	79
18	58	42

3.4 - VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS Igs PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Com a intenção de verificar a especificidade das Igs secretadas pelas células esplênicas dos animais infectados, o sobrenadante dos "pulsos" de ³H-leucina (Vide Material e Métodos) foram absorvidos com tripanosomas obtidos no pico parasitário de animais irradiados e infectados, separados por centrifu

gação sobre Ficol-Hipaque. Em seguida, a quantidade de Igs existente no sobrenadante foi determinada pelo método descrito anteriormente.

Os resultados expressos na fig. 4 mostram que não ocorreu diminuição no número de contagens/min. das amostras absorvidas pelos tripanosomas, o que sugere a inespecificidade da maior parte da Igs secretadas pelas células esplênicas dos animais infectados.

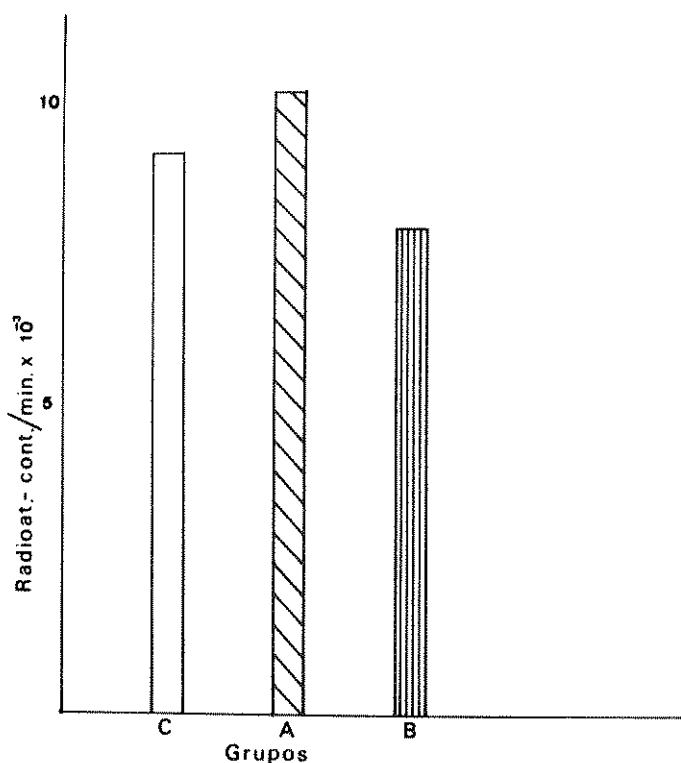


FIGURA 4 - ABSORÇÃO DAS Igs MARCADAS COM ³H-LEUCINA COM TRIPANOSOMAS.

A - 3×10^5 parasitas.

B - 10^5 parasitas.

C - Controle.

3.5 - RELAÇÃO ENTRE INCORPORAÇÃO DA ³H-TIMIDINA E A PRODUÇÃO DE Igs.

A fig. 2 apresenta os resultados obtidos com a incorporação da ³H-timidina e a produção de Igs conforme descrição anterior. Os resultados apresentados mostram que a produção

de Igs foi maior quando foi máxima a redução na incorporação da ^3H -timidina.

3.6 - NÍVEIS SÉRICOS DE Igs DURANTE A INFECÇÃO.

Com a verificação de que a maior parte das Igs secretadas "in vitro" pelas células esplênicas dos animais infectados logo após o sacrifício dos animais e após 8 dias de infecção era do tipo IgG (tab.2), procuramos determinar se haveria também maior quantidade deste último tipo de Ig na circulação dos animais infectados.

Para tanto, alíquotas dos soros provenientes de 3 - 4 animais infectados foram medidas em diferentes dias de infecção.

Os resultados expressos na fig. 5 mostram que a partir do 7º e 10º dias de infecção ocorreu um aumento na quantidade de Igs circulantes, tanto de IgM que atinge o máximo por volta do 14º dia de infecção, quanto de IgG que atinge também o máximo no 14º dia, porém em quantidade 2x maior que IgM e 5x maior que o normal.

Estes níveis séricos de IgM e IgG começam a cair depois do 14º dia porém mantem-se ainda altos no 18º dia.

Existe portanto uma correlação entre maior nível sérico de Igs e parasitemia, sendo que esta decresce com o aumento das Igs verificando-se, igualmente, a maior quantidade de IgG do que de IgM.

3.7 - RESPOSTA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS AO LPS.

A resposta "in vitro" das células esplênicas normais ao LPS tem sido estudada por diversos autores: Coutinho & Möller (1975), Askonas & North (1976), Askonas et al. (1976), North & Askonas (1976), Zauderer & Askonas (1976).

Dois tipos de cultura empregando a técnica de Mishell & Dutton (1967) tem sido utilizados:

a) culturas de baixa densidade (Kearney & Lawton

1975) - 2×10^5 cels./ml num total de 3 ml em meio de cultura contendo 2-Mercaptoetanol (2-ME) e

b) culturas de alta densidade - 2×10^6 cels./ml num total de 2 ml em meio de cultura sem 2-ME.

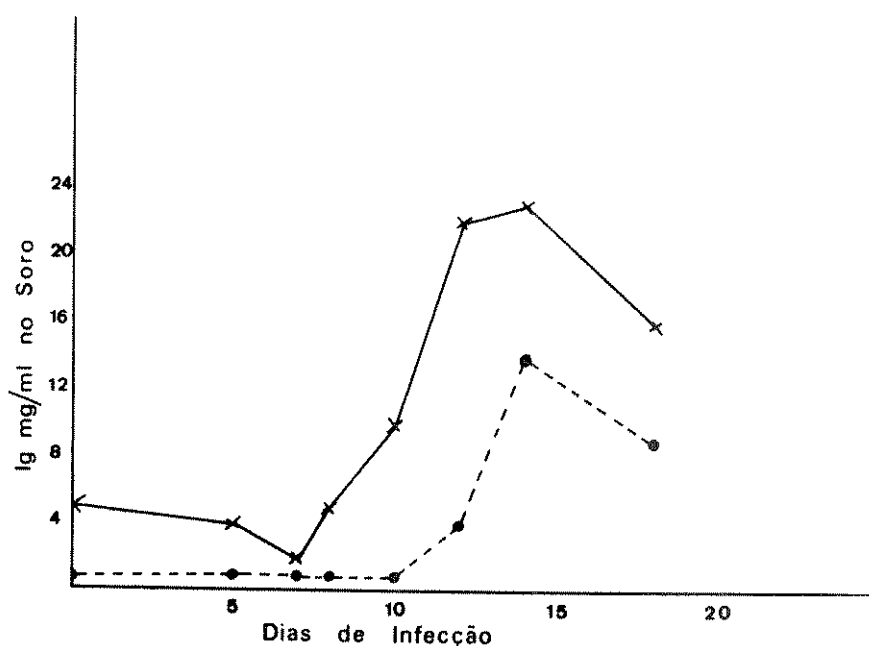


FIGURA 5 - NÍVEIS SÉRICOS DE Igs DURANTE A INFECÇÃO POR T. brucei.

Amostras de soro de 3-4 animais foram tomadas em vários dias após a infecção e a quantidade de IgG e IgM medidas por imunodifusão radial simples.

(x — x) IgG; (● — ●) IgM.

No caso, as culturas de baixa densidade foram feitas em placas de Petri e as de alta densidade em frascos "bijou", ambos de plástico - "Falcon" ou "Sterilin".

A resposta das células esplênicas normais ao LPS, em culturas de baixa densidade, caracteriza-se por um pico na incorporação da ^3H -timidina no 3º - 4º dia de cultura e por

um pico na produção de Igs no 6º - 7º dia. Para as culturas de alta densidade os picos são, respectivamente, no 2º e 4º dia de cultura Askonas & North (1976).

Com a finalidade de estudar a resposta das células esplênicas dos camundongos infectados ao LPS, culturas de baixa densidade foram preparadas utilizando-se animais em diferentes dias de infecção. Cada experimento contou com um controle normal.

Os resultados apresentados na fig. 6 mostram que as células dos camundongos com 5 dias de infecção apresentaram uma intensa proliferação no primeiro dia de cultura, decaindo no 3º havendo, no entanto, uma recuperação no 7º dia.

As células esplênicas dos camundongos no 12º dia de infecção apresentaram da mesma maneira uma intensa proliferação no primeiro dia de cultura, porém, diferentemente das anteriores, no 7º dia de cultura apresentaram um pequeno número de células. Fig. 6.

Na fig. 6 estão também representados os resultados obtidos com as células esplênicas provenientes dos camundongos com 8 dias de infecção. Neste caso não foi verificado o aumento das células no primeiro dia de cultura e também o número de células no 7º dia foi inferior aos anteriores.

Os picos blastogênicos verificados no primeiro dia das culturas das células esplênicas dos camundongos com 5 e 12 dias de infecção e ausentes naqueles com 8 dias, estão de acordo com os dados obtidos com a incorporação de ³H-timidina. Fig. 2.

3.8 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DOS MACRÓFAGOS E CÉLULAS T DAS POPULAÇÕES ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E A RESPOSTA AO LPS.

Visando determinar se a baixa resposta ao LPS resultava de uma exaustão do potencial B nos animais infectados ou se seria o resultado da ação de células de atividade supressora, estudamos o efeito dos MØs e linfócitos T na resposta ao LPS. Pa

ra tanto, as populações esplênicas foram submetidas ao tratamento com ferro carbonil e soro anti - θ para a depleção dos M ϕ s e linfócitos T respectivamente.

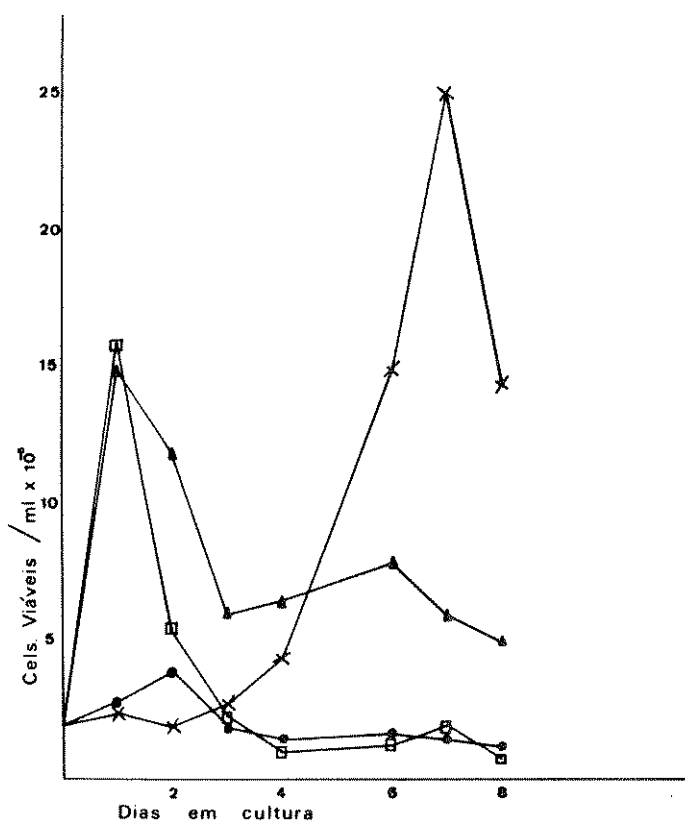


FIGURA 6 - RESPOSTA PROLIFERATIVA AO LPS DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS NORMAIS E DE CAMUNDONGOS COM 5, 8 E 12 DIAS DE INFECÇÃO.

2×10^5 cels./ml foram cultivadas por 8 dias com $10 \mu\text{g/ml}$ de LPS.

Células viáveis no decurso da cultura. (x — x) normais; (▲ — ▲) 5 dias de infecção; (● — ●) 8 dias de infecção; (□ — □) 12 dias de infecção.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos com a população das células esplênicas dos camundongos no 8º dia de infecção após estes tratamentos.

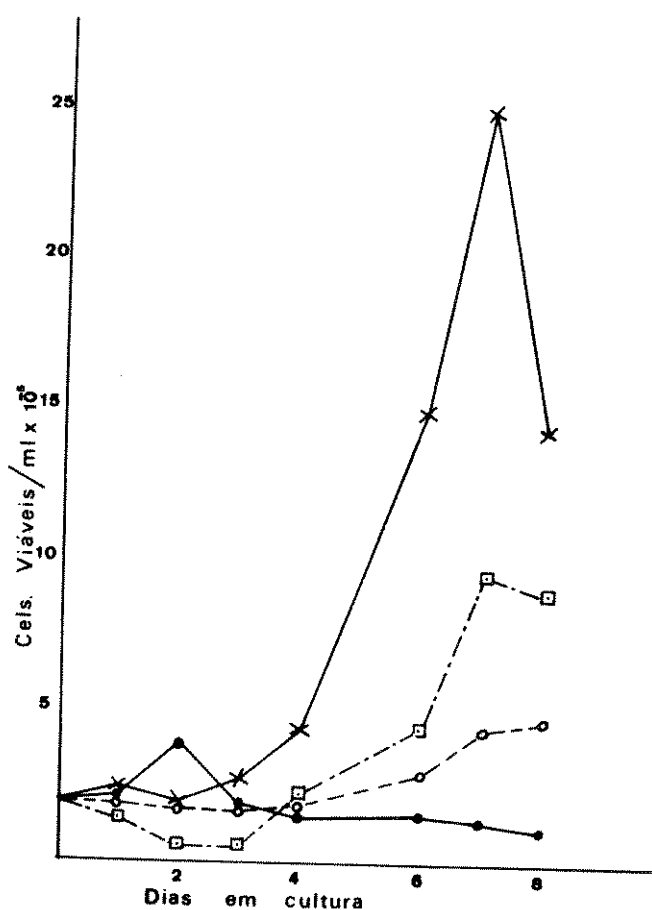


FIGURA 7 - RESPOSTA PROLIFERATIVA AO LPS DE DIVERSAS SUB-POPULAÇÕES DE CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS COM 8 DIAS DE INFECÇÃO.

Células viáveis/ml durante 8 dias de cultura com LPS -10 µg/ml.

(x — x) - normais.

(● — ●) - cels. após 8 dias de infecção - I₈.

(○ — ○) - I₈ após remoção dos MØs com ferro-carbonil.

(□ — □) - I₈ após remoção dos MØs e dos linfócitos T com soro antiθ e C.

Verificou-se que após a depleção dos macrófagos ocorreu uma certa proliferação celular no 7º dia de cultura.

A remoção dos macrófagos e o tratamento pelo soro anti- θ caracterizaram-se por uma diminuição do número de células nos primeiros dias de cultura havendo, no entanto, uma recuperação no 4º dia.

No 7º dia de cultura observou-se uma reversão na resposta ao LPS com um número de células maior do que aquele verificado com a remoção dos macrófagos apenas.

3.9 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DOS MØs E CÉLULAS T NA PRODUÇÃO DE Igs NAS CULTURAS DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS EM RESPOSTA AO LPS.

Conforme descrito por Askonas & North (1976) as culturas das células esplênicas dos camundongos normais em resposta ao LPS, quando cultivadas em baixa densidade, apresentam uma máxima produção de Igs no 6º - 7º dia de cultura.

