

MARIA RITA LABEGALINI ZUCATO

“EFEITO DA ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL (ST<sub>a</sub>),  
SEMIPURIFICADA, DE *Escherichia coli*, NA RESPOSTA  
IMUNE DE CAMUNDONGOS (CBA<sub>x</sub>C<sub>57</sub>BI/10) F<sub>1</sub> :  
HIPÓTESES PARA EXPLICAR O MECANISMO DE AÇÃO”

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para a  
obtenção do grau de mestre


CAMPINAS - SP  
1985

Z82e

6544/BC

MARIA RITA LABEGALINI ZUCATO

"Efeito da enterotoxina termo-estável (STa), semipurificada,  
de Escherichia coli, na resposta imune de camundongos  
(CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>: hipóteses para explicar o mecanismo de  
ação."

974 exemplar corresponde a edição final da  
tese defendida pela Sra. Maria Rita Labegalini  
Zucato e aprovada pela comissão julgadora  
 10/09/85

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para a  
obtenção do grau de Mestre.

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Universidade Estadual de Campinas

São Paulo - Brasil

- 1985 -

Ao querido amigo e orientador,  
Dr. Antonio Carlos Corsini,  
hoje ausente, pelo carinho,  
dedicação e sabedoria que  
sempre demonstrou.

Aos meus pais e irmãos,  
a meu esposo, Beto  
e a meu filho, Fábio.

PROF. DR. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO

PROF. DR. ANTONIO CARLOS CORSINI

ORIENTADORES

## AGRADECIMENTOS

A DEUS

Pela presença constante em toda a minha vida.

Ao Dr. Antonio Carlos Corsini

Pelos ensinamentos transmitidos durante a nossa  
convivência.

Ao Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Pela dedicação e conhecimentos científicos que me  
ofereceu, possibilitando a continuidade na execução  
da presente tese.

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Lucila Costallat Ricci, pela orientação durante a etapa de semipurificação da enterotoxina STa.
  
- Aos Profs. Dr. Fawzi Dawood  
Dr. Luís Candido de Souza Dias  
Dr. Marcos Garcia Costa  
Dr. Tomomasa Yano  
pelas valiosas críticas e sugestões na análise prévia deste trabalho.
  
- Às colegas Aparecida Celli P. de Almeida  
Denise Balduino Ciampi  
Doralice S. L. Balan  
pela amizade e solidariedade.
  
- Aos funcionários Dirce Lima Gabriel  
Ismália M. Doné  
João Garcia de Andrade  
Manoel Bernardo da Silva  
José Airton Honorato  
pela amizade e auxílios prestados.
  
- Demais colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

- CAPES, da qual, a autora, durante o desenvolvimento deste trabalho, foi bolsista.
  
- CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -  
Programa Nacional de Saúde Animal.
  
- FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos.
  
- UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.



## ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - MATERIAL E MÉTODOS	06
I - Animais	06
II - Preparo e semipurificação da enterotoxina STa bruta	06
II - 1. Preparo da toxina bruta	06
II - 2. Ensaio da enterotoxina STa	07
II - 3. Semipurificação da enterotoxina STa	07
II-3-1. Cromatografia de troca iônica em Amberlite	07
II-3-2. Concentração	08
II-3-3. Diálise	08
II-3-4. Cromatografia em gel de Sephadex G15	08
III - Inoculação de camundongos (CBA x C <sub>57</sub> B1/10)F <sub>1</sub> com a enterotoxina STa semipurificada	09
IV - Preparo das hemácias de carneiro (HC)	09
V - Imunização com hemácias de carneiro	10
VI - Preparo da suspensão de células esplênicas	10
VII - Determinação do número de células formadoras de placas (PFC)	10
VIII- Determinação da viabilidade celular	11
IX - Hipersensibilidade tardia (DTH) ao dinitrofluorbenzeno (DNFB)	11
X - Depuração do carbono coloidal	12
3 - RESULTADOS	14
I - Resposta imune humoral em camundongos imunizados com HC	14
I - 1. Variação da dose e tempo de administração da toxina STa semipurificada	14
I - 2. Ação do meio de CAYE na resposta imune humoral a HC	17
I - 3. Número de células e viabilidade celular	17
I - 4. Análise da cinética da resposta imune e competição antigênica	17
I - 5. Efeito da enterotoxina STa semipurificada na resposta imune primária a HC	20

	Página
I - 6. Efeito da enterotoxina STa semipurificada autoclavada na resposta imune primária	25
I - 7. Efeito da enterotoxina STa semipurificada na resposta imune secundária a HC	25
I - 8. Efeito da enterotoxina STa semipurificada autoclavada na resposta imune secundária	28
II - Efeito da enterotoxina STa na resposta imune mediada por células	28
II - 1. Avaliação da hipersensibilidade tardia (DTH) ao dinitrofluorbenzeno (DNFB)	28
III - Efeito da enterotoxina STa semipurificada na depuração do carbono coloidal	30
IV - Efeito da enterotoxina STa semipurificada autoclavada e aquecida na depuração do carbono coloidal	34
4 - DISCUSSÃO	36
5 - RESUMO E CONCLUSÕES	54
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

## ABREVIACOES

- Ac : Anticorpo
- Ag : Antígeno
- CAYE : Casamino acids-yeast extract
- CRN : Camundongo recém-nascido
- DNFB : Dinitrofluorbenzeno
- DTH : Hipersensibilidade tardia (Delayed Type Hipersensitivity)
- HC : Hemácias de carneiro
- LT : Enterotoxina termolábil
- MME : Meio mínimo essencial de Eagle
- PFC : Células formadoras de placas (Plaque Forming Cells)
- PBS : Tampão de salina fosfatada
- RI : Resposta imune
- RIC : Resposta imune mediada por células
- RIH : Resposta imune humoral
- RIHS : Resposta imune humoral secundária
- rpm : Rotações por minuto
- SFV : Soro fetal bovino
- ST : Enterotoxina termoestável
- STa : Enterotoxina termoestável, solúvel em metanol, detectável pelo teste do CRN
- STb : Enterotoxina termoestável, insolúvel em metanol, detectável biologicamente apenas pelo teste de alça ligada de intestino de porco de 5-7 semanas.
- UT : Unidades tóxicas

"It is better to ask some of the questions than to know all of the answers"

James Thurber, "The scotty who know too much"

In: "Fables for our time" (Harper & Row, N.Y., 1940)

## INTRODUÇÃO

Vibrio cholerae e amostras enterotoxigênicas de Escherichia coli causam doenças diarréicas no homem e diversas espécies de animais (Craig, 1965; Gyles et al, 1967; Smith et al, 1971; Field, 1971; Gyles, 1971; Evans et al, 1973; Evans et al, 1973; Myers et al, 1976; Moon et al, 1976; Smith, 1976; Guinee et al, 1977; Simões et al, 1982).

As amostras de E. coli podem produzir pelo menos 2 tipos de enterotoxinas; uma de baixo peso molecular, dialisável e termo-estável denominada ST (stable-toxin) (Dean et al, 1973; Franceschi et al, 1977; Gyles, 1979), e outra de alto peso molecular, não dialisável e termo-lábil conhecida como LT (labile-toxin).

A enterotoxina LT se acha atualmente muito bem estudada quanto a sua natureza química, características antigênicas e efeitos biológicos. É bastante semelhante ao "choleragen" ou enterotoxina colérica do Vibrio cholerae, em outras palavras, ambas as toxinas, quando inoculadas em coelhos, por via intradérmica, ocasionam no local de inoculação, uma reação inflamatória de natureza edematosa a qual se convencionou chamar de fator de permeabilidade (PF) (Craig, 1965; Dorner et al, 1976; Evans et al, 1976; Gill et al, 1976; Richards et al, 1978). Igualmente, estas duas enterotoxinas são capazes de dilatar, através do acúmulo de líquido, a alça ligada do intestino dos animais, tais como, coelhos e porcos, experimentalmente inoculados com as mesmas (Burrows et al, 1966; Gyles et al, 1967; Smith et al, 1967; Smith, 1976). Ainda sob o ponto de vista de suas atividades biológicas as enterotoxinas LT e a colérica, são capazes de provocar alterações morfológicas em algumas linhagens celulares, por exemplo, células Y-1 (células de tumor de adrenal de camundongos) (Donta et al, 1974), CHO (células de ovário de hamster) (Guerrant et al, 1974) e VERO (células de rim de macaco) (Spiers et al, 1977).

Sob o ponto de vista estrutural, a toxina colérica, do Vibrio cholerae, é composta de duas subunidades denominadas respectivamente de A e B. A subunidade B é constituída de 5 a 6 fragmentos que seriam responsáveis pela fixação da toxina ao gangliosídeo GM<sub>1</sub> das células das vilosidades intestinais. Após esta fixação, através de processos ainda não muito bem esclarecidos dar-se-ia a entrada da subunidade A, que, por sua vez, é composta de 2 fragmentos denominados A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, cabendo ao fragmento A<sub>2</sub> o papel de atuar como um agente carreador do fragmento A<sub>1</sub>, ao qual se atribui

a ativação da enzima adenil-ciclase que ocasiona, conseqüentemente, um aumento do AMP-cíclico intracelular. Esta alteração provoca uma modificação do equilíbrio hidrosalino que acarreta uma perda de água e de eletrólitos que se traduz nos fenômenos diarrêicos observados nos doentes com cólera. Admite-se que para a enterotoxina LT, de Escherichia coli, exista uma estrutura semelhante, se não idêntica, com afinidade também pelo gangliosídeo GM<sub>1</sub> provocando alterações funcionais das células intestinais conseqüentes também a um aumento do AMP-cíclico intracelular (Stephen et al, 1981).

Sob o ponto de vista químico, tanto a enterotoxina colérica quanto a enterotoxina LT são proteínas com peso molecular ao redor de 84.000 daltons. Até recentemente, estas duas toxinas, como que acompanhando as semelhanças já por nós apontadas, eram consideradas como antigenicamente bastante relacionadas (Clements et al, 1980), admitindo-se, por outro lado, não existirem diferenças entre as enterotoxina LT de E. coli, de origem humana ou suína. As primeiras indicações de que pelo menos deveriam existir diferenças entre as enterotoxinas LT, se deveu ao trabalho de Serafim et al (1979) que demonstrou ser o antisoro LT, preparado com amostra de origem humana, praticamente ineficiente na detecção de amostras de E. coli enterotoxigênicas de origem suínas, quando se utilizava para tal, teste de imuno-hemólise passiva (Evans and Evans, 1977).

Recentemente, Honda et al (1981), verificaram que realmente as enterotoxinas LT de origem humana e de origem suína e a enterotoxina colérica apresentavam relações antigênicas, porém existiam também em cada uma delas determinantes antigênicos que eram específicos e capazes de agir apenas com a enterotoxina homóloga. Tais diferenças antigênicas, contudo, não parecem influenciar nos mecanismos básicos de atuação destas toxinas e seus respectivos efeitos biológicos.

Com relação a enterotoxina ST, só recentemente se conseguiu a sua purificação (Alderete et al, 1978; Gianella et al, 1979; Staples et al, 1979; Takeda et al, 1979), bem como se determinou que a sua natureza química era peptídica com cerca de 18 ou 19 resíduos de aminoácidos (Alderete et al, 1978; Takeda et al, 1979), com peso molecular ao redor de 1500 daltons. Estes dados são válidos para a enterotoxina detectável pelo teste do camundongo recém-nascido (CRN) (Dean et al, 1973), a qual se denominou STa, se conhecendo, atualmente, uma outra forma de enterotoxina termo-estável, STb, ativa unicamente em alça ligada de leitões de 5 a 7 semanas (Gyles, 1979; Whipp et al, 1981).

Não se conhece mecanismos pelos quais a enterotoxina STb é capaz de causar diarreia em suínos, porém, a enterotoxina STa, é capaz de ativar a enzima guanil-ciclastase ocasionando um aumento do GMP-cíclico intracelular (Field et al, 1978; Hugles et al, 1978; Gianella et al, 1979; Greenberg et al, 1980; Guerrant et al, 1980).

A enterotoxina STa é também pouco imunogênica, sendo capaz de induzir a formação de anticorpos anti-STa apenas quando inoculada acoplada a um antígeno completo, podendo, portanto, ser considerada como um hapteno (Greenberg et al, 1981). Apesar da reconhecida importância da enterotoxina STa no envolvimento de casos de diarreia no homem e animais, esta característica, isto é, não imunogenicidade, talvez tenha se constituído em um sério obstáculo a um melhor conhecimento das propriedades desta enterotoxina. Aliás, na ocasião em que conduzíamos a parte experimental de nosso trabalho, já existiam citações, algumas controvertidas, sobre a purificação e caracterização físico-química desta enterotoxina (Jacks et al; Klipstein et al, 1976; Field et al, 1978; Mullan et al, 1978).

Trabalhos anteriores haviam demonstrado, com relação a toxina colérica, que esta, tem a capacidade de aumentar (Chisari et al, 1974) ou suprimir (Henney et al, 1973; Lichtenstein et al, 1973) a resposta imune a hemácia de carneiro (HC), dependendo, em parte, da dose e do tempo em que era administrada a enterotoxina. Assim sendo, foi demonstrado, ainda por Chisari et al (1974), que a toxina colérica era um potente adjuvante quando administrada a camundongos por via parenteral juntamente com as HC. Por outro lado, se inoculada 12 horas antes ou após o antígeno, funcionava como imunossupressora. O mecanismo destes efeitos, segundo estes autores, pode ser decorrente de fenômenos tais como, modificações na permeabilidade da membrana, citotoxicidade com liberação de oligodesoxirribonucleotídeos, proliferação aumentada dos tecidos linfóides e também um aumento do AMP-c intracelular devido a estimulação da adenil-ciclastase (Chisari et al, 1974).

Sabe-se que o AMP-c e agentes que elevam o AMP-c intracelular tem interação com uma série de diferentes fenômenos imunológicos, tais como, citólise mediada por linfócitos (Wenchurch et al, 1971; Henney et al, 1972) e liberação de histamina de basófilos mediados por IgE (Lichtenstein et al, 1971; Bourne et al, 1972).

Por outro lado, diferentes populações de células imunocompetentes exibem fenômenos dose-dependentes, por exemplo, células T podem ser estimuladas por baixos níveis de toxina colérica e inibidas por altos níveis desta toxina que por sua vez po-

deriam ser capazes de estimular linfócitos B (Chisari et al, 1974).

É sabido, ainda, que existem interações intrínsecas entre os níveis de AMP-c e GMP-c intracelulares, isto é, um aumento do primeiro, via de regra, ocasiona uma diminuição no segundo, e vice-versa (Goldberg et al, 1973; Goldberg et al, 1974).

Portanto, não seria surpresa encontrarmos alterações nas respostas imune humoral e mediada por células, devidas a enterotoxina STa, quer por uma eventual influência direta de GMP-c intracelular de células imunocompetentes, ou indireta, decorrente da diminuição do AMP-c destas células, resultante da elevação do GMP-c destas mesmas células em contacto com a enterotoxina STa.

Por outro lado, fenômenos de imunossupressão têm sido observados com vários antígenos de natureza biológica, e efeitos adjuvantes têm sido verificados com alguns destes antígenos (fitohemaglutinina, endotoxina, etc) sendo, portanto, concebível admitir-se algum efeito deste tipo em relação a enterotoxina STa (O'Brien et al, 1978).

Foi, porém, a falta de dados sobre outras propriedades biológicas da enterotoxina STa que nos levou a conduzir o presente trabalho, pois apesar dos progressos recentemente alcançados com relação a sua purificação (Alderete et al, 1978) e estrutura química (Alderete et al, 1978; Takeda et al, 1979) e até mesmo dados sobre os genes responsáveis por sua codificação (Moseley et al, 1983), a única atividade biológica que se conhece é a capacidade que tem a enterotoxina STa de causar aumento de líquido na luz intestinal como resultado da ativação da guanil-ciclase, aumento este detectado pelo teste CRN (Dean et al, 1973). Nesta investigação sobre novas atividades biológicas da enterotoxina STa procuramos nos orientar para uma área ainda não estudada com relação a esta enterotoxina, mas que apresentou uma série de dados interessantes, a semelhança do que foi realizado com a enterotoxina colérica. Mais especificamente, Chisari e Northrup (1974) verificaram que a toxina colérica, pode matar camundongos, produzir severa atrofia cortical do timo e diminuição das células linfóides da polpa vermelha do baço; verificaram ainda que doses letais da toxina podiam diminuir a viabilidade das células esplênicas e dos timócitos, "in vitro".

Diante do exposto, utilizando preparados semipurificados (Ricci et al, 1982) da enterotoxina STa procuramos, através da técnica de Células Formadoras de Placas (PFC) contra HC e da técnica de Hipersensibilidade Tardia (DTH) ao Dinitrofluorbenzeno (DNFB), verificar qual a atividade da enterotoxina STa na resposta humoral e mediada por células, respectivamente. Paralelamente, a fim de verificar a influência da



enterotoxina STa na fagocitose, utilizou-se a técnica de Depuração do Carbono Coloidal.

A par da possível obtenção de novas informações sobre a atividade biológica da enterotoxina STa a nível de células imunocompetentes, o nosso trabalho também justifica-se em virtude de se ter informações que diarreia no homem, produzidas por V. cholerae e E. coli ocasionam na fase de convalescença, fenômenos de imunossupressão (Palmer et al, 1979) o que eventualmente poderia tornar o indivíduo sensível a infecções intercorrentes, o que normalmente, na prática, às vezes, é observado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### I - Animais

Camundongos (CBA x C<sub>57</sub>Bl/10)F<sub>1</sub> com 2 meses de idade, de ambos os sexos, foram utilizados para se estudar a ação da enterotoxina STa semipurificada, na resposta imune humoral, na resposta imune mediada por células e no teste de depuração do carbono coloidal.

Camundongos Swiss-55, recém-nascidos, de 2 a 4 dias de idade, foram usados na detecção da enterotoxina STa através do teste do camundongo recém-nascido (CRN) (Dean et al, 1973).

### II - Preparo e Semipurificação da Enterotoxina STa Bruta

Para o preparo e semipurificação da enterotoxina STa foram usados os procedimentos descritos por Ricci et al (1982), com ligeiras modificações.

#### 1. Preparo da Toxina Bruta.

Para o preparo da enterotoxina bruta, a amostra de E. coli H<sub>3</sub> (sorogrupo O<sub>128</sub>), produtora única e exclusivamente da enterotoxina STa, foi semeada em tubos contendo 2 ml de caldo simples, e incubada a 37°C por 10 horas. A partir destes cultivos tomou-se 0,5 ml que foi utilizado como inóculo para o preparo da enterotoxina em meio de Casamino Acid-Yeast Extract (CAYE) (Evans et al, 1973) distribuídos em Erlenmeyers de 125 ml, na quantidade de 15 ml de meio por frasco. Estes, após semeados, foram colocados em estufa a 37°C, por 18 horas, sob agitação constante (200 rpm). Foi preparado um total de 4 litros de cultura, que foi em seguida centrifugada a 3,079 g, durante 40 minutos. Após a centrifugação separou-se o sobrenadante, ao qual foi adicionado como preservativo, solução de mertiolato na concentração de 1/10.000. Em testes preliminares (dados não publicados) foi verificado que a adição deste conservador não ocasionava qualquer alteração na atividade biológica da enterotoxina STa ensaiada pelo teste do CRN.

## 2. Ensaio da Enterotoxina STa.

Tanto os preparados brutos de enterotoxina STa bem como a enterotoxina semi-purificada, nas diferentes etapas do seu processo de purificação, foram estudados pelo teste do CRN (Dean et al, 1973). Este teste avalia a atividade da enterotoxina STa, a nível intestinal, pelo acúmulo de líquido encontrado dentro das alças, dos camundongos inoculados por via intra-gástrica. Quando este aumento de líquido fornece relação peso do intestino/peso da carcaça igual ou maior que 0,0085 os resultados são considerados positivos. Para a realização do teste do CRN, foram utilizados para cada material examinado, lotes de 4 camundongos Swiss-55 com 2 a 4 dias de idade. Em cada animal foi injetado no estômago, por via percutânea 0,1 ml do preparado a ser ensaiado ao qual havia se adicionado previamente uma gota de azul de Evans (2%) por ml de sobrenadante de cultura. Três a quatro horas após a inoculação, os animais foram sacrificados com éter sulfúrico, necropsiados e os intestinos separados das carcaças, determinando-se em seguida, a relação peso do intestino/peso da carcaça.

