

IMUNOSSUPRESSÃO POR DIFERENTES DROGAS NA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA À OVALBUMINA¹

(Immunosuppression by different drugs in the reaction of delayed hypersensitivity to ovalbumine)

Andréia Tuyama²
 Firmino Ribeiro Neto²
 Jovana S. V. Lima²
 Lízia Ribeiro²
 Marcos Leonardo Condé²
 Luiz Carlos Ferreira de Andrade³
 Marcus Gomes Bastos⁴

RESUMO

Os autores descrevem as etapas de um modelo de reação de hipersensibilidade retardada (RHR) ao antígeno ovalbumina (OA), utilizando camundongos BALB/c. O processo inflamatório resultante traduziria a ação de macrófagos ativados por citocinas provenientes de células T previamente ativadas e por isso, capaz de simular o que ocorreria nos episódios de rejeição de aloenxertos de órgãos (rim) e também em algumas doenças auto-imunes (glomerulopatias). A intensidade deste processo inflamatório permitiria avaliar e quantificar a resposta imune, mediada pela célula T a imunógenos (OA) e, através do uso deste modelo, estudar a ação de drogas imunossupressoras, como a ciclosporina A e a azatioprina, as quais, nos experimentos realizados inibiram de maneira significativa a RHR a OA.

Unitermos: imunossupressores, reação, hipersensibilidade, retardada.

¹ Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF. Patrocinado pelo PICD- CNPq- UFJF e Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (Fundação IMEPEN)

² Alunos bolsistas de Iniciação Científica- PIBIC/UFJF/CNPq

³ Professor adjunto da disciplina de Nefrologia da FM-UFJF

⁴ Professor responsável pela disciplina/serviço de Nefrologia- UFJF

INTRODUÇÃO

A reação de hipersensibilidade retardada (RHR) é uma resposta inflamatória imuno-mediada pelo linfócito T, com a ativação e a participação de macrófagos. O termo retardada é aplicado porque o tempo de evolução da reação na pele é medido em dias ou mesmo semanas (12, 16).

O estudo da RHR em animais é uma maneira de analisar as etapas da resposta imune, mediada pelas células T, observada na rejeição de aloenxerto de órgãos, em certas doenças auto-imunes (glomerulopatias) e neoplasias (4).

Objetivando determinar um modelo experimental que ofereça resultados mais uniformes e reproduzíveis, os autores elaboraram o modelo de RHR a ovalbumina (OA), com controle de fidelidade e, neste estudo, o testaram com as drogas imunossupressoras Ciclosporina A (CsA) e Azatioprina (AZA).

MATERIAL e MÉTODO

Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c singênicos, machos com idade de 8-12 semanas, fornecidos pelo biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG). Grupos de 5 a 6 animais foram alimentados com ração comercial Labina^R (Purina, Campinas, SP) e ingeriram água de acordo com as suas necessidades.

Reagentes

Ovalbumina (OA) (5 vezes cristalizada), OA (2x), adjuvante completo de Freund (CFA), todos fornecidos pela Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

RHR a OA

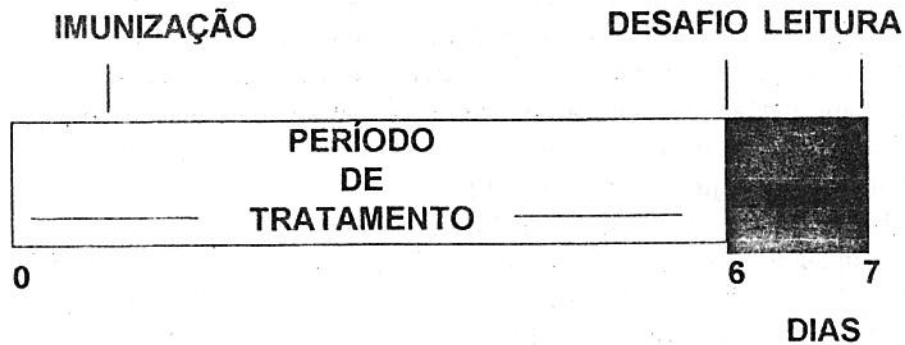
Foi obedecido o protocolo previamente descrito por Ferreira (1992) e Andrade (1994) (Fig. 1).