Visando quantificar a produção de Igs pelas culturas das células esplênicas dos camundongos infectados, e também verificar o efeito da depleção dos macrófagos e células T das populações originais e na produção de Igs, 4×10^5 células viáveis no 6º dia de cultura foram "pulsadas" com ^3H -leucina, e determinada a quantidade de Igs produzidas.

A fig. 8 mostra os resultados obtidos com as culturas das células esplênicas de camundongos em diferentes dias de infecção.

Os resultados mostraram que a produção de Igs por cultura está diminuída pela metade após 5 dias de infecção, e a partir deste ponto severamente comprometida.

A remoção dos macrófagos pelo ferro carbonil pouco alterou esta produção. Porém, a remoção das células T após tratamento pelo soro anti- θ reverteu a produção de Igs nos 7º e 8º dias de infecção trazendo-a a metade dos níveis normais. Após o 12º e 18º dias de infecção, no entanto, esta reversão foi desprezível.

Estes resultados sugerem que existem células de atividade supressora atuando nestas populações celulares, e que após 12 dias de infecção a resposta LPS continua baixa denotando um comprometimento do potencial B destes animais.

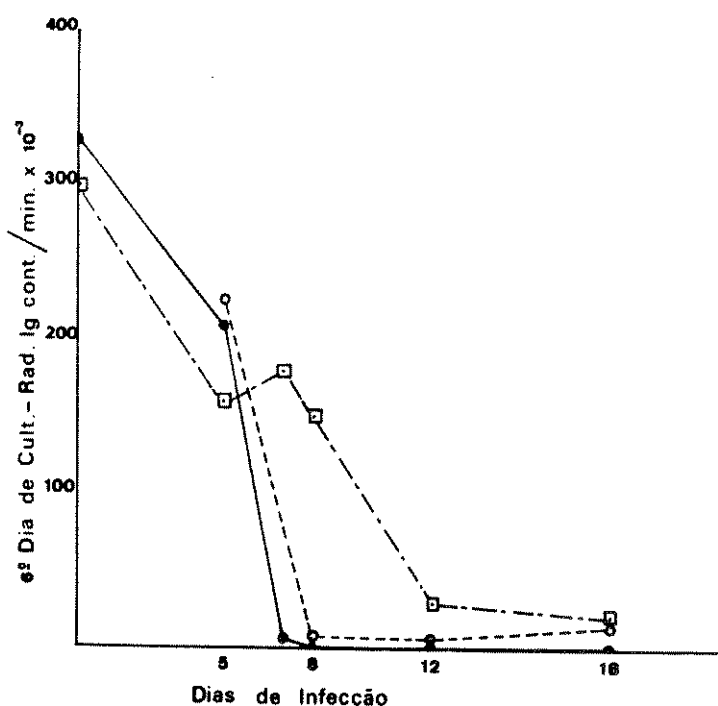


FIGURA 8 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DAS CÉLULAS T NA PRODUÇÃO DE Igs NAS CULTURAS DE CÉLULAS ESPLÊNICAS ESTIMULADAS PELO LPS.

2×10^5 cel./ml cultivadas com $10 \mu\text{g/ml}$ de LPS. Resultados no 6º dia de cultura estão expressos por 3 ml de cultura.

(● — ●) - suspensão original.

(○ — ○) - suspensão depletada de MØs.

(□ — □) - suspensão depletada de MØs e de células T.

3.10 - INIBIÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS
NORMAIS PELO LPS POR MACRÓFAGOS PROVENIENTES DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Diferentemente das culturas de alta densidade, uma grande proporção de macrófagos normais (25 - 50% das células totais), podem ser adicionadas a culturas de baixa densidade sem ocorrer efeitos deletérios (Askonas comunicação pessoal). Isto nos permitiu verificar o efeito dos macrófagos sobre a estimulação das células esplênicas de camundongos normais pelo LPS.

Macrófagos coletados da cavidade peritoneal de camundongos infectados, em diferentes dias de infecção, foram semeados previamente em placas de Petri (35 mm) em número suficiente para dar no final $1,5 \times 10^5$ células aderentes por placa. Usualmente ocorre a aderência de 50% das células semeadas.

Sobre estes macrófagos foram adicionadas células esplênicas de camundongos normais em número de 6×10^5 dando portanto uma relação MØ/célula esplênica de 1:4. As culturas receberam como anteriormente $10 \mu\text{g/ml}$ de LPS.

Determinou-se a incorporação da ^3H -timidina no 3º dia de cultura e a produção de Igs no 6º dia.

Os resultados expressos na tabela 3 mostram que ocorreu uma intensa inibição da proliferação celular evidenciada tanto pelo número de células quanto pela incorporação da ^3H -timidina e pela produção de Igs. Estes efeitos se tornaram evidentes a partir do 5º dia e se acentuaram a medida que se prolongou a infecção.

Na fig. 9 estão expressos os resultados obtidos com a inibição da proliferação celular assim também como a inibição da produção de Igs pelas culturas por MØs provenientes de camundongos infectados i.e. MØs supressores. Nesta figura os resultados da incorporação da ^3H -timidina estão expressos/ 10^3 células. Verificamos então que a inibição da multiplicação das células esplênicas pelos MØs supressores está comprometida quer os resultados sejam expressos por 10^3 células ou pelo total da cultura (tab. 3).

TABELA 3 - INIBIÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS NOR
MAIS PELO LPS POR MØs PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS IN
FECTADOS.

Doadores de MØs Dias de Infecção	3º dia cultura Inc. ³ H-Timidina ct/min/ml	6º dia de Cultura	
		cels. viáveis/ml	Ig-ct/min/ml cultura
0	49.492	14,5	73.080
5	28.250	4,6	14.954
8	10.999	5,1	16.910
12	8.114	1,6	2.480
18	5.639	1,5	1.850

3.11 - CAPTAÇÃO DA PROTEÍNA IODADA (¹²⁵I) POR MØs DA CA
VIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR
T. brucei.

Os resultados anteriores demonstraram que durante a infecção por T. brucei ocorreu uma ativação dos MØs os quais exerceram atividade supressora sobre as células esplênicas em resposta ao LPS. Esta atividade supressora pode ser demonstrada já a partir do 5º dia de infecção. Tabela 3 e fig. 9.

Verificamos igualmente nestes animais um aumento do número de células da cavidade peritoneal e também um aumento na proporção de MØs sobre os linfócitos i.e. de 40% nos animais normais para 80% nos animais infectados (Corsini & Askonas - resultados não publicados).

Estes fatos, levaram-nos a verificar se nesta parasitose ocorreria uma maior captação de proteínas pelos macrófagos peritoneais que pudesse ser relacionada com estes fenômenos de supressão e com uma maior atividade do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF).

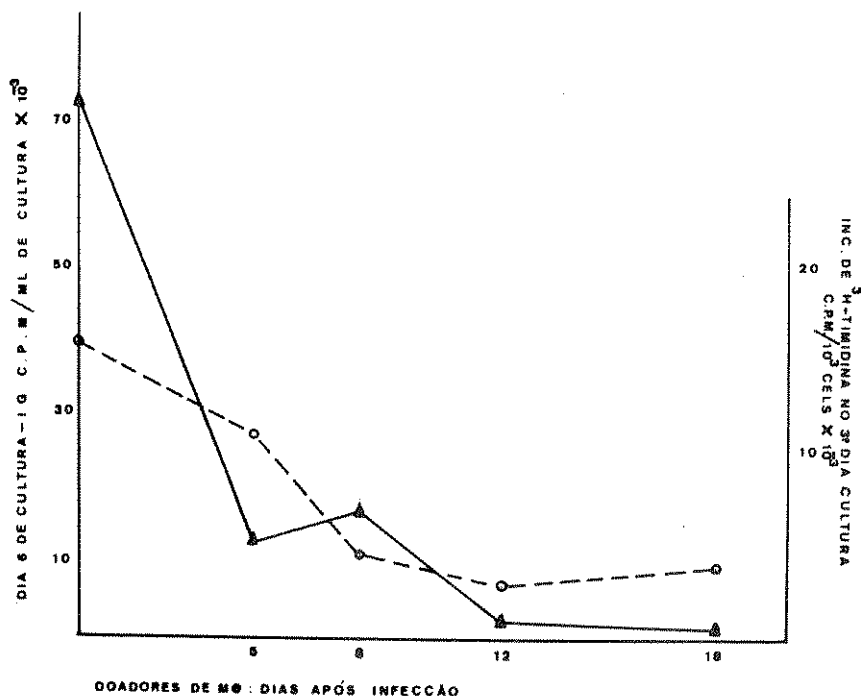


FIGURA 9 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E SECREÇÃO DE Igs INIBIDAS POR MØs SUPRESSORES.

Culturas de cels. esplênicas normais estimuladas pelo LPS na presença de MØ provenientes de animais infectados.

(▲ — ▲) Igs; (o — o) Incorporação de ^3H -timidina/ 10^3 cels.

Para tanto, camundongos em diferentes dias de infecção foram injetados I.P. com hemocianina de Maia squinado (HMS) marcada com ^{125}I .

Foram injetadas I.P., 80 μg de MSH e $6,9 \times 10^6$ contagens de ^{125}I - HMS num volume de 0,25 ml em T.F.. Depois de 45 minutos da injeção os animais foram sacrificados, e o exsudato peritoneal coletado conforme descrição anterior (vide Material e Métodos). As células foram lavadas 2x em MME - 1% SFV e a radioatividade ligada às células determinada em contador gama.

Os resultados expressos na tabela 4 revelaram que ocorreu uma menor captação da proteína iodada pelos MØs dos animais infectados diminuição esta que se acentuou à medida que se prolongou a infecção. Existe portanto uma relação inversa entre captação da proteína marcada e atividade supressora dos MØs da cavidade peritoneal dos animais infectados.

TABELA 4 - CAPTAÇÃO DA PROTEÍNA IODADA (125 I) POR MØs DA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO T.brucei.

Dias de Infecção	Cels. Perit/cam. x 10 ⁶	% Inges/cam.	Rad. Tomada/cam.	Rad./10 ⁶ MØs
N	2,65	1,40	97.000	36.603
6	3,10	1,31	87.932	28.190
9	4,80	0,49	27.785	5.788
13	14,00	1,25	85.092	6.078

3.12 - RESPOSTA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS À FITOHEMAGLUTININA (FHA).

Com a finalidade de se estudar a resposta das células esplênicas dos camundongos infectados à fitohemaglutinina, foram preparadas culturas de alta densidade (2×10^6 cels./ ml num total de 2 ml em frascos plásticos) estimuladas com 0,5µg/ml de fitohemaglutinina.

As culturas de células esplênicas normais em resposta à fitohemaglutinina apresentam um pico na incorporação da 3 H-timidina no 2º dia de cultura (Corsini & Askonas - resultados não publicados); por esta razão, a incorporação da 3 H-timidina foi medida no 2º dia de cultura.

Os resultados expressos na fig. 10 mostraram que a partir do 5º dia de infecção ocorreu uma diminuição de 90% na incorporação de ^3H -timidina, e à medida que a infecção se prolongou as células tornaram-se refratárias ao estímulo mitogênico da fitohemaglutinina denotando, portanto, sério comprometimento das células T pela infecção quando medido através da resposta à FHA.

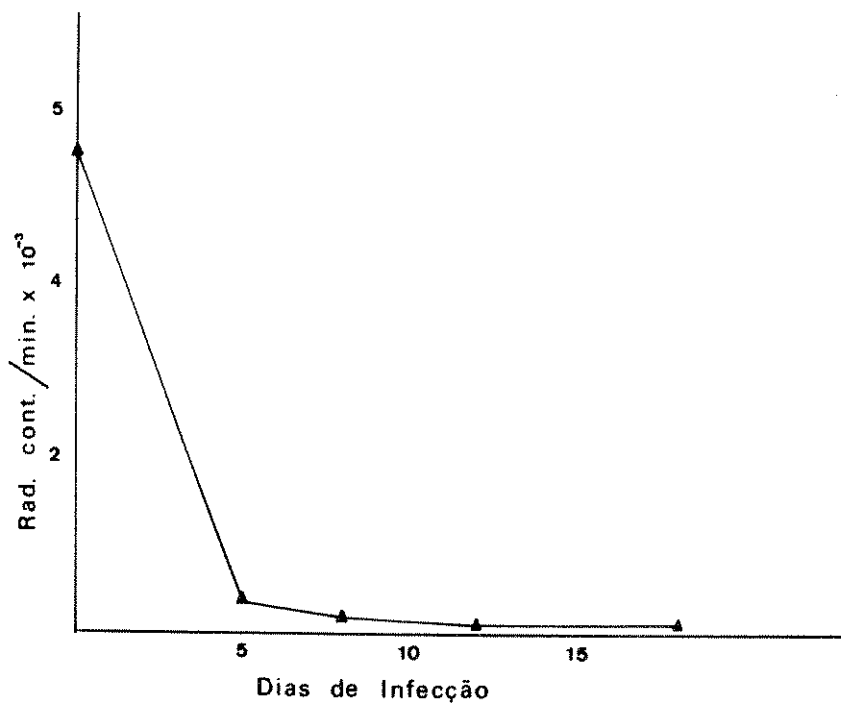


FIGURA 10 - RESPOSTA "in vitro" A FHA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

2×10^6 cels./ml (2ml) foram cultivadas com FHA $0,5 \mu\text{g/ml}$. Incorporação da ^3H -timidina no 2º dia de cultura.

3.13 - REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS (R.M.L.) ENTRE CÉLULAS ESPLÊNICAS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS VERSUS CÉLULAS ESPLÊNICAS IRRADIADAS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS BALB/C NORMAIS.

A verificação da refratariedade das células esplênicas dos camundongos infectados ao estímulo da FHA. após 5 dias de infecção e considerando que a reação mista de linfócitos entre raças de camundongos que diferem quanto ao locus H2 do complexo de histocompatibilidade (especificamente região I) pode ser utilizada como uma medida do potencial T dos animais (Schendel & Bach, 1974; Paul & Benacerraf, 1977); foram realizados experimentos de R.M.L. utilizando-se células esplênicas provenientes de camundongos com 8 e 16 dias de infecção versus células esplênicas irradiadas (1500 rads - ^{60}Co) de camundongos BALB/C normais.

Culturas de alta densidade, num volume de 2 ml em frascos plásticos, contendo 5×10^6 células alvo e a mesma quantidade de células reativas, foram "pulsadas" no 2º dia de cultura com $1\mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina. Os resultados expressos na fig. 11 representam a média aritmética de frascos em duplicata.

Os resultados mostraram que ocorreu uma diminuição na incorporação da ^3H -timidina de 86% após 8 dias de infecção e de 94,2% após 16 dias.

3.14 - REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS (R.M.L.) ENTRE CÉLULAS ESPLÊNICAS T PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS VERSUS CÉLULAS ESPLÊNICAS IRRADIADAS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS BALB/C NORMAIS.

A separação de populações de linfócitos do tipo T tem sido feita através da técnica descrita por Julius et al. (1973) pela passagem de populações celulares por colunas de lã de "nylon".

