

Modelo murino de tolerância oral: inibição da resposta de hipersensibilidade do tipo I a ácaros de poeira domiciliar (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

*Induction of regulatory cytokines in oral tolerance to *Dermatophagoides pteronyssinus* extract in a murine model of type I hypersensitivity*

Maria N. Sato, Anderson F. Carvalho, Andréia A. O. Silva, Milton Maciel Jr., Ana E. Fusaro, Alberto J. S. Duarte

Resumo

Objetivo: A capacidade de modular a função Th2, através do protocolo de administração oral com antígeno foi investigada em modelo murino de hipersensibilidade do tipo I a ácaros de poeira domiciliar (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p).

Métodos: Camundongos AS/n foram imunizados com extrato de Der p-hidróxido de alumínio e administrados pela via intra-gástrica com 0,25, 1,0, 4,0 ou 10,0 mg de Der p ou tampão fosfato, dividido em três dias. Após dois reforços antigênicos, os soros dos animais foram avaliados quanto a presença de anticorpos IgE específicos por reação de anafilaxia cutânea passiva e de subclasses de anticorpos IgG e IgE total por Eli-sa. As células esplênicas secretoras de anticorpos IgE e IgG1 e de citocinas (IL-4, IL-5, IL-2 e IFN- γ) foram quantificadas por Elispot.

Resultados: A administração intra-gástrica de Der p em camundongos sensibilizados induziu significativa inibição da produção de anticorpos IgE específicos, independente da dose de antígeno. Os níveis de IgE total diminuíram em paralelo aos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG2b espe

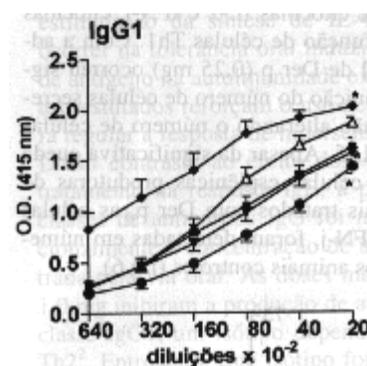
cíficos, exceto quando dose elevada foi utilizada, que também estimulou a produção de anticorpos IgG1 específicos. A baixa dose de Der p diminuiu a resposta Th2 dos animais, demonstrado pela queda do número de células esplênicas secretoras de IL-4 e de plasmócitos secretores de anticorpos IgE e IgG1. Os animais tolerizados também demonstraram diminuição da frequência das células secretoras de IL-2.

Conclusão: Os resultados demonstraram que a administração oral de Der p em camundongos sensibilizados inibe a produção de anticorpos IgE, associada a função Th2 e sugere ser um potencial candidato para a terapia de doenças alérgicas medidas por células Th2.

Efeito da administração oral de Der p em células esplênicas secretoras de anticorpos IgE e IgG1 específicos:

Como o efeito inibitório do tratamento oral foi mais eficaz com a dose mais baixa de Der p (0,25 mg) testada, a investigação da resposta humoral foi realizada nos grupos de animais tratados com esta concentração de antígeno. Geralmente, na resposta a antígenos T-dependentes as células esplênicas secretoras de anticorpos IgE ocorrem em baixa frequência. Dessa forma, foi padronizado um ensaio sensível e específico de Elispot para possibilitar utilização de maior número de células e possibilitar a detecção de células secretoras (plasmócitos) de anticorpos IgE e IgG1 específicos.

Os camundongos administrados com baixa dose de Der p apresentaram significativa diminuição do número de células esplênicas secretoras de anticorpos IgE anti-Der p e das células secretoras de IgE total em relação aos animais controles (fig. 5). As células secretoras de anticorpos IgG1 anti-Der p, encontradas em maior frequência, também diminuíram significativamente com o tratamento oral com Der p (fig. 5).



Abstract

Objective: The capacity to modulate Th2 lymphocyte function through a protocol of oral anti-gen administration was studied in a murine model of type I hypersensitivity to house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p).

Methods: As/n mice were immunized with alum-Der p extract and administered by the intragastric route 0.25, 1.0, 1.5, 4.0 or 10.0 mg of the Der p or phosphate-buffered saline, divided in three days. After two antigenic intraperitoneal boosts, the sera from the animals were analysed to IgE antibody level by passive anaphylaxis cutaneous reaction and specific IgG subclasses and total IgE by Elisa. The IgE and IgG1 plasma secreting cells as well as cytokine secreting-cells (IL-4, IL-5, IL-2 e IFN- γ) was detected by Elispot assay.

Results: The sensitized animals that received the oral feeding protocol showed a marked down-regulation of the specific IgE antibody response, in a dose independent way. The total IgE level decreased in parallel with IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies levels, except when the highest dose was used, that also enhanced the IgG1 antibody response. The feeding with lower dose of the allergen decreased the Th2 response of the animals, as shown by the decreasing in the number of IL-4 secreting-cells and allergen-specific IgE and IgG1 plasma cells. These tolerized animals also had a decreased frequency of IL-2 secreting-cells.