O número de unidades tóxicas (UT), presentes numa determinada preparação de enterotoxina STa foi definido como sendo o inverso da maior diluição desta preparação, que ensaiada pelo teste do CRN, fornecia relações peso do intestino/peso da carcaça, iguais ou superiores a 0,0085.

## 3. Semipurificação da Enterotoxina STa.

### A - Cromatografia de troca iônica em Amberlite

Aliquotas de 140 ml de enterotoxina STa bruta, com pH acertado para 9,0 com NaOH 0,1 M, foram aplicadas em uma coluna (2,2 por 43 cm) de resina Amberlite (Merck), usando-se como tampão para equilibrá-la e eluir a amostra, o tampão acetato de amônia 0,01 M, pH 9,0 sob um fluxo de 15 ml/minuto.

Da cromatografia de cada alíquota de 140 ml de toxina bruta foi colhido um total de 13 frações com 20 ml cada uma. A D.O dessas frações foi determinada a 280 nm, em espectrofotômetro Zeiss, selecionando-se as cinco que apresentassem maior absorbância neste comprimento de onda e maior atividade enterotóxica detectada através do teste do CRN.

Este material foi guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua concentração.

## B - Concentração

Os materiais cromatografados, que estavam estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , após descongelamento a temperatura ambiente, foram misturados, resultando uma preparação com volume final de 2900 ml.

Esta foi concentrada em um evaporador rotatório, sendo posteriormente reconstituída com água destilada, a um volume 10 vezes menor que o inicial.

O material assim concentrado, foi em seguida avaliado quanto a sua atividade enterotóxica pelo teste do CRN.

## C - Diálise

Para tal, foram utilizados sacos de diálise Sigma 250-7U de 21mm de diâmetro por 30 cm de comprimento que foram tratados com solução de anidrido acético e piridina (1:1) de acordo com Craig (1960), a fim de reduzir a porosidade ("cut off") dos mesmos, impedindo que a enterotoxina STa fosse dialisada.

Alíquotas de 20 ml do material concentrado foram então dialisados por 48 horas em câmara fria, sob agitação constante contra um volume de 4 litros de água destilada, correspondente aproximadamente a 20 vezes o volume desta alíquota antes da sua concentração.

A água foi trocada duas vezes ao dia e sua condutividade e absorbância foram verificadas. Idêntico procedimento foi adotado para a amostra ao término da diálise, reavaliando-se a sua atividade enterotóxica pelo teste do CRN.

O material de cada diálise (volume original 20 ml) foi liofilizado e ressuspenso em 2,5 ml de água destilada, procedendo-se em seguida a filtração em gel.

## D - Cromatografia em gel de Sephadex G15

Após estes tratamentos descritos acima, cada volume de 2,5 ml da amostra foi aplicado a uma coluna (0,8 x 92 cm) de Sephadex G15 padronizada por uma solução de azul de dextran 0,25% e NaCl 1,5 M. Para a eluição utilizou-se tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, sendo coletadas frações de aproximadamente 4,0 ml.

As frações assim obtidas foram examinadas a 280 nm, selecionando-se aquelas com maior absorbância que foram em seguida analisadas pelo teste do CRN. Este procedimento foi repetido até que todas as alíquotas de 2,5 ml das amostras concentradas

fossem cromatografadas como descrito acima.

Ao final de todas as cromatografias neste gel, as frações com alta atividade específica e uma purificação de no mínimo vinte vezes superior aquela existente na preparação original, foram reunidas numa única preparação equivalente a um volume final de 160 ml e uma absorbância a 280 nm de 1,15 e 100 UT/0,1 ml.

Esta preparação foi distribuída em alíquotas de 20 ml, equivalentes a 20.000 UT, que foram em seguida liofilizadas.

No momento do uso, cada frasco liofilizado foi ressuspenso em 4 ml de água destilada equivalendo a um total de 500 UT/0,1 ml.

Para o cálculo da atividade específica, foi utilizada a seguinte relação:

$$AE = \frac{\text{número de UT}}{\text{absorbância a 280 nm}}$$

Durante as diferentes fases do processo de purificação, para quantificarmos o número de vezes em que as preparações em estudo foram concentradas em relação a enterotoxina bruta, relacionamos a atividade específica das mesmas em relação a atividade específica do preparado bruto inicial.

$$\text{Ou seja : } \frac{\text{AE da preparação}}{\text{AE do preparado bruto inicial}} = \text{número de vezes em que a amostra foi purificada}$$

### III - Inoculação de Camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> com a Enterotoxina STa semipurificada

Os animais foram inoculados intravenosamente com 0,1 ml de enterotoxina STa semipurificada, inicialmente contendo, 500 UT, 250 UT, 125 UT ou 62,5 UT, antes ou após a HC, a fim de se determinar qual a dose ótima desta enterotoxina que causava alteração na RIH. Nos experimentos posteriores, os camundongos foram inoculados de modo semelhante com 250 UT, conforme resultados dos experimentos mencionados no parágrafo anterior.

### IV - Preparo das Hemácias de Carneiro (HC)

O sangue de carneiro foi coletado em solução de Alsever e conservado em ge-

ladeira por um período máximo de 1 mês.

No momento do uso, o sangue assim coletado foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos, dispensando-se o sobrenadante. A papa de hemácia resultante foi então lavada três vezes em PBS e posteriormente ressuspensa no mesmo tampão de modo a fornecer uma solução de HC a 5%.

#### V - Imunização com Hemácia de Carneiro

Camundongos foram imunizados intravenosamente com 0,2 ml da suspensão de HC 5% em PBS, que corresponde a uma média de  $2 \times 10^8$  células, em diferentes tempos em relação a administração da enterotoxina STa semipurificada.

No estudo da resposta imune secundária, os animais receberam uma dose de reforço de HC, 26 dias após a primeira dose.

#### VI - Preparo da Suspensão de Células Esplênicas

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O baço de cada animal foi retirado e macerado cuidadosa e rapidamente em cerca de 2 ml de Meio Mínimo Essencial (MME) contendo 1% de Soro Fetal Bovino (SFV); para a maceração utilizou-se o macerador de Biozzi.

Imediatamente após a maceração, a suspensão celular foi colocada em banho de gelo, procedendo-se em seguida a centrifugação a 1500 rpm por 8 minutos (Jerne, 1974; Dresser, 1978).

O sobrenadante foi descartado e as células, lavadas duas vezes em MME com 1% de SFV e posteriormente ressuspensas e diluídas no mesmo meio.

#### VII - Determinação do Número de Células Formadoras de Placas

Foi feito o estudo da resposta imune humoral a HC, através da técnica de PFC descrita por Jerne (1974) e modificada por Dresser (1978).

Resumidamente, 100  $\mu$ l da suspensão esplênica, diluídos em MME, 1% SFV, foram misturados com igual volume de HC a 5%, em tubos 30 x 5mm que posteriormente foram transferidos para banho-maria a 45°C onde se acrescentou 200  $\mu$ l de agarose 0,8%.

O volume total foi homogenizado delicadamente e espalhado de modo uniforme em lâminas de microscópio, previamente banhadas em agarose 0,1%, colocadas sobre placas de metal aquecidas a 45°C, alguns minutos, imediatamente antes do uso.

As lâminas foram incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida após o qual uma solução de complemento de coabaia a 10% foi adicionada cobrindo cada lâmina que foram novamente incubadas a 37°C por 1 hora. Após este processo, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído (4% em PBS), durante 20 minutos.

Duplicatas foram feitas de cada diluição da suspensão de células e os resultados foram averiguados.

O número de células formadoras de placas foi contado com auxílio de lupa e o resultado foi dado pelo número de PFC por  $10^6$  células.

Pelo método descrito se obtêm as placas diretas, ou seja, o número de células produtoras de IgM. Para as placas indiretas, ou seja, determinação do número de células produtoras de IgG, foi utilizado soro de coelho anti-gamaglobulina de camundongo, que foi adicionado na quantidade de 10 µl por 100 µl de suspensão celular, no preparo de tubos com a suspensão esplênica.

Para a resposta primária, o número de PFC, para IgM, foi determinado no quarto dia, e para IgG, no sexto dia, após a imunização. Na resposta secundária, o número de PFC (IgM e IgG) foi determinado no sexto dia após a dose de reforço.

#### VIII - Determinação da Viabilidade Celular

O número de células viáveis foi determinado em hemocitômetro de Neubauer, fazendo-se diluições da suspensão celular em ácido acético 1% e em azul tripan (2mg/ml) diluído em cloreto de sódio 0,85%.

#### IX - Hipersensibilidade Tardia (DTH) ao Dinitrofluorbenzeno (DNFB)

Camundongos imunizados com a enterotoxina STa semipurificada e camundongos contrôles foram tricotomizados no abdômem, onde foi aplicada uma dose sensibilizante de 50 µl de DNFB (10 mg/ml) diluído em acetona-óleo de oliva 1:1.

Uma dose desencadeante de 5 µl de DNFB foi aplicada 5 dias após a dose sensibilizante em toda superfície da orelha esquerda (Vadas et al, 1975).

Vinte e quatro horas depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as orelhas, direita e esquerda, foram cortadas.

A reação de hipersensibilidade retardada foi avaliada através da relação peso da orelha esquerda/orelha direita (Corsini et al, 1981).

#### X - Depuração do Carbono Coloidal

A depuração do carbono coloidal foi determinada através da técnica descrita por Biozzi et al (1954).

A preparação utilizada continha 64 mg/ml de carbono coloidal com partículas de 25 Å de tamanho, suspensas em gelatina de peixe 1%.

Os animais, com 20 gramas de peso, controles e os inoculados com a enterotoxina STa semipurificada, foram inoculados intravenosamente com 0,2 ml de carbono coloidal (8 mg/100 g de massa corporal do animal) e efetuou-se a sangria de 0,025 ml, com pipeta calibrada e heparinizada, pelo plexo venoso ocular, nos intervalos de tempo: 2, 5, 10, 15, e 20 minutos após cada inoculação.

Cada amostra retirada foi adicionada, imediatamente em 2,0 ml de água destilada, a fim de provocar lise das hemácias. Posteriormente, determinou-se os valores de absorvância a 560 nm em um espectrofotômetro Coleman Jr.

Após as sangrias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos, fígado e baço, retirados e pesados.

O Índice de fagocitose K, que expressa a velocidade de depuração do carbono coloidal, foi calculado conforme padronizado por Biozzi et al (1954). Deste modo determinou-se o coeficiente angular da reta traçada, sendo que nas abscissas, em escala aritmética, se colocou os intervalos de tempo da sangria, e, nas ordenadas, em escala logarítmica, as absorvâncias obtidas.

A equação estabelecida por Biozzi et al (1954) para este fenômeno é a seguinte:

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{\Delta t}$$



Onde:

- $\log C_1$  : logarítmo decimal da concentração do carbono coloidal no tempo 1.
- $\log C_2$  : logarítmo decimal da concentração do carbono coloidal no tempo 2.
- $\Delta t$  : intervalo de tempo decorrido entre o tempo 1 e o tempo 2.

Para o cálculo de fagocitose corrigido,  $\alpha$ , leva-se em consideração a massa do animal e a somatõria das massas do baço e fígado do mesmo, conforme expresso na equação estabelecida por Biozzi et al (1954):

$$\alpha = M_a / M_o \sqrt[3]{K}$$

Onde:

$M_a$  : massa do animal.

$M_o$  : somatõria das massas do fígado e do baço.

## RESULTADOS

### I - RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM HC

Para o estudo da Resposta Imune Humoral, pela técnica de PFC descrita por Jerne (1974) e modificada por Dresser (1978), foram utilizados camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, inoculados com a enterotoxina STa semipurificada em diferentes intervalos de tempo em relação a HC.

Foram feitos experimentos variando-se a dose e tempo de administração da toxina, analisando-se ainda a ação do meio de CAYE no qual a mesma foi preparada; o número de células esplênicas; viabilidade celular; a cinética de resposta e competição de reconhecimento entre HC e enterotoxina, além dos estudos referentes a resposta imune humoral primária e secundária.

#### 1 - Variação da dose e tempo de administração da enterotoxina STa semipurificada

Com a finalidade de se verificar qual a dose e tempo de administração da enterotoxina que correspondia ao pico de alteração do número de células formadoras de placas contra HC, foram feitos experimentos variando-se estes dois parâmetros.

A enterotoxina foi aplicada intravenosamente nas doses de 500 UT, 250 UT, 125 UT ou 62,5 UT e nos tempos de, 2h, 1h, 30 minutos ou 15 minutos antes ou após HC.

Nos nossos experimentos verificamos que a enterotoxina STa semipurificada nas doses 250 UT e 500 UT deprimem a resposta imune humoral primária a HC em 40% - 50% do nº de PFC em animais inoculados com a toxina 15 minutos antes deste Ag. Não se observou depressão quando a toxina foi inoculada nas doses 125 UT e 62,5 UT (Tabela 1).

Quando se variou o tempo de administração da enterotoxina em relação a HC, verificou-se que 250 UT deprimem o número de PFC somente quando aplicados 15 minutos antes do Ag, não se observando depressão quando a enterotoxina foi aplicada após o mesmo (Tabela 2).

Portanto, após estes resultados, para a realização do presente trabalho,

Tabela 1 - Efeito da variação da dose de enterotoxina termo-estável (Sta)

semipurificada, na resposta imune humoral, em camundongos

(CBA x C<sub>57</sub>Bl/10)F<sub>1</sub> imunizados com hemácias de carneiro.

Grupos de animais	Dose de Sta <sup>(1)</sup> (nº de UT) <sup>(2)</sup>	Dose de HC (/0,2ml)	PFC/10 <sup>6</sup> células esplênicas <sup>(3)</sup>	% de supressão (teste t : valor de p)
(CONTROLE) A	-	2x10 <sup>8</sup> cél.	2730 ± 435 <sup>(5)</sup>	-
B	500	2x10 <sup>8</sup> cél.	1519 ± 180	40 (p < 0,001)
C	250	2x10 <sup>8</sup> cél.	1382 ± 150	50 (p < 0,001)
D	125	2x10 <sup>8</sup> cél.	2378 ± 152	13 (p > 0,05)NS <sup>(4)</sup>
E	62,5	2x10 <sup>8</sup> cél.	2266 ± 317	17 (p > 0,05)NS

(1) - Inoculada 15 minutos antes da hemácia de carneiro.

(2) - UT: número de unidades tóxicas.

(3) - PFC/10<sup>6</sup> células esplênicas: número de células formadoras de placas por 10<sup>6</sup> células esplênicas.

(4) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(5) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

Tabela 2 - Efeito da variação do tempo de administração da enterotoxina termo-estável

(STa) semipurificada, na resposta imune humoral, em camundongos

(CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, imunizados com hemácias de carneiro.

Grupos de animais	Dose de STa (nº de UT) (2)	Tempo de administração da STa (1)	Dose de HC (/0,2ml)	PFC/10 <sup>6</sup> células splênicas (3)	% de supressão teste t : valor de p)
(CONTRÔLE) A	-	-	2x10 <sup>8</sup> cél.	2054 ± 174 (5)	-
B	250 UT	15 min. antes	2x10 <sup>8</sup> cél.	1037 ± 167	50 (p < 0,001)
C	250 UT	1 h. antes	2x10 <sup>8</sup> cél.	1960 ± 180	4,5 (p > 0,05)NS (4)
D	250 UT	2 h. antes	2x10 <sup>8</sup> cél.	1847 ± 190	10 (p > 0,05)NS
E	250 UT	15 min. após	2x10 <sup>8</sup> cél.	1980 ± 225	4,4 (p > 0,05)NS
F	250 UT	30 min. após	2x10 <sup>8</sup> cél.	1992 ± 260	3,0 (p > 0,05)NS

(1) - Tempo de administração da STa em relação a inoculação de HC.

(2) - UT: número de unidades tóxicas.

(3) - PFC/10<sup>6</sup> células splênicas: número de células formadoras de placas por 10<sup>6</sup> células splênicas.

(4) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(5) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

convencionou-se o uso de 250 UT, que foi a dose mínima necessária para observação de alteração da resposta imune, e, o tempo de 15 minutos antes da imunização com a HC, com relação ao qual se obteve uma imunossupressão significativa (Tabela 2).

## 2 - Ação do Meio de CAYE na Resposta Imune Humoral a HC

O Meio de CAYE foi o meio utilizado no preparo da toxina bruta. Com a finalidade de verificar se este meio exercia alguma influência na resposta imune humoral do camundongo a HC, foram feitos experimentos com diferentes diluições do mesmo.

Com os dados apresentados na Tabela 3, constatou-se que ele não altera a resposta imune humoral a HC, quando inoculado 15 minutos antes deste Ag, como era aplicada a enterotoxina, tendo como controle animais inoculados somente com a HC.

Apesar desta confirmação, ele foi usado como controle nos experimentos seguintes, na diluição 1/5, para se avaliar com maior precaução as alterações que viessem a ser observadas na presença da enterotoxina STa semipurificada.

## 3 - Número de células e viabilidade celular

Durante os primeiros experimentos com a enterotoxina STa semipurificada notamos uma esplenomegalia nos animais imunizados.

Com a finalidade de se determinar o aumento do número de células esplênicas e a viabilidade celular, camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> foram imunizados com 250 UT tendo como grupo controle animais inoculados com Meio de CAYE 1/5.

Nossos experimentos demonstraram que havia um aumento de 30% no número de células esplênicas nos animais inoculados com a toxina, em comparação aos inoculados com o Meio de CAYE, mas a viabilidade tanto em um grupo como em outro não estava alterada, permanecendo por volta de 90% (Tabela 4).

## 4 - Análise da cinética da Resposta Imune e Competição Antigênica

Tem sido mostrado (Corsini & Costa, 1981), que o pico da resposta das células produtoras de Ac a HC, através da técnica de PFC, em camundongos, ocorre no 4º dia após a imunização.

Tabela 3 - Efeito do meio de CAYE na resposta imune humoral em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> imunizados com hemácia de carneiro.

Grupos de animais	Diluição do meio de CAYE (0,2ml/animal) (1)	Dose de HC (/0,2ml)	PFC/10 <sup>6</sup> células esplênicas (teste t : valor de p)
(CONTRÔLE) A	-	2x10 <sup>8</sup> cél.	1929 ± 190 (3)
B	1/5	2x10 <sup>8</sup> cél.	1900 ± 126 (p > 0,05)NS (2)
C	1/10	2x10 <sup>8</sup> cél.	2060 ± 208 (p > 0,05)NS
D	1/20	2x10 <sup>8</sup> cél.	1885 ± 157 (p > 0,05)NS

(1) - Meio de casamino-ácido-extrato de levedura, inoculado na dose de 0,2 ml por animal.

(2) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(3) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

Tabela 4 - Efeito da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada, inoculada em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, em relação ao número de células esplênicas e respectiva viabilidade celular.

Grupos de animais	Inóculo <sup>(1)</sup> (0,2ml/animal)	Dose de HC (/0,2ml)	Nº de células esplênicas	Viabilidade celular (%)
(CONTRÔLE) A	meio de CAYE (1/5)	2x10 <sup>8</sup> cél.	96 ± 12 <sup>(2)</sup>	90 ± 2
B	250 UT de STa	2x10 <sup>8</sup> cél.	142 ± 16	90 ± 4

(1) - Inoculadas 15 minutos antes da imunização com HC.

(2) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

Como o estudo da ação da enterotoxina STa na resposta imune não havia sido feito anteriormente, nos pareceu importante verificar se a mesma não teria capacidade de alterar a cinética de resposta de Ac, do animal, a HC ou se ela não competiria com este Ag a nível de reconhecimento.

Foi observado que não houve "shift", sendo que o pico de resposta a HC continuava no 4º dia (Figura 1), e mesmo aumentando-se a concentração de hemácia e conservando-se fixa a quantidade de toxina, a porcentagem de inibição não acompanhou a da concentração de HC (Figura 2). Portanto, não houve, aparentemente, competição entre estes Ag.