Através desta técnica e com a passagem por 2 colunas de lã de "nylon" obtem-se populações de linfócitos T com 95% de pureza conforme determinação por imunofluorescência e testes de citotoxicidade com soro anti- θ (Askonas, resultados não publicados).

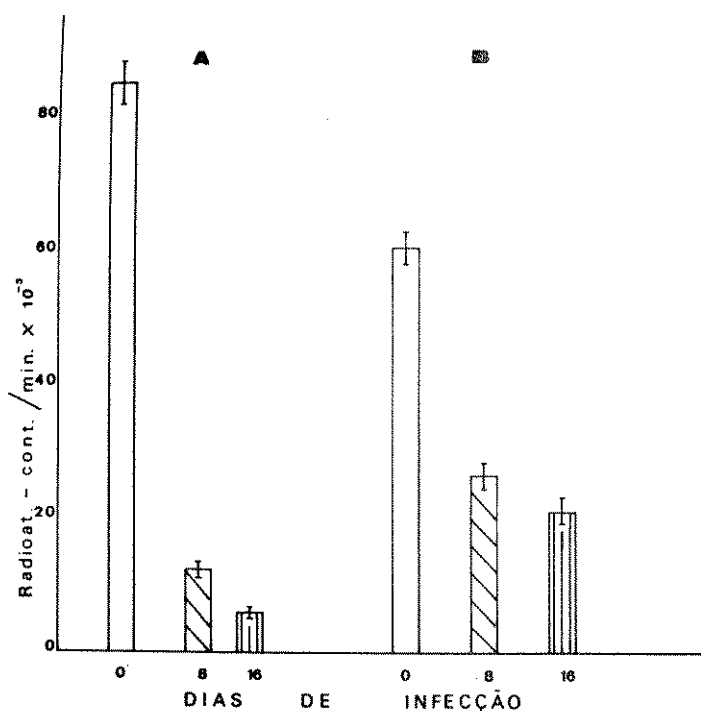


FIGURA 11 - REAÇÃO MISTA DE LINFÓCITOS DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Cels. Esplênicas de camundongos normais e infectados versus cels. esplen. irradiadas de camundongos BALB/C normais.

Incorporação da ³H-timidina pelas culturas no 2º dia. Resultados expressam a média aritmética \pm d.p. de frascos em duplicata.

A - Suspensões originais.

B - Suspensões de células separadas por lã de "nylon" - cels. T.

A utilização desta técnica, permitiu-nos realizar experimentos de reação mista de linfócitos entre linfócitos T de camundongos normais e infectados versus células esplênicas irradiadas provenientes de camundongos BA1B/C normais.

Foram utilizados os mesmos tipos de cultura descritos anteriormente e o "pulso" com ^3H -timidina também foi feito em duplicata no 2º dia de cultura.

Os resultados expressos na fig. 11 mostraram que embora persista a diminuição na incorporação da ^3H -timidina nas culturas das células provenientes dos camundongos infectados, a inibição foi menor tanto para 8º quanto para o 16º dia de infecção, respectivamente: 62,2% e 88,2%.

3.15 - HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA AO DNFB EM CAMUNDONGOS INFECTADOS.

A hipersensibilidade retardada ao DNFB tem sido utilizada por diversos autores como uma medida do potencial T do animal uma vez que é mediada pelos linfócitos T (Gell & Benacerraf, 1961; Lagrange et al., 1974; Mackaness et al., 1974; Phahuphak et al., 1974).

A verificação do comprometimento da resposta T dos animais infectados pela refratariedade ao estímulo mitogênico da FHA. e pela reação mista de linfócitos, e a verificação anterior de Murray et al. (1974b) descrevendo como normal a resposta ao DNFB em camundongos infectados com T. brucei, levou-nos a estudar nestes animais a sensibilização cutânea ao DNFB.

Camundongos em diferentes dias de infecção foram sensibilizados mediante a aplicação em área da pele abdominal (previamente depilada) de 50 µl de uma solução de DNFB em acetona - óleo de oliva. Após 5 dias, os animais receberam 5 µl da mesma solução na orelha esquerda como dose desencadeante.

Para se evitar os possíveis erros decorrentes da determinação da espessura das orelhas dos animais, utilizou-se da técnica descrita por Vadas et al. (1975) para a avaliação da resposta dos animais.

Os resultados da fig. 12 expressam as médias aritméticas obtidas com grupos de 5 animais dividindo-se as con

tagens observadas na orelha esquerda pelas contagens verificadas na orelha direita, 12 horas após injeção do isótopo radioativo para avaliação R.H.R. (Vide material e métodos).

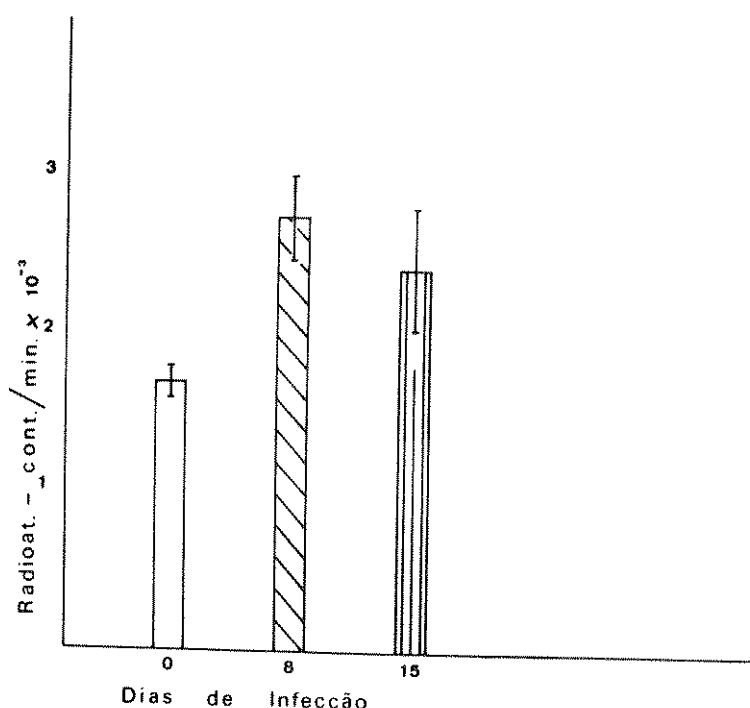


FIGURA 12 - HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA AO DNFB EM CAMUNDONGOS NORMAIS E INFECTADOS COM T. brucei.

Relação entre contagens obtidas na orelha E e na orelha D.

¹²⁵IUDR injetada I.P. 10 horas após a dose de sensibilidade de 5 dias após sensibilização.

Resultados expressam a média aritmética \pm d.p. de 5 animais/grupo.

Observou-se que os animais com 8 e 15 dias de infecção apresentaram uma resposta ao DNFB mais intensa que os animais normais. Tais resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Murray et al. (1974b) verificando-se que a sensibilidade

cutanea ao DNFB não está diminuída na tripanosomíase africana experimental.

3.16 - EFEITO DA DEPLEÇÃO DAS CÉLULAS T "IN VIVO" E A RESPOSTA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS AO LPS E A FHA.

Tem sido demonstrado por Hudson (K. Hudson - comunicação pessoal) que em camundongos timectomizados a infecção por T. brucei apresenta o mesmo curso que nos animais não timectomizados embora exista uma sobrevida ligeiramente maior daqueles animais.

Camundongos "nu/nu" infectados por T. brucei clone NIM 2 apresentaram a mesma curva parasitêmica que os controles (CBA x C57)F₁ (Clayton & Corsini, resultados não publicados); Clayton et al. em preparação).

Visando estabelecer o papel desempenhado pelas células T nesta infecção em experimentos "in vivo", camundongos "nu/nu" e camundongos (CBA x C57)F₁ timectomizados com 1 mes de vida irradiados e reconstituídos com células fetais do fígado singeneicas (células B), foram infectados com T. brucei da maneira convencional.

Em diferentes dias da infecção estabeleceram-se as culturas habituais, de alta e baixa densidade, para se estudar a resposta "in vitro" das células esplênicas destes animais ao LPS e à FHA.

Como controle foram utilizados além dos animais F₁, animais irradiados e reconstituídos com células B, camundongos CBA/H e CBA/N. Esta última raça caracteriza-se por uma refratariedade ao estímulo mitogênico do LPS geneticamente controlada e ligada ao sexo - Gerry Klaus (comunicação pessoal).

Os resultados estão expressos na tabela 5.

O número de parasitas detectado nas suspensões celulares esplênicas dos camundongos timectomizados, irradiados e reconstituídos (camundongos B), no 5º e 11º dias de infecção foi menor que nos controles, e no caso dos "nu/nu" não foram detectados parasitas nestas suspensões.

TABELA 5 - EFEITOS DA TIMECTOMIA E DA AUSÊNCIA CONGÊNITA DO TIMO NA INFECÇÃO POR T. brucei E A RESPOSTA "in vitro" AO LPS E A FHA.

Animais	(CBA x C57)F ₁		Timectomizados Irrradiados (B)		Irrradiados reconstituídos		CBA/N		"Nudes"	
	6	11	5	10	5	10	5	10	5	10
Nº parasitos x 10 ⁶ /baço(Susp.celular)	48,00	24,80	4,80	14,80	3,20	21,20	6,91	26,40	Não Detec.	Não Detec.
Prod. Ig Dia Sacrif.-1/N	N.F.	116,0	N.F.	13,00	N.F.	43,00	N.F.	28,00	N.F.	1,70
Estimul. FHA - Inc. ³ H-timidina 2º dia cult. I/N	0,24	0,08	0,91	N.F.	0,33	0,05	0,31	0,05	N.F.	N.F.
Prod. Ig-6º Dia cult. LPS-1/N	0,20	0	1,08	0	0,31	0	Sem resposta		0,04	0
Estimul. LPS - Inc. ³ H-timidina 3º dia cult. I/N	1,03	0,06	1,12	0,04	0,78	0	Sem resposta		N.F.	N.F.
Incorp. ³ H-timidina Dia Sacrif. I/N	1,03	11,0	1,53	1,02	1,75	4,40	0,01	7,40	0,11	0,92

Camundongos foram timectomizados com 1 mes de vida, irradiados 30 dias após e reconstituídos com células fetais esplênicas de camundongos singeneicos. Camundongos "nu/nu" foram utilizados com 4 meses de vida.

A incorporação da ³H-timidina pelas células esplênicas após 5 dias de infecção foi 50% menos nos "nu/nu" e não revelou diferenças entre os outros grupos. No entanto, no 10º dia de infecção ocorreu uma profunda inibição (90%) nos camundongos B e "nu/nu".

Isto nos sugere que as populações celulares sensíveis ao estímulo mitogênico do parasita se esgotam mais rapidamente nos camundongos B e "nu/nu", restando ainda nos outros

camundongos populações celulares sensíveis ao estímulo mitogênico após o primeiro pico parasitêmico.

A produção de Igs pelas células esplênicas logo após o sacrifício do animal com 10 dias de infecção (12 dias para os "nu/nu") foi 89% menor nos camundongos B e 98% nos "nu/nu". Nos camundongos CBA/N a diminuição foi de 75%.

Estes resultados sugerem pois que nos camundongos B e nos "nu/nu" as populações B são exauridas mais precocemente do que nos animais controles.

Verificamos ainda que, mesmo os camundongos CBA/N respondem ao estímulo mitogênico da infecção por T. brucei sugerindo que outros clones B que não aqueles sensíveis ao LPS são estimulados pelos pressupostos mitogênicos.

Nas culturas de baixa densidade estimuladas pelos LPS a incorporação da ³H-timidina no 3º dia de cultura revelou uma total ausência de resposta nas culturas das células esplênicas provenientes dos camundongos CBA/N.

Com relação aos demais grupos não foi verificada diferença entre os mesmos havendo a mesma exaustão do potencial reprodutivo após 10 dias de infecção.

A produção de Igs no 6º dia destas culturas confirmou a ausência de resposta ao LPS por parte das células esplênicas provenientes dos camundongos CBA/N e da mesma maneira a exaustão do potencial de resposta após 12 dias de infecção.

No entanto, após 5 dias de infecção verificamos que as culturas de células esplênicas provenientes dos camundongos B apresentaram uma resposta 80% maior que nos controles normais.

Este fato poderia ser explicado pela ausência de células T supressoras nestes animais.

A incorporação da ³H-timidina pelas culturas de alta densidade estimuladas pela FHA no 2º dia de cultura não revelou diferenças entre os grupos apresentando a mesma exaustão do potencial reprodutivo após 5 dias de infecção.

3.17 - EXAUSTÃO DA MEMÓRIA B E T EM CAMUNDONGOS INFECTA
DOS COM T. brucei.

A verificação de que as respostas ao LPS, à FHA e a reação mista dos linfócitos das populações esplênicas dos camundongos infectados estão severamente comprometidas, demonstra a existência de uma exaustão do potencial imunológico B e T nestes animais.

A baixa reatividade destas populações também é explicada pela existência de células de atividade supressora, MØs e linfócitos T, em determinadas fases da infecção. Porém, a medida que a infecção se prolonga o potencial imunológico está de tal maneira alterado que mesmo a eliminação destas células supressoras não restabelece a reatividade destas populações.

A existência de um potencial imunológico caracterizado por uma população de linfócitos B e T não comprometidos, e capazes de se diferenciarem nas populações produtoras de anticorpos, mediadores da hipersensibilidade retardada e/ou células de memória (Burnet, 1957), constitui a base experimental da Imunologia Moderna.

Os resultados obtidos até então levaram-nos a estudar nestes animais infectados a geração das células de memória B e T.

Com a intenção de verificar qual a subpopulação de células B e/ou T estaria afetada pela infecção, e se células maduras e.g. células de memória para resposta IgG estariam comprometidas durante o curso da infecção, foram realizados experimentos de adoção da resposta anti-hapteno mediante a transferência de células esplênicas de animais previamente imunizados para recipientes isogênicos irradiados.

Em resumo: camundongos foram imunizados com DNP-Proteína para a obtenção de altos títulos anti-DNP, tanto após a transferência de populações esplênicas integrais quanto populações depletadas de células T (populações B) suplementadas com populações provenientes de animais imunizados apenas com a proteína carregadora (populações T) - Mitchson (1971).

Para tanto, camundongos foram imunizados com 100 µg de DNP - KLH, DNP -HGG,KLH e HGG precipitados pelo alumen e 10^9 organismos de Bordetella pertussis injetados I.P., e utilizados 2 meses após a imunização. Parte destes animais foi infectada com T. brucei e utilizados em diferentes dias após a infecção.

Com a finalidade de demonstrar a atividade supressora exercida pelos macrófagos dos animais infectados sobre a geração de células de memória, células da cavidade peritoneal foram coletadas em diferentes dias da infecção, e inoculadas juntamente com as células esplênicas nos animais recipientes.

O esquema experimental seguiu a delineação esquematizada na figura 12.

Camundongos isogênicos do mesmo sexo receberam uma dose de 660 rads de uma fonte de ^{60}Co e 0,2 ml de soro humano normal I.P. para se evitar a infecção por T. brucei, Clayton (resultados não publicados), Askonas et al. (1978).