Conclusion: The results showed that feeding with Der p of sensitized mice inhibit the IgE anti-body production associated with the Th2 function. These results warrant further studies of low dose protocol as a potential candidate to Th2 mediated allergic diseases therapy.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1998; 21(6):185-195 Domestic mites, *Dermatophagoides pteronyssinus*, oral tolerance, Th1 and Th2 lymphocytes.

Laboratório de Imunogenética e de Transplante Experimental da Faculdade de Medicina da USP

Introdução

A alergia ou hipersensibilidade é desencadeada em resposta a antígenos ambientais (denominados alérgenos), que resultam na inflamação de tecidos e na disfunção de órgãos. Entre os alérgenos, os ácaros de poeira domiciliar, como *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) são potencialmente capazes de sensibilizar e desencadear as reações alérgicas¹.

Na hipersensibilidade imediata, vários fatores são relevantes para a geração e a manutenção da resposta IgE² como o tipo do alérgeno, a predisposição genética dos indivíduos, o microambiente da apresentação antigênica e as citocinas geradas pelas células CD4+. As células CD4+ são classi-

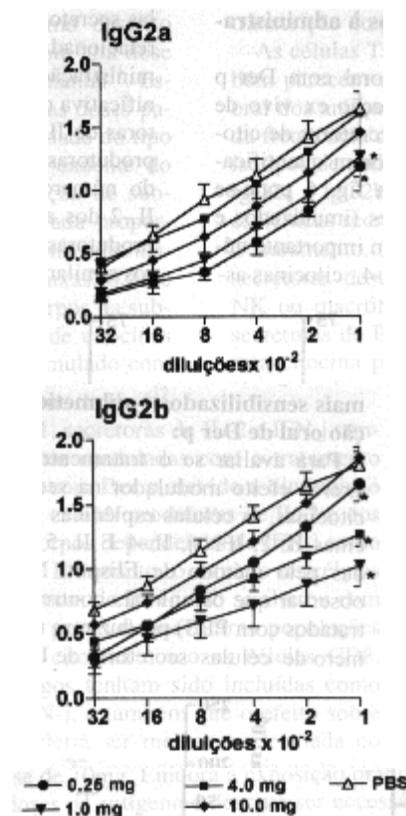
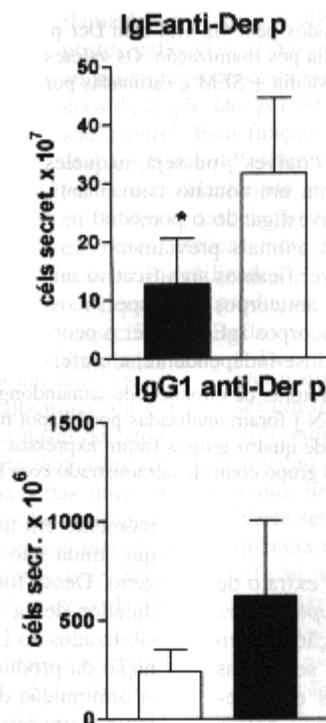


Figura 4. Perfil de subclasse de anticorpos IgG específicos de camundongos sensibilizados e administrados pela via oral com Der p. Soros de camundongos tratados pela via intragástrica com 0,25, 1,0, 4,0 ou 10,0 mg de Der p ou PBS foram obtidos no 28^o dia e analisados por Elisa. Os valores de 3-4 camundongos/por grupo de um total de quatro grupos foram expressos com Média \pm SEM da DO obtida. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle administrado com PBS.



ficadas de acordo com o padrão de secreção de citocinas em Th1 e Th2² e o desequilíbrio da resposta imunológica pode estimular uma resposta preferencial para um determinado subtipo celular. Nas doenças alérgicas o predomínio de células Th2, secretoras de interleucina 4 (IL-4), IL-5, e IL-13, desempenham importante papel na produção dos anticorpos IgE e nos processos inflamatórios.

Visto a alta incidência de alergia na população e pela sua cronicidade, há um crescente interesse para que novas estratégias terapêuticas sejam estabelecidas. Um dos objetivos na modulação da resposta alérgica é a tentativa de inibir ou desviar as funções excessivas geradas pelas células Th2³. Um procedimento utilizado para inibir a resposta antígeno-específica, denominado tolerância oral, é um fenômeno que ocorre com a administração oral do antígeno após a reexposição do antígeno pela via parenteral⁴. Vários estudos experimentais têm sido realizados para induzir tolerância oral em doenças autoimunes⁵, na rejeição de transplantes⁶ e na alergia⁷⁻⁹. A tolerância oral é um processo complexo que depende da dose de antígeno para se estabelecer um protocolo que resulte em tolerância parcial (específica) ou total e que iniba especificamente os linfócitos T e /ou B, em especial as células de memória¹⁰.

O mecanismo regulador mediado pela tolerância oral envolve supressão ativa, anergia ou deleção clonal¹¹⁻¹⁴. Na supressão ocorre secreção de citocinas com potencial inflamatório e imunossupressor como o fator de transformação e crescimento (TGF- β), interleucina-4 (IL-4) e IL-10, citocinas que estão relacionadas com a função Th2¹⁵⁻¹⁶. Entretanto, não está claro como a estimulação de células Th2 induzida pela tolerância oral pode modular a resposta alérgica, predominantemente mediada por células Th2. Além disso, a investigação da indução de tolerância oral em animais previamente sensibilizados a alérgenos, o torna um interessante protocolo a ser estudado na resposta de hipersensibilidade do tipo I, visto a dificuldade de se tolerizar as células de memória.