##### 5 - Efeito da Enterotoxina STa Semipurificada na Resposta Imune Primária a HC

A capacidade da enterotoxina STa semipurificada interferir na resposta imune primária a HC foi estudada em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>.

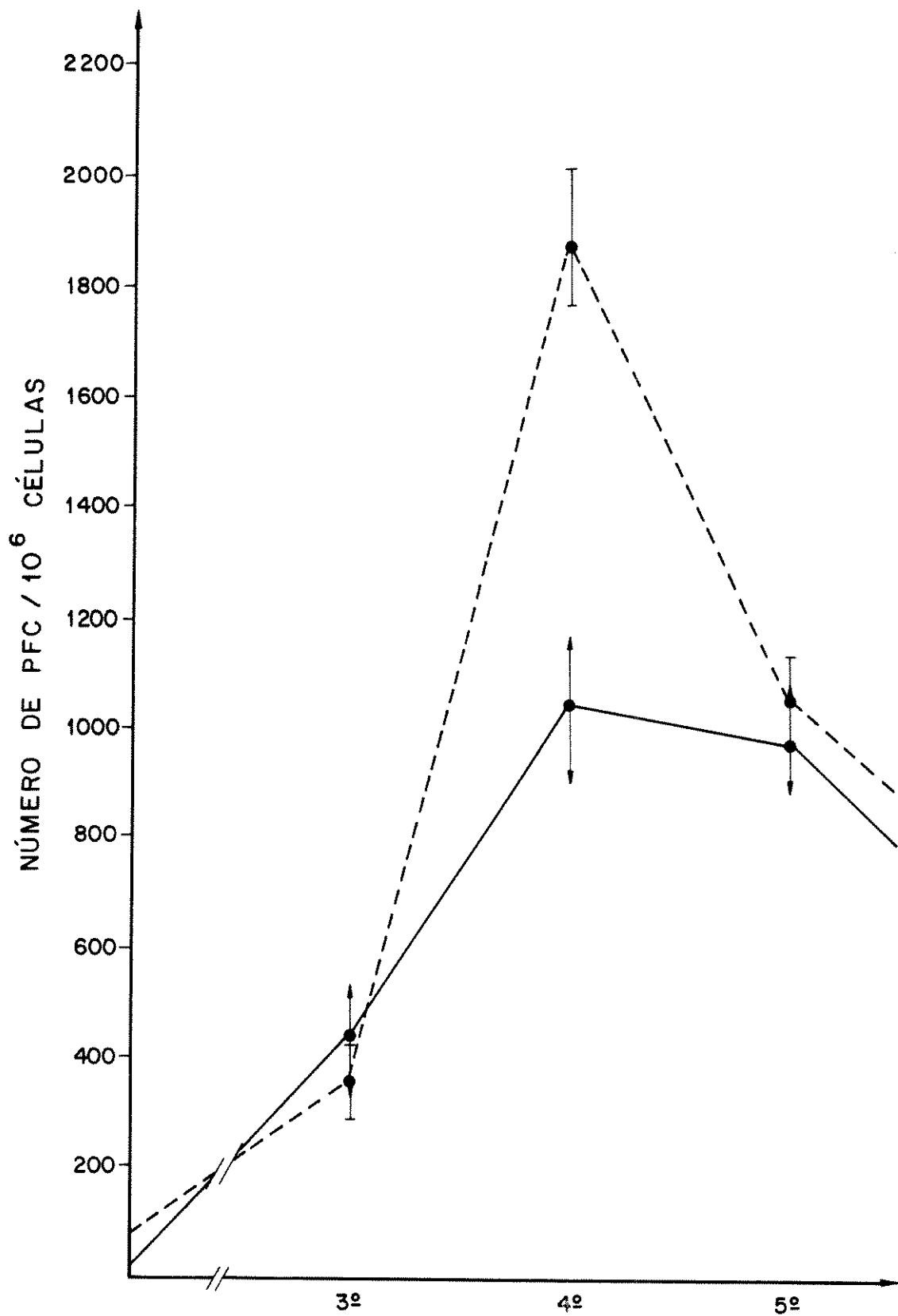
A dose empregada nestes experimentos foi de 250 UT nos tempos, 15 minutos antes de HC, por ser este o tempo ótimo verificado, ou 48 horas antes do Ag, por ser este tempo o relativo ao pico observado na depuração do carbono coloidal em presença da enterotoxina STa semipurificada (Figura 3).

Uma vez realizados os experimentos, os resultados obtidos na Tabela 5 mostram que quando a toxina foi aplicada 15 minutos antes da HC, houve uma supressão de 30% no nível de IgM no 4º dia após a inoculação do Ag, e que no 6º dia aumentou de 30% o nível de IgM e 45% o nível de IgG.

Similarmente, quando a enterotoxina STa foi aplicada 48 horas antes da HC, a Tabela 6 mostra que houve uma supressão, no 4º dia, de 45% de IgM e, no 6º dia, de 30% de IgM e de 45% de IgG.

Portanto, concluímos, que a toxina quando aplicada 15 minutos antes do Ag teve a princípio um efeito supressor no nível de IgM, sendo que posteriormente passa a estimular tanto a produção de IgM como a de IgG. Porém, quando a enterotoxina STa foi inoculada 48 horas antes da hemácia havia apenas um efeito supressor no nível destas duas classes de imunoglobulinas.





DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO COM HEMÁCIAS DE CARNEIRO

Figura 1 - Resposta imune humoral a hemácia de carneiro (HC) de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, inoculados com a enterotoxina termo-estável (STa) (250 UT), injetada 15 minutos antes da HC. Cada ponto representa a média aritmética  $\pm$  1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 5 animais. Animais contrôles (---). Animais inoculados com a enterotoxina STa (—).

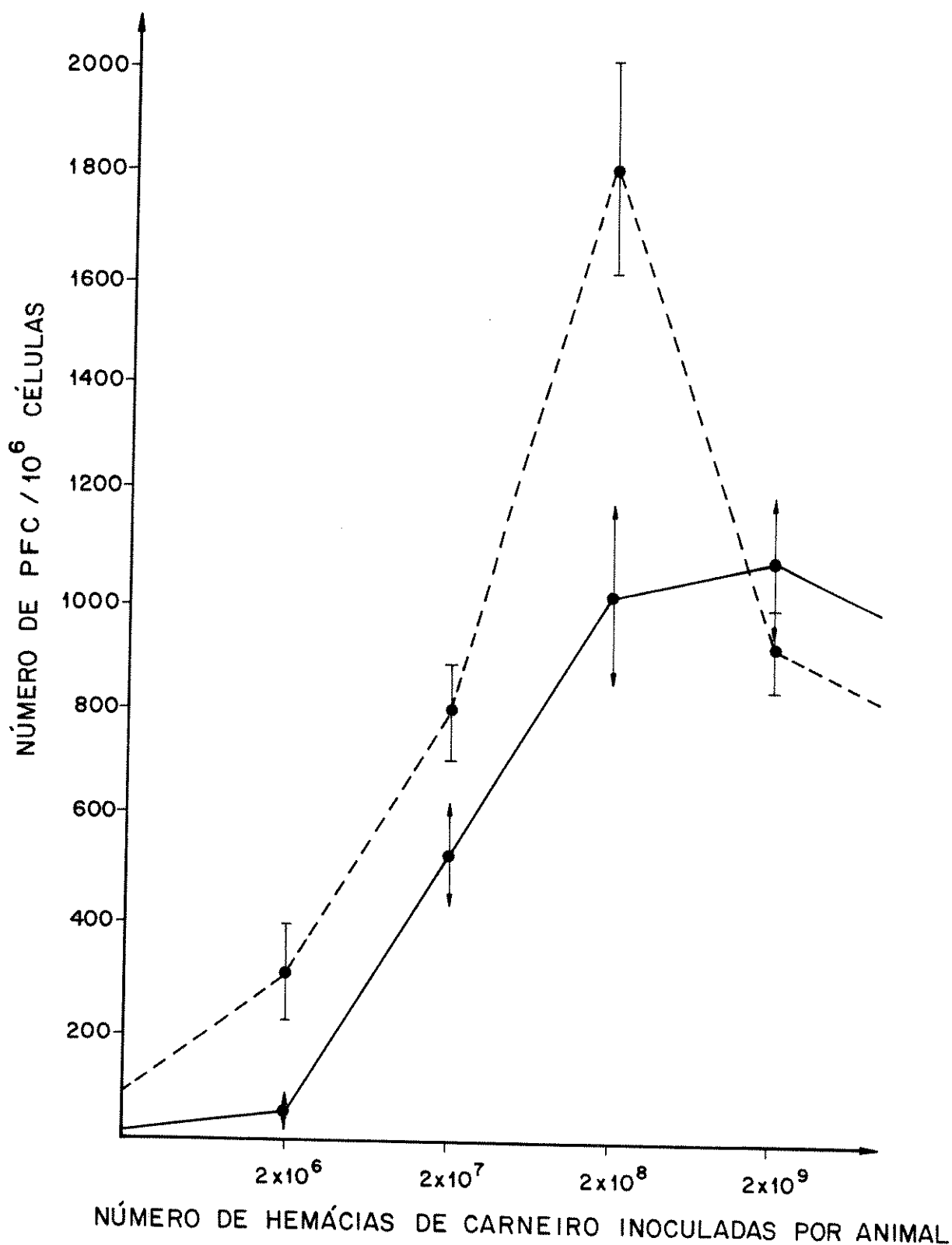


Figura 2 - Influência do número de hemácias de carneiro (HC) na resposta imune humoral de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> previamente (15 minutos antes da dose de HC) inoculados com 250 UT de enterotoxina termo-estável (STa). Cada ponto representa a média aritmética  $\pm$  1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 5 animais. Animais contrôles (—+). Animais inoculados com a enterotoxina STa (—|).

Tabela 5 - Efeito na resposta imune primária, da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada, ativa e autoclavada (121°C - 30'), inoculada 15 minutos antes da hemácia de carneiro.

Grupos de animais	Inóculo (0,2ml/animal)	Dose de HC (/0,2ml)	4º dia		6º dia			
			IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição <sup>(1)</sup> (teste t:valor de p)	IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição <sup>(1)</sup> (teste t:valor de p)	IgG (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição <sup>(1)</sup> (teste t:valor de p)
(CONTRÔLE) A	M. de CAYE (1/5)	2x10 <sup>8</sup> cél.	2448 ± 257 <sup>(4)</sup>	-	293 ± 39 <sup>(4)</sup>	-	979 ± 146 <sup>(4)</sup>	-
B	250 UT	2x10 <sup>8</sup> cél.	1682 ± 121	↓IgM 30% (p < 0,001)	494 ± 69	↑IgM 30% (p < 0,001)	1840 ± 102	↑IgG 48% (p < 0,001)
C	250 UT autocl. <sup>(2)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	2024 ± 280	17% (p > 0,05)NS <sup>(3)</sup>	240 ± 69	18% (p > 0,05)NS	1061 ± 220	8% (p > 0,05)NS

(1) - Variação da resposta imune primária em função dos níveis de IgM e IgG com base nos resultados do teste de PFC direto e indireto, respectivamente.

(2) - 250 UT de enterotoxina STa autoclavada a 121°C por 30 minutos.

(3) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(4) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

Tabela 6 - Efeito na resposta imune primária, da enterotoxina termo-estável (Sta) semipurificada, ativa e autoclavada (121°C - 30'), inoculada 48 horas antes da hemácia de carneiro.

Grupos de animais	Inóculo (0,2ml/animal)	Dose de HC (/0,2ml)	4º dia		6º dia			
			IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição (1) (teste t:valor de p)	IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição (1) (teste t:valor de p)	IgG (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição (1) (teste t:valor de p)
(CONTRÔLE) A	M. de CAYE (1/5)	2x10 <sup>8</sup> cél.	2630 ± 230 (4)	-	514 ± 50 (4)	-	1050 ± 89 (4)	-
B	250 UT	2x10 <sup>8</sup> cél.	1406 ± 190	↓IgM 45% (p < 0,001)	350 ± 91	↓IgM 30% (p < 0,001)	580 ± 62	↓IgG 45% (p < 0,001)
C	250 UT autocl. (2)	2x10 <sup>8</sup> cél.	2400 ± 280	9% (p > 0,05)NS (3)	495 ± 68	4% (p > 0,05)NS	958 ± 82	9% (p > 0,05)NS

(1) - Variação da resposta imune primária em função dos níveis de IgM e IgG, com base nos resultados do teste de PFC direto e indireto, respectivamente.

(2) - 250 UT de enterotoxina Sta autoclavada a 121°C por 30 minutos.

(3) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(4) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

## 6 - Efeito da Enterotoxina STa Semipurificada Autoclavada na Resposta Imune Primária

A enterotoxina STa se caracteriza por ser termoestável quando aquecida a 100°C por 15 minutos, sendo porém a sua atividade biológica destruída por autoclavação a 121°C por 30 minutos (Franceschi et al, 1977).

Quando a enterotoxina STa inativada pela autoclavação, negativa no teste do CRN, foi submetida aos mesmos experimentos anteriores, descritos para o estudo da enterotoxina ativa na resposta imune primária, verificou-se que a enterotoxina STa em tal estado de inativação não teve nenhum efeito nos níveis de IgM e IgG (Tabelas 5 e 6).

## 7 - Efeito da Enterotoxina STa Semipurificada na Resposta Imune Secundária a HC

Com a finalidade de verificar se a enterotoxina STa semipurificada também teria algum efeito na resposta imune secundária, camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> foram imunizados, intravenosamente, com HC e 26 dias após receberam a segunda dose desse mesmo antígeno como dose reforço.

A enterotoxina STa semipurificada foi aplicada na quantidade de 250 UT e nos tempos de 15 minutos ou 48 horas antes da dose primária ou da dose secundária de HC.

O número de PFC tanto diretas (IgM) quanto indiretas (IgG), foram determinados.

Nossos resultados indicam que, quando 250 UT eram inoculadas antes da dose primária de HC, havia um aumento de 75% de IgM enquanto que o nível de IgG estava aumentado em apenas 25% (Tabela 7).

Por outro lado, quando a mesma dose de enterotoxina era aplicada 15 minutos antes da dose secundária de HC, havia, na maioria dos experimentos, um aumento de 45% no nível de IgM e de 20% no nível de IgG, sendo que em alguns não houve alteração detectável no nível dessa última classe de imunoglobulina.

Conforme podemos observar, na Tabela 8, a ação da enterotoxina 48 horas antes da dose primária foi de aumentar 30% o nível de IgM e IgG. Quando a enterotoxina

Tabela 7 - Efeito, na resposta imune secundária, da enterotoxina termo-estável (Sta), ativa e autoclavada (121°C - 30'), inoculada 15 minutos antes da dose primária ou secundária de hemácia de carneiro em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>.

Grupos de animais (CONTRÔLE)	Inóculo (0,2ml/animal)	Dose de HC (/0,2ml)	6º dia			
			IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição (4) (teste t : valor de p)	IgG (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição (4) (teste t : valor de p)
A	M. de CAYE (1/5)	2x10 <sup>8</sup> cél.	480 ± 17 <sup>(6)</sup>	-	4429 ± 364 <sup>(6)</sup>	-
B	250 UT <sup>(1)</sup> antes DP <sup>(2)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	1982 ± 234	↑IgM 75% (p < 0,001)	5860 ± 440	↑IgG 25% (p < 0,001)
C	250 UT aut. antes DP <sup>(2)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	510 ± 32	3% (p > 0,05)NS	4950 ± 320	10% (p > 0,05)NS
D	250 UT antes D.S. <sup>(3)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	893 ± 134	↑IgM 45% (p < 0,001)	5600 ± 465	↑IgG 20% (p < 0,001)
E	250 UT aut. antes DS <sup>(3)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	496 ± 12	6% (p > 0,05)NS	4720 ± 296	6% (p > 0,05)NS

(1) - UT: número de unidades tóxicas.

(2) - D.P.: dose primária de HC.

(3) - D.S.: dose secundária de HC.

(4) - Varição da resposta imune em função dos níveis de IgM e IgG.

(5) - NS: Não significativo em relação aos resultados do grupo controle.

(6) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

Tabela 8 - Efeito, na resposta imune secundária, da enterotoxina termo-estável (Sta), ativa e autoclavada (121°C - 30'), inoculada 48 horas antes da dose primária ou secundária de hemácia de carneiro.

Grupos de animais (CONTRÔLE)	Inóculo (0,2ml/animal)	Dose de HC (/0,2ml)	6º dia			
			IgM (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição <sup>(4)</sup> (teste t : valor de p)	IgG (PFC/10 <sup>6</sup> cél.)	Varição <sup>(4)</sup> (teste t : valor de p)
A	M. de CAYE (1/5)	2x10 <sup>8</sup> cél.	582 ± 56 <sup>(6)</sup>	-	3833 ± 430 <sup>(6)</sup>	-
B	250 UT <sup>(1)</sup> antes D.P. <sup>(2)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	838 ± 34	↑ IgM 30% (p < 0,001)	5570 ± 820	↑ IgG 30% (p < 0,001)
C	250 UT aut. antes D.P.	2x10 <sup>8</sup> cél.	602 ± 40	3% (p > 0,05)NS <sup>(5)</sup>	4244 ± 426	10% (p > 0,05)NS
D	250 UT antes D.S. <sup>(3)</sup>	2x10 <sup>8</sup> cél.	296 ± 43	↓ IgM 50% (p < 0,001)	1020 ± 480	↓ IgG 75 (p < 0,001)
E	250 UT aut. antes D.S.	2x10 <sup>8</sup> cél.	560 ± 61	4% (p > 0,05)NS	3760 ± 236	2% (p > 0,05)NS

(1) - UT: número de unidades tóxicas.

(2) - D.P.: dose primária de HC.

(3) - D.S.: dose secundária de HC.

(4) - Variação da resposta imune em função dos níveis de IgM e IgG.

(5) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(6) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

foi aplicada 48 horas antes da dose secundária, diminuiu em 50% o nível de IgM e em 75% o nível de IgG.

Concluimos, portanto, que a enterotoxina STa semipurificada exerce influência na resposta imune secundária, sendo que quando aplicada antes da dose primária aumenta tanto o nível de IgM como de IgG. Porém, quando aplicada antes da dose secundária, a alteração no nível das imunoglobulinas, depende do tempo de administração da enterotoxina STa.

#### 8 - Efeito da Enterotoxina STa Semipurificada Autoclavada na Resposta Imune Secundária

Como foi verificado, a enterotoxina autoclavada não teve efeito no nível de IgM e IgG no estudo da resposta imune primária (Tabelas 5 e 6).

Com o objetivo de verificar se a enterotoxina STa inativada biologicamente, teria algum efeito na resposta imune secundária, foram realizados experimentos similares ao da resposta imune primária.

Mediante os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 verificamos que a enterotoxina autoclavada não alterou os níveis de IgM e IgG.

## II - EFEITO DA ENTEROTOXINA STa NA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS

### 1 - Avaliação da Hipersensibilidade Tardia (DTH) ao Dinitrofluorbenzeno (DNFB)

Com a finalidade de se estudar uma possível atuação da enterotoxina STa na resposta imune mediada por células, camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> foram sensibilizados com DNFB e 5 dias após receberam a dose desencadeante. Os animais foram divididos em 3 grupos: em um grupo, os animais foram inoculados com 250 UT no dia do desafio, em outro grupo, a mesma dose por animal foi inoculada durante os quatro dias (0, 1, 2, 3) após a sensibilização pelo DNFB e finalmente, no terceiro grupo, os animais foram inoculados com a mesma dose de STa, durante os 4 dias antes da dose sensibilizante de DNFB.

Os resultados da Tabela 9, que representam a relação dos pesos das orelhas



Tabela 9 - Estudo da ação da enterotoxina termo-estável, semipurificada, na hipersensibilidade retardada (DTH) de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> sensibilizados com dinitrofluorbenzeno (DNFB).

Grupos de animais	Sensibilização (1)	Inóculo (2)	Desafio	Relação peso da OE/OD (4) (teste t : valor de p)
A	+ (controle)	—	+	2,1274 ± 0,176 (6)
B	+	+ (no dia do desafio)	+	2,2861 ± 0,632 (p > 0,05)NS (5)
C	+	+ (durante 4 dias (0,1,2,3) após sensibilização)	+	2,4220 ± 0,769 (p > 0,05)NS
D	+	+ (durante 4 dias antes da sensibilização)	+	1,9842 ± 0,546 (p > 0,05)NS

(1) - 50 µl de DNFB/animal.