Preparo da solução de OA para a imunização: OA 5 vezes concentrada (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) foi dissolvida em salina 2mg/ml, deixando a solução em repouso, armazenada em freezer. Em uma seringa de plástico recortada, foi colocado 1ml da solução de OA mais 1ml de adjuvante de Freund (CFA). Foi deixada na geladeira por 30 minutos ou 10 minutos em freezer. Com uma seringa de vidro e movimentando-se o êmbolo (injetando/aspirando), a solução OA+CFA foi agitada até obter a consistência cremosa. No dia zero, grupos de 5 a 6 animais foram injetados com 0,1ml da solução OA (5x) mais CFA subcutaneamente, na base da cauda de cada animal, bilateralmente, tornando-os imunizados.

O preparo da solução de OA para o desafio: 50mg de OA (2x) foram suspensos em 2,4ml de salina. Incubou-se esta solução a 80°C por 1 hora (agitando de 15/15 minutos). A solução foi então centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos e lavada uma vez com salina. A solução foi novamente centrifugada e retirou-se a salina com pipeta Pasteur. Finalmente a solução foi novamente suspensa em 2ml de salina. O desafio foi realizado no dia seis pela injeção de 30µl da OA agregada, subcutaneamente, no coxim plantar posterior direito, interdigital. Para o controle de fidelidade, administrou-se de maneira similar, 30µl de salina na pata posterior esquerda de cada animal.

24 horas após o desafio, procedeu-se a leitura da RHR, comparando a espessura das patas posteriores de cada animal, com o auxílio de um micrômetro (Starret, Athol, MA). Os resultados representam a média de 5-6 animais por grupo \pm erro padrão, expressos em unidades RHR, definida como a diferença de 0,01mm na espessura das patas direita e esquerda de cada animal.

Fig. 1 - Protocolo geral da reação de hipersensibilidade retardada a ovalbumina em camundongos.



Preparação das drogas

A solução estoque de AZA (Microbiológica-Química Farmacêutica (Rio de Janeiro, RJ) foi preparada dissolvendo 5mg em 0,03ml de hidróxido de sódio (0,1%) e 4,97ml de água bidestilada, corrigindo o pH para 7,4 e posteriormente, foi esterilizada em filtro milipore, com 13mm de diâmetro (Miliporo Co., Shimadzu, Japão) e preparada no dia da administração.

A solução estoque de CsA foi obtida dissolvendo 25mg de CsA (0,5ml do frasco-ampola de Sandimmun^R, Sandoz, SP) em 1,0ml de PBS. A droga em solução foi filtrada em milipore, com 13mm de diâmetro (Miliporo Co., Shimadzu, Japão), antes de ser usada.

As drogas CsA e AZA nos experimentos foram administradas intraperitonealmente (ip) através da seringa de Hamilton de 50 e 100 μ l (Hamilton Co., Nevada, USA). Os animais foram tratados entre os dias 0 e 6, um grupo de animais recebendo 30mg/kg/dia de CsA (Borel, 1989) e outro 0,5 ou 5mg/kg/dia de AZA (Andrade, 1997) de acordo com o protocolo proposto.

A análise estatística

Quando as variáveis foram expressadas como média ± erro padrão, utilizou-se a análise de variância (ANCOVA) para comparar quatro ou mais animais nos experimentos; uma vez alcançada a significância estatística, utilizou-se o teste t de Bonferroni.

Foi aceito como nível de significância 0,05. Para realizar os cálculos foi utilizado o programa de informática Primer of Biostatistics (10).