Juntamente com as respectivas populações celulares, os animais receberam uma 2ª dose do antígeno correspondente i.e. DNP - KLH, DNP - HGG ou DNP - Ficol. Quando da verificação da resposta terciária, os animais receberam uma dose de reforço do antígeno correspondente e foram sangrados igualmente após 10 dias.

A resposta imunológica foi medida através da técnica de Farr (1958) e o título do soro expresso em capacidade de ligação do Ag/ml (C.L.A.), ou pelo número de células formadoras de placa/baço (vide Material e Métodos).

Os resultados expostos nas tabelas 6 e 7 e fig. 13 demonstraram que a memória B está severamente comprometida nesta infecção ocorrendo uma diminuição da C.L.A. e também das células formadoras de placa, tanto diretas quanto indiretas, a medida que a infecção se prolongou.

O comprometimento da memória B foi evidenciado tanto na resposta secundária (tab. 7 e fig. 13) quanto na resposta terciária (tab. 8) quando os animais receberam uma terceira dose do antígeno e foram sangrados 17 dias após.

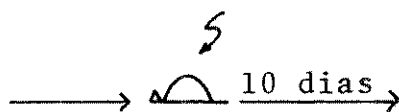
Da mesma maneira, a memória T está severamente comprometida no decorrer da infecção conforme os dados da Tab.6.

FIGURA 12

a) Estudo da Memória T.

1) Cels. Esplênicas Camund.
Norm. e Infect. (8-16 dias).

Imunizados DNP-KLH + 10 µg Ag



Soro analis.

Tec. Farr.

2) Cels. Espl. Camund. Imun.

DNP-KLH tratados soro anti-T (Cels. B).

+

Cels. Espl. Camund. Norm.

ou Infect. (8 e 16 dias)

Separadas lã de "nylon"

(Cels. T "Helpers"). + 10 µg Ag



Soro Anal.

Tec. Farr.

b) Estudo da Memória T e MØ Supressores.

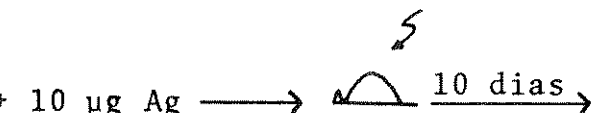
Cels. Espl. Camund.

Imuniz. DNP-KLH

+

MØs Cav. Perit.

Camund. Infec. (8-16 dias). + 10 µg Ag



Soro Anal.

Tec. Farr.

c) Estudo da Memória B.

1) Cels. Espl. Camund. Imuniz.

DNP-HGG Norm. e Infect. (8-16 dias)

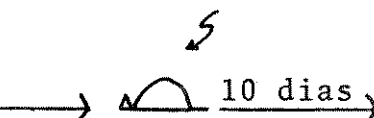
tratadas soro anti-T (Cels. B).

+

Cels. Espl. Camund.

Norm. Imuniz. HGG.-

("Helpers" Norm.) + 10 µg Ag



Soro Anal.

Tec. Farr.

2) Cels. Espl. Camund. Imuniz.

DNP-HGG Norm. e Infect. (8-16 dias)

tratadas soro anti-T (Cels. B). + DNP-Ficol.



C.F.P.

anti-DNP.

(50 µg)

Os resultados mostraram igualmente que os MØs dos animais infectados exerceram atividade supressora na geração da memória T havendo uma diminuição do 50% na C.L.A. nos animais que receberam MØs provenientes de animais com 8 dias de infecção e 76% após 16 dias.

TABELA 6 - EXAUSTÃO DA MEMÓRIA T E EFEITO SUPRESSOR DOS MØs EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Doadores DNP-KLH imunizados 2 meses	Doadores Macrófagos (Peritoneo)	DNP KLH 10 µg	Doadores KLH Células sep. lâ de "Nylon"	Titulo Soro C.L.A./ml - 10º Dia
Sem trat./o	-	+	-	35,61 \bar{x} 1,50
8 dias de infec.	-	+	-	5,10 \bar{x} 1,20
16 dias de infec.	-	+	-	0,47 \bar{x} 1,01
Tratados com Anti-T	-	+	normal	6,60 \bar{x} 1,04
"	-	+	8 dias de infec.	3,65 \bar{x} 1,21
"	-	+	16 dias de infec.	0,33 \bar{x} 1,00
Sem tratamento	normal	+	-	37,30 \bar{x} 1,21
"	8 dias de inf.	+	-	18,50 \bar{x} 1,30
"	10 dias de inf.	+	-	8,97 \bar{x} 1,11

Capacidade de ligação do Ag expressa em hapteno ligado/mMol $\times 10^{-8}$.

Camundongos recipientes foram irradiados com 660 rads e sangrados 10 dias após a transferência das células. Média geométrica \bar{x} d.p. de 6 animais/grupo.

Estes resultados mostram claramente que a infecções por T. brucei dos camundongos imunizados previamente, levaram a uma supressão da resposta adotiva do tipo IgG. Esta supressão não é devida a transferência de parasitas juntamente com as po

pulações esplênicas para o recipiente visto que a infecção não se instala nestes últimos graças a inoculação prévia de 0,2 ml de plasma humano.

TABELA 7 - EXAUSTÃO DA MEMÓRIA B EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Doadores DNP-HGG Imunizados 2 meses	DNP HGG 10 µg	DNP Ficoid 50 µg	Doadores Imunes a HGG	Título Soro C.L.A. °/ml: 10* dia	C.F.P. NO 7º DIA	
					Diretas	Indiretas
DNP-HGG anti T normal	+	-	normal	7,33 \bar{x} 1,33	N.F.	N.F.
DNP-HGG anti-T normal	+	-	-	0,71 \bar{x} 1,22	N.F.	N.F.
DNP-HGG anti-T 8 dias de infecção	+	-	normal	0,26 \bar{x} 1,50	N.F.	N.F.
DNP-HGG anti-T 16 dias de infecção	+	-	normal	0,58 \bar{x} 1,24	N.F.	N.F.
DNP-HGG anti-T normal	-	+	-	N.F.	4.380 \bar{x} 1,54	61.664 \bar{x} 1,79
DNP-HGG anti-T 8 dias de infecção	-	+	-	N.F.	1.530 \bar{x} 2,20	6.023 \bar{x} 1,46
DNP-HGG anti-T 16 dias de infecção	-	+	-	N.F.	755 \bar{x} 1,39	358 \bar{x} 2,72

Capacidade de ligação do Ag expressa como na tab. anterior.

Resultados expressam a média geométrica \bar{x} d.p. de grupos de 5 animais.

Camundongos recipientes foram irradiados com 660 rads antes da transferência das células e sangrados 10 dias após ou sacrificados 7 dias depois da transferência.

C.F.P. indiretas foram reveladas com um soro de coelho anti-Ig de camundongo.

A demonstraçãõ prãvia da existãncia de cãlulas T supressoras que poderiam interferir com a resposta adotiva foi contornada com o tratamento pelo soro anti- θ e C, anteriormente à transferãncia.

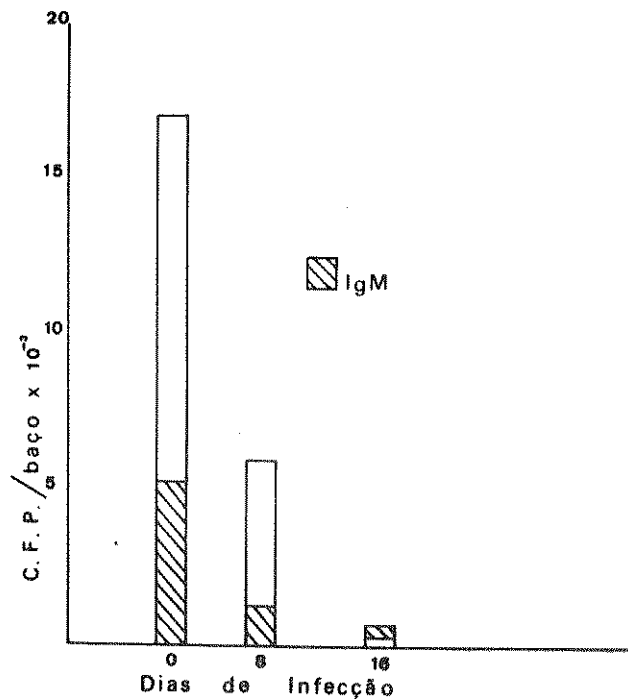


FIGURA 13 - EXAUSTÃO DA MEMÓRIA B EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Cãlulas formadoras de placa anti-DNP 7 dias apõs a transferãncia das cãls. e 50 μ g de DNP-Ficol. Vide tab.7.

A resposta das populações esplãnicas "depletadas" de cãlulas T (populações B) provenientes de camundongos normais puderam ser restauradas com cãlulas esplãnicas imunes às proteĩnas-carregadoras e separadas pela lã de "nylon" (cãlulas T), diferentemente daquelas populações B provenientes de camundongos infectados. Tab. 7.

Uma 2^a imunizaçãõ apõs 3 semanas de transferãncia adotiva ainda nãõ demonstrou recuperaçãõ da produçãõ de anti

corpos. A resposta terciária anti-DNP foi de apenas 15% e 19% da resposta normal naqueles experimentos em que foram utilizados a n i m a i s, respectivamente, com 8 e 16 dias de infecção. Tab. 8.

TABELA 8 - EXAUSTÃO DA MEMÓRIA B EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei. RESPOSTA TERCIÁRIA.

	% Inibição da C.L.A.		
	Norm.	I ₈ *2	I ₁₆ *3
DNP-KLH	0	69	94
*1 Cels. B + T	0	89	91

Animais recipientes foram irradiados com 660 rads e transferidos com células esplenicas imunes provenientes de animais normais ou infectados com T. brucei.

Reforço com 10 µg de Ag. I.V. 17 dias após a transferência e sangria 10 dias após reforço.

*1 - DNP-KLH anti-T + células purificadas com lã de "Nylon" provenientes de camundongos imunizados com KLH.

*2 - 8 dias de infecção.

*3 - 16 dias de infecção.

Da mesma maneira, células de memória T foram e x a u r i d a s durante a infecção. Camundongos imunizados com a proteí n a c a r r e d a d o r e s de T "helpers". Testou-se a habilidade destas células r e s t a r e s t a r e m a resposta anti-hapteno das populações tratadas com s o r o anti-T e C (populações B) provenientes de animais n o r m a i s i m u n i z a d o s.

Estas células separadas pela lã de "nylon" p e r d e r a m gradualmente no decurso da infecção a capacidade de r e s t a r e m a resposta anti-DNP daquelas populações. Assim sendo, o c o m p a r t i m e n t o das células T "helpers" está quase que completamente exaurido após 2 semanas de infecção. Tab. 6.

Estes experimentos mostraram claramente que a infecção exauriu as células de memória B e T a antígenos Timo dependentes.

Da mesma maneira, as células B de memória a antígenos T independentes estão comprometidas na infecção por T. brucei visto que o número de placas tanto diretas quanto indiretas está diminuído em 95% e 85% após 8 e 16 dias de infecção respectivamente. Tab. 7 e Fig. 13.

Nestes experimentos, células esplênicas provenientes de animais imunizados com DNP-HGG e infectados com T. brucei foram tratados com soro anti-T e C e transferidos a animais singeneicos irradiados que receberam no momento da transferência 50 µg de DNP-Ficol, um antígeno T independente (Mosier et al. - 1974), e o número de células formadoras de placa verificado 7 dias após transferência. Tab. 7 e Fig. 13.

Estes resultados implicam não somente numa depleção permanente das células de memória, mas também de células virgens que pudessem ser susceptíveis a imunização com o antígeno dado no momento da transferência.

3.18 - QUADRO SANGUÍNEO PERIFÉRICO DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS POR T. brucei.

Durante a infecção por T. brucei, pudemos observar nos animais infectados o desenvolvimento de uma anemia, assim sendo, visando caracterizar o quadro sanguíneo periférico destes animais procedeu-se a contagem de reticulócitos, glóbulos vermelhos e brancos em esfregaços corados pelo método de Giemsa.

Os resultados expressos nas figs. 14 e 15 mostram que a anemia acentuou-se no 12º dia de infecção quando foi máximo o número de reticulócitos circulantes. Observou-se paralelamente uma leucocitose que atingiu valores máximos no 7º dia o correndo, no entanto, uma leucopenia no 21º dia.

A contagem diferencial revelou quadros semelhantes para os neutrófilos, linfócitos pequenos, médios e grandes i. e. aumento no 7º dia de infecção e diminuição no 21º dia.

Observou-se uma monocitose a partir do 7º dia de infecção ocorrendo um pico no 12º dia com persistência ainda no 21º dia.

Estes resultados da contagem diferencial foram confirmados pelos testes citoquímicos do "sudan-black", fosfatase ácida e estearase ácida.

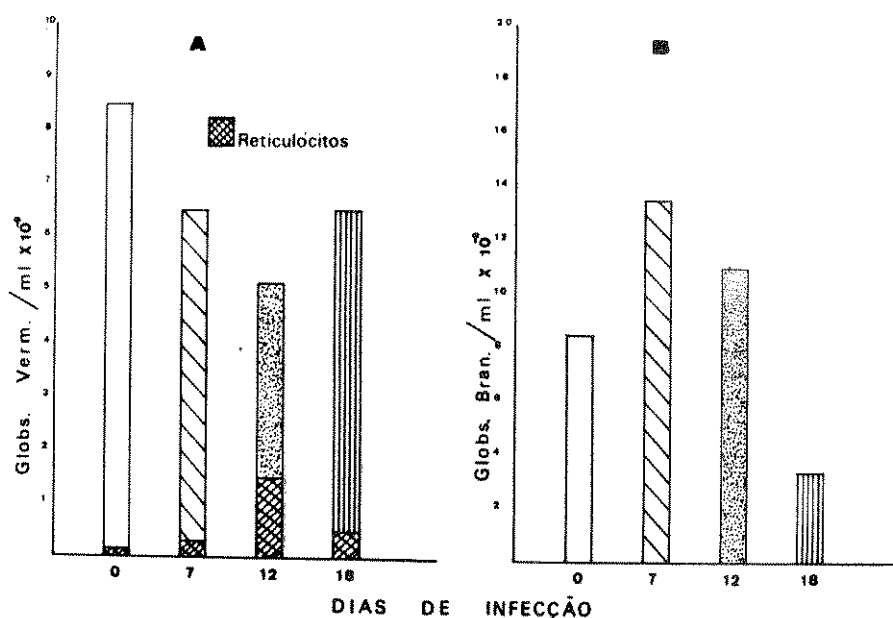


FIGURA 14 - QUADRO SANGUÍNEO PERIFÉRICO DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

A - Glóbulos vermelhos.

B - Glóbulos brancos.

3.19 - PESQUISA DE ANTICORPOS E C₃ NAS HEMÁCIAS

Visando observar se nos camundongos infectados por T. brucei ocorreria um fenômeno imunológico na gênese da ane

mia, foram pesquisadas a presença de IgG, IgM, IgA e C₃ na superfície das hemácias dos camundongos empregando-se os antisoros específicos (gentileza do Dr. Gerry Klaus) através da técnica da hemaglutinação.