(2) - 250 UT/animal.

(3) - 5 µl de DNFB/animal.

(4) - Relação entre pesos das orelhas Esquerda/Direita em média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

(5) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

(6) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

esquerda e direita (E/D), 24 horas após a dose desencadeante, mostram que em todos estes experimentos, 250 UT de enterotoxina STa semipurificada não interfere com a DTH ao DNFB em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> comparado com o grupo controle.

Concluimos, portanto, que diferentemente da resposta imune humoral, onde, através de experimentos utilizando a técnica PFC, observamos supressão ou estímulo do nível de IgM ou IgG, não houve qualquer influência detectável na resposta imune mediada por células na presença da enterotoxina STa semipurificada.

### III - EFEITO DA ENTEROTOXINA STa SEMIPURIFICADA NA DEPURAÇÃO DO CARBONO COLOIDAL

A atividade fagocitária dos macrófagos pode ser medida pela ingestão de uma substância coloidal intravenosamente.

Assim sendo, com a finalidade de se estudar a possibilidade da enterotoxina STa semipurificada intervir na função fagocitária dos macrófagos foram feitos experimentos na presença de 250 UT da mesma em diferentes intervalos de tempo: 15 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas antes da inoculação do carbono coloidal.

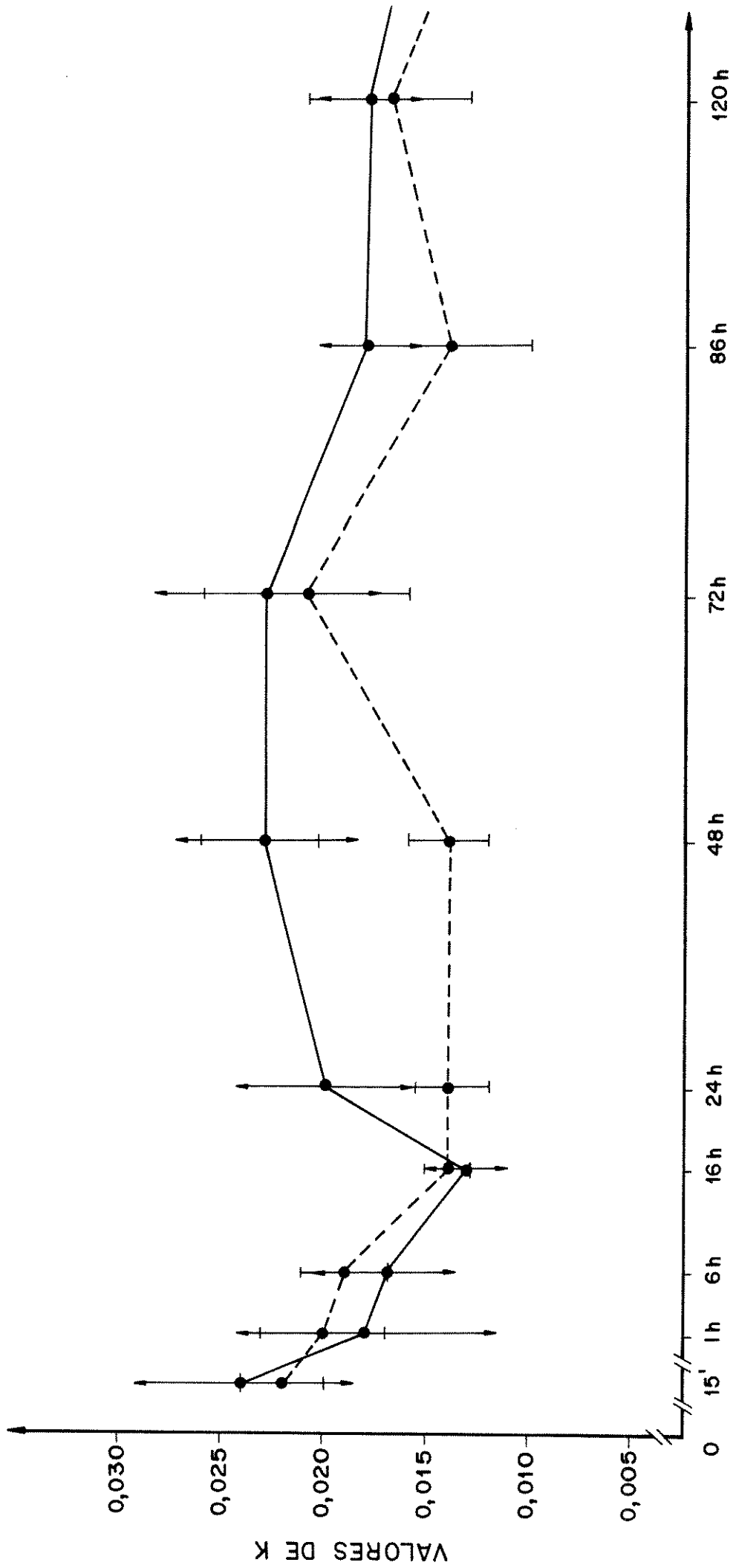
Os resultados obtidos, mostram que 250 UT aumentam a velocidade de depuração do carbono coloidal quando inoculadas 24, 48, 72 e 96 horas antes da administração do mesmo (Figura 3).

Similarmente, ainda através da Figura 3, notamos que antes ou após estes tempos, não houve interferência significativa da toxina e que a aplicação da mesma 48 horas antes correspondia ao pico da depuração do carbono coloidal.

A análise do peso dos órgãos, baço e fígado, extraídos logo após o término do teste da depuração do carbono coloidal, revelou uma esplenomegalia, nos animais inoculados com a enterotoxina STa, mas, um peso normal do fígado comparados com os do grupo controle.

As observações da massa dos órgãos, indicam que o tempo de administração da toxina 48 horas antes do carbono coloidal correspondiam também ao pico da esplenomegalia, nos animais inoculados com a enterotoxina STa (Figuras 4 e 5).

Concluimos, portanto, que a enterotoxina STa semipurificada não interferiu na hipersensibilidade retardada ao DNFB mas teve a capacidade de alterar a atividade fagocitária dos macrófagos ao carbono coloidal.



TEMPO DE INOCULAÇÃO DA ENTEROTOXINA STa

Figura 3 - Índice de fagocitose (K) no teste de depuração do carbono coloidal em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, inoculados com 250 UT de enterotoxina termo-estável (STa) em diferentes tempos. Cada ponto representa a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controles (— — —). Animais inoculados com a enterotoxina STa (— — —).

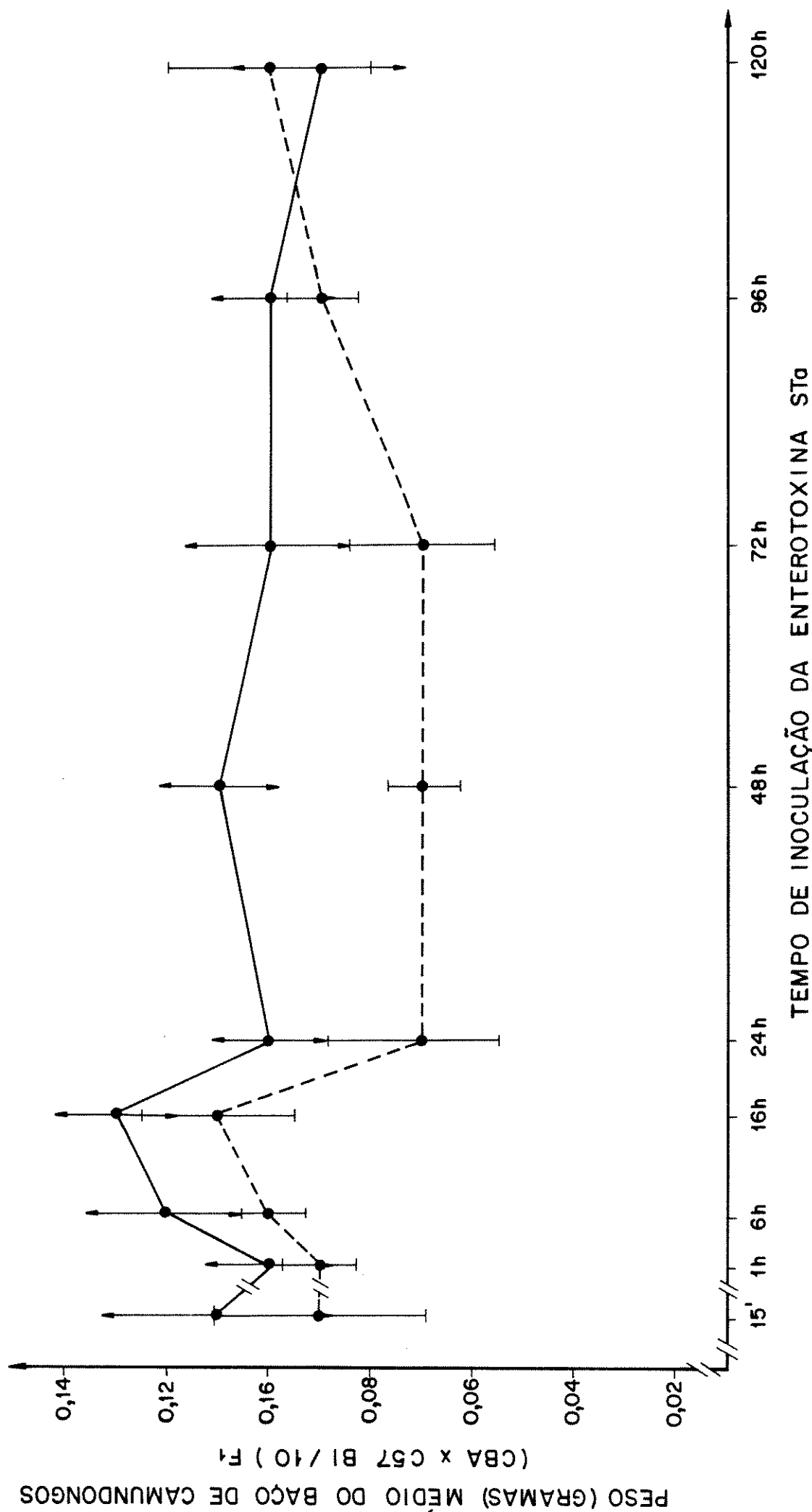
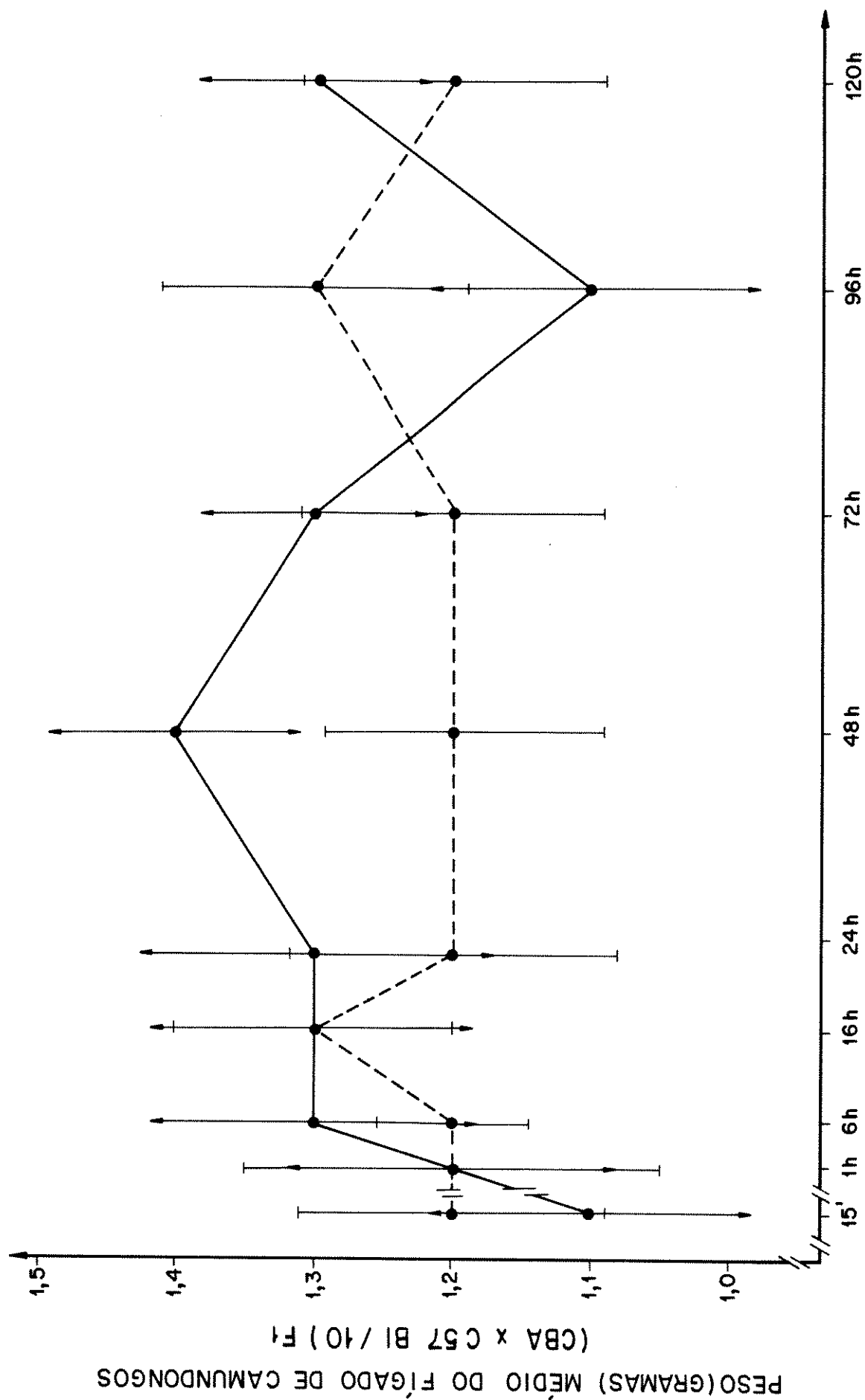


Figura 4 - Efeito da enterotoxina termo-estável (STa), 250 UT por animal, sobre o peso (g) médio (n : 8) do fígado de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>Bl/10)F<sub>1</sub> inoculados com carbono coloidal. Cada ponto representa a média aritmética  $\pm$  1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controle (---). Animais inoculados com a enterotoxina STa (—).



### TEMPO DE INOCULAÇÃO DA ENTEROTOXINA STa

Figura 5 - Efeito da enterotoxina termo-estável (STa), 250 UT por animal, sobre o peso (g) médio (n : 8) do baço de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>Bl/10)F<sub>1</sub> inoculados com carbono coloidal. Cada ponto representa a média aritmética  $\pm$  1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controle (---). Animais inoculados com a enterotoxina STa (—).

IV - EFEITO DA ENTEROTOXINA STa SEMIPURIFICADA AUTOCLAVADA E AQUECIDA NA DEPURAÇÃO DO CARBONO COLOIDAL

Quando analisamos a ação da enterotoxina STa semipurificada, aplicada 48 horas antes do carbono coloidal (Tabela 10), observamos que os valores de K e  $\alpha$  para os animais inoculados com a enterotoxina normal, em comparação ao grupo controle, se apresentavam significativamente aumentados, demonstrando um estímulo na depuração do carbono coloidal.

Quando avaliamos a ação da enterotoxina STa semipurificada, autoclavada (121°C - 30 minutos) ou aquecida a 100°C por 15 minutos, aplicadas 48 horas antes do carbono coloidal, observamos que a enterotoxina quando somente aquecida, apresentou valores de K e  $\alpha$  também significativamente aumentados em relação ao grupo controle (Tabela 10), demonstrando que a atividade desta enterotoxina é realmente termo-estável, suportando até mesmo o aquecimento realizado. Por outro lado, quando autoclavada (121°C - 30 minutos) a atividade foi perdida, levando a valores de K e  $\alpha$  comparáveis aos observados para o grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada no teste de depuração do carbono coloidal, realizado em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>.

Grupos de animais	Inóculo <sup>(1)</sup> (0,2 ml/animal)	K <sup>(2)</sup> (teste t : valor de p)	$\alpha$ <sup>(3)</sup> (teste t : valor de p)
A	M. de CAYE (1/5)	0,026 ± 0,004 <sup>(7)</sup>	3,8 ± 0,3 <sup>(7)</sup>
B	250 UT <sup>(4)</sup>	0,042 ± 0,004 (p < 0,001)	5,7 ± 0,3 (p < 0,001)
C	250 UT aquecida <sup>(5)</sup>	0,032 ± 0,002 (p < 0,01)	4,3 ± 0,2 (p < 0,01)
D	250 UT autoclavada <sup>(6)</sup>	0,028 ± 0,003 (p > 0,05)NS <sup>(8)</sup>	3,6 ± 0,5 (p > 0,05)NS

(1) - 48 horas antes do carbono coloidal.

(2) - Índice de fagocitose K.

(3) - Índice de fagocitose corrigido  $\alpha$ .

(4) - UT: número de unidades tóxicas.

(5) - Enterotoxina STa aquecida a 100°C por 15 minutos.

(6) - Enterotoxina STa autoclavada a 121°C por 30 minutos.

(7) - Os resultados expressam a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) (n = 5).

(8) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

## DISCUSSÃO

Desde que Nowell (1960) demonstrou que a fitohemaglutinina (PHA) era capaz de causar a proliferação de linfócitos humanos, uma grande variedade de mitógenos, tais como, concanavalina A (ConA), pokeed (PWM), agentes oxidantes (periodato, galactoxidases), produtos bacterianos (LPS, enterotoxina B do estafilococo, estreptolisina O), poliaminas (dextran, tripsina, elastase, trombina), metais pesados (zinco, mercúrio), íons de  $Ca^{++}$ , etc, mostram exercer influência sobre as células linfóides (O'Brien et al, 1978).

Alguns destes mitógenos estimulam populações selecionadas de linfócitos, isto é, certos mitógenos como a PHA, ConA, periodato e galactoxidase, estimulam linfócitos T (O'Brien et al, 1978). Outros compostos tais como o LPS bacteriano, PWM, levan polissacarídico de pneumocotipo III, flagelina polimerizada e polianions, estimulam linfócitos B (Watson, 1975). Estes linfócitos podem ainda serem induzidos a transformação por fatores mitogênicos ou blastogênicos liberados por células T estimuladas por seus mitógenos específicos (O'Brien et al, 1978).

A par do estímulo que ocorre nas células B e T por ação dos mitógenos, existem outros mecanismos, alguns com a participação também dos macrófagos, através dos quais linfócitos B e T são deprimidos, geralmente com o envolvimento de células T ditas supressoras (Pierce, 1979; Nelson, 1973).

Nestes mecanismos reguladores, indutores da ativação ou da supressão de linfócitos, parece existir a participação de mediadores intracelulares de modo que um sinal exterior, a nível de membrana, possa ser transmitido para o interior da célula, provocando alterações tais como, o aumento, do transporte de cálcio, de aminoácidos, de nucleotídeos, de glicose, de síntese de DNA, divisão celular e maturação, que em resumo fazem parte do processo de transformação de linfócitos, sejam eles B ou T (Watson et al, 1973; Watson, 1975).

No que concerne a célula B, tem sido demonstrado que, por vezes, um único sinal é o suficiente para que esta célula se diferencie em plasmócito e se torne uma célula formadora de anticorpos. Em alguns casos tem-se demonstrado, objetivamente, que este mediador intracelular está representado pela participação de nucleotídeos cíclicos em especial o AMP-c e GMP-c (Watson, 1975).

Conforme já comentamos anteriormente, estes mesmos compostos são os mediado



res celulares envolvidos nos fenômenos diarrêicos, observados na cólera e em infecções entéricas causadas por amostras de E. coli enterotoxigênicas. A maior concentração de AMP-c nas células intestinais decorrentes da ação das enterotoxinas, colérica e termo-lábil (LT), ocasiona um aumento de líquido na luz do intestino delgado, ao passo que o aumento de GMP-c está envolvido na patogenia da diarréia causada pela enterotoxina termoestável do tipo ST de E. coli (Guerrant et al, 1974; Banwell et al, 1973; Sack, 1975; Hugles et al, 1978; Gianella et al, 1979; Guerrant et al, 1980; Greenberg, 1982).