RESULTADOS

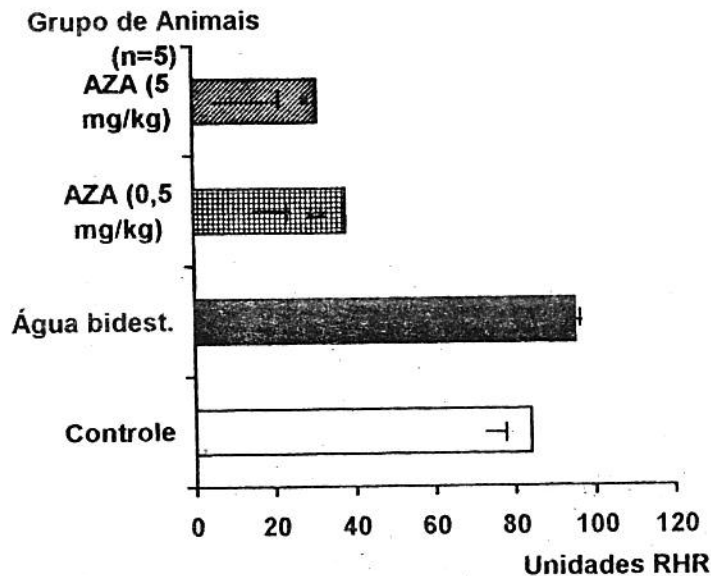
A ação imunossupressora da AZA na RHR a OA.

A RHR a OA foi menor e estatisticamente significativa em camundongos do grupo IV, tratados com 5mg/kg de AZA do que no grupo I não tratado ($31 \pm 10,84$ vs $84 \pm 2,24$, $p < 0,05$). Em relação ao grupo II, tratado com água bidestilada também houve diferença significativa, demonstrando a intensa inibição da RHR a OA pela AZA ($31 \pm 10,84$ vs $95,40 \pm 3,11$, $p < 0,05$) (Fig. 2).

Os animais do grupo III, tratados com 0,5mg/kg de AZA apresentaram menor resposta a RHR a OA em relação aos grupos I e II de maneira estatisticamente significativa ($38,40 \pm 7,44$ vs $84 \pm 1,00$ e $38,40 \pm 7,44$ vs $95,40 \pm 3,11$, respectivamente, $p < 0,05$). Embora a intensidade da RHR no grupo de camundongos tratados com 0,5mg/kg/dia ip de AZA (grupo III) tenha sido maior do que aquela observada nos camundongos tratados com 5mg/kg/dia ip de AZA (grupo IV), a diferença não atingiu significância estatística ($38,40 \pm 7,44$ vs $31 \pm 10,84$, NS) (Fig. 2).

Em suma, a AZA nas doses de 0,5 e 5mg/kg/dia ip inibiu a RHR a OA em camundongos de forma intensa e estatisticamente significativa em relação aos animais não tratados.

Fig. 2 - A azatioprina (AZA) inibindo a RHR a OA em camundongos BALB/c.



A AZA nas doses de 0,5 e 5 mg/kg/dia *ip* (grupos III e IV) inibiu a RHR a OA em camundongos de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (grupo I) não tratado e ao grupo de animais tratados com água bidestilada (grupo II).

Não houve diferença estatística entre as respostas com as diferentes doses de AZA, embora a inibição com 5mg/kg/dia *ip* tenha sido maior. Cada coluna representa a média \pm EP dos resultados dos diferentes grupos. * ** $p < 0,05$.