Os resultados foram negativos e sugerem a exclusão, portanto, da existência destes mecanismos na gênese da anemia da tripanosomíase africana experimental.

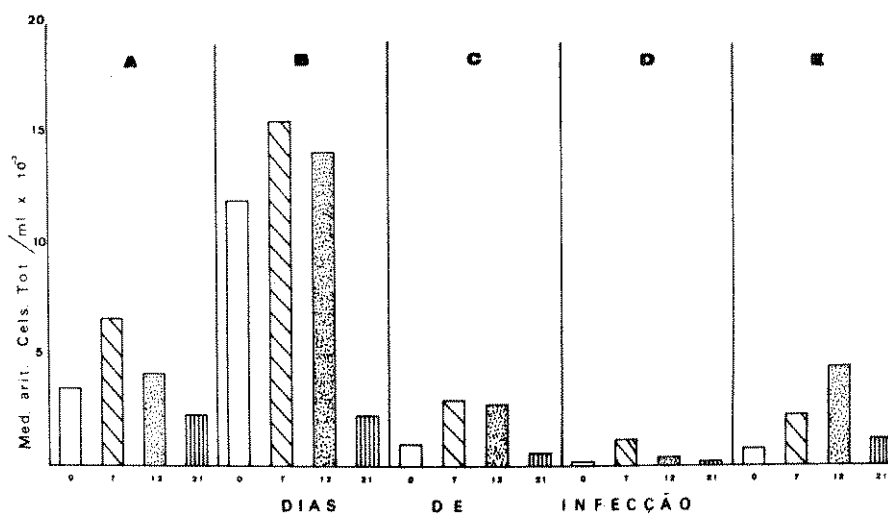


FIGURA 15 - CONTAGEM DIFERENCIAL DO SANGUE PERIFÉRICO DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Os esfregaços foram corados pelo Giemsa.

A - Polimorfos.

B - Linfócitos Pequenos.

C - Linfócitos Médios.

D - Linfócitos Grandes.

E - Monócitos.

3.20 - VERIFICAÇÃO DA CELULARIDADE E DO NÚMERO DE MØs NA MEDULA ÓSSEA (M.O.) DOS ANIMAIS INFECTADOS.

Excluída a existência do mecanismo imunológico descrito anteriormente como explicação da anemia verificada nos animais infectados, procurou-se quantificar o número de células assim também como o número de MØs existentes na medula dos camundongos infectados.

Suspensões celulares da M.O. em T.F. - 5% SFV foram preparadas utilizando-se os dois femures do animal. As células foram lavadas 1x e conservadas em banho de gelo. Procedeu-se a contagem do número de células e a determinação do número de MØs pela técnica do vermelho neutro.

Os resultados expressos na tabela 9 mostraram um decréscimo na celularidade da M.O. dos animais infectados sendo mínimo o número de células no 12º dia de infecção, e também a ocorrência de uma recuperação com números praticamente normais no 21º dia. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Mayor-Whitey et al (1978).

Os MØs aumentaram de proporção nas medulas dos animais infectados atingindo número máximo no 8º dia de infecção (12,3%) conservando-se ainda em grande número após 21 dias.

3.21 - DETERMINAÇÃO DO Nº DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (U.F.C.) NA M.O. DE ANIMAIS INFECTADOS.

Visto que a celularidade de M.O. dos animais infectados diminui no decorrer da infecção, determinou-se através da técnica descrita por Till & McClullogh (1961) o número de Unidades Formadoras de Colonia na M.O. dos animais. Brevemente : suspensões celulares de M.O. são injetados I.V. em camundongos isogênicos do mesmo sexo, previamente irradiados (^{60}Co -600 rads) e no 8º dia após a transferência o número de nódulos - colonias é determinado no baço destes animais.

Os resultados expressos na fig. 16 revelaram que

ocorreu uma diminuição do número de U.F.C. na M.O. dos animais infectados assim também como uma recuperação após 21 dias de infecção. Não somente o número de nódulos está diminuído no 8º dia de infecção mas também o tamanho dos mesmos é menor do que os nódulos normais. Fig. 17.

TABELA 9 - ALTERAÇÕES CELULARES DA MEDULA ÓSSEA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Dias de Infecção	nº de cels./ camun x 10 ⁶	MØs % Cels. Totais
0	27,4	2,6
8	15,1	12,3
12	11,4	N.F.
14	17,0	N.F.
19	15,6	9,3
21	24,0	8,9

As cels. foram colhidas de ambos os femures dos animais.

O nº de MØs foi determinado pelo método do vermelho neutro.

Estes fatos estão em concordância com os resultados descritos anteriormente quando verificamos a hipocelularidade na primeira semana de infecção seguida de uma recuperação nos dias subsequentes.

A existência de um maior número de MØs nestas populações celulares poderia representar uma atividade de supressão exercida por estas células na geração dos precursores eritro e leucopoiéticos, assim também como o menor tamanho e o menor número dos nódulos poderia representar um comprometimento da capacidade de multiplicação das células da M.O. dos animais infectados.

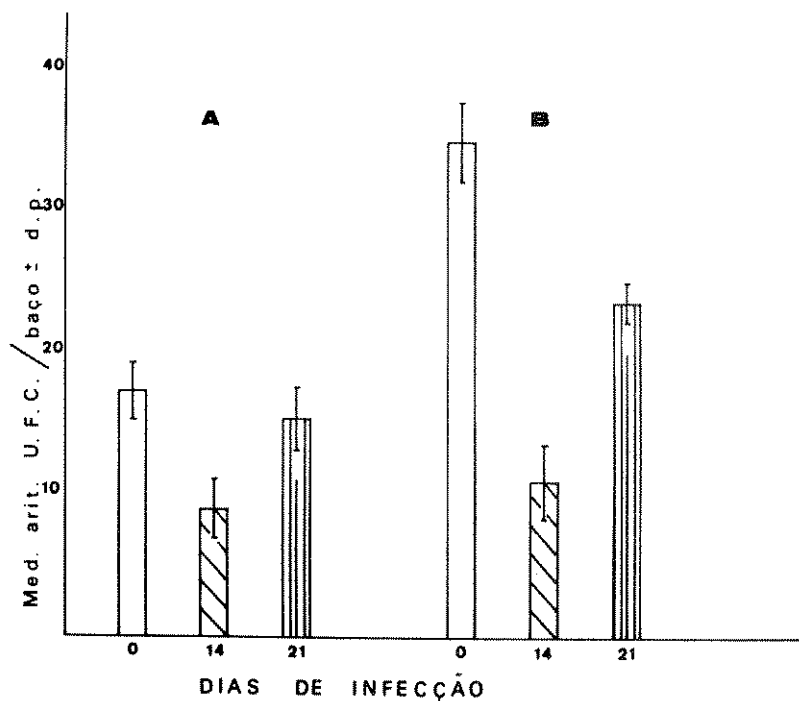


FIGURA 16 - POTENCIAL DA MEDULA ÓSSEA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM T. brucei.

Técnica de Till & McCulloch. Vide Material e Métodos.

A - $0,3 \times 10^5$ cêls. inoculadas.

B - $0,5 \times 10^5$ cêls. inoculadas.



A

B

C

FIGURA 17 - BAÇOS DOS CAMUNDONGOS INJETADOS COM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS NORMAIS OU INFECTADOS COM T. brucei.

Técnica de Till & McCulloch. Vide Material e Métodos.

A - Cels. Normais.

B - Cels. de animais com 8 dias de infecção.

C - Cels. de animais com 21 dias de infecção.

4 - DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam que as infecções por T. brucei em camundongos são fatais num período de aproximadamente 21 dias.

No decorrer da infecção verificamos que acompanhando o aumento do número de células, ocorreram profundas alterações na população esplênica dos animais infectados.

O estudo da incorporação da ^3H -timidina pelas células esplênicas logo após o sacrifício do animal mostrou que a blastogênese não se mantém alta a partir do 5º dia, mas apresenta menor incorporação nos 7º e 8º dias de infecção. Estes dados contrariam os estudos realizados "in vivo" com a incorporação da ^{125}I - iododeoxiuridina no ganglio linfático de camundongos infectados com T. brucei, onde verificou-se uma maior incorporação do isótopo a partir do 6º dia permanecendo em altos níveis durante todo o decorrer da infecção (Jennings et al., 1974).

Verificamos pois que a queda na incorporação de ^3H -timidina pelas células esplênicas dos animais infectados nos 7º e 8º dias de infecção corresponde ao início do aumento das Igs circulantes, tanto IgM quanto IgG, particularmente desta última, e a queda no número de parasitas circulantes, coincidindo, portanto, com o controle do primeiro pico parasitêmico. Figs. 2 e 5.

A pesquisa de Igs na superfície de células blásticas revelou que tanto células Ig+ quanto Ig- estão aumentados e consequentemente a blastogênese se deve tanto a células B quanto células T, com início nestas últimas visto que no 5º dia de infecção foi verificado apenas um aumento dos blastos Ig-.

No entanto, é possível que estes blastos Ig- não sejam na realidade células T, uma vez que George Roelants et al. (comunicação pessoal) no "International Laboratory Research in Animal Diseases" - Nairobi-Kenya, utilizando uma técnica de dupla marcação com fluorescência e rodamina, não verificou nesta infecção aumento no nº das células T, mas somente das células B e, posteriormente, das células classificadas como "Null"; isto é,

células sem Igs e antígeno θ na superfície.

Os mesmos autores verificaram que em camundongos "nu/nu" não ocorreu a diferença no número das células B verificando, no entanto, aumento do número das células "null" e "al guns T".

Embora estes resultados variassem de acordo com a raça dos camundongos utilizados, eles não encontraram aumento no número das células T em nenhuma delas.

Porém, a verificação de que estes blastos Ig- são susceptíveis a ação lítica do soro anti θ - anti Thy - 1-2 (Corsini & Askonas - resultados não publicados) sugere que a blastogênese ocorre tanto nas células B quanto nas células T.

No entanto, Mayor-Withey et al. (1978) demonstraram utilizando técnicas de autoradiografia e dupla marcação com anti-soros específicos anti- θ e anti-Ig de camundongo, que o número de células esplênicas duplicou após 5 dias de infecção e que ocorreu um aumento transitório de 3 x no número das células T, voltando a números normais após 8 dias de infecção e diminuindo após 12 dias.

As células B aumentaram 2,5 vezes e as células "null" 35 vezes após o primeiro pico parasitemico (entre 7-12 dias) havendo uma queda drástica no 14º dia. Esta última queda poderia ser devido a uma maior fragilidade destas últimas células nos processos de manipulação e preparo das lâminas.

Estes dados confirmam pois que ocorre durante a infecção por T. brucei um aumento das células T e B, embora o maior aumento seja das "Null". Estes mesmos autores demonstraram que ao redor do 12º dia de infecção 11% das células em divisão são células B, 12% T e 77% células "Null".

Além do aumento das células B e T no baço dos animais infectados, constatou-se um aumento de 4x do número de MØs, quando determinado pelo método do vermelho neutro.

É possível que este aumento seja na realidade maior que o verificado visto que o manuseio dos baços dos animais infectados para a feitura das suspensões é difícil devido ao tamanho dos mesmos, e portanto muitos MØs poderão permanecer aderidos

dos aos debrís e grumos do tecido esplênico.

Considerando que a natureza destas células "null" é desconhecida, existe a possibilidade de que algumas sejam "pré-B", já que ocasionalmente foram verificadas Igs no citoplasma, e também que possam ser macrófagos já que ocorre uma proliferação do Sistema Mononuclear Fagocitário na vigência da infecção (Murray et al., 1974a; Corsini et al., 1977; Corsini (resultados não publicados); Clayton et al. (em preparação).

Em resumo, os resultados mostraram que nas infecções por T. brucei ocorreram profundas alterações na celularidade do baço dos animais infectados verificando-se um aumento no número de células blásticas, de linfócitos B e T e de MØs. Estas alterações se manifestaram precocemente, já a partir do 5º dia de infecção, ocorrendo inicialmente um aumento dos linfócitos T e MØs, seguindo-se do aumento das células B. A incorporação de ³H-timidina revelou 3 picos blastogênicos no 5º, 12º e 18º dias de infecção.

A produção de Igs "in vitro" pelas células esplênicas medida por ocasião do sacrifício dos animais, em diferentes dias de infecção, apresentou um pico na quantidade secretada no 8º dia da infecção que coincidiu com a queda temporária na incorporação da ³H-timidina e com o controle do primeiro pico parasitêmico pelo animal.

Este aumento na produção de Igs não foi verificado se não a partir do 7º dia de infecção portanto, após o pico na incorporação da ³H-timidina.

Um resultado particularmente interessante é que a maior parte dos Igs secretadas foi do tipo IgG, sendo que nos animais normais e infectados até o dia 5 foi do tipo IgM, ocorrendo portanto uma mudança neste período com relação ao tipo de Ig produzido.

A inespecificidade da maior parte destas Igs com relação ao parasita foi verificada através dos experimentos de absorção com tripansomas obtidos no pico parasitêmico de animais irradiados e separados pelo gradiente de Ficoll - Hipaque.

Portanto, não existe especificidade de anticorpo con

tra T. brucei nestas Igs secretadas "in vitro" pelas células esplênicas dos animais infectados confirmando portanto as previsões de Greenwood (1974) e Hudson et al. (1976).

No entanto, o controle da parasitemia no 7º dia de infecção deve-se à produção de anticorpos contra o parasita (Brown & Williamson, 1962; Cohen, 1974, 1975, 1976; Hudson et al., 1976). Assim sendo, a ativação policlonal do sistema linfóide pelo parasita (Greenwood, 1974; Hudson et al., 1976) embora determine uma maior produção de Igs inespecíficas, o animal ainda consegue controlar a infecção com a produção de anticorpos específicos contra T. brucei.

A quantificação das Igs circulantes pela técnica de Mancini et al. (1965) confirmou o aumento das Igs, tanto IgM quanto IgG, particularmente com um rápido aumento na quantidade desta última a partir do 7º dia de infecção que poderia ter levado, portanto, ao controle do primeiro pico parasitêmico, apesar da inespecificidade da maior parte destas Igs (Cohen, 1976; Hudson et al., 1976; Corsini et al., 1977; Askonas et al., 1978).

Estes resultados mostram, pois, que a infecção por T. brucei tem um efeito profundo sobre os linfócitos B.

Da mesma maneira, alterações nos linfócitos B causadas por esta infecção puderam ser verificadas quando células esplênicas foram cultivadas em baixa densidade na presença de LPS conforme os métodos descritos por Kearney & Lawton (1975) e Askonas & North (1976).

Células esplênicas normais nestas condições não apresentam aumento do número até o 3º dia de cultura quando então apresentam um rápido aumento que atinge o máximo no 6º - 7º dia. Este aumento de 10- 12 vezes deve corresponder aproximadamente a 6 - 8 ciclos de divisão visto que menos da metade do número de células respondem a LPS (Janossy & Greaves, 1975).

Em contraste com estes resultados, células esplênicas provenientes de animais com 5 e 12 dias de infecção apresentaram uma blastogênese imediata, atingindo 8 x mais o número de células após 24 horas em cultura. Estes resultados implicam num ciclo reprodutivo extremamente rápido destas células, da ordem de

8 - 10 horas, independentemente da presença de LPS na cultura.