Com relação ao AMP-c e GMP-c tem-se admitido a semelhança de uma teoria Yin-Yang (Goldberg et al, 1974) que os mesmos possuem efeitos que podem ser considerados opostos, isto é, o que um deprime ou aumenta, o outro apresenta um efeito contrário. Assim sendo, a incubação de neutrófilos com agentes que reconhecidamente promovem o aumento de AMP-c intracelular (epinefrina, histamina, prostaglandinas  $E_1$  e  $E_2$ ) inibem a resposta leucotóxica destes neutrófilos. Por outro lado, quando o aumento é de GMP-c, através da ação de compostos como acetilcolina, LPS, etc, ocorre um aumento considerável na atividade leucotóxica destes neutrófilos (Hill et al, 1975).

Outras experiências com nucleotídeos cíclicos tem demonstrado que a adição de AMP-c, ou agentes que estimulam o seu aumento intracelularmente, inibem a indução da resposta imune primária a HC por parte de linfócitos de camundongos (Watson et al, 1973; Watson, 1974).

Entretanto, não seria o nível absoluto de AMP-c intracelular que levaria a uma diminuição daquela resposta e sim a razão AMP-c/GMP-c (Rudland et al, 1974; Watson, 1975).

Tem se verificado que todas as células em divisão parecem ter necessidade de um nível baixo da razão AMP-c/GMP-c (Watson, 1974; Rudland et al, 1974). Esta razão pode ser alterada, aumentando-se diferentemente estes dois nucleotídeos. Mitógenos de células B, podem alterar a razão aumentando-se somente o GMP-c, promovendo, portanto, um decréscimo na razão AMP-c/GMP-c, iniciando-se uma resposta positiva. Se ambos forem aumentados a resposta será positiva somente se o aumento for maior para o GMP-c levando a uma diminuição na razão AMP-c/GMP-c (Watson, 1975).

Ainda com relação aos níveis destes nucleotídeos, Chisari e col. (1974) demonstraram que apesar da toxina colérica ativar a adenil-ciclase (Carpenter, 1971; Pierce, 1971), aumentando conseqüentemente o nível de AMP-c, o efeito da mesma na resposta imune a HC dependia da dose a ser injetada e principalmente do tempo de

administração da toxina em relação a inoculação de HC. Quando a toxina era administrada em doses não superiores a 2 µg por animal, simultaneamente com a HC, observava-se um efeito adjuvante na resposta imune estudada pela técnica de PFC. Doses superiores se mostraram tóxicas e doses inferiores apresentavam um efeito inibidor no número de PFC, quando eram inoculadas 12 horas antes ou após a HC. Quando no primeiro caso se observou o efeito adjuvante, experimentos paralelos, conduzidos para correlacionar o efeito adjuvante com os níveis de AMP-c intracelular, demonstraram que ocorria um aumento evidente deste nucleotídeo, aumento este que perdurava entre 12 e 48 horas após a inoculação da toxina colérica. Em um sistema, dois níveis presumivelmente diferentes de AMP-c estavam associados a efeitos opostos: estímulo em níveis baixos e inibição em níveis mais altos.

Outros tipos de experimentos sobre a dualidade de efeitos de AMP-c demonstraram que níveis fisiológicos deste nucleotídeo promovem a síntese de DNA e atividade mitótica, em suspensão de timócitos de ratos. Em contraposição, concentrações elevadas de AMP-c inibiram o crescimento celular (Mac Manus et al, 1969).

Tem sido confirmado através de inúmeros experimentos (Feldmann et al, 1979; Mosier, 1967) que os macrófagos exercem influência sobre os linfócitos B. Portanto, foi observado, in vitro, que a proliferação de linfócitos é particularmente aumentada quando a relação macrófagos/linfócitos é pequena (Keller, 1975) e quando os macrófagos são ativados, interagindo com células em replicação numa proporção 5:1 ou mais, esta proliferação é cessada, sendo esta citostase completamente reversível dentro de 16-24 horas (Keller, 1973, 1977). Deste modo, macrófagos não ativados seriam células "helper" enquanto macrófagos ativados seriam supressores (Rinchart et al, 1979). Macrófagos ativados, são tidos como um dos principais fatores na regulação da produção de anticorpos (Wiener and Bandieri, 1974).

Outros experimentos, relativos a artrite reumatóide (Goodwin, 1978) tem demonstrado que a ação supressora de macrófagos ativados pode ser devido a liberação de prostaglandinas por estas células, que agindo sobre os linfócitos B ocasionam um aumento do nível de AMP-c causando uma inibição na RIH a HC.

Foi demonstrado, ainda, por Finazzi-Agro e col. (1980), que macrófagos em tal estado de ativação produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que sem alterar a viabilidade celular de linfócitos B, em baixa concentração, aumentam o GMP-c destas células (Mittal et al, 1977; White et al, 1976) induzindo a um estímulo na síntese

de imunoglobulinas em culturas de linfócitos. Em concentrações dez vezes maiores, o  $H_2O_2$  produzido, tem um efeito inibitório sobre a RIH (Mittal et al, 1977).

O nível dos nucleotídeos cíclicos parece ainda ter uma grande importância no que diz respeito a fagocitose pelos macrófagos, pois tem sido observado, que a agregação de plaquetas estimula a fagocitose das partículas de carbono coloidal, fenômeno este que sofre uma inibição (Van Aken et al, 1970) a medida que aumenta o AMP-c extracelular (Born and Cross, 1963; Regoli and Clark, 1963) em contacto com plaquetas.

No que diz respeito ao nosso trabalho em particular, com a enterotoxina STa de E. coli, encontramos uma série de alterações na resposta imune humoral a anticorpos detectáveis pela técnica de PFC direta e indireta e na depuração do carbono coloidal.

Embora não nos tenha sido possível dosar o nível de nucleotídeos cíclicos em culturas de células esplênicas de camundongos submetidos a ação da enterotoxina STa, para então analisarmos uma possível correspondência entre a ação desta na resposta imune, em decorrência dos conhecimentos atuais sobre a ação destes nucleotídeos em vários fenômenos imunológicos, alguns envolvendo a enterotoxina colérica, não podemos deixar de fazer com que a nossa discussão gire em torno desses nucleotídeos em virtude das implicações que os mesmos tem com o mecanismo de ação das enterotoxinas de E. coli.

Com base nos resultados do trabalho de Chisari et al (1974), citado anteriormente, poderíamos admitir que com a enterotoxina STa e sua respectiva capacidade de ativar a guanil-ciclase e conseqüente aumento de GMP-c intracelular, aconteceriam fenômenos opostos aos observados para o AMP-c, de acordo com o postulado pela teoria Yin-Yang (Goldberg et al, 1974) já mencionada?

A primeira dúvida surgida é se a enterotoxina STa poderia realmente ativar a guanil-ciclase de linfócitos, aumentando o GMP-c nestas células. Até a pouco tempo, postulava-se que a enterotoxina STa seria capaz de ativar apenas e unicamente a guanil-ciclase presente nas células das vilosidades intestinais não interferindo nos níveis de GMP-c das células do estômago, pâncreas, pulmão, coração, rim, e cortex cerebral (Greenberg et al, 1982). Experiências recentes, contudo, demonstraram que células basófilas leucêmicas de rato apresentavam um maior influxo de íons de  $Ca^{++}$  e um aumento na síntese de GMP-c quando em contato com a enterotoxina STa (Knoop et

al, 1983). Foi também observado um aumento deste mesmo nucleotídeo em culturas de células CCL-6, Hela, L e Mm-1, após a incubação com a enterotoxina STa (Inoue et al, 1983).

Não encontramos na literatura nenhum dado negando uma possível ação da enterotoxina STa, em linfócitos B e T, o que, com base nas observações acima, permitem sugerir a possibilidade de que tais células, em contato com a enterotoxina STa, possam responder com um aumento do GMP-c e respectivas consequências em relação a suas funções específicas. Aliás, corroborando com esta possibilidade, alguns dos nossos achados se encaixaram perfeitamente, como resultados opostos que foram (teoria Yin-Yang), nos observados para a toxina colérica por Chisari et al (1974).

Em primeiro lugar, tomando como base os trabalhos de Alderete & Robertson (1978), sobre a purificação da enterotoxina STa, que calcularam, uma unidade tóxica (1 UT) de STa como equivalente a 0,85 ng de STa purificada, podemos extrapolar que as 250 UT de STa (Tabela 1) semipurificada, utilizadas nesta pesquisa, correspondiam aproximadamente a 0,212 µg de STa. Em se aceitando a nossa hipótese, de um possível efeito da STa em linfócitos B, obtidos a partir do baço de camundongos, podemos inferir que a enterotoxina STa foi comparativamente menos eficiente que a colérica em seus efeitos na resposta imune humoral, pois com esta foram obtidos efeitos estimulantes na RIH a HC em níveis de 0,01 µg por animal.

Aliás, a toxina colérica é considerada como mais ativa biologicamente que a própria enterotoxina LT (Richards et al, 1978) que por sua vez parece ter pelo menos um espectro biológico de ação mais ampla que a STa (Gyles, 1971; Evans et al, 1973).

O intervalo entre o tempo de inoculação da toxina STa e a HC, a semelhança do que aconteceu nos experimentos realizados com a toxina colérica (Chisari et al, 1974), foi extremamente importante e se observarmos a tabela 2 iremos verificar que a mesma fase preliminar onde a enterotoxina STa foi inoculada 15 minutos, 1 hora e 2 horas antes e, 15 minutos e 30 minutos depois da HC, apenas a inoculação de 250 UT, 15 minutos antes da HC foi capaz de causar uma alteração na resposta humoral, que se caracterizou por uma diminuição em média de 50% no número de PFC dos animais sacrificados 4 dias após o início do experimento.

Embora não saibamos o que acontece "in vivo", nos camundongos inoculados intravenosamente com preparado semipurificado de STa, poder-se-ia considerar que a

ativação do GMP-c seria um processo mais complexo e talvez mais lento do que aquele observado "in vitro" (Watson, 1975). Diante do exposto seria admissível supor-se que dentro deste intervalo de 15 minutos, decorridos entre a inoculação da enterotoxina STa e das HC, as células B já tivessem em seu interior níveis baixos, mas significativos, de GMP-c, decorrentes da ação da enterotoxina. Deste modo, estes níveis baixos de GMP-c seriam suficientes para causar uma supressão, resposta oposta a observada no caso da toxina colérica, em que níveis baixos de AMP-c estimularam a RIH (Chisari et al, 1974).

Com relação aos resultados de inoculação das HC, 1 e 2 horas (Tabela 2) após a administração da enterotoxina STa, aparentemente não houve interferência desta na RIH a HC. O que talvez tenha ocorrido pode ser explicado pela razão AMP-c/GMP-c, que estaria nestes períodos de tempo possivelmente equilibrada não somente pelo efeito da enterotoxina STa, causando ainda o aumento do GMP-c, como também pela ação dos macrófagos ativados por esta toxina que a esta altura já estariam ocasionando um aumento do AMP-c, como veremos adiante.

Este equilíbrio, entre os nucleotídeos cíclicos, possivelmente tenha sido transitório, pois quando a enterotoxina foi inoculada 48 horas antes da HC se observou novamente alterações na resposta imune humoral (Tabela 6). Portanto, nos parece de primordial importância as alterações que a enterotoxina STa ocasiona antes da administração da HC, por uma ação direta sobre os linfócitos B e/ou sobre os macrófagos.

Apesar dos resultados obtidos com a enterotoxina STa estarem de acordo com os efeitos normalmente opostos observados para estes dois mediadores celulares (AMP-c e GMP-c), a explicação para a imunossupressão a HC observada, continua, a nosso ver, difícil. Porém, como já mencionamos, o GMP-c pelo menos em culturas de células, é instável dando origem a metabólitos tóxicos, tais como a guanosina, o que poderia explicar a depressão observada através de um efeito tóxico (Watson, 1975). Confrontando esta possibilidade existem dois fatores:

- 1 - Experimentos sobre a variação do número de células esplênicas e respectivas viabilidades celulares (Tabela 4) sugerem que a enterotoxina STa não é citotóxica.
- 2 - Mesmo na resposta imune primária a HC houve uma recuperação traduzida em estímulo da produção não só de IgM como também de IgG no sexto dia após a inoculação de HC (Tabela 5).

Estas alterações amplas na RIH primária a HC, iniciadas por uma depressão seguidas por uma facilitação (Tabela 5) do mesmo tipo de resposta, sugerem um efeito transitório da enterotoxina STa sobre a RIH. Este fenômeno talvez pudesse explicar a depressão momentânea da resposta imune por uma ação transitória do GMP-c, enquanto o mesmo fosse mantido em níveis suficientes para interferir estimulando ou suprimindo a resposta imune humoral.

Outra possibilidade para explicar a depressão poderia estar relacionada a uma ação da STa sobre os linfócitos T, que possivelmente, com o envolvimento de macrófagos, produziriam fatores supressores (Nelson, 1973). Uma outra alternativa para explicar este fenômeno seria admitir-se que linfócitos T supressores, de algum modo, estimulados pela enterotoxina STa, liberariam substâncias do tipo SIRS (specific immune response suppressive factors) (Panayi, 1980), que poderiam atuar diretamente nas células B.

Embora estas suposições sejam aparentemente válidas, queremos lembrar que seria por demais especulativo, admitir-se que células T supressoras seriam ativadas pela STa, a semelhança do que ocorre com células ditas Ts-ConA que são estimuladas especificamente pela ConA (Hubert et al, 1976). Além do mais, é importante ressaltar que nos experimentos realizados, para medir a resposta mediada por células, a enterotoxina STa foi incapaz de provocar qualquer alteração neste tipo de resposta (Tabela 9).

Diante disto, a provável exclusão dos linfócitos T, quer na depressão, quer na facilitação da RIH por ação da STa, deixa como alternativa, para explicar este rápido e incomum "shift" na produção de IgM e IgG, apenas alguma possível alteração que possa ter ocorrido no nível de GMP-c e/ou AMP-c, que interfeririam na RIH a HC.

Até o presente não discutimos pormenorizadamente, a possibilidade de macrófagos interferirem direta ou indiretamente nos resultados por nós observados. Entretanto, como já vimos anteriormente, a modulação da resposta imune implica sempre na participação ativa destas células, produzindo, por exemplo,  $H_2O_2$ .

O  $H_2O_2$ , quando em baixa concentração, aumentaria o GMP-c dos linfócitos B, levando a um estímulo na RIH. Por outro lado, o  $H_2O_2$  em concentrações maiores, seria tóxico, ocasionando um efeito inibitório sobre a RIH (Mittal et al, 1977).

Os macrófagos ativados poderiam ter ainda um efeito sobre a RIH, devido a liberação de prostaglandinas por estas células a qual ocasiona o aumento de AMP-c nos

linfócitos B, podendo suprimir a RIH (Godwin, 1978).

De fato, os resultados por nós obtidos com relação a depuração do carbono coloidal (Tabela 10) demonstraram que a enterotoxina STa é capaz de causar uma ativação de macrófagos e possivelmente uma proliferação destas células.

É evidente que estas alterações na atividade de macrófagos devem ter interferido nas relações existentes entre estas células e linfócitos, já apontados anteriormente. É, portanto, com base nesta interação, macrófagos-linfócitos, além da possível ação direta da enterotoxina STa sobre os linfócitos B, igualmente já considerada, que faremos agora com que nossa discussão se revista de uma visão global, no que concerne a integração destes parâmetros, conforme observado no diagrama 1, a saber: ativação do GMP-c pela enterotoxina STa e/ou o aumento, em linfócitos B, do GMP-c ou AMP-c, como decorrência de macrófagos ativados pela mesma enterotoxina.

Diante disto, na análise da resposta imune primária, quando a enterotoxina STa foi inoculada 15 minutos antes da HC, como mostra o Diagrama 2, os resultados obtidos no quarto dia (Tabela 5) sugerem, diante do que foi exposto, que talvez já tenha havido um aumento do GMP-c por ação da STa, porém, ainda, este se apresenta em baixos níveis (Diagrama 2-a), levando a uma supressão da RIH. Outra possibilidade é que durante o tempo transcorrido entre a inoculação da enterotoxina STa e o dia do teste, houve ativação de macrófagos, levando a formação de altas concentrações de  $H_2O_2$  (Diagrama 2-b), que conforme apontado acima, ocasiona uma supressão da RIH, levando a uma diminuição dos níveis de IgM. Ainda, o aumento do AMP-c em linfócitos B, decorrentes da ativação de macrófagos (Diagrama 2-c), poderia explicar a supressão da RIH primária (Godwin, 1978).

A esta supressão da RIH primária, no quarto dia, sucedeu-se um estímulo na produção de IgM e IgG, observado no sexto dia após a inoculação da HC. Supondo-se que a supressão tenha sido devido a liberação de prostaglandina por parte de macrófagos, como esta atuação é reversível (Keller, 1973, 1977), acreditamos que após o aumento do AMP-c no quarto dia, ele tenha voltado a níveis normais e quem comandaria a ativação dos linfócitos B seria o nível aumentado de GMP-c, ainda decorrente da ação da enterotoxina STa sobre estes linfócitos (Diagrama 2-d), ou, ainda, da baixa concentração de  $H_2O_2$  (Diagrama 2-e), já que através do teste de depuração do carbono coloidal (Figura 3) observamos que a ativação dos macrófagos também é transitória, declinando gradualmente.

Diagrama 1 - Esquema geral sobre possíveis níveis de atuação da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada na RIH de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub> imunizados com HC.