Neste trabalho, o efeito da administração oral com diferentes doses de extrato de ácaros de poeira doméstica foi avaliado em modelo murino de hipersensibilidade do tipo I. Para melhor investigar a resposta humoral foi utilizado um método sensível e específico de Elispot para quantificar as células produtoras de anticorpos IgE e IgG1 antígeno específicos e as células produtoras de citocinas. A administração pela via intragástrica de Der p em camundongos sensibilizados diminuiu a produção de anticorpos IgE e IL-4, importantes mediadores da resposta alérgica. Os achados sugerem que um protocolo breve realizado com baixa dose de antígeno pela via oral é capaz de tolerizar a função Th2 de camundongos sensibilizados ao Der p.

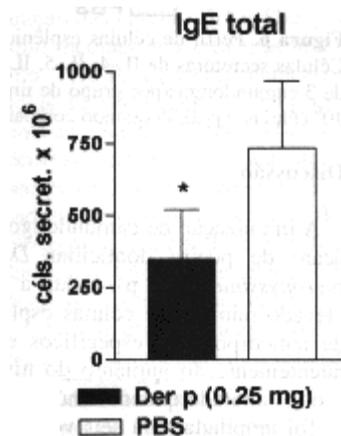
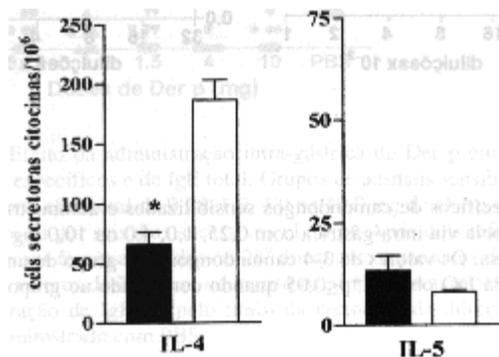


Figura 5. Frequência de células esplênicas secretoras de anticorpos de camundongos tratados pela via oral com Der p. Células secretoras de anticorpos IgE e IgG1 anti-Der p e de IgE total foram analisadas por Elispot no 28^o dia pós imunização. Os valores de 3 camundongos por grupo de um total de quatro grupos foram expressos como Média \pm SEM e estimadas por 10⁶ ou 10⁷ células. *p \leq 0,05 quando comparado ao grupo controle administrado com PBS.

Perfil de células secretoras de citocinas de ani-mais sensibilizados e submetidos à administração oral de Der p:

Para avaliar se o tratamento oral com Der p exerce efeito modulador na secreção ex vivo de citocinas, as células esplênicas secretoras de citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 foram quantificadas pelo método de Elispot. Na fig. 6 pode-se observar que os animais controles (imunizados e tratados com PBS) produziram um importante número de células secretoras de IL-4, citocinas associadas ao tipo Th2, e menor frequência de células secretoras de citocinas IL-2 e IFN- γ , citocinas relacionadas à função de células Th1. Com a administração oral de Der p (0,25 mg) ocorreu significativa diminuição do número de células secretoras de IL-4, não alterando o número de células produtoras de IL-5. Apesar da significativa queda do número de células esplênicas produtoras de IL-2 dos animais tratados com Der p, as células produtoras de IFN- γ , foram detectadas em números similares dos animais controles (fig 6).



Materiais e métodos

Animais:

Camundongos da linhagem AS/n, fêmeas, fo-ram utilizados com 8-10 semanas de idade. Ratos Wistar Furth (RT1^{u,u}) de ambos os sexos, com 3-4 meses de idade foram utilizados para as reações de anafilaxia cutânea passiva.

Protocolo de imunização:

Os camundongos foram imunizados pela via subcutânea com 10µg de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p, IFIDESA-ARIS-TE GUI, 112.900 UBE/ml) em 6 mg de Al(OH)₃. No 14^o e 21^o dia após a imunização os animais receberam reforço pela via intraperitoneal (i.p.) sem adjuvante com 10 e 50µg de Der p, res-pectivamente. Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital no 7^o, 14^o ou 28^o dia após a imunização. Os soros foram estocados a -20°C até o momento de uso.

Administração intra-gástrica de Der p:

Grupos de camundongos foram anestesiados e administrados no +7,+8 e +9 dia da imunização (dia 0) pela via intra-gástrica com auxílio de son-da uretral com um total de 0,25 mg, 1,0 mg, 4,0 mg ou 10,0 mg de extrato de Der p diluído em 0,5 ml de PBS. Alguns grupos de animais foram administrados pela via oral nos dias +7 a +12, com total de 1,5 mg do antígeno. Os animais controles foram imunizados, administrados pela via intra-gástrica com tampão fosfato (PBS) e receberam reforço i.p. no 14^o e no 21^o dia após a imuniza-ção, no mesmo esquema que os animais adminis-trados pela via oral com Der p.

Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP):

A estimacão de anticorpos IgE foi realizada pe-la reação de anafilaxia cutânea passiva como des-crito por Ovary¹⁷ e modificado por Mota & Wong¹⁸. Resumidamente, diluições das amostras de soros dos camundongos foram inoculadas in-tradermicamente em volume de 0,1 ml no dorso de ratos previamente tricotomizados. Após 18 ho-ras, os ratos receberam pela via intravenosa 0,8 mg de extrato de Der p em 1,0 ml de solução de Azul de Evans a 0,5%. Uma hora após os ratos foram sacrificados e o título do soro foi conside-rado como a recíproca da maior diluição do soro que apresentasse reação acima de 5 mm de diâ-metro.

Ensaio imunoenzimático (Elisa) para detecção de subclasses de anticorpos IgG específicos e dosagem de IgE sérica:

Os orifícios de microplaca de 96 orifícios (Cos-tar, Cambrigde, MA) foram sensibilizados com 10µg/ml de extrato de Der p (para detecção de subclasses de IgG) ou 5 µg/ml

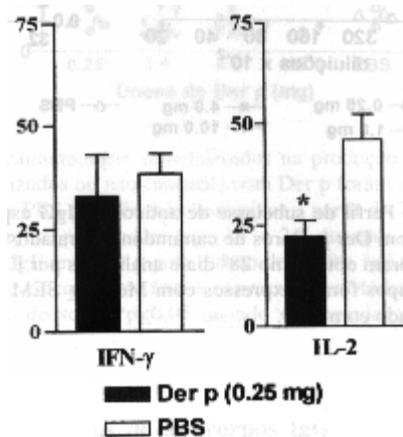


Figura 6. Perfil de células esplênicas secretoras de citocinas de camundongos tratados pela via oral com Der p. Células secretoras de IL-4, IL-5, IL-2 e IFN- γ foram analisadas por Elispot no 28^o dia pós imunização. Os valores de 3 camundongos/por grupo de um total de quatro grupos foram expressos como Média \pm SEM e estimadas por 10⁶ células. *p \leq 0,05 quando comparado ao grupo controle administrado com PBS.

Discussão

A imunização de camundongos com extrato de ácaro de poeira domiciliar *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), induz a produção de um elevado número de células esplênicas secretoras de anticorpos IgE específicos e totais e conse-qüentemente do aumento do nível sérico desses isótipos de anticorpos. O aumento do número de células esplênicas produtoras de IL-4 nos camun-dongos, em relação às secretoras de IL-2 e IFN- γ , caracteriza o predomínio da função Th2 na res-posta imune ao Der p.

Com o intuito de estabelecermos um protocolo para hipossensibilizar as funções inibitórias natu-rais, como a via oral. A administração do antíge-no por essa via é reconhecida ser capaz de induzir tolerância oral⁴ e é um fenômeno estudado princi-palmente em animais "naives", ou seja, naqueles que ainda não entraram em contato com o antí-geno. Dessa forma, investigando o potencial mo-dulador dessa via em animais previamente sen-sibilizados ao Der p, verificamos significativa ini-bição da produção de anticorpos IgE específicos. A diminuição dos anticorpos IgE anti Der p ocor-reu por um processo dose-independente, e o efei-to inibitório não foi alterado quando o número de administrações foi ampliada para seis vezes, su-gerindo que para modular a função Th2, nem sempre é necessário uma exposição oral contínua do antígeno²⁰.

Paralelamente à queda dos anticorpos especifi-cos, os níveis séricos de IgE total dos animais também diminuiram, exceto quando utilizado alta dose no tratamento. O tratamento da dose de antí-geno parece ter induzido produção policlonal de IgE. É possível que este efeito seja decorrente da estimulação da síntese de IL-4, como descrito ocorrer na tolerância oral induzida com alta dose de antígeno na autoimunidade experimental¹¹. Es-tes resultados reforçam o uso de baixas doses pa-rra regular a resposta de

de anti-IgE (para dosagem de IgE total) por 1 h a 37°C. e por 18 horas a 4°C. em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH=9,5. A saturação das placas foi realizada com solução de PBS-0,5% de gelatina por 1h a 37°C., lavadas e posteriormente incubadas com diluições seriadas dos soros por 1 hora a 37°C. e por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS-0,1% Tween e incubadas com anticorpos biotinilados específicos a cada sub-classe de anticorpo a ser analisada (Southern Bio-technology Ass., Birminghham, AL) por 1 h a 37°C. Após lavagens, estreptoavidina-b eta galac-tosidase (Sigma, St. Louis, MO) foi incubada por 1h a 37°C. A solução de ONPG (orthonitrophenil- -b-D-galactopyranosideo, Sigma, St. Louis, Mis-souri) a 0,8 mg/ml em 0,1M de tampão fosfato, pH 7, contendo 0,0056 % (v/v) b -mer-captoetanol foi incubada a 37°C. e a leitura realizada a 415 nm em leitor de microplaca de Elisa (Biorad, USA). A concentração de IgE total foi obtida pela interpolação dos valores de densidade optica (D.O) na curva padrão de proteína IgE (Phar-mingen, San Diego, CA).