Esta blastogênese não foi verificada nas culturas de células esplênicas de animais com 8 dias de infecção, o que estaria de acordo com a baixa incorporação de ^3H -timidina por estas células logo após o sacrifício do animal (fig. 2).

Embora o aumento na incorporação de ^3H -timidina tenha sido verificado em todas amostras de células esplênicas provenientes de animais infectados com 5 e 12 dias a infecção, o pico blastogênico do 1º dia de cultura foi detectado em apenas 50% dos experimentos. As razões deste fato não foram elucidadas e tampouco foi verificado se o aumento de número de células era devido a células B - T, ou de ambos os tipos.

Verificou-se também que o número de células no 7º dia de cultura está severamente diminuído nas culturas provenientes de animais com 8, 12 e 18 dias de infecção denotando, portanto, um comprometimento do número de células sensíveis ao estímulo mitogênico do LPS após 5 dias de infecção.

Askonas et North (1976) mostraram que nestas condições de cultura de baixa densidade, ocorre um pico na produção de Igs no 6º - 7º dia de cultura. Nossos resultados mostraram que a infecção por T. brucei compromete severamente esta produção de Igs pelas células esplênicas em cultura, a medida que se prolonga a infecção, sendo praticamente suprimida a partir do 12º dia, embora até o 5º dia de infecção a resposta ao LPS não esteja comprometida. Fig. 6.

A remoção dos linfócitos T pelo tratamento com soro anti θ revelou que nas populações celulares esplênicas de animais com 8 dias de infecção existem linfócitos T de atividade supressora sobre a estimulação das células pelo LPS que não haviam sido detectadas até o 5º dia de infecção. Fig. 7.

Após 12 dias de infecção, a remoção de linfócitos T não interfere no número de células e na produção de Igs denotando portanto sério comprometimento do número de células reativas ao LPS.

Embora a remoção dos MØs pelo tratamento com ferro-carbonil não tenha afetado o número de células e a produção de Igs

nas culturas das células esplênicas dos animais infectados, mesmo no 8º dia de infecção, a atividade supressora exercida por estas células pode ser demonstrada quando MØs da cavidade peritoneal de animais, em diferentes dias de infecção, foram acrescentados à cultura de células esplênicas de animais normais.

Neste caso verificamos que, já a partir do 5º dia de infecção os MØs dos animais infectados exibem atividade supressora visto que no 3º dia de cultura diminuem a incorporação de ³H-timidina e o número de células e a produção de Igs no 6º dia Fig. 9.

Assim sendo, nossos resultados com a demonstração da existência de linfócitos T de atividade supressora nestas populações esplênicas, confirmam os dados de Jayawardena & Waksman (1977) e Eardley & Jayawardena (1977) e acrescentam a existência dos MØs com células de atividade supressora na tripanosomíase africana experimental.

Os MØs da cavidade peritoneal apresentaram uma menor captação da ¹²⁵I - HMS a partir do 6º dia de infecção, quando os animais estão controlando o primeiro pico parasitêmico, que se acentou com o decorrer da mesma. Verificou-se, pois, que existe um paralelismo entre menor atividade de fagocitose e maior atividade supressora. Tais resultados implicariam numa possível saturação do SMF e ativação dos MØs no decorrer da infecção por T. brucei, por restos do parasita ou por complexos Ab-Ag (Humphrey, 1974; Lambert & Houba, 1974; Wilson, 1974; Cohen, 1976; Capron et al., 1977) em virtude da lise dos parasitas no final de cada onda parasitêmica (Cohen, 1975, 1976).

Estes resultados, em conjunto, mostram pois que na infecção por T. brucei a capacidade de resposta das células B ao LPS "in vitro", tanto no que se refere ao número de células quanto a produção de Igs está quase que completamente suprimida após 7 - 8 dias de infecção. Infecções de 5 dias causam pequena ou nenhuma supressão.

Zauderer & Askonas (1976) e Askonas & North (1976) mostraram ser essencial para a maturação das células produtoras e secretoras de IgGs que as mesmas passem por várias fases de pro

liferação. Tais células possuem receptores de Igs na superfície e requerem sinais providos por antígenos e interações celulares ou por substâncias como LPS em cada estágio para o que parece ser um programa de proliferação e maturação.

Nossos resultados suportam a sugestão de Greenwood (1974) e Hudson et al. (1976) que os tripanosomas proveem sinais que desencadeiam e aceleram a proliferação e maturação das células B do camundongo. Aquelas em estado mais avançado são ativadas pelo estímulo blastogênico dos parasitas e dentro de poucos dias aumenta o número basal de C.F.P. do tipo IgM (Longstaffe et al., 1973; Murray et al., 1974b; Hudson et al., 1976). De acordo com nossos resultados, depois de 1 semana de infecção, a produção de IgG e IgM aumenta mais de 50 vezes.

Aparentemente, as células B que estão numa estágio primitivo do programa de desenvolvimento por ocasião da infecção são imediatamente estimuladas a proliferar de maneira que toda a população B é levada pelo estímulo blastogênico dos tripanosomas em direção da exaustão clonal.

Considerando que o potencial proliferativo dos clones das células B é limitado (Williamson & Askonas, 1972), quando os animais são infectados e conseqüentemente o sistema linfóide estimulado por estes potentes estimuladores, as células B tornam-se refratárias aos estímulos antigênicos e eventualmente os animais sucumbem a infecção.

Estes resultados confirmaram aqueles obtidos "in vivo" por Hudson et al. (1976), e sugerem igualmente que altos níveis de produção de IgM e imunossupressão estão correlacionados e que ambos são conseqüência do estímulo blastogênico da infecção.

Embora a resposta das células esplênicas ao LPS esteja comprometida após 1 semana de infecção, os animais são ainda capazes de controlar o primeiro pico parasitêmico visto que ocorre um aumento das Igs circulantes, e permanecem em baixa parasitemia até o 15º dia de infecção após o que o número de parasitas no sangue periférico aumenta progressivamente e os camundongos morrem após 3 semanas de infecção aproximadamente.

Os mesmos fenômenos de blastogênese aumentada e altera

ções na resposta "in vitro" de células esplênicas a mitógenos, também ocorrem em infecção com *P. berghei* que não são letais em ratos, conforme demonstram os trabalhos de Golenser et al. (1975) e Spira et al. (1976).

MØs e células T de atividade supressora presentes nas populações esplênicas dos animais infectados são responsáveis, em parte, pela diminuição da resposta ao LPS em cultura.

A recuperação do número de células e da produção de Igs observados nas culturas de células esplênicas dos animais com 7 e 8 dias de infecção quando da remoção das células T, implicam que estas células T exerceram um efeito supressivo na proliferação e maturação das células B possivelmente por ação direta em determinados estádios de desenvolvimento destas células.

No entanto, conforme dito anteriormente, a remoção destas células após 12 dias de infecção pouco altera esta baixa resposta visto que o potencial de proliferação e maturação das células B em resposta ao LPS está praticamente exaurido.

A presença de células com Igs na superfície ainda presentes nesta fase tardia de infecção, sugere a exaustão do potencial ao invés do desaparecimento destas células B - tabela 1.

Embora tenhamos demonstrado a existência de T supressores nestas populações esplênicas, nos experimentos realizados com mistura de células, diferentemente dos resultados de Jayawardena & Waksman (1977) e Eardley & Jayawardena (1977), não detectamos diminuição da resposta ao LPS no que se refere ao número de células e síntese de Igs. Por outro lado, estes autores não puderam demonstrar a susceptibilidade das células supressoras ao soro anti- θ , atribuindo este fato a uma possível diminuição da concentração do antígeno θ na superfície destas células supressoras.

Nossos resultados negativos com as culturas de mistura de células talvez sejam devidos à morte prematura destas células nas nossas condições de cultura e, conseqüentemente, quando por ocasião da proliferação celular ao redor do 3º dia, as células normais estariam, portanto, livres do efeito depressor das células supressoras.

Outras evidências dos efeitos da infecção sobre as cé

lulas T são dadas pelos experimentos da resposta "in vitro" das células esplênicas a FHA e reações mistas de linfócitos.

A partir do 5º dia de infecção, a resposta das células esplênicas à FHA "in vitro" estava diminuída em 90% e ainda mais comprometida a medida que se prolongou a infecção.

Da mesma maneira, a reação mista de linfócitos demonstrou uma diminuição de 86% após 8 dias de infecção e 94,2% após 16 dias.

Quando foram utilizadas células separadas pela coluna de lã de "nylon", embora tenha havido uma recuperação na resposta, a inibição foi ainda de 62,2% para 8 dias de infecção e 88,2% para 16 dias.

Esta recuperação poderia ser explicada pela remoção parcial de T supressores pela coluna vista que Askonas et al. (1978) sugerem uma maior adesividade dos T supressores à lã de "nylon", embora não tenha sido verificado o efeito do tratamento das células esplênicas pelo soro anti- θ e portanto demonstrado a ação de T supressores nestas reações.

Estes resultados sugerem, portanto, uma ativação inicial das células T mostrada pelo aumento dos blastos Ig - no 5º dia de infecção, seguido de uma refrataridade na resposta à FHA e uma inibição na reação mista de linfócitos.

Pensamos que, da mesma maneira que para as células B as células T apresentam um programa de desenvolvimento com etapas proliferativas e diferenciativas, sensíveis ao estímulo blastogênico dos tripanosomas, cuja resultante será também a estimulação destes clones T em direção a exaustão (Askonas et al. , 1978).

No entanto, a hipersensibilidade retardada ao DNFB, medida pelo método de Vadas et al. (1975) não diminuiu no decorrer da infecção, confirmando os resultados obtidos por Murray et al. (1974-b), apresentando-se, pelo contrário, aumentada nos animais infectados.

Este resultado poderia ser explicado:

a) pela depleção de linfócitos T supressores em determinadas fases de infecção a exemplo do que ocorre com tratamento

pela ciclofosfamida Mitsuoka et al. (1976), permitindo a expressão de reações de hipersensibilidade retardada (R.H.R.); ou

b) pelo aumento da população de linfócitos reativos ao DNFB em consequência do estímulo blastogênico dos parasitas, a exemplo do que ocorre com o aumento do número basal de células formadores de placa na vigência da infecção por T. brucei; como também, ainda,

c) pela existência de subpopulações de T inacessíveis ou insensíveis ao estímulo mitogênico da infecção, localizados em diferentes órgãos, já que a via de imunização foi totalmente diferente daquela utilizada para os outros antígenos testados, culminando assim com a livre expressão da R.H.R. ao DNFB.

Experimentos "in vivo" confirmaram a existência de T. supressores visto que as culturas preparadas com células esplênicas provenientes dos camundongos timectomizados, irradiados e reconstituídos com células fetais - camundongos B infectados - apresentaram uma produção 80% maior de Igs em resposta ao LPS do que os controles. Tab. 5.

Estes experimentos mostraram também que nestes camundongos B e nos camundongos "nu/nu", as populações esplênicas sensíveis ao estímulo blastogênico se esgotam mais rapidamente restando ainda nos outros camundongos populações celulares sensíveis ao estímulo mitogênico do parasita após o primeiro pico parasitêmico.

Curiosamente estes animais B e "nu/nu" apresentam a mesma curva parasitêmica que os controles infectados, com menor número de parasitas detectado no baço por ocasião de sacrifício, não havendo sido detectados parasitas nas suspensões esplênicas dos "nu/nu".

Tal fato estaria de acordo com os resultados de K. N. Hudson (comunicação pessoal) onde embora de difícil mensuração, os camundongos "nu/nu" sobrevivem melhor à infecção por T. brucei ou pelo menos não apresentam um decurso pior quando infectados.

Estes experimentos confirmaram a ativação policlonal das células B na vigência da infecção e apresentaram um resultado curioso visto que nestes camundongos B a produção de Igs pe

las células esplênicas quando "pulsadas" após 5 e 10 dias de infecção logo após o sacrifício do animal, foi 90% menor que nos controles - tab. 5.

Este fato seria explicado pela ausência do controle T nos fenômenos de proliferação e diferenciação das células B que seriam assim levadas a exaustão mais rapidamente pelos estímulos blastogênicos dos parasitas, a exemplo do sugerido por Greenwood & Vick (1975) e Fakunle & Greenwood (1976) na malária.

Estes fatos nos sugere que na infecção por T. brucei haveria portanto um rompimento do equilíbrio dinâmico cooperativo B-T, e, provavelmente, também dos MØs, pelo estímulo blastogênico dos parasitas, que cooperaria para a exaustão dos clones B e T.

Esta exaustão seria mais rápida nos camundongos B exatamente pela ausência de T supressores, que nos animais normais estariam presentes, em determinadas fases da infecção, em maior número que os facilitadores, retardando neste último caso a exaustão do potencial B.

Tais experimentos "in vivo" demonstraram também que mesmo as células esplênicas dos camundongos CBA/N refratárias por restrição genética ao estímulo mitogênico do LPS são sensíveis, no entanto, ao estímulo mitogênico dos parasitas, embora não se possa excluir, obviamente, a existência de subpopulações celulares sensíveis a diferentes mitogênicos.

Os experimentos realizados com o intuito de verificar a capacidade de geração das células de memória pelos animais infectados demonstraram que esta capacidade para as células T está diminuída em 45% e 95% após, respectivamente, 8 e 16 dias de infecção.

Para as células B os resultados na resposta primária indicam uma inibição de 90% já a partir do 8º dia quando verificado pela técnica de Farr (C.L.A.) e de 70% para o número de C.F.P. (tanto IgM quanto IgG); sendo que o número de C.F.P. é praticamente desprezível após 16 dias de infecção.

Estes resultados revelam pois que a capacidade de geração da memória B está mais precocemente comprometida e exaurida que a aquela das células T.

Os resultados destes experimentos mostraram também a atividade supressora dos MØs coletados da cavidade peritoneal dos animais infectados na geração de células de memória T. Esta atividade supressora, da mesma maneira que os resultados obtidos na produção de Igs, aumenta a medida que se prolonga a infecção sendo a supressão de 50% para 8 dias de infecção e 76% para 16 dias.

Estes resultados sugerem, pois, que a geração de células de memória está seriamente comprometida na infecção por T. brucei. O estímulo blastogênico da infecção exaure os clones B e T dirigindo-os a exaustão após 8 dias de infecção, podendo atuar sobre as células, aparentemente, em vários estádios do desenvolvimento.

Um vez que as células de memória não se desenvolvem após 8 dias de infecção, compreende-se que a segunda onda parasitária não encontrará as barreiras defensivas do hospedeiro e portanto a multiplicação do parasita se faz mais livremente e o decurso é fatal.

A demonstração da existência de MØs supressores na geração de células de memória T revela os intrincados eventos de interação celular na resposta imune na vigência de infecção pelo T. brucei.

O estudo do quadro sanguíneo periférico dos animais infectados por T. brucei confirmaram a ocorrência de uma anemia no decurso da infecção cuja causa provavelmente não é devida à imune-hemólise, isto é: a existência de anticorpos anti-hemácias e/ou frações do C nas paredes das hemácias, visto que a pesquisa destas substâncias pela técnica da hemaglutinação utilizando-se os anti-soros específicos foi negativa.