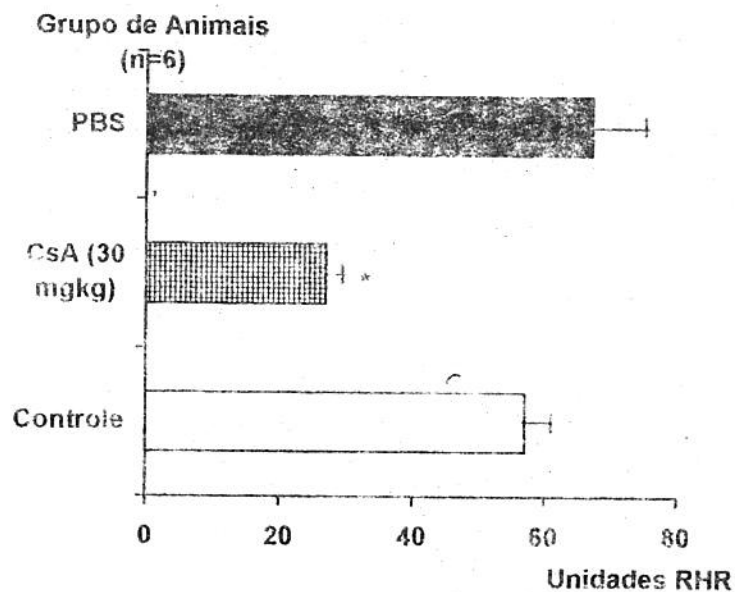
A ação imunossupressora da CsA na RHR a OA.

A RHR a OA foi menor e estatisticamente significativa em camundongos do grupo II, tratados com 30mg/kg de CsA do que no grupo I não tratado ($26,6 \pm 3,07$ vs $57,5 \pm 13,7$, $p < 0,05$). Em relação ao grupo III, tratado com PBS também houve diferença significativa,

demonstrando a intensa inibição da RHR a OA pela CsA ($26,6 \pm 3,07$ vs $67,5 \pm 6,1$, $p > 0,05$) (Fig. 3).

Em suma, a CsA na dose 30mg/kg/dia *ip* inibiu a RHR a OA em camundongos de forma intensa e estatisticamente significativa em relação aos animais não tratados.

Fig. 3 - A ciclosporina A (CsA) inibindo a RHR a OA em camundongos BALB/c.



A CsA na dose de 30mg/kg/dia *ip* (grupo II) inibiu a RHR a OA em camundongos de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (grupo I) não tratado e ao grupo de animais tratados com PBS (grupo III). Cada coluna representa a média \pm Ep dos resultados dos diferentes grupos. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os primeiros experimentos descrevendo a RHR foram executados por Robert Koch (1890), utilizando o bacilo da tuberculose inoculado em cobaias.

A RHR em camundongos passou a ser utilizada a partir de 1955, quando observou-se que a timectomia nestes animais impedia a formação de granulomas na RHR ensaiada. O atual de RHR em camundongos, identificando o macrófago, células T, somente foi descrito por Pritchard e Micklein em 1972, como descrito por Crowle em 1975. A preferência pelo camundongo se deveu ao conhecimento do sistema LyT 1.2 (antígenos) que corresponde ao complexo Principal de Histo-compatibilidade humano, inclusive sendo codificado no mesmo cromossoma 6, sugerindo um sistema de controle na reação imune da RHR no camundongo.

As células que participam do fenômeno de RHR são as células apresentadoras de antígenos tidas como profissionais (macrófago, célula B, células de Langerhans), diferentes tipos de célula T (auxiliares, supressoras, citotóxicas e específicas para a RHR), células B (produtoras de imunoglobulinas ou anticorpos, responsáveis pela citotoxicidade mediada por anticorpo e/ou complemento) e células natural killer. A maioria das células participantes da RHR é recrutada inespecificamente e somente 5-15% dos linfócitos na RHR são específicos.