Obtenção de Células:

Os baços de camundongos foram colhidos as-septicamente e masserado sob tela de aço ino-xidável em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 5×10^{-5} Mde 2ME, 2mM de L-glutamina, 20 mg/ml de gentamicina e 10mM de HEPES para obtenção de suspensão de células. As células foram centrifugadas sob a so-lução de Ficol-hypaque para a separação de célu-las mononucleares e após as lavagens, a concen-tração celular foi avaliada de acordo com o ensaio a ser executado.

ELISPOT para detecção de células secretoras de anticorpos:

Para identificação de células secretoras de anti-corpos anti-Der p foi realizado o método de ELISPOT¹⁹. Resumidamente, membranas de ni-trocelulose de 45µ de porosidade (Shleicher & Schuell, Alemanha) foram empregadas como su-porte e utilizadas em formato circular de 15mm de diâmetro para serem adaptadas nos orifícios de placa de cultura de 24 orifícios (Costar, Cambrid-ge, MA). As membranas foram sensibilizadas com 10µg/ml de anticorpo monoclonal anti-IgE (Pharmingem, San Diego, CA) ou 25µg/ml de ex-trato de Der p diluídos em PBS, por 18 horas a temperatura ambiente. As membranas nos orifí-cios foram lavadas 4 vezes em PBS e em seguida bloqueadas em solução de 1% de soro fetal bovi-no e 0,5% de soro albumina bovina (BSA) por 2 horas a temperatura ambiente e lavadas 5 vezes com PBS. Suspensões de células esplênicas de diferentes concentrações em 0,5ml foram incubadas por 18 horas a 37°C. em estufa de 5% de CO₂.

As membranas das placas foram lavadas exten-sivamente em PBS-0,1% Tween e incubadas com 0,5ml de 0,75 µg /ml de anticorpo biotinilado an-ti-IgE (Pharmingem, San Diego, CA) por 18 ho-ras a 4°C. As placas foram lavadas e incubadas com estreptoavidinafosfatase alcalina (Southern Biotechnology Ass., Birmingham, AL) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a última lavagem, os spots foram visualizados por reação colorimé-trica pela adição de

hipersensibilidade do tipo I. Em contraste ao efeito dose-independente do tratamento na resposta IgE, a produção de sub-classes de anticorpos IgG foi modulada propor-cionalmente à concentração de antígeno adminis-trada pela via oral. As doses mais baixas, 0,25 e 1,0 mg inibiram a produção de anticorpos da sub-classe IgG1, um isótipo dependente de citocinas Th2². Entretanto, este isótipo foi estimulado com a dose de 10mg. Embora a exposição oral com al-tas doses de antígeno é descrita ser necessária pa-rra tolerizar as células Th2²¹, é essencial uma ava-liação criteriosa da dose de antígeno a ser admi-nistrada, pois às vezes o aumento da concentração pode estimular a resposta pré-existente de anti-corpos nos camundongos. O efeito estimulador desta via é observado em camundongos imuniza-dos submetidos a administração oral com ovalbu-mina²⁴, que desenvolveram aumento dos níveis de anticorpos IgE específicos e dos níveis séricos de IgE total. Por outro lado, inibição da resposta in-flamatória pulmonar é observada em animais ex-postos pelas vias aéreas com ovalbumina⁸ ou em animais que receberam instilação nasal de peptí-deos da fração Der p 1 do Dermatophagoides pte-ronyssinus⁹. Esta função paradoxal das mucosas oral ou nasal de inibir ou estimular a resposta imune está relacionada a fatores como dose, tipo de antígeno, associação a adjuvantes, bem como das características inerentes da linhagem de ca-mundongos utilizados²³⁻²⁴.

A queda da produção de anticorpos antígeno- -específicos quando os animais foram tratados com baixa dose de Der p, indica que o efeito sis-têmico do tratamento afeta diretamente as células secretoras de anticorpos como também as secre-toras de IL-4, citocina essencial para o "switch" para IgE²². A IL-5, citocina também relacionada com as células Th2²⁶, não se modificou nos ani-mais tratados com Der p. Estes resultados suge-rem que o mecanismo de regulação da IL-5 pode ocorrer independente da IL-4, visto a queda do número de células secretoras de IL-4. Neste con-texto, tem sido relatado que a transcrição do gene da IL-5 pode ser diferencialmente regulada da transcrição do gene de IL-4²⁷.

As células Th1, secretoras de IL-2 e IFN-j tam-bém parecem estar moduladas com o tratamento oral dos animais com Der p, devido a diminuição da freqüência de células produtoras de IL-2 e dos isótipos de anticorpos dependentes de IFN-j como IgG2a e IgG2b². Entretanto, o número de células esplênicas secretoras de IFN-j não se alterou com o tratamento. É possível que outras populações secretoras desta citocina como as células CD8, NK ou macrófagos tenham sido incluídas como secretoras de IFN-j, e também que o efeito sobre esta citocina poderia ser melhor evidenciada no sítio primário da tolerância oral, ou seja no tecido linfóide associado às mucosas.