A gênese da anemia na tripanosomiase africana tem interessado vários autores embora os resultados sejam ainda inconclusivos (Jennings et al., 1972; Woo e Kobayaschi, 1975; Chi et al., 1975; Anosa & Isoun, 1976; Ikeđ et al., 1977).

O estudo da celularidade da M.O. dos animais infectados indicou a ocorrência de uma hipocelularidade a medida que se prolongou a infecção até a 3a. semana, quando verificou-se um número normal de elementos figurados na medula. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Mayor - Withey et al. (1978).

Assim sendo, verificamos que ocorreu uma regeneração

da medula óssea no intervalo coincidente com a baixa parasitemia do 9º ao 18º dias de infecção.

Tais resultados são confirmados pelas experiências utilizando-se a técnica a Till & McCulloch (1961) para a verificação do número de Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.), onde o número de U.F.C. está diminuído após a primeira semana de infecção com recuperação após a terceira semana.

Paralelamente à diminuição do número dos nódulos verificou-se que o tamanho dos mesmos também está diminuído denotando, provavelmente, uma menor capacidade de multiplicação das células que os deram origem.

A determinação do número de MØs existentes na M.O. dos animais infectados mostrou que estas células atingem um número máximo no 8º dia após a infecção quando portanto é mínimo o número de U.F.C., e menor o tamanho dos nódulos.

Experimentos preliminares - Corsini (resultados não publicados) - mostraram igualmente um aumento no número de linfócitos T quando determinado pela susceptibilidade das células da M.O. ao soro anti θ .

Portanto, tres mecanismos poderiam explicar a diminuição do número de U.F.C.:

a) uma diminuição do número de células primitivas na M.O. dos animais infectados, em decorrência da infecção, onde um fator tóxico não poderia ser excluído (Chi et al. (1975)) e/ou

b) uma diminuição do número de U.F.C. como consequência da atividade supressora das células do tipo T e/ou MØs a exemplo do que ocorreria em certos casos de hipogamaglobulinemia humana onde foram demonstradas células de atividade supressora do tipo linfócito T (Litwin & Zanjani, 1977) e/ou

c) a estimulação das células primitivas da medula óssea pelos supostos fatores mitogênicos diferenciando precocemente estas células e, ainda mais uma vez, exaurindo o potencial eritro e leucopoiético.

Estes fatos teriam suporte na anemia verificada, na leucopenia detectada após a primeira semana de infecção, e ainda no pequeno tamanho dos nódulos verificados nas experiências utilizando-se a técnica de Till & McCulloch (1961).

Mayor-Whithey et al. (1978) empregando as mesmas técnicas de autoradiografia e imunofluorescência para o estudo da citologia da medula óssea dos animais infectados confirmaram a diminuição do número de células no decorrer da infecção e embora a proporção de células pequenas e médias dos tres tipos isto é: B, T e "Null" não varie significativamente, o número de células blásticas ($> 12 \mu$) aumentou dramaticamente.

Dentro de apenas 3 dias de infecção, grandes células blásticas dos 3 tipos apareceram; após 1 semana de infecção blastos Thy-1.2 não foram mais encontrados, porém 33% das células B e 13% das células "Null" são muito grandes.

Isto significa que também ocorreram na medula óssea profundas alterações da celularidade.

O leucograma dos animais infectados mostrou que neutrófilos, linfócitos pequenos, médios e grandes estão aumentados no 7º dia de infecção e diminuídos no 21º. Este fato poderia ser explicado pela exaustão do número de células primitivas que dão origem a estas células no decorrer da infecção. Esta explicação seria reforçada pelo fato de que os monócitos circulantes permanecem ainda em grande número após a 3ª. semana da mesma maneira que os MØs na M.O. dos animais. Haveria portanto uma estimulação inicial da M.O. dos animais infectados que esgotaria o potencial leucopoiético destes animais com exceção da série monocítica.

Estes resultados mostram pois a universalidade e a profundidade das alterações dos órgãos linfóides tanto primários / quanto secundários quando da infecção pelo T. brucei.

Aparentemente não há um tipo de célula que seja ativa do primeiramente, e seja a causa primária das alterações verificadas segundo a proposição de Eardley & Jayawardena (1977). Apesar de termos verificado um aumento inicial das células T no baço dos animais infectados, dados estes confirmados por Askonas et al. (1978), a transitoriedade deste aumento não nos permite concluir que sejam as células T de atividade supressora assim como os MØs, as responsáveis primárias da imunodepressão subsequente.

Esta hipótese de Eardley & Jayawardena (1977) é ainda

mais insustentável se atentarmos para o fato de que o curso da infecção é o mesmo em camundongos "nu/nu" (Jayawardena & Waksman 1977; Askonas et al., 1978; Clayton & Corsini (não publicados) e a imunossupressão também ocorre em camundongos "nu/nu" e camundongos timectomizados, irradiados e reconstituídos com células fetais do fígado (camundongos B) conforme mostram nossos resultados - tab. 5.

Estas opiniões também são compartilhadas por Askonas et al. (1978) e Mayor Withey et al. (1978).

Concluindo, pensamos que a infecção por T. brucei induz o tecido linfóide a proliferar em resposta a um possível estímulo mitogênico por parte do parasita, de acordo com a hipótese de Fakunle & Greenwood (1976) para a malária, ou de Greenwood (1974), Hudson et al. (1976) para a tripanosomiase africana, e xaurindo desta maneira os clones das células linfóides. Estes efeitos seriam verificados a nível inclusive da M.O. dos animais infectados, comprometendo assim e também a origem destas células nestes órgãos linfóides primários.

Paralelamente haveria a gênese de células linfóides T supressoras, como também a ativação do S.M.F. com a gênese de MØs de atividade supressora.

Experimentos nos quais tentamos demonstrar a mitogenicidade de extratos do parasita "in vitro", preparados segundo Esuruoso (1976) foram negativas. Da mesma maneira, não conseguimos demonstrar atividade mitogênica na fração glicoproteica cedida pelo Dr. Cross, havendo sido utilizado até 100 µg/ml desta proteína em culturas de células esplênicas normais.

A adição de parasitas separados pelos gradientes de Ficoll-Hipaque na cultura, também não resultou em atividade blastogênica. Tentamos, igualmente, a adição de sobrenadantes das culturas de T. brucei preparados segundo Hirumi et al. (1977), sem contudo obtermos resultados positivos convincentes.

Ultimamente - Clayton (comunicação pessoal), refere-se a um aumento no número basal de células formadoras de placa quando camundongos foram inoculados I.P. com extratos preparados por sonificação dos tripanosomas.

Sugerimos, portanto, que na infecção por T. brucei os fenômenos de imunodepressão poderão ser explicados em parte pela exaustão do potencial B e T destes animais e pelo desenvolvimento de células de atividade supressora do tipo T e MØs, visto que a infecção representa um considerável estímulo antigênico para o hospedeiro. Cada onda parasitêmica corresponde ao aparecimento de nova variedade antigênica na superfície do parasita e, conseqüentemente, a liberação de grandes quantidades de antígenos e/ou complexos antígeno - anticorpo na circulação com todos os possíveis efeitos destas substâncias sobre o tecido linfóide (Humphrey, 1974).

Trabalhos futuros poderão elucidar a natureza do estímulo mitogênico e as alterações das relações homeostáticas entre MØs e linfócitos B e T nos animais infectados, assim também como a alteração na arquitetura dos órgãos linfóides e.g. o baço e a medula óssea, que poderão concorrer igualmente para a imunodepressão (Humphrey, 1974).

5 - CONCLUSÕES

- 1 - A infecção por T. brucei em camundongos é fatal e causa profundas alterações no baço dos animais infectados i.e. esplenomegalia com aumento do número de macrófagos e linfócitos B e T.
- 2 - As células esplênicas tornaram-se refratárias ao estímulo mitogênico "in vitro" do LPS e da FHA no decorrer da infecção.
- 3 - As células esplênicas tornaram-se refratárias à produção de Igs "in vitro" quando estimuladas pelo LPS e tampouco respondem à Reação Mista de Linfócitos após 12 dias de infecção.
- 4 - No decorrer da infecção desenvolveram-se células de atividade de supressora caracterizadas como linfócitos T e Macrófagos. Estas células são em parte responsáveis pela refratariedade da resposta ao LPS e da Reação Mista de Linfócitos.
- 5 - A maior parte das Igs secretadas tanto "in vivo" quanto "in vitro" pelas células esplênicas dos animais infectados é do tipo IgG, e a maior parte delas não tem atividade de anticorpo contra o tripanosoma tanto quanto se refere à absorção das Igs secretadas "in vitro" pelas células esplênicas, em diferentes dias de infecção, e logo após o sacrifício do animal.
- 6 - Animais timectomizados e "nu/nu" quando infectados pelo T. brucei, também apresentaram os mesmos fenômenos de exaustão clonal apresentados pelos animais normais, o que sugere ser este o principal mecanismo de imunodepressão verificada nesta parasitose.

- 7 - Não somente células linfóides imaturas são sensíveis ao estímulo mitogênico da infecção mas também células de memória B e T; desta maneira, toda a população linfóide é levada à exaustão clonal, fenômeno este que poderá contribuir para a morte do hospedeiro em virtude da severa imunodepressão desenvolvida.
- 8 - A infecção também determinou alterações na celularidade do sangue periférico, tanto dos glóbulos vermelhos quanto dos glóbulos brancos, correspondendo às mesmas alterações verificadas na Medula Óssea dos animais infectados.
- 9 - Não houve diminuição na reação de Hipersensibilidade Retardada ao DNFB que se apresentou, pelo contrário, aumentada nos animais infectados.
- 10 - Tais fenômenos verificados na infecção do camundongo pelo T. brucei poderão ser todos explicados pela existência de uma substância mitogênica de ativação policlonal produzida pelo parasita.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) - Ackerman, S.B. and Seed, J.R. (1976) Immunodepression during Trypanosoma brucei gambiense infections in the field vole, Microtus montanus. Clin. exp. Immunol. 25: 152.
- 2) - Afchain, D., Le Ray, D., Van Meirvenne, N., Fuit, J. & Capron, A. (1975) - Analyse immunoélectrophoretique comparative des formes de culture et des formes sanguicole de Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense. Caractérisation d'antigènes spécifique de stade et de type antigénique. Ann. Immunol. , (Inst. Pasteur). 125: 45.
- 3) - Allt, G., Evans, E.M.E., Evans, D.H.L. and Targett, G.A.T. (1971) Effect of infection with Trypanosomes on the development of experimental allergic reaction in rabbits. Nature. (Lond) 233: 197.
- 4) - Anosa, V.O. & Isoun, T.T. (1976) Serum proteins, blood and plasma volumes in Trypanosoma vivax infections of sheep and goats. Trop. Anim. Health Prod. , 8 (1):14.
- 5) - Askonas, B.A., Corsini, A.C., Clayton, C.E. and Ogilvie, B.M. (1978) - Functional depletion of T and B memory cells and other lymphoid cell subpopulations during Trypanosomiasis. Immunol. in press.
- 6) - Askonas, B.A. and North, R.J. (1976) The lifestyle of B cell. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biology. 41.

- 7) - Askonas, B.A. and Parkhouse, R.M.E. (1971) Assembly of immunoglobulin M; blocked thiol groups of intracellular 7S subunits. *Biochem. J.*, 123:629.
- 8) - Askonas, B.A. & Williamson, A.R. (1972) Factors affecting the propagation of a B cell clone forming antibody to the 2,4 - dinitrophenyl group. *Eur. J. Immunol.*, 2: 487.
- 9) - Askonas, B.A., Roelants, G.E., Mayor-Withey K.S. and Welstead, J.L. (1976) Dual pathway of B lymphocyte differentiation "in vitro". *Eur. J. Immunol.*, 6: 250.
- 10) - Boyum, A. (1966) Ficoll Hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, p. 77.
- 11) - Brown, K.N. & Williamson, J. (1962) Antigens of Brucei Trypanosomes. *Nature*, 194: 1253.
- 12) - Burnet, F.M. (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust. J. Sci.*, 20: 67.
- 13) - Capron, A., Camus, D., Dessaint, J.P. et Le Boubenec-Fischer, E. (1977) Altération de la réponse immune au cours des infections parasitaires. *Ann. Immunol.*, (Inst. Pasteur) 128-C: 541.
- 14) - Chi, N.H., Webb, L., Lambert, P.H. & Miescher, P.A. (1975) Pathogenesis of the anaemia in african trypanosomiasis: Characterization and purification of a hemolytic factor. *Schweiz. med. Wochschr.*, 105: 1582.

- 15) - Clayton, C.E. (1978) Trypanosoma brucei: Influence of Host Strain and Parasite Antigenic Type on Infections in Mice. *Exp. Parasitol*, 44: 202.
- 16) - Cohen, S. (1974) The immune response to parasites. In: Parasites in the Immunized Host: mechanisms of survival. Ciba Foundation Symposium 25(New Series). Associated Scientific Publishers.
- 17) - Cohen, S. (1975) Immunoprophylaxis of Protozoal Diseases. In: Clinical Aspects of Immunology. Ed., by P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann. Blackwell Scientific Publications.
- 18) - Cohen, S. (1976) Survival of Parasites in the Immunized Host. In: Immunology of Parasite Infections. Ed. by S. Cohen and E. Sadum. Blackwell Scientific Publications.
- 19) - Cohn, Z.A. & Wiener, E. (1963) The particulate hydrolyses of Macrophages. II. Biochemical and morphological response to particulate ingestion. *J. exp. Med.*, 118: 991.
- 20) - Corsini, A.C., Clayton, C.E., Askonas, B.A., Ogilvie, B.M. (1977) Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei. *Clin. exp. Immunol.*, 29: 122.
- 21) - Coutinho, A. & Müller, G. (1975) Thymus-independent B cell induction and paralysis. *Adv. Immunol*, 21: 113.
- 22) - Cox, F.E.G. (1976) Human trypanosomiasis today. *Nature (Lond.)* 262: 646.
- 23) - Cox, F.E.G. (1977) Trypanosome Antigens. *Nature*. 266:20.

- 24) - Cross, G.A.M. (1975) Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitology. 71: 393.
- 25) - Cross, G.A.M. & Johnson, J.G. (1976) Structure and organisation of surface antigens of Trypanosoma brucei. In: "Second International Symposium on the Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships" Ed., by H. Van den Bossche. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 26) - Dacie, J.V., Lewis, S.M., Catovsky, D. (1975) Blood cell cytochemistry and supplementary techniques. In: Practical Haematology. Ed. by J. V. Dacie & S. M. Lewis. Churchill Livingstone.
- 27) - Dacie, J.V. & Worlledge, S. (1975) Auto-Allergic Blood Diseases. In: Clinical Aspects of Immunology. Ed., by P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann. Blackwell Scientific Publications.
- 28) - de Raadt, P.M. (1974) Immunity and antigenic variation: clinical observations suggestive of immune phenomena in African Trypanosomiasis. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas'disease. Ciba Foundation Symposium 20 (New Series). Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
- 29) - de Raadt, P.M. (1976) African sleeping sickness today. Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg., 70: 114.
- 30) - Desowitz, R.S. (1970) Immunity in Mammalian Hosts - African Trypanosomes. In: Immunity to Parasitic Animals. Vol. 2. Ed. by G.J. Jackson, R. Herman and I. Singer. Appleton-Century-Crofts, New York.