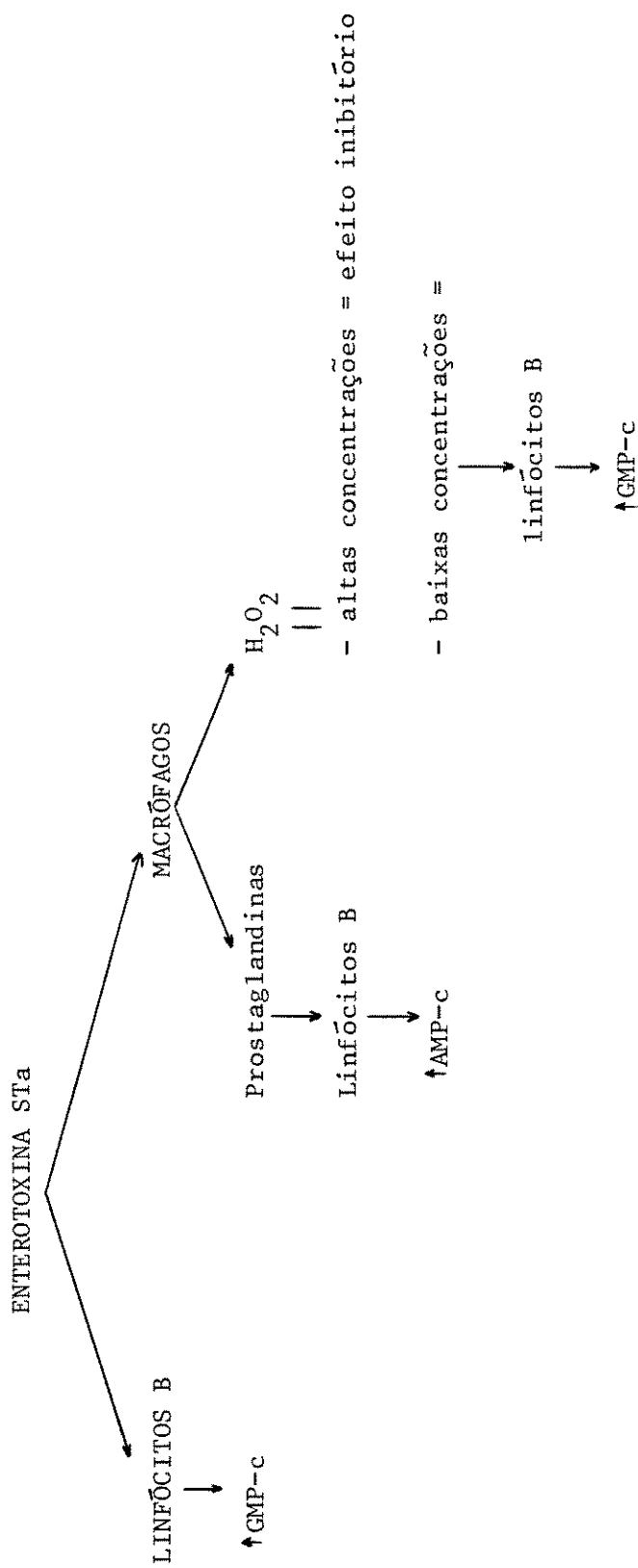
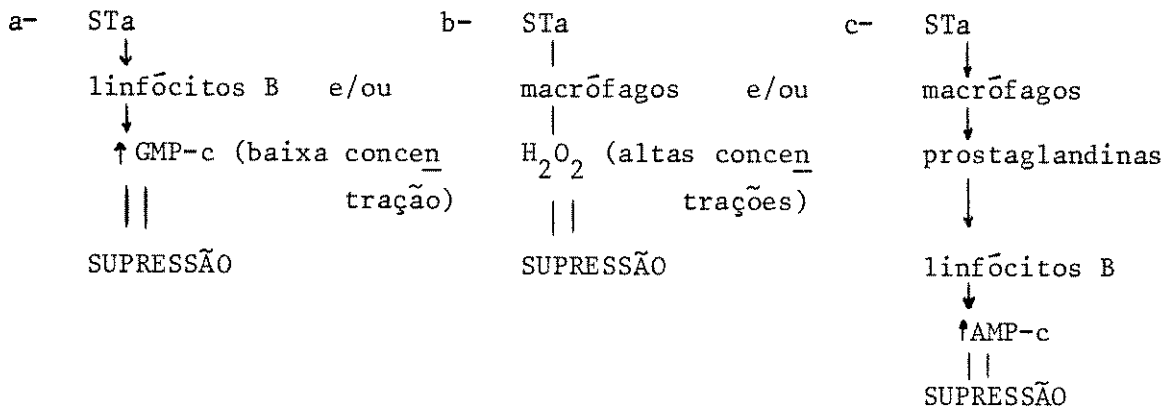


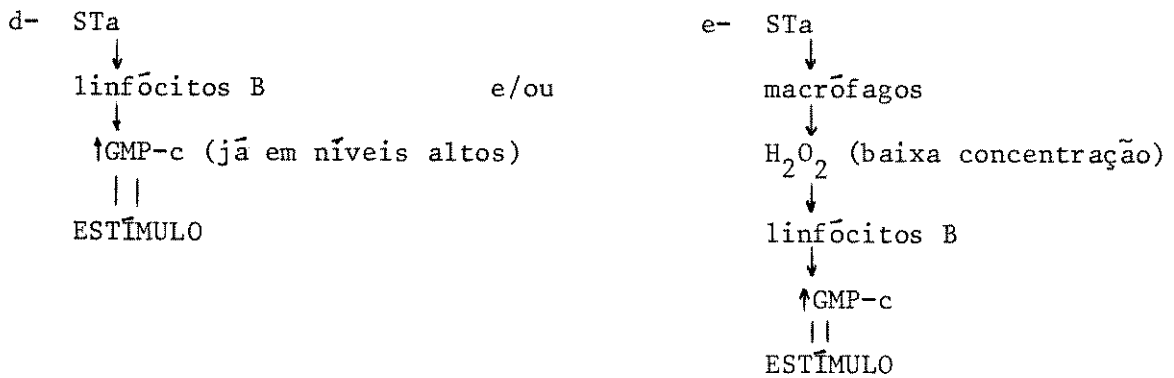


Diagrama 2 - Possíveis mecanismos de ação da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada, inoculada 15 minutos antes das hemácias de carneiro (HC), em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, na RIH primária.

49 dia



69 dia - A ação da STa sobre os macrófagos (STa → macrófagos → prostaglandinas → linfócitos B → AMP-c) é transitória, voltando ao normal o nível de AMP-c. Portanto, quem comandaria a reação seria o nível de GMP-c.



Com relação a inoculação da STa, 48 horas antes das HC (Tabela 6) obtivemos alguns resultados interessantes, que merecem uma discussão mais detalhada. Assim sendo, de acordo com o Diagrama 3, quando a suspensão de HC foi inoculada, coincidiu com o pico de ativação dos macrófagos (Figura 3) e, conseqüentemente, com o AMP-c bastante elevado, sobrepondo-se provavelmente, ao do GMP-c (Diagrama 3-a), o que acarretaria, portanto, no quarto dia, uma supressão da RIH (Tabela 5). Outra possibilidade (Diagrama 3-b) é que esta supressão tenha sido consequência da alta concentração de  $H_2O_2$  produzida pelos macrófagos ativados (Mittal et al, 1977).

Com relação ao sexto dia, onde esta supressão ainda foi observada, a ação dos macrófagos ativados sobre os linfócitos B já deve ter cessado (Diagrama 3-c), porém, o aumento de GMP-c induzido pela ação da enterotoxina STa, sobre os linfócitos B, que também é transitória (Watson, 1975), já deve ter diminuído, levando, por conseguinte, a uma supressão da RIH por baixa concentração de GMP-c (Diagrama 3-d).

Na RIH secundária, quando a enterotoxina foi inoculada 15 minutos antes da dose secundária de HC, os resultados obtidos (Tabela 7), medidos 6 dias após a esta inoculação, mostram que foi muito semelhante ao observado na RIH primária em experimentos realizados em idênticas condições (Tabela 5).

Assim sendo, como se observa no Diagrama 4, conforme já comentamos anteriormente, a ação dos macrófagos ativados sobre o AMP-c, já teria declinado consideravelmente no sexto dia (Diagrama 4-a), por outro lado, o nível de  $H_2O_2$  produzido por estes macrófagos deveria também estar suficientemente baixo, ocasionando um aumento do GMP-c nos linfócitos B (Diagrama 4-c), em níveis compatíveis com o estímulo observado na RIH secundária.

Concomitantemente, poderia ainda estar ocorrendo um aumento do GMP-c nos linfócitos B por uma ação direta da enterotoxina STa (Diagrama 4-b), ocasionando, do mesmo modo, um estímulo na RIH secundária.

Deste modo, quando a enterotoxina foi aplicada 15 minutos antes da primeira dose de HC (Tabela 7), ainda de acordo com o Diagrama 4 podemos supor que no tempo transcorrido entre a primeira e segunda dose de hemácia, até o dia do teste, houve uma ativação de macrófagos com aumento de AMP-c (Diagrama 4-d) e provavelmente uma alta na produção de  $H_2O_2$  (Diagrama 4-e), levando a uma supressão da resposta imune. Após este período de citostase transitória, induzida por macrófagos ativados, a nossa hipótese é de que se sucedeu um período de concentração máxima de GMP-c, induzido

Diagrama 3 - Possíveis mecanismos de ação da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada inoculada 48 horas antes das hemácias de carneiro (HC) em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, na RIH primária.

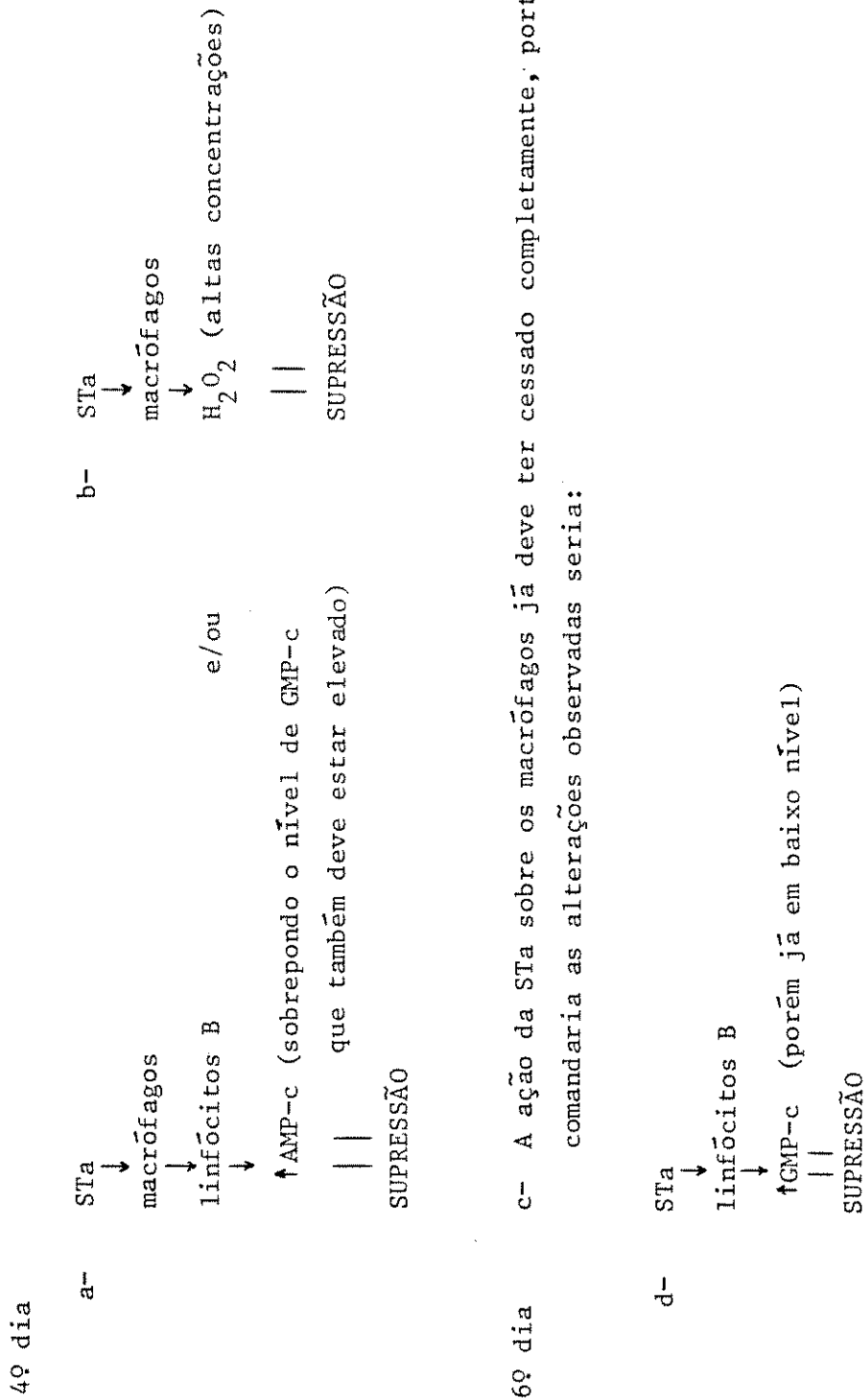
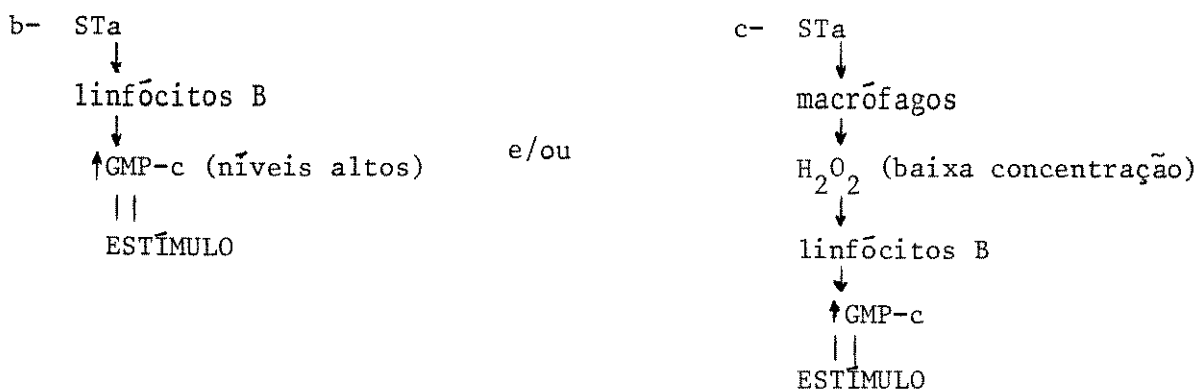


Diagrama 4 - Possíveis mecanismos de ação da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada, inoculada 15 minutos antes da dose primária ou secundária de hemácia de carneiro (HC) em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, na RIH secundária.

15 minutos antes da dose secundária de HC

69 dia-

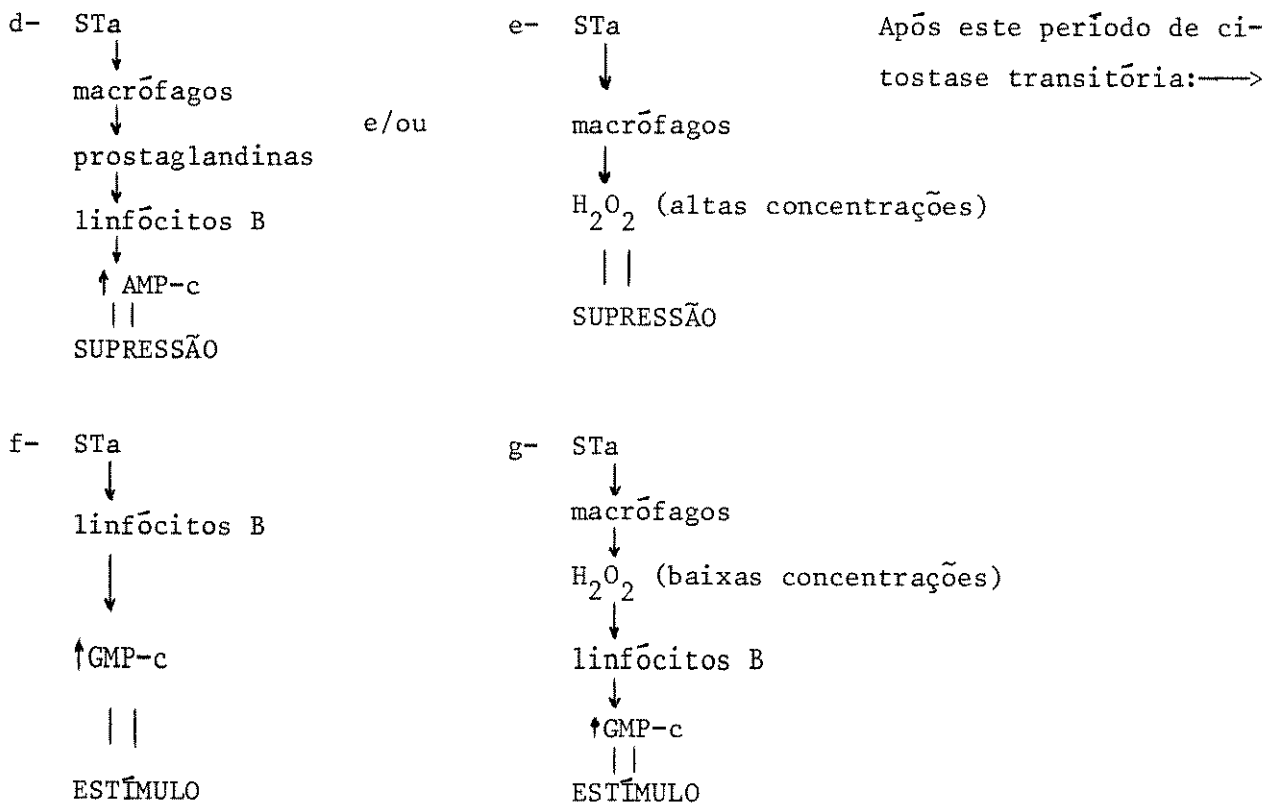
a- A ação da STa sobre os macrófagos (STa → macrófagos → prostaglandina → linfócitos B → AMP-c) já deve ter cessado, voltando ao normal o nível de AMP-c. Portanto, quem comandaria as alterações observadas seria o nível de GMP-c.



15 minutos antes da dose primária de HC

69 dia-

Entre o tempo transcorrido entre a primeira e a segunda dose de HC deve ter havido:



ativação na síntese de células de memória levando a um estímulo na produção de IgM e IgG, seis dias após a dose desencadeante.

pela ação da enterotoxina STa sobre os linfócitos e macrófagos, acarretando um estímulo da RIH a HC, com uma ativação na síntese de células de memória a HC (Diagrama 4-f). Portanto, quando os linfócitos entraram novamente em contacto em este antígeno, por ocasião da dose de reforço, o número de células de memória, nestes animais, era maior que o dos animais contrôles, levando a um aumento no nível de IgM e IgG, medidos respectivamente pelas provas de PFC, direta e indireta.

Quando a enterotoxina STa foi inoculada 48 horas antes da primeira dose de HC (Tabela 8) as hemácias entraram em contacto com os macrófagos no pico de ativação destes (Figura 3).

Que fenômenos podem ter ocorrido após este período durante o tempo transcorrido entre a primeira inoculação das HC e o sexto dia após a segunda inoculação deste antígeno, quando foi feita a reação de PFC?

A nossa suposição, como mostramos no Diagrama 5, é de que, por parte dos macrófagos, não somente uma maior síntese de prostaglandinas como também a de  $H_2O_2$  deve ter ocorrido. As primeiras, aumentariam o AMP-c de linfócitos B, o que provocaria uma inibição na RIH (Diagrama 5-a). Ao passo que o  $H_2O_2$  (Diagrama 5-b), como já vimos anteriormente, em altas concentrações, apresentariam um efeito supressivo para a RIH.

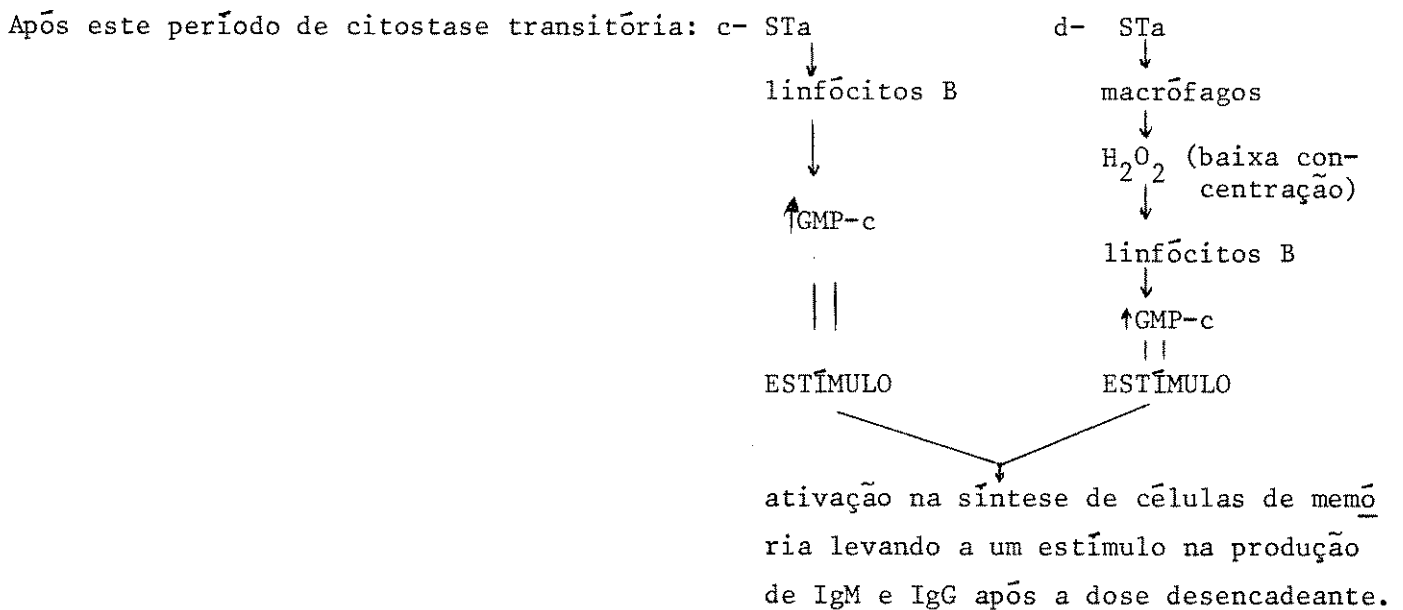
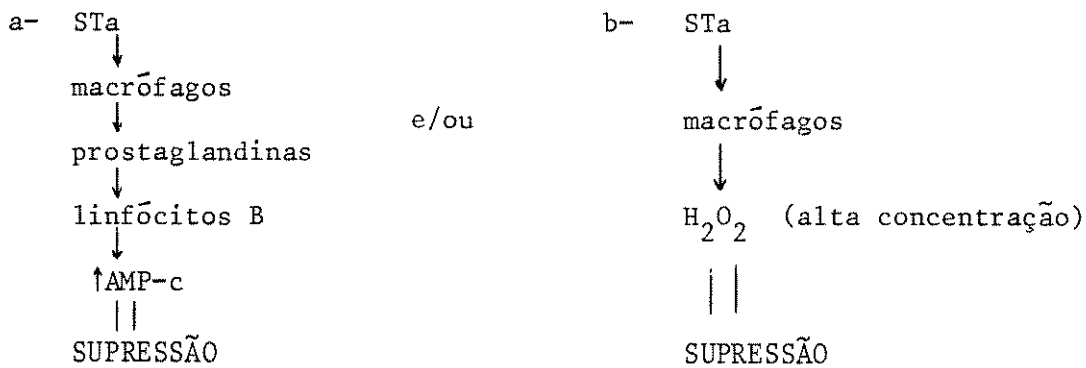
Posteriormente os níveis de prostaglandina e de  $H_2O_2$  cairiam, ocasionando, como efeito residual do baixo nível de  $H_2O_2$  (Diagrama 5-d) um aumento do GMP-c nos linfócitos B, resultando numa facilitação da RIH (Mittal et al, 1977). Esta mesma facilitação da RIH poderia ter ocorrido por uma influência de um alto nível de GMP-c induzido diretamente pela enterotoxina STa sobre os linfócitos B (Diagrama 5-c). Esta facilitação da RIH levaria a uma ativação na síntese de células de memória ocasionando, conseqüentemente, após a exposição à segunda dose de HC, estímulo na RIH secundária, observado no sexto dia após a dose desencadeante.