Os mecanismos reguladores da tolerância oral são descritos depender da concentração de antíge-no administrada, onde baixa dose pode mediar supressão ativa¹¹⁻¹² e alta dose, anergia e deleção clonal¹³⁻¹⁴. Na encefalomielite alérgica, a admi-nistração de proteína de mielina básica, gera um

solução de BCIP/NBT (Sig-ma, St. Louis, MO). A reação foi neutralizada adicionando-se água destilada e a leitura dos spots realizada com auxílio de microscópio invertido. O spots foram estimados e expressos por 10^6 ou 10^7 células dependendo do isótipo da classe de anticorpo em análise.

ELISPOT para detecção de células secretoras de citocinas:

Microplacas de 96 orifícios (High binding, Costar, Cambridge) foram sensibilizadas com 4-8µg/ml de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (clone RA-6A2), IL-4 (clone 11B11), IL-2 (clone JES6-1A12) ou IL-5 (clone TRFK5) de camundongo (Pharmingen, San Diego, CA) e incubadas por 18 horas a 4°C. como descrito por Sacks et al¹⁹. As placas foram bloqueadas com solução de PBS-1% BSA, lavadas 3 vezes com PBS e várias concentrações de células esplênicas foram adicionadas, a partir de 10^6 células/orifício e incubadas por 18 horas a 37°C. a 5% CO₂. As placas foram lavadas em PBS-0,1% Tween por 3 vezes, cada lavagem por 10 minutos e em seguida adicionou-se 1,5µg/ml de anticorpo monoclonal biotilado anti-IFN- γ (clone XMG1.2), IL-4 (clone BVD6-24G2), IL-2 (clone JES6-5H4) ou IL-5 (clone TRFK4) de camundongo (Pharmingen, San Diego, CA.) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas novamente e estreptoavidina fosfatase alcalina (Southern Biotechnology Associates, Birmingham INC, AL) foi incubada por 2 horas a 37°C. Após a lavagem final foi acrescentado solução de 0,1% BCIP em tampão 2-amino-2-metil-1-propanol pH=10,25 (Sigma St. Louis, Missouri) por 2 horas a 37°C. A reação colorimétrica foi neutralizada com água e os spots foram avaliados em 10^6 células.

Análise estatística:

A comparação dos grupos foi analisada pelo teste não paramétrico de "Mann Whitney" e as diferenças foram consideradas significativas quando $\leq 0,05$.

Resultados

Resposta de hipersensibilidade do tipo I a extrato de ácaros de poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) em camundongos:

Elevados níveis de anticorpos IgM anti-Der p já eram evidenciados no 7º dia após a imunização nos soros dos camundongos (fig. 1). Posteriormente, no 14º dia os níveis de anticorpos IgG1 aumentaram permanecendo elevados até o último período a ser analisado (28º dia de imunização, fig. 1). Neste período, os animais desenvolveram elevados títulos de anticorpos IgE anti-Der p, avaliados por reação de anafilaxia cutânea passiva (fig. 2). Em paralelo aos anticorpos IgE específicos, evidenciou-se aumento do nível sérico de IgE (fig. 2)

microambiente que direciona as células T para o fenótipo Th2 devido à secreção de IL-4 e IL-10, que favorece a produção de TGF- β ^{12,16}. A ação inibitória do tratamento oral com baixa dose de Der p sobre a função das células Th1 e Th2, pode ser um mecanismo mediado por citocinas imunossupressoras como TGF- β . Conseqüentemente, a inibição das células Th pode limitar a geração de sinais necessários ao "switching" de anticorpos. Neste sentido, ocorreu importante redução de frequência de anticorpos IgE e IgG1 antígeno-específicos, após a administração oral com esta dose de antígeno. É possível que além da produção de citocinas a redução do número de plasmócitos possa estar associada a outros mecanismos de regulação como a deleção clonal, via apoptose celular. A investigação desses mecanismos está sendo realizada neste modelo animal de tolerância oral a Der p.

Os resultados demonstraram que o protocolo de administração oral de Der p em camundongos pré-sensibilizados inibe a resposta de hipersensibilidade do tipo I, por um efeito dose independente. Contudo, a investigação do efeito sistêmico do tratamento oral na produção de subclasses de anticorpos IgG e de células secretoras de anticorpos indicam que baixa dose de Der p é mais apropriada para inibir a resposta humoral anti-Der p. A inibição da resposta de hipersensibilidade ao Der p através da tolerância oral, sugere ser decorrente da inibição da função Th2. A capacidade inibitória do protocolo de administração oral de Der p em camundongos sensibilizados, poder ser uma alternativa promissora para a terapia subcutânea de doenças alérgicas.