- 31) - Dorozynski, A. (1976) The attack on Tropical Diseases. Nature, 262: 85.
- 32) - Doyle, J.J. (1976) Antigenic variation in the haemo protozoa (with special reference to salivarian trypanosomes). Rockefeller Monography.
- 33) - Dresser, D.W. (1978) - Assays for immunoglobulin secreting cells, In: Handbook of Experimental Immunology. Ed. by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications.
- 34) - Eardley, D.D. & Jayawardena, A.N. (1977) Suppressor cells in mice infected with Trypanosoma brucei . J. Immunol., 119: 1029.
- 35) - Esuruoso, G.O. (1976) The demonstration "in vitro" of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic and cyclophosphamide treated mice. Clin. exp. Immunol., 23:314.
- 36) - Fakunle, Y.M. & Greenwood, B.M. (1976) A suppressor T cell defect in Tropical Splenomegaly Syndrome. The Lancet. II (7986): 608.
- 37) - Farr, R.S. (1958) A quantitative immunochemical measure of primary interaction between I-BSA and antibody. J. Infect. Dis., 103: 239.
- 38) - Freeman, J., Hudson, K.M., Longstaffe, J.A. and Terry, R.J. (1973) Immunodepression in trypanosome infections. Parasitology, 67: 23.
- 39) - Gell, P.G.H. & Benacerraf, B. (1961) Studies on hypersensitivity. IV-The relationship between contact and delayed sensitivity: A study on the

- specificity of cellular immune reactions. *J. exp. Med.*, 113: 571.
- 40) - Golenser, J., Spira, D.J. and Zuckerman, A. (1975)
Dynamics of thymidine incorporation by spleen
cells from rats infected with Plasmodium berghei.
Clin. exp. - Immunol., 22: 364.
- 41) - Goodwin, L.G. (1970) The Pathology of African Trypano-
somiasis. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, 64:
797.
- 42) - Goodwin, L.G. (1974) The African Scene: Mechanisms of
pathogenesis in trypanosomiasis. In: Trypanosomia-
sis and Leishmaniasis with special reference to
Chagas' Disease. Ciba Foundation Symposium. 20
(New Series) Associated Scientific Publishers.
- 43) - Goodwin, L. G., Green, D. G., Guy, M. W. and Voller,
A. (1972) Immunosuppression during trupanosomia-
sis. *Brit. J. exp. Path.*, 53: 40.
- 44) - Gray, A. R. (1965a) Antigenic variation in a strain
of Trypanosoma brucei transmitted by Glossina
morsitans and Glossina palpalis. *J. gen. Micro*
biol., 41: 195.
- 45) - Gray, A. R. (1965b) Antigenic variation in clones of
Trypanosoma brucei. I-Immunological relation-
ships of the clones. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*,
59: 27.
- 46) - Gray, A.R. (1975) A Pattern in the Development of
Agglutinogenic Antigens of cyclically transmitted
isolates of Trypanosoma gambiense. *Trans. Roy Soc.*
Trop. Med. Hyg., 69: 131.

- 47) - Gray, A.R. & Luckins, A. G. (1976) Antigenic variation in salivarian trypanosomes. In: Biology of the Kinetoplastida. Ed. by W.H.R. Lumsden & D. A. Evans. Academic Press, London.
- 48) - Greenwood, B. N. (1974) Immunosuppression in malaria and trypanosomiasis. In: Parasites in the Immunized Host : mechanisms of survival. Ed. by R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers.
- 49) - Greenwood, B. N., Playfair, J. H. L. and Torrigiani, G. (1971a) Immunosuppression in murine malaria . I-General characteristics. Clin. exp. Immunol., 8: 467.
- 50) - Greenwood, B. N., Brown, J.C., de Jesus, D. G., Holborow, E. J. (1971b) Immunosuppression in murine malaria. II-Effect on reticulo-endothelial and germinal centre function. Clin. exp. Immunol., 9: 345.
- 51) - Greenwood, B. N., & Vick, R. N. (1975) Evidence for a malaria mitogen in human malaria. Nature. 257:592.
- 52) - Hirumi, H., Doyle, J.J. and Hirumi, K., (1977) African trypanosomes: Cultivation of animal-infective Trypanosoma brucei "in vitro". Science. 196: 992.
- 53) - Hoare, C. A. (1972) The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph Blackwell Scientific Publications.
- 54) - Houba, V., Brown, K.V. and Allison, A. C. (1969) Heterophile antibodies, M-antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. Clin. exp. Immunol., 4: 113.

- 55) - Hudson, K. M., Kyner, C., Freeman, J. and Terry, R. J. (1976) Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature (Lond)* 264: 256.
- 56) - Humphrey, J. H. (1974) Conclusion of Symposium. In: *Parasites in the Immunized host: mechanisms of survival*. Ed. by R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers.
- 57) - Hunter, W. M. & Greenwood, F. C. (1962) Preparation of Iodine - 131 labelled human growth hormone of specific activity. *Nature*, 194: 495.
- 58) - Iked, B. O., Lule, M. and Terry, R. J. (1977) Anaemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with Trypanosoma congolense or T. brucei. *Acta Trop.*, 34: 63.
- 59) - Janossy, G. & Greaves, M. (1975) Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets. *Trans plant. Rev.*, 24: 177.
- 60) - Jayawardena, A.N. and Waksman, B. H. (1977) Suppressor cells in Experimental Trypanosomiasis. *Nature*. 265: 539.
- 61) - Jennings, F. W., Murray, P. K., Murray, M. and Urquhart, G. M. (1974) Immunodepression in trypanosomiasis: the incorporation of iododeoxyuridine into the lymph nodes of trypanosome infected mice. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68: 151.
- 62) - Jennings, F. W., Urquhart, G. M. and Murray, M. (1972) Trypanosoma brucei infection in mice: studies on the anaemia, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66: 342.

- 63) - Jerne, N. K., Henry, C., Nordin, A.A., Fuji, H., Koros, A. M. C. and Lefkovits, I. (1974) Plaque forming cells: Methodology and Theory. *Transp. Rev.* 18: 130.
- 64) - Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A. (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 3: 645.
- 65) - Kearney, J. F. and Lawton, A.R. (1975) B lymphocyte differentiation induced by tyopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major Ig classes. *J. Immunol.*, 115: 671.
- 66) - Lachmann, P. J. (1975) Complement. *In: Clinical Aspects of Immunology.* Ed. by P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann. Blackwell Scientific Publications.
- 67) - Lagrange, P.H., Mackaness, G. B. and Miller, T. E. (1974) Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. *J. exp. Med.*, 139: 528.
- 68) - Lambert, P. H. & Houba, V. (1974) Immune complexes in Parasitic Diseases. *In: Progress in Immunology II, Vol. 5:* Ed. by L. Brent & J. Holborow. North-Holland Publishing Company.
- 69) - Le Ray, D., Barry, J. D., Vickerman, K. (1978) Antigenic Heterogeneity of Metacyclic forms of Trypanosoma brucei. *Nature.* 273: 300.
- 70) - Litwin, S. D. and Zanjani, E.D. (1977) Lymphocyte suppressing both Ig production and erythroid differentiation in hypogammaglobulinaemia. *Nature.* 266: 57.

- 71) - Longstaffe, J. A., Freeman, J. and Hudson, K. M. (1973) Immunodepression in Trypanosomiasis: some thymus dependent and thymus independent responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67: 264.
- 72) - Loose, L. D., Cook, J. A. and Di Luzio, N. R. (1972) Malaria Immunosuppression-a Macrophage mediated defect. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 39 (Special issue: Basic Research in Malaria) 484.
- 73) - Lourie, E. M. & O'Connor, R. J. (1937) a study of Trypanosoma rhodesiense relapse strains "in vitro". *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 31: 319.
- 74) - Luckins, A. J. (1976) The immune response of cattle to infection with Trypanosoma congolense and T. vivax. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 70: 133.
- 75) - Mackaness, G. B., Lagrange, P. H., Miller, T. E. and Ishibashi, T. (1974) Feedback inhibition of specifically sensitized lymphocytes. *J. exp. Med.* 139: 543.
- 76) - Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 2: 235.
- 77) - Mattern, P., Masseyeff, R., Michel, R. and Pretti, P. (1961) Étude immunochimique de B2 macroglobuline des serums de malades atteints de trypanosomiase Africaine a T. gambiense. *Ann. Inst. Pasteur.*, 101: 382.
- 78) - Mayor-Withey, K. S., Clayton, C. E., Roelants, G. E. and Askonas, B. A. (1978) -

Trypanosomiasis leads to extensive proliferation of B, T. and "Null" cells in spleen and bone marrow. Clin. exp. Immunol., in press.

- 79) - Mishell, R. I. and Dutton, R. W. (1967) Immunization of dissociated spleen cells. Culture from normal mice. J. exp. Med., 126: 423.
- 80) - Mollison, P. L. (1975) Haemolytic Syndromes due to Antibodies. In: Clinical Aspects of Immunology. Ed. by P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann. Blackwell Scientific Publications.
- 81) - Mitchson, N. A. (1971) The carrier affect in the secondary immune response to hapten-protein conjugates. I-Measurement of the effect with transferred cells and objection to the local enviroment hypothesis. Eur. J. Immunol., 1: 10.
- 82) - Mitsuoka, A., Baba, M., Monkawa, S. (1976) Enhancement of delayed hypersensitivity by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice. Nature. 262: 77.
- 83) - Mosier, D. E., Johnson, B. M., Paul, W. E. and MacMaster P. R. B. (1974) Cellular requiriments for the primary in vitro antibody response to DNP - Ficoll. J. exp. Med. 139: 1354.
- 84) - Murray, M. (1974) The Pathology of African Trypanosomiasis. In: Progress in Immunology II-Vol. 4, Edited by L. Brent and J. Holborow. North-Holland Publishing Company.
- 85) - Murray, P. K., Jennings, F. W., Murray, M. and Urquhart, G. M. (1974 a) The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections. I-The role of macrophage. Immunology. 27: 815.

- 86) - Murray, P. K., Jennings, F. W. Murray, M. and Urquhart, G. M. (1974b) The nature of immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in mice. II. The role of T and B lymphocytes. Immunology. 27: 825.
- 87) - North, J. R. and Askonas, B. A. (1976) Ig response "in vitro". I. The requirement for an intermediate responsive cell type. Eur. J. Immunol., 6: 8.
- 88) - Ormerod, W. E. (1976) Ecological effect of Control of African Trypanosomiasis. Science, 191: 815.
- 89) - Parish, C. R., Kirov, S. M., Bower, N. and Blanden, R. V. (1974) A one-step procedure for separating mouse T and B lymphocytes. Eur. J. Immunol., 4: 808.
- 90) - Paul, W. E. & Benacerraf, B. (1977) Functional specificity of thymus-dependent lymphocytes. Science, 195: 1293.
- 91) - Phahuphak, P., Moorhead, J. W. and Claman, H. N. (1974) Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. J. Immunol., 112: 115.
- 92) - Schendel, D. J. and Bach, F. H. (1974) Genetic Control of cell mediated lympholysis in mouse. J. exp. Med., 140: 1534.
- 93) - Slijivic, V. S. and Watson, S. R. (1977) The adjuvant effect of C. parvum. T cell dependence of macrophage activation. J. exp. Med., 145: 45.
- 94) - Soughate, V. R. (1976) Parasite invasion. Nature, 264: 704.

- 95) - Spira, D. T., Golenser, J. and Gery, I. (1976) The reactivity of spleen cells from malarious rats to non-specific mitogens. Clin. exp. Immunol., 24: 139.
- 96) - Taylor, D. W. and Cross, G. A. M. (1977) The synthesis of a variant specific antigen by Trypanosoma brucei "in vitro". Parasitol., 74: 47.
- 97) - Terry, R. J. (1974) Immunity in Malaria and Trypanosomiasis. In: Progress in Immunology. Vol. 4. Ed. by L. Brent and J. Holborow. North Holland Publishing Company.
- 98) - Till, J. E. and McCulloch, E. A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. Research. 14: 213.
- 99) - Turk, J. L. & Belehu, A. (1974) Immunological spectra in infectious diseases. In: Parasites in the Immunized Host: mechanism of survival. Ed. by R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers.
- 100) - Urquhart, G. M., Murray, M., Murray, P. K., Jennings, F. W. and Bate, E. (1973) Immunosuppression in Trypanosoma brucei infections in rats and mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67: 528.
- 101) - Vadas, M. A., Miller, J. F. A. P., Gamble, J. and Whitelaw, A. (1975) A radioisotopic method to measure delayed type hypersensitivity in the mouse. I-Studies in sensitized and normal mice. Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol., 49: 670.
- 102) - Van Meirvenne, N., Janssens, P.G. & Magnus, E. (1976) Antigenic Variation in Syringe-passage Popula

- tion of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I. Rationalization of the Experimental Approach. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 55: 1.
- 103) - Vickerman, K. (1969) On the surface coat and flagellar adhesions in trypanosomes. J. Cell. Sci., 5: 163.
- 104) - Vickerman, K. (1974) Antigenic variation in African trypanosomes. In: Parasites in the Immunized host: mechanisms of survival. Ed. by R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers.
- 105) - Vickerman, K. & Luckins, A. G. (1969) Localization of variable antigens in the surface coat on Trypanosoma brucei using ferritin conjugated antibody. Nature. (Lond) 224: 1125.
- 106) - Walker, P. J. (1970) Techniques for the manipulation and maintenance of trypanosome strains in the laboratory. In: The African Trypanosomiasis. Ed. by H. W. Milligan George Allen and Unwin, London.
- 107) - Warren, H. S. & Weidanz, W. P. (1976) Malarial immunodepression "in vitro": adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. Eur. J. Immunol., 6: 816.
- 108) - Williamson, A. R. and Askonas, B. A. (1972) Senescence of an antibody-forming cell clone. Nature. (Lond.) 238: 337.
- 109) - Williamson, A. R. and Brown, K. N. (1974) The chemical composition of trypanosomes. III- Antigenic constituents of brucei trypanosomes. Exp. Parasit., 15: 44.

- 110) - Wilson, R. J. M. (1974) Soluble antigens as blocking antigens. In: Parasites in the Immunized Host: mechanism of survival. Ed. by R. Porter and J. Knight. Ciba Foundation Symposium 25 (New Series). Associated Scientific Publishers.
- 111) - Woo, P. T. K. and Kobayashi, A. (1975) Studies on the anaemia in Experimental African Trypanosomiasis. I. -A preliminary communication on the mechanism of anaemia. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 55: 37.
- 112) - Zauderer, M. and Askonas, B. A. (1976) Several proliferative phases precede maturation of IgG-secreting cells in mitogen stimulated cultures. Nature (Lond.) 260: 611.