A RHR se desenvolve no período de 7 a 9 dias, segundo duas etapas: a imunização e o desafio. Quando o animal é inoculado pela primeira vez com a OA, causando sensibilização de suas células, particularmente macrófagos e células T, as quais teriam sofrido seleção clonal tímica e por isso capazes de identificar imunologicamente a OA. A fase de imunização do animal está na dependência da natureza da dose da substância usada e da via de sua administração. O adjuvante de Freund é utilizado para amplificar a intensidade da imunização (17). Mediante a participação celular, a RHR poderá se encerrar na fase de imunização precocemente, desde que haja atuação das células T supressoras e citotóxicas, eliminando o clone das células T específicas da RHR (7). Entretanto, o controle da fase de imunização parece ser de

natureza genética através do sistema LyT1.2 (14). A etapa do desafio é realizada, quando a OA usada na imunização é administrada na pata posterior dos animais, provocando uma reação inflamatória, traduzida por um intumescimento, cuja leitura de sua espessura é feita após 24 horas. As células específicas da RHR reconhecem a OA, aderem às células endoteliais dos capilares e emigram dos capilares para encontrar o antígeno durante algumas horas após o desafio. As células T e as células apresentadoras de antígenos secretam citocinas sensibilizando células endoteliais, facilitando a participação e a adesão de outros linfócitos T e células mononucleares, produzindo vasodilatação. O macrófago ativado produz lesão tissular, através de enzimas e metabólitos oxigenados liberados por ele após processamento da OA (20). Assim, a intensidade do processo inflamatório da RHR a Oa poderá ser diminuída ou atenuada por drogas que interfiram nesta etapa da resposta imune, simulando o que ocorreria nos episódios de rejeição de aloenxertos de órgãos (renal) e também em algumas glomerulopatias. O modelo experimental da RHR a OA permite avaliar e quantificar a resposta imune da célula T a imunógenos (OA), simulando o fenômeno de rejeição aguda e doenças auto-imunes, permitindo o seu uso no estudo do potencial imunossupressor de agentes sintéticos tais como a AZA e a CsA (4, 11, 15).

Nas séries de experimentos apresentadas, ficou demonstrado que as drogas imunossupressoras de eficácia clínica comprovada, como a CsA e a AZA inibiram de forma intensa a RHR a OA.

A CsA é uma droga imunossupressora eficaz em uso clínico, utilizada no controle das reações de rejeição, doença hospedeiro versus enxerto e algumas formas de doenças auto-imunes. Ela bloqueia a resposta imune, inibindo a produção da Interleucina-2 pelas células T, recentemente ativadas, impedindo que esta exerça as suas funções, impossibilitando a sua proliferação, estacionando o seu desenvolvimento a nível da fase G1b do ciclo de desenvolvimento celular. Por isso, a CsA atuaria nas fases iniciais da resposta imune, agindo em sítios bem definidos na cascata de ativação da célula T (5, 18, 19)

O mecanismo de ação da AZA é do tipo não mediado por receptor, mas sim por incorporação falsificada de metabólitos análogos da purina a nível das moléculas dos ácidos nucleicos dos linfoblastos em processo de divisão celular pós-estimulação antigênica, causando uma ação antimetabólica, inibindo a síntese de ácidos nucleicos e novas purinas, bloqueando a replicação genética, com inibição da proliferação celular em sítios tardios da cascata de ativação da célula T (2, 5, 18, 19).

Conclusão: na RHR, os macrófagos ativados por linfocinas provenientes de células T previamente ativadas determinam lesão tissular, constituindo em um modelo experimental, importante para se estudar a ação da CsA e da AZA na resposta imune pelo antígeno OA em modelo de RHR.

SUMMARY

The authors describe the steps of a delayed hypersensitivity reaction (DHR) model to albumin egg (AE) antigen, using BALB/c mice. The resulting inflammatory process, meaning the action of cytokines activated macrophages, from activated T cell, what would able to simulate of allografts, and also in some auto-immune diseases. The intensity of the inflammatory process would allow to evaluate and quantify the immune response mediated by T cell to immunogens (AE), and by using this model be able to study the action of immunosuppressive drugs such as cyclosporin A and azathioprine which inhibit significantly the DHR to AE.