Referências bibliográficas

1. Platts-Mills T, Weck A - Dust mite allergen and asthma. A world wide problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 83:416.
2. Mossman TR, Coffman RL - Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 1989;7:145.
3. Umetsu DT, DeKruyff RH - Th1 and Th2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997;100(1): 1-6
4. Mowat AM - The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol. Today* 1987; 8:93-8.
5. Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Thentham DE - Oral Tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Ann. Rev. Immunol.* 1994;12: 809-37.
6. Hancock WW, Sayegh MH, Kwok CA, Weiner HL, Carpenter CB - Oral but not intravenous allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation. *Transplantation* 1993; 55: 1112-18.
7. Holt PG, Batty JE, Turner KJ - Inhibition of specific IgE responses in mice by preexposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981;42:409-25.
8. Hoyne GF, Callow MG, Kuo MC, Thomas WR - Inhibition of T-cell responses by feeding peptides containing major and cryptic epitopes: studies with the Der p I allergen. *Immunology.* 1994; 83:190-5
9. Hoyne GF, Thomas WR - T-cell responses to orally administered antigens. Study of the kinetics of lymphokine production after single and multiple feeding. *Immunology.* 1995; 84: 304-9
10. Katona IM, Urban JF Jr, Kang SS, Paul WE, Finckelstein FD - IL-4 requirements for the generation of secondary in vivo IgE responses. *J. Immunol.* 1991; 146: 4215-21.
11. Friedman A, Weiner HL - Introduction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91: 6688-92.
12. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL - Suppressor T cells generated by oral tolerance to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 421-25.

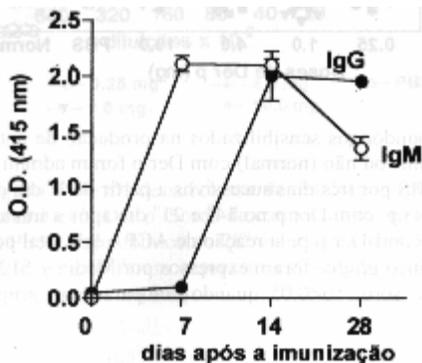


Figura 1. Produção de anticorpos IgM (o) e IgG (•) específicos de camundongos AS/n imunizados com extrato de Der p. Anticorpos IgM e IgG anti-Der p foram avaliados nos soros dos animais nos dias 0, 7^o, 14^o e 28^o após a imunização por ELISA. Os resultados demonstram a Média da densidade óptica (D.O) do soro de 12-15 camundongos.

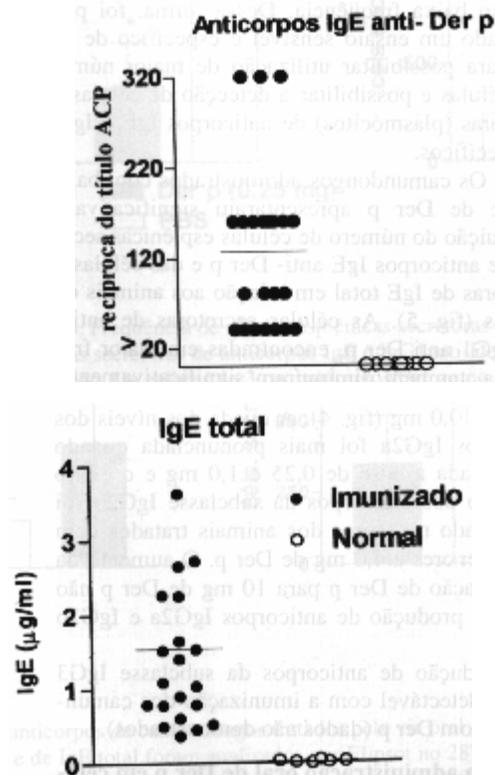


Figura 2. Produção de anticorpos IgE anti-Der p e de IgE sérica total de camundongos AS/n imunizados com extrato de Der p. Anticorpos IgE específicos foram avaliados por reação de anafilaxia cutânea passiva e a concentração sérica de IgE avaliada por Elisa nos soros de 12-15 camundongos.

13. Melamed D, Friedman A - Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:935-42.
14. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL - Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995; 376: 177-80.
15. Chin YH, Cai JP, Xu XM - Transforming growth factor-beta 1 and IL-4 regulate the adhesiveness of Peyer's path high endothelial venule cells for lymphocytes. *J. Immunol.* 1992; 148: 1106.
16. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL - Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential up-regulation of transforming growth factor beta, interleukin-4 and prostaglandin E expression in the brain. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1355-64.
17. Ovary Z - Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.* 1958;81:355.
18. Mota I, Wong D - Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 1969;8:813-20.
19. Sacks T, Klinman DM - Long-Term of Primary Immunization on subsequent immune responsiveness. *Cellular Immunol.* 1997;177: 162-8.
20. Melamed D, Fishman-Lovell J, Uni Z, Weiner HL, Friedman A - Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Int. Immunol.* 1996; 8:717-24.
21. Garside P, Steel M, Worthey EA, Satoskar A, Alexander J, Bluethmann H, Liew FY, Mowat AM - T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J. Immunol.* 1995;154:5649-55.
22. Van Halteren AGS, van der Cammen MJF, Bie-weng J SHFJ, Kraal G - IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure: A urine model to study the onset of food allergy. *J Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99(1): 94-9.
23. Brandtzaeg P - History of oral tolerance and mucosal immunity. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1996; 778: 1-27.
24. Faria AMC, Garcia G, Rios MJC, Michalaros CL, Vaz Nm - decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures on the rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology.* 1993; 78: 147-51.
25. Sutton BJ, Gould HJ - The human IgE network. *Nature* 1993; 366:421-8.
26. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Mattheaei KI, Young IG - Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med* 1996; 183:195-201.
27. Okudaira H, Mori A, Kaminuma O, Suko M - IL-5 regulation: A new approach to allergy therapy. *Allergy & Clin. Immunol. Intern.* 1996; 8 (5-6): 172-9.