No que se refere a administração da enterotoxina STa 48 horas antes da dose secundária de HC, os nossos resultados se assemelham aos observados na RIH primária, quando da administração da referida toxina, 48 horas antes da dose única de HC (Tabela 6). Portanto, o que observamos nesta resposta secundária, foi uma depressão, quando o teste de PFC foi realizado seis dias após a administração da dose desencadeante. Neste tempo, Diagrama 5, a ação dos macrófagos sobre os níveis de PFC já deve ter cessado (Diagrama 5-e) e também o nível de GMP-c, por influência direta da enteroto-

Diagrama 5 - Possíveis mecanismos de ação da enterotoxina termo-estável (STa), semi-purificada, inoculada 48 horas antes da dose primária ou secundária de hemácia de carneiro (HC) em camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>, na RIH secundária.

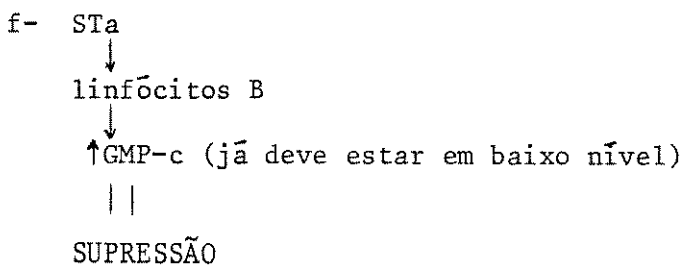
6º dia- 48 horas antes da dose primária

No tempo transcorrido entre a primeira e segunda dose de HC deve ter havido:



6º dia- 48 horas antes da dose secundária

e- A ação da STa sobre os macrófagos já deve ter cessado completamente, portanto quem comandaria as alterações observadas seria:



xina STa sobre os linfócitos B, já deve ter declinado a um nível baixo (Diagrama 5-f), levando a uma depressão da RIH.

As nossas suposições no que diz respeito a admitirmos que a ação dos macrófagos no nível de AMP-c cessa mais rapidamente em relação ao nível de GMP-c (quer por ação destes mesmos macrófagos ativados ou por uma ação direta da enterotoxina STa sobre os linfócitos B) é pelo fato de se ter conhecimento que as manifestações da citostase ocasionada por macrófagos ativados é completamente reversível dentro de 16-24 horas, *in vitro* (Keller, 1980), enquanto que o máximo de estímulo em culturas de células após a adição de GMP-c é dentro de 24-48 horas (Watson, 1975).

Portanto, concluímos, que possivelmente, a RIH a HC, na presença da enterotoxina STa, pode ser influenciada diretamente por esta enterotoxina ou indiretamente através da ativação de macrófagos.

Para verificar se a inoculação da enterotoxina STa em camundongos provocava alguma alteração na atividade fagocitária de macrófagos, utilizamos o teste de depuração do carbono coloidal, (Stiffel et al, 1970). Neste teste a suspensão de carbono coloidal, injetada intravenosamente é incapaz de atravessar as paredes dos vasos sanguíneos (Benacerraff et al, 1957; Biozzi and Stiffel, 1963), sendo então as partículas coloidais, fagocitadas somente pelos macrófagos circulantes sem a intervenção de fatores humorais (Biozzi et al, 1963a).

Em nossos experimentos, verificamos que a inoculação da enterotoxina STa semipurificada, causou um estímulo na depuração do carbono coloidal. Este estímulo na depuração do carbono coloidal pode ter sido devido a uma ação da enterotoxina STa, na proliferação de macrófagos, já que se tem observado que a ativação de macrófagos está associada a proliferação aumentada no número destas células localizadas no baço (Stuart, 1963; Biozzi et al, 1963b) sendo este fenômeno acompanhado de síntese de DNA (Kelly et al, 1962). Embora não tenhamos realizado contagem de macrófagos no baço dos animais inoculados com a enterotoxina STa, é importante lembrarmos, que houve uma esplenomegalia significativa destes animais em relação aos animais contrôles (Tabela 4).

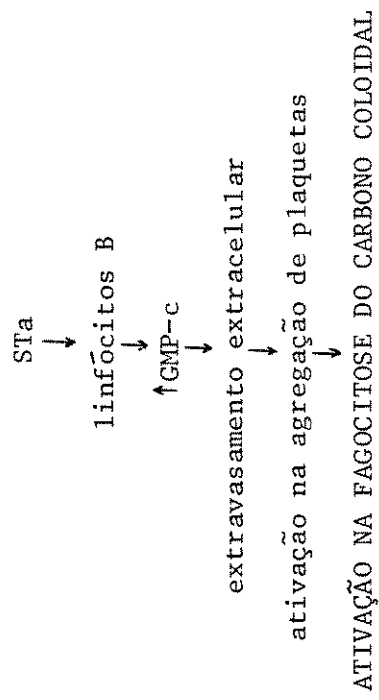
Uma outra hipótese seria, como mostra o Diagrama 6, que o GMP-c aumentado por efeito da enterotoxina STa, de acordo com a teoria Yin-Yang, teria um efeito contrário ao do AMP-c, estimulando a agregação de plaquetas e por conseguinte, aumentando a depuração de carbono coloidal. Para esta hipótese, embora elegante, teríamos

Diagrama 6 - Depuração do carbono coloidal sobre a influência da enterotoxina termo-estável (STa), semipurificada, e possíveis interrelações com variações dos níveis de GMP-c nos linfócitos B.

Relembrando que:

- Agregação de plaquetas estimula a fagocitose do carbono coloidal  
 - AMP-c  $\longrightarrow$  inibe a agregação de plaquetas  $\xrightarrow{\cdot}$  inibe a fagocitose de carbono coloidal

Segundo a teoria Yin-Yang, teríamos:





que admitir, entretanto, que somente o GMP-c localizado intracelularmente, nos linfócitos ativados, extravasaria para o espaço extracelular, a fim de entrar em contato com as plaquetas, baseado no trabalho de Van Aken et al (1970), citado anteriormente.

Todos os experimentos levados a efeito com a enterotoxina STa semipurificada, autoclavada, demonstraram que o desaparecimento da atividade biológica da mesma após este tratamento corria em paralelo com a incapacidade da enterotoxina causar qualquer influência na resposta imune primária e secundária a HC (Tabelas 5,6,7,8). Fenômeno idêntico foi observado nos experimentos relativos a depuração do carbono coloidal (Tabela 10).

A enterotoxina STa não interferiu na hipersensibilidade tardia ao DNFB, sugerindo que as células T não sofrem influência desta enterotoxina (Tabela 9).

Por não ter sido possível avaliarmos os níveis de prostaglandina,  $H_2O_2$ , AMP-c, GMP-c, nas diferentes etapas de nossos experimentos, não podemos assegurar qual seria realmente a razão das alterações observadas. Mas também é preciso lembrar que muitos fenômenos imunológicos relacionados ao aumento de GMP-c e AMP-c tem sido alvo de relatos conflitantes, provavelmente devidos a diferentes efeitos sobre diferentes tipos de células (O'Brien et al, 1978).

De qualquer modo, embora reconhecendo os nossos dados como preliminares, eles são sugestivos de que realmente ocorre um efeito da enterotoxina STa na RI e é importante que estes estudos tenham continuidade com preparados mais purificados de STa. Em nossa opinião a ação da enterotoxina STa semipurificada na RI foi relevante, fato a ser considerado em termos de atividade biológica desta enterotoxina, que até o presente somente se restringia a capacidade de dilatar alças ligadas, experimentalmente, de animais sensíveis (Gyles et al, 1967); Smith et al, 1967; Gyles et al, 1971) ao teste do CRN (Dean et al, 1973) e, mais recentemente, a um maior influxo de cálcio e aumento de GMP-c em células basófilas leucêmicas de rato (Knoop et al, 1983) e em outros cultivos celulares (Inoue et al, 1983).

Por outro lado, como decorrência de nossas observações, achamos que a enterotoxina STa poderia se constituir em um importante material para estudos de fenômenos imunológicos, a semelhança do que se tem feito em relação a toxina colérica.

## RESUMO E CONCLUSÕES

A enterotoxina termoestável (STa) de Escherichia coli, extraída de uma amostra de origem humana (sorogrupo O128), semipurificada de acordo com Ricci et al (1982), foi estudada quanto a sua capacidade de interferir na Resposta Imune Humoral (RIH), Resposta Imune Mediada por Células (RIC) e na capacidade fagocitária dos macrófagos, de camundongos (CBA x C<sub>57</sub>B1/10)F<sub>1</sub>.

Para análise de nossos resultados nos baseamos nos seguintes resultados e hipóteses:

- 1 - A enterotoxina STa ativa a guanil-ciclase levando a um aumento no nível de GMP-c nos linfócitos B (Field et al, 1978; Hugles et al, 1978; Guerrant et al, 1980). Quando o estímulo fosse suficiente para causar apenas um ligeiro aumento de GMP-c, ocorreria uma supressão na RIH, ao passo que, quando o estímulo resultasse em altos níveis de GMP-c levaria a uma ativação na RIH, de acordo com a teoria Yin-Yang (Goldberg et al, 1973) e baseado no trabalho de Chisari et al (1974).
- 2 - A enterotoxina STa agiria sobre os macrófagos do sistema imune dos animais imunizados. Os macrófagos em tal estado de ativação produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Finazzi-Agro et al, 1980), que em baixa concentração aumentam o GMP-c dos linfócitos B (Mittal et al, 1977; White et al, 1976), levando a um estímulo na RIH, ao passo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações muito maiores tem um efeito inibitório sobre a mesma (Mittal et al, 1977).
- 3 - Os macrófagos ativados pela enterotoxina STa poderiam ter ainda um efeito sobre a RIH, devido a liberação de prostaglandina por estas células, que ocasionaria um aumento de AMP-c nos linfócitos B (Godwin, 1978) levando a uma supressão da RIH.
- 4 - A agregação de plaquetas estimula a fagocitose das partículas de carbono coloidal (Van Aken et al, 1968), fenômeno este que sofre uma inibição a medida que aumenta o AMP-c extracelular (Born and Cross, 1963; Regoli and Clark, 1963) em contacto com as plaquetas. Levando-se em consideração a teoria Yin-Yang (o AMP-c

e GMP-c teriam efeitos contrários), a ação da enterotoxina STa sobre os linfócitos B provocaria um aumento do GMP-c nestas células que extravasando para o exterior das mesmas levaria a um maior estímulo na agregação de plaquetas, aumentando, portanto, a fagocitose das partículas de carbono coloidal pelos macrófagos.

Portanto, com base nestes dados e hipóteses, os nossos resultados foram assim interpretados:

#### I - Resposta Imune Humoral Primária - STa 15 minutos antes da HC

No quarto dia após a imunização com HC, houve uma supressão da RIH que poderia ser devido:

- a - a ação da STa, sobre os linfócitos B levando a um estímulo, ainda baixo, no nível de GMP-c e/ou
- b - a enterotoxina STa agiria sobre os macrófagos levando a uma alta produção de  $H_2O_2$  que ocasionaria a supressão da RIH e/ou
- c - a enterotoxina STa agiria sobre os macrófagos levando a síntese de prostaglandina, a qual agiria sobre os linfócitos B levando a um aumento no nível de AMP-c, ocasionando a supressão da RIH.

No sexto dia após a imunização dos animais com a HC, houve um estímulo na RIH, o qual poderíamos explicar, por acreditarmos que neste tempo a ação da STa sobre os macrófagos, que é transitória, já deve ter cessado em relação a produção de prostaglandina, e, por outro lado, o nível de AMP-c já deve ter voltado ao seu normal. Portanto, quem comandaria as alterações na RIH seria o GMP-c:

- a - seja por ação direta da STa sobre os linfócitos B levando a um aumento, com altos níveis deste nucleotídeo, que ocasionaria um estímulo na RIH e/ou
- b - a enterotoxina STa estaria agindo sobre os macrófagos os quais estariam liberando  $H_2O_2$ , porém, já em baixo nível, o que induziria a liberação de GMP-c pelos linfócitos B, levando a um estímulo na RIH.

## II - Resposta Imune Humoral Primária - STa 48 horas antes da HC

No quarto dia após a inoculação da HC houve uma supressão na RIH, sugerindo:

- a - quando a HC foi inoculada, coincidiu com o pico de ativação dos macrófagos e consequentemente com o AMP-c bastante elevado sobrepondo-se provavelmente ao do GMP-c.
- b - a enterotoxina STa agiria sobre os macrófagos o qual liberaria  $H_2O_2$  em grandes quantidades levando a uma supressão da RIH.

No sexto dia após a inoculação da HC a supressão da RIH continuou, levando-nos a admitir que:

- a - a ação da enterotoxina STa sobre os macrófagos já deva ter cessado.
- b - portanto, quem comandaria as alterações na RIH seria, a ação da STa diretamente sobre os linfócitos B, com aumento do GMP-c, que também já deve estar em baixo nível, levando a uma supressão na RIH.

## III - Resposta Imune Humoral Secundária - (RIHS)

A - 15 minutos antes da dose secundária de HC.

No sexto dia após a dose desencadeante de HC houve um estímulo na RIHS, sugerindo, com base nos dados já apontados, as seguintes hipóteses:

- a - a ação da enterotoxina STa sobre os macrófagos, levando a produção de prostaglandina já deve ter cessado, voltando o AMP-c a níveis normais. Portanto, quem comandaria as alterações ocorridas na RIHS seriam os níveis de GMP-c, que poderiam estar alterados por:
  - 1 - a enterotoxina STa agiria sobre os linfócitos B levando a um aumento do GMP-c em altos níveis, o que ocasionaria um estímulo na RIHS e/ou
  - 2 - a enterotoxina STa agiria sobre os macrófagos levando a produção de  $H_2O_2$ , em baixos níveis, que agindo sobre os linfócitos B aumentaria o

nível de GMP-c, ocasionando um estímulo na RIHS.

B - STa 15 minutos antes da dose primária de HC.

No tempo transcorrido entre a primeira e a segunda dose de HC deve ter havido uma ativação de macrófagos com aumento de AMP-c e provavelmente uma alta produção de  $H_2O_2$ , levando a uma supressão da resposta imune.

Após este período de citostase transitória, induzido por macrófagos ativados, a nossa hipótese é de que se sucedeu um período de concentração máxima de GMP-c induzido por:

a - a ação da STa diretamente sobre os linfócitos B, produzindo um aumento no nível de GMP-c e/ou

b - a STa estaria agindo sobre os macrófagos, nesta fase, produzindo baixos níveis de  $H_2O_2$ , o que levaria a liberação de GMP-c pelos linfócitos B.

O aumento de GMP-c levaria a uma ativação na resposta imune, acompanhada de estímulo na síntese de células de memória a HC. Portanto, quando os linfócitos entram novamente em contato com este antígeno, por ocasião da dose de reforço, o número de células de memória, nesses animais, era maior que nos controles, ocasionando um estímulo na RIHS, quando avaliada 6 dias após a dose desencadeante.

#### IV - Resposta Imune Humoral Secundária (RIHS)

A - STa 48 horas antes da dose primária de HC.

Neste intervalo de tempo, quando a HC foi inoculada pela primeira vez, ela entrou no pico de ativação dos macrófagos, portanto, deveria estar ocorrendo um estímulo na síntese de AMP-c pelos linfócitos B com a liberação de prostaglandina e altas concentrações de  $H_2O_2$  por estes macrófagos ativados, os quais provocariam uma inibição na resposta imune. Posteriormente, os níveis destas substâncias caíam e teríamos uma facilitação na resposta imune por:

a - efeito residual pelo baixo nível de  $H_2O_2$ , aumentando o GMP-c dos linfócitos B e/ou

b - ação da enterotoxina STa diretamente sobre os linfócitos B, levando a um aumento no nível de GMP-c.

Esta facilitação da resposta imune ocasionaria uma ativação na síntese de células de memória, produzindo, conseqüentemente, após a exposição à segunda dose de HC, um estímulo na RIH secundária, observado no sexto dia após a dose desencadeante.

B - STa 48 horas antes da dose secundária de HC.

No sexto dia após a dose desencadeante, a ação da STa sobre os macrófagos já deve ter cessado e quem comandaria as alterações observadas na RIHS seria a ação direta da enterotoxina STa sobre os linfócitos B, levando a um aumento de GMP-c, que, porém, também já deve estar em baixos níveis, ocasionando, deste modo, uma depressão na RIHS.

V - Depuração do carbono coloidal.

Houve uma ativação na fagocitose do carbono coloidal pelos macrófagos, na presença da enterotoxina STa, o que sugere:

a - a STa agindo sobre os linfócitos B, aumentariam o nível de GMP-c, o qual extravasaria destas células, ativando a agregação de plaquetas o que levaria a uma ativação na fagocitose do carbono coloidal.

VI - Resposta Celular - Hipersensibilidade Tardia (DTH) ao Dinitrofluorbenzeno (DNFB).

No que diz respeito a resposta celular, não encontramos nenhum efeito aparente, quando esta foi analisada em camundongos (CBA x  $C_{57}B1/10$ ) $F_1$ , inoculados com a enterotoxina STa semipurificada, levando-nos a excluir a possibilidade de linfócitos T estarem influenciando nas alterações observadas em nossos experimentos.