Key words: immunosuppressive- hypersensitivity- delayed-type.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, L.C.F.; FERREIRA, A.P.; MONTESANO, M.A.F.; RIBEIRO, L.; CANGUSSU, L.O.; BASTOS, M.G. Estudo comparativo da reação de hipersensibilidade retardada (RHR) induzida por diferentes substâncias. *J. Bras. Nefrol.* v.16, n.2, p.S141, 1994.
2. ANDRADE, L.C.F. Azatioprina. *Rev. Méd. Minas Gerais* v.5, n.2, p.114-18, 1995.
3. ANDRADE, L.C.F. O estudo da ação imunobiológica de um novo derivado 6-mercaptopurínico: GTPII. **Tese de doutorado em Nefrologia apresentada a UNIFESP-EPM, São Paulo, 1997, 174 p.**
4. BASTOS, M.G.; PANKEWYCZ, O.; KELLEY, V.E.R.; MURPHY, J.R.; STROM, T.B. Concomitant administration of hapten and IL-2-toxin (DAB₄₈₆-IL-2) results in specific deletion of antigen-activated T cell clones. *J. Immunol.* v.145, p.3535-39, 1990.
5. BASTOS, M.G. & PESTANA, J.O.M. Selective immunosuppression in organ transplantation. *Rev. Hosp. S. Paulo- EPM* v.3, n.1/4, p.23-32, 1991.
6. BOREL, J.F. Pharmacology of cyclosporin (Sandimmune^R). *Pharmacol. Rev.* v.41, n.3, p.271, 1989.
7. CLAMAN, H.N.; MILLER, S.D.; SY, M.; MOORHEAD, J.W. Suppressive mechanisms involving sensitization and tolerance in contact allergy. *Immunol. Rev.* v.50, p.105-32, 1980.
8. CROWLE, A.J. Delayed hypersensitivity in the mouse. *Adv. Immunol.* v.20, p.197-265, 1975.
9. Ferreira, A.P. Efeito do extrato de *Ascaris suum* na resposta imune celular de camundongos a um antígeno heterólogo. **Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, 1992. 120p.**
10. GLANTZ, S.A. **Primer of Biostatistics. 3^a Ed., San Francisco, Mc Graw-Hill Inc., 1992.**
11. HUANG, X.R.; HOLDSWORTH, S.R.; TIPPING, P.G. Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation. *Kidney Int.* v.46, p.69-78, 1994.

12. KIRKPATRICK, C.. Delayed hypersensitivity. In: Samter, Talma-ge, Frank, Austin, Calmon. **Immunological Diseases**. 4ªEd., Boston/Toronto, Little Brown Co., 1988, p.261-76.
13. KOCH, R.. Weitere Mittheilung über ein Heilmittel gegen tuberculose. **Detsch. Med. Wochenschr.** v.16, p.1029-35, 1890.
14. NASH, A.A. & GELL, P.G.H.. The delayed hypersensitivity T cell and its interaction with other T cells. **Immunol. Today** v.2, p.162-65, 1981.
15. ORTIZ, A.; BUSTOS, C.; ALONSO, J.; ALCÁZAR, R.; LÓPEZ-ARMADA M.J.; PLAZAI, J.J.; GONZÁLEZ, E.; EGILDO, J.. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of experimental and human glomerulonephritis. **Adv. Nephrol.** v.24, p.53-77, 1995.
16. SELL, S. & HSU, P.. Delayed hypersensitivity, immune deviation, antigen processing and T cell subset selection in syphilis pathogenesis and vaccine design. **Immunol. Today** v.14, n.12, p.576-82, 1993.
17. STADECKER, M.J. & VILLANUEVA, P.O.F.. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. **Immunol. Today** v.15, n.12, p.571-74, 1994.
18. STROM, T.B.. Molecular immunology and immunopharmacology of allograft rejection. **Kidney Int.** v.42 (suppl. 38), p. S182-87, 1992.
19. SUTHANTHIRAN, M. & STROM, T.B.. Renal Transplantation. **N. Engl. J. Med.** v. 331, n.6, p.365-76, 1994.
20. TIZARD, I.R