Endereço para correspondência:

Maria Notomi Sato
Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 – 2º andar s/2345
CEP 01246-903 São Paulo - SP

Efeito da administração oral com Der p em camundongos sensibilizados:

Para modular a resposta de hipersensibilidade tipo I a Der p, os camundongos foram previamente sensibilizados com o antígeno e submetidos a um esquema de administração intragástrica com total de 0,25, 1,0, 4,0 ou 10,0 mg de Der p ou PBS (controle). O tratamento foi realizado por três dias consecutivos, a partir do 7º dia após a imunização, período em que já se detectavam elevados níveis de anticorpos IgM e início de produção de IgG (fig. 1). Após o tratamento oral e de dois reforços com Der p pela via intra-peritoneal

observou-se significativa diminuição da produção dos anticorpos IgE específicos (fig. 3) em relação ao grupo de animais controles (animais sensibilizados e tratados com PBS). O efeito inibitório sobre a produção de anticorpos IgE específicos ocorreu de maneira dose-independente. O aumento do número de administração oral para seis vezes, com 1,5 mg de Der p, não alterou a ação inibitória do tratamento sobre a produção dos anticorpos IgE específicos (fig. 3).

Os níveis séricos de IgE também diminuíram com o tratamento realizado com 0,25, 1,0 e 4,0 mg de antígeno (fig. 3). Entretanto, os níveis de IgE total dos animais tratados com 10,0 mg de Der p foi semelhante ao observado nos soros dos animais controles, imunizados e administrados pela via oral com PBS (1,45 $\mu\text{g/ml} \pm 0,87$ vs 1,54 $\mu\text{g/ml} \pm 1,18$, respectivamente).

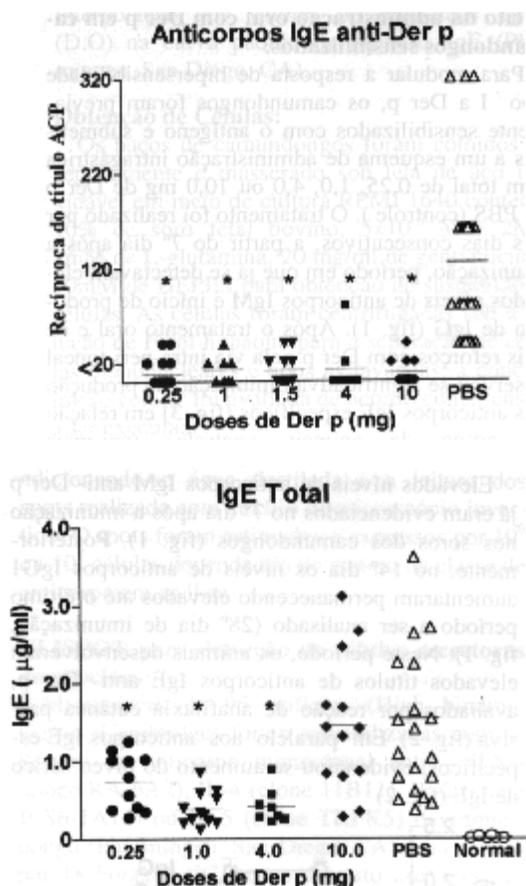


Figura 3. Efeito da administração intra-gástrica de Der p em camundongos sensibilizados na produção de anti-corpos IgE específicos e de IgE total. Grupos de animais sensibilizados ou não (normal) com Der p foram administrados via oral com total de 0,25, 1,0, 4,0 ou 10,0 mg de Der p ou PBS por três dias sucessivos a partir do 7^o dia da imunização, ou por seis dias sucessivos (1,5mg). Após dois reforços i.p. com Der p no 14^o e 21^o dia após a imunização. Os soros foram avaliados no 28^o dia quanto a presença de IgE anti-Der p pela reação de ACP e IgE total por ELISA. Os valores de 3-4 camundongos/por grupo de um total de cinco grupos foram expressos por Média \pm SEM da concentração de IgE ou pelo título da recíproca da diluição do soro. * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle administrado com PBS.

Perfil dos isotipos de anticorpos IgG de ani-mais sensibilizados submetidos à administração oral com Der p:

Os níveis de anticorpos específicos da subclasse IgG1 diminuíram significativamente com as doses de 0,25 e 1,0 mg de Der p, não se alteraram com a dose de 4,0mg e foram estimulados com a dose de 10,0 mg (fig. 4). A queda dos níveis dos anticorpos IgG2a foi mais pronunciada quando foi utilizada a dose de 0,25 e 1,0 mg e o efeito inibitório dos anticorpos da subclasse IgG2b foi evidenciado nos soros dos animais tratados com doses menores a 4,0 mg de Der p. O aumento da concentração de Der p para 10 mg de Der p não alterou a produção de anticorpos IgG2a e IgG2b (fig. 4).

A produção de anticorpos da subclasse IgG3 não foi detectável com a imunização dos camundongos com Der p (dados não demonstrados)..



[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)

A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
Copyright 1998 - SBAI - Av. Prof. Ascendino Reis, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 04027-000