VII - As experiências realizadas com a enterotoxina STa semipurificada, autoclavada, a qual perdeu sua atividade tóxica em virtude deste tratamento, conforme comprovamos em resultados do teste do CRN, não apresentou nenhuma alteração na resposta imune dos camundongos inoculados com a toxina inativa, apresentando resultados semelhantes aos dos animais controles normais utilizados em cada experimento, que foram inoculados apenas com meio de CAYE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AKEN, W.G. van; GOOTE Th. M & VREEKEN J. - Platelet agregation: an intermediary mechanism in carbon clearance. *Scand. J. Haemat.*, 5: 333-, 1968.
- 2 - ALDERETE, J.F.' & ROBERTSON, D.C. - Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strain of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 19: 1021-1030, 1978.
- 3 - BANWELL, J.G. & SHERRY, H. - Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 65: 467-497, 1973.
- 4 - BENACERRAF, B.; BIOZZI, G.; HALPERN, B. & STIFFEL, C. - Physiology of phagocytosis of particles by the RES. In: *Physiopathology of the RES.* (Ed). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 52, 1957.
- 5 - BIOZZI, G.; BENACERRAF, B.; GRUMBACH, F.; HALPERN, B.; LEVADITI, J. & RIST, N. Etude de l'activite granulopexique du SRE au cours de l'infection tuberculeuse experimentale de la souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 87: 291, 1954.
- 6 - BIOZZI, G. & STIFFEL, C. - Etude du role opsonines dans le phenomene de phagocytose des microorganismes et des colloides par les cellules du SRE. Dans *l'Immunité Antibactérienne et Antitumorale.* (Ed.). C.N.R.S., Paris, 261, 1963a.
- 7 - BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; HALPERN, B. & MOUNTON D. - Lack of action of serum opsonins in phagocytosis on inert particles by cells of RES. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112, 1017, 1963b.
- 8 - BIOZZI, G.; STIFFEL, C. & MOUNTON, D. - Stimulation et dépression de la fonction phagocytaire du SRE par des émulsion de lipides. Relations avec quelques phénomènes immunologiques. *Rev. Franç. Et. Clin. & Biol.*, 8, 341, 1963c.



- 9 - BORN, G. V. R. & CROSS, M. - Effect of ADP on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature (London)*, 197, 974, 1963.
- 10 - BOURNE, H. R.; LICHENSTEIN, L.M. and MELMON, K. L. - Pharmacologic control of allergic histamine release in vitro: Evidence for an inhibitory role of 3' - 5' adenosine monophosphate in human leukocytes. *J. Immunol.* 108: 695, 1972.
- 11 - BURROWS, W.; KOUR, J; and CERCAVSKI, L. - Discussion: the cholera enterotoxin and local immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176: 323-329, 1971.
- 12 - BURROWS, W; and MUSTEIKIS, G. M. - Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop. *J. Infect. Dis.*, 116: 183-190, 1966.
- 13 - CARPENTER, C.C.J. Jr. - Cholera enterotoxin - recent investigations yield insights into transport processes. *Am. J. Med.*, 50: 1 - 7, 1971.
- 14 - CHISARI, F. V. and NORTHRUP, R. S. - Pathophysiologic effect of lethal and immunoregulatory doses of cholera enterotoxin in the mouse. *J. Immunol.*, 113: 740 - 749, 1974.
- 15 - CHISARI, F. V.; NORTHRUP, R.S. and CHEN, L.C. - The modulation effect of cholera enterotoxin on the immune response. *J. Immunol.*, 113: 729 - 739, 1974.
- 16 - CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J. and FINKELSTEIN, R.A. - Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 29: 91 - 97, 1980.
- 17 - CORSINI, A. C.; BELLUCI, S. B. & COSTA, M. G. - A simple method of evaluating delayed type hypersensitivity in mice. *J. Immunol. Methods*, 30: 195 - 200, 1979.
- 18 - CORSINI, A. C. & COSTA, M. G. - Immunossuppression in mice infected with Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). II - Trypomastigote crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*,

23(3): 122 - 126, 1981.

- 19 - CRAIG, J.P. - A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrate and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature (London)* 207: 614 - 616, 1965.
- 20 - DEAN, A. G.; CHING, Y. C.; WILLIAMS, R. G. and HARDEN, L.B. - Test for Escherichia coli enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125: 407 - 411, 1973.
- 21 - DONIA, S.T. - Differentiation between the steroidogenic effect of cholera enterotoxin and adrenocorticotropin through use of a mutant adrenal cell line. *J. Infect. Dis.*, 129: 728 - 731, 1974.
- 22 - DORNER, F.; JAKSCHE, H. and STOCKL, W. - Escherichia coli enterotoxin: purification, partial characterization, and immunological observations. *J. Infect. Dis. Suppl.*, 133: S142 - S156, 1976.
- 23 - DRESSER, D.W. - Assays for immunoglobulin-secreting cell. In: WEIR, D.M., ed. *Handbook of experimental immunology*. Oxford Blackwell Scientific Publications, p. 28-1-28, 25, 1978.
- 24 - EVANS, D.G.; EVANS, D.J. Jr. and GORBACH, S. L. - Identification of enterotoxigenic Escherichia coli and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Infect. Immun.*, 8: 731 - 735, 1973.
- 25 - EVANS, D. J. Jr.; EVANS, D. G. and GORBACH, S. L. - Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. *Infect. Immun.*, 8: 725 - 730, 1973.
- 26 - EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G.; RICHARDSON, S.H. and GORBACH, S.L. - Purification of polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Infect. Dis. Suppl.*, 133: S97 - S102, 1976.

- 27 - EVANS, D. J. Jr., and EVANS, D. G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16: 604 - 609, 1977.
- 28 - FELDMANN, M.R. and ERB, P. - Macrophage-lymphocyte interactions in immune inductions. *Inst. Rev. Cytol.*, 60: 149, 1979.
- 29 - FIELD, M. - Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. *N. Engl. J. Med.*, 284: 1137 - 1144, 1971.
- 30 - FIELD, M.; GRAF, J. H. Jr.; LAIRD, W. J. and SMITH, P. L. - Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: In vitro effect on guanylate-cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 2800 - 2804, 1978.
- 31 - FINAZZI-AGRO, A.; CONTI, P.; HOFFMANN, M.; ANGELETTI, P.V. and ROTILIO, G. - Activation of lymphocytes by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In: *Trends in Inflammation. Research I*, Edited by G.P. Velo, pp. 220 - 223, 1980.
- 32 - FRANCESCHI, A.P.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; SERAFIM, M. B. and PUSTIGLIONE, L. Neto - Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por Escherichia coli. *Rev. Microb. (S. Paulo)*, 8: 123-128, 1977.
- 33 - GIANELLA, R. A. & DRAKE, K. W. - Effect of purified Escherichia coli heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. *Infect. Immun.*, 24: 19 - 23, 1979.
- 34 - GILL, D. M.; EVANS, D. J. Jr.; EVANS, D. G. - Mechanism of activation of adenylate cyclase in vitro by polymyxin-released heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. *J. Infect. Dis. Suppl.*, 133: S103 - S107, 1976.

- 35 - GOLDBERG, N. D.; HADDOX, M. K.; HARTLE, D. K.; HADDEN, J. W. - The biological role of cyclic 3' - 5' - guanosine monophosphate. In: Proceedings of the Fifth International Congress on Pharmacology, Basel, Karger, 5: 146 - 169, 1973.
- 36 - GOLDBERG, N. D.; HADDOX, M. K.; DUNHAM, E.; LOPEZ, C.; HADDEN, J. W. - The Yin-Yang hypothesis of biological control: opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP in the regulation of cell proliferation and others biological processes. In: Clarkson B., Besrega R. (eds): The Cold Spring Harbor Symposium on the regulation of proliferation in animal cells. New York Academic Press, pp. 609 - 625, 1974.
- 37 - GOODWIN, J. S.; MESSNER, R. P. and PEAKE, G. T. - Prostaglandin supression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. J. Clin. Invest., 62: 753-760, 1978.
- 38 - GRAIG, L. C. - Fractionation and characterization by dialisys. Analitical Methods of Protein Chemistry. Eds. Alexander, B. & Brock, R. J. , Bergamon Press. 103, 1960.
- 39 - GREENBERG, R. N.; MURAD, F.; CHANG, B.; ROBERTSON, D. C. and GUERRANT, L. - Inhibition of Escherichia coli heat-stable enterotoxin by indomethacin and chlorpromazine. Infect. Immun., 29: 908 - 913, 1980.
- 40 - GREENBERG, R. N. and GUERRANT, R. L. - E. coli heat-stable enterotoxin. Pharmac. Ther., 13: 507 - 531, 1981.
- 41 - GREENBERG, R. N.; MURAD, F.; and GUERRANT, R. L. - Lanthanum choride inhibition of the secretory response to Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 35: 483 - 488, 1982.
- 42 - GUERRANT, R. L.; BRUNTON, L. L.; SCHNAITMAN, T. C.; REBHUN, L. I. and GILMAN, A. G. - Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary morphology a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxin of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun., 10: 320 - 327, 1974.

- 43 - GUERRANT, R. L.; HUGLES, J. M.; CHANG, B.; ROBERTSON, D. C.; and MURAD, F. -  
Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of  
Escherichia coli: studies of tissue specificity, potential receptors and  
intermediates. J. Infect. Dis., 142: 220 - 228, 1980.
- 44 - GUINEE, P. A. M.; AGTERBERG, C. M.; JANSEN, W. H.; and FRIK, J. F. -  
Serological identification of pig enterotoxigenic Escherichia coli strains not  
belonging to the classical serotypes. Infect. Immun., 15: 549 - 555, 1977.
- 45 - GYLES, C. L. - Discussion: heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin  
from Escherichia coli strains enteropathogenic for pigs. Ann. N. Y. Acad. Sci.,  
176: 314 - 322, 1971.
- 46 - GYLES; C. L. - Limitations of the infant mouse test for Escherichia coli  
heat-stable enterotoxin. Can. J. Compar. Med., 43: 371 - 379, 1979.
- 47 - GYLES; C. L. and BARNUN, D. A. - Escherichia coli in ligated segments of pig  
intestine. J. Path. Bact., 94: 189 - 194, 1967.
- 48 - HILL, H. R.; ESTENSEN, R. D.; QUIE, P. G.; HOGAN, N. A. and GOLDBERG, N. D. -  
Modulation of human neutrophil chemotactic response by cyclic 3', 5'-guanosine  
monophosphate and cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. Metabolism.,  
24: 447 - 456, 1975.
- 49 - HENNEY; C. S.; LICHTENSTEIN, L. M.; GILLESPIE, E. and ROLLEY, R. T. - In vivo  
suppression of the immune response to alloantigen by cholera enterotoxin.  
J. Clin. Invest., 52: 2853, 1973.
- 50 - HENNEY, C. S.; BOURNE, H. R. and LICHTENSTEIN, L. M. - The role of cyclic  
3'- 5' adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes.  
J. Immunol., 108: 1526, 1972.

- 51 - HONDA, T.; TSEYI, T.; TAKEDA, Y. and MIWATANI, T. - Immunological non-identity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun., 34: 337 - 340, 1981.
- 52 - HUBERT, C.; DELESPESE, G. and GOVAERTS, A. - Concanavalin-A activated supressor cells in normal human peripheral blood lymphocytes. Clin. Exp. Immunol., 26: 95 - 98, 1976.
- 53 - HUGLES; J. M.; MURAD, F.; CHANG, B. and Guerrant, R. L. - Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Nature, 271(5647): 755 - 756, 1978.
- 54 - INOUE, T.; OKAMOTO, K.; MORIYAMA, T.; TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, K.; MIYAMA, A. - Effect of Yersinia enterocolitica ST on cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. Microbio. Immunol., 27(2): 159 - 166, 1983.
- 55 - JACKS, T. M. & WU, B. J. - Biochemical properties of Escherichia coli low-molecular weight heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 9: 342 - 347, 1974.
- 56 - JERNE, N. K. - Towards a network theory of the immune. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 125C: 373 - 389, 1974.
- 57 - KELLER, R. - Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells in vitro by nonspecifically activated macrophages. J. Exp. Med., 138, 625 - 644, 1973.
- 58 - KELLER, R. - Major changes in lymphocytes proliferation evoked by activated macrophages. Cell. Immunol., 17: 542 - 551, 1975.
- 59 - KELLER, R. - Mononuclear phagocytes and antitumor resistance: a discussion in: The macrophage and cancer (Eds. K. James, W. H. MC Bride and A. Stuart, Econoprint. Edinburgh, pp 31 - 48, 1977).

- 60 - KELLER, R. - Regulatory functions of macrophages. In: Trends in Inflammation, Research I, Ed. by G. P. Velo, pp. 90 - 99, 1980.
- 61 - KELLY, L. S.; BROWN, B. A. & Dobson, E. L. - Cell division and phagocytic activity in liver reticuloendothelial cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110: 555, 1962.
- 62 - KLIPSTEIN, F. A.; LEE, C. S. & ENGERT, R. F. - Assay of Escherichia coli enterotoxins by in vivo perfusion in the rat jejunum. Infect. Immun., 14: 1004 - 1010, 1976.
- 63 - KNOOP, F. C. and THOMAS, D. D. - Stimulation of calcium uptake and cyclic GMP synthesis in rat basophilic leukemic cells by Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 41: 971 - 977, 1983.
- 64 - LICHTENSTEIN, L. M. - The role of cyclic AMP in inhibiting the IgE-mediated release of histamine. Ann. N. Y. Acad. Sci., 185: 403, 1971.
- 65 - LICHTENSTEIN, L. M.; HENNEY, C. S.; BOURNE, H. R. and GREENOUGH, W. B. - Effects of cholera toxin on in vivo models of immediate and delayed hypersensitivity. J. Clin. Invest., 52: 691, 1973.
- 66 - MAC MANUS, J. P. & WHITFIELD, J. F. - Stimulation of desoxyribonucleic acid synthesis and mitotic activity of thimic lymphocytes by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. Exp. Cell. Res., 58: 188, 1969.
- 67 - MITTAL, C. K. and MURAD, F. - Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radicals: a physiological regulator of guanosine 3'- 5' monophosphate formation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74: 4360 - 4364, 1977.
- 68 - MOON, H. W.; WHIPP, S. C. and SKARVEDT, S. M. - Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves: frequencies and methods for detecting enterotoxin and K99

- antigen production by Escherichia coli. *Am. J. Vet. Res.*, 37: 1025-1029, 1976.
- 69 - MOSELEY, S.L.; JONATHAN, W. H.; HUG, I. M.; ECHEVERRIA, P. and FALKOW, S. - Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 39: 1167 - 1174, 1983.
- 70 - MOSIER, D. E. - A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science*, 158: 1573, 1967.
- 71 - MULLAN, N. A.; BURGESS, M. N. & NEWSOME, P. M. - Characterization of a partially purified methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice. *Infect. Immun.*, 19: 779 - 784, 1978.
- 72 - MYERS, L. L. and GUINEÉ, P. A. M. - Occurrence and characteristics of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from calves with diarrhea. *Infect Immun.*, 13: 1117 - 1119, 1976.
- 73 - NELSON, D. S. - Production by stimulated macrophages of factors depressing lymphocyte transformations. *Nature (London)* 246: 306 - 307, 1973.
- 74 - NORTHROP, R. S. and FAUCI, A. S. - Adjuvant effect of cholera enterotoxin on the immune response of the mouse to sheep red blood cells. *J. Infect. Dis.*, 125: 672, 1972.
- 75 - NOWELL, D. C. - Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 20: 462 - 466, 1960.
- 76 - O'BRIEN, R. L.; PARKER, I. W. and DIXON, J. F. P. - Mechanisms of lymphocytes transformation. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Editor F. E. Hahn, Edited by Springer Verlag, Heidelberg, pp: 201 - 270, 1978.
- 77 - PALMER, D. L. and ZAMAN, S. N. - Depression of cell mediated immunity (CMI) in acute diarrhea. *Infect. Immun.*, 23: 27 - 30, 1979.



- 78 - PANAYI, G. S. - Human Supressor Cells. In: Trends in Inflammation, Research I, Edited by G. P. Velo, pp: 121 - 125, 1980.
- 79 - PIERCE, N. F.; GREENOUGH, W. B. and CARPENTER, C. C. - Vibrio cholerae enterotoxin and its mode of action. J. Bacteriol. Rev., 35: 1, 1971.
- 80 - PIERCE, N. F.; TADAKUMA, T.; PEARY, D. L. - In: Supressor cells in immunity. (Ed.) S. K. Singhal, N. R. S. Sinclair, pp: 115 - 126; Intern. Symp. London, Ontario: University of Western Ontario Press, 1975.
- 81 - REGOLI, D. & CLARK U. - Prevention by adenosine of the effect of adenosine diphosphate on the concentration of circulating platetes, Nature (London), 197: 974, 1963.
- 82 - RICCI, L. C.; PESTANA DE CASTRO, A. F. & RANGEL, H. A. - Purificação da enterotoxina termo-estável (ST) de Escherichia coli. Rev. Microbiol., 13(4): 359 - 366, 1982.
- 83 - RICHARDS, K. L. and DOUGLAS, S. D. - Pathophysiological effects of Vibrio cholerae and Escherichia coli on eucaryotic cells. Microbiological Review, 42: 592 - 613, 1978.
- 84 - RINEHART, J. J.; ORSER, M.; and KAPLAN, M. E. - Human monocyte and macrophage. Modulation of lymphocyte proliferation. Cell. Immunol., 44: 131 - 143, 1979.
- 85 - RUDLAND, P. S.; GOSPODAROWICZ, D. and SEIFERT, W. - Activation of guanyl cyclase and intracelular cyclic GMP by fibroblast growth factor, Nature (London), 250: 741, 1974.
- 86 - SACK, R. B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 35: 333 - 353, 1975.

- 87 - SERAFIM, M. B.; CASTRO, A. F. P. de; REIS, M. H. L. dos; and TRABULSI, L. R. - Passive immune hemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 24: 606 - 610, 1979.
- 88 - SIMÕES, M. O.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; SERAFIM, M. B. e PORTUGAL, M. A. S. C.- Produção de enterotoxina e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia. *Rev. Microbiol. S. Paulo*, 13: 135 - 142, 1982.
- 89 - SMITH, H. W. & HALLS, S. - Studies on Escherichia coli enterotoxin. *J. Path. Bact.*, 93: 513 - 543, 1967.
- 90 - SMITH, H. W. - Neonatal Escherichia coli infections in domestics mammals transmissibility of pathogenic characteristics. *Ciba Foundation Symposium*, 45: 72, 1976.
- 91 - SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. and KONOWALCHUK, S. - Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with VERO cells. *Infect. Immun.*, 16: 617 - 622, 1977.
- 92 - STAPLES, S. J. & GIANELLA, R. A. - Production and purification of human Escherichia coli heat-stable enterotoxin. In: *Proceedings of the 15Th. Joint Conference of Cholera*. National Institutes of Health Bethesda, Md.: 127-141, 1979.
- 93 - STEPHEN, J. and PIETROWSKI, R. A. - *Bacterial Toxins*. Edited by: Thomas Nelson and Sons LTD., England, 104p, 1981.
- 94 - STIFFEL, C.; MOUNTON, D. and BIOZZI, G. - Kinetics of the phagocytic function of reticuloendothelial macrophages in vivo. In: *Mononuclear Phagocytes*, Edited by: Ralph van Furth, 1970.
- 95 - STUART, A. E. - Structural and functional effects of lipids on the RES. In: *Role du SRE dans l'immunité antibactérienne et antitumorale*. (Ed.) C.N.R.S. Paris, 1963.

- 96 - TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMAMOTO, K. & MIWATANI, T. - Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli.
- 97 - VADAS, M. S.; MILLER, J. F. A. P.; GAMBLE, J. & WHETELAW, A. - A radioisotopic method to measure delayed-type hypersensitivity in the mouse. In: Studies in sensitized and normal mice. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 49: 670 - 692, 1975.
- 98 - WATSON, J.; EPSTEIN, R. & COHN, M. - Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen-sensitive cells. Nature (London), 246: 405, 1973.
- 99 - WATSON, J. - Cyclic nucleotides as intracellular mediators of B cell activation. Transplant. Rev., 23: 223 - 249, 1975a.
- 100 - WATSON, J. - The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. J. Exp. Med., 141: 97, 1975b.
- 101 - WENCHURCH, R.; ISHIZUKA, M.; WEBB, D. and BROWN, W. - Adenyl cyclase activity of spleen cells exposed to immuno-enhancing synthetic oligo - and polynucleotides. J. Immun., 106: 1399, 1971.
- 102 - WHIPP, S. C.; MOORE, H. W. and ARGENZIO, R. A. - Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and 2 Escherichia coli of swine origin. Infect. Immun., 31: 245 - 351, 1981.
- 103 - WHITE, A. A.; CRAWFORD, K. M.; PATT, C. S. and LAD, P. J. - Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., 251: 7304 - 7312, 1976.

104 - WIENER, E. and BANDIERI, A. - Differences in antigen handling by peritoneal macrophages from the Biozzi high and low responder lines of mice. Eur. J. Immunol., 4: 457 - 463, 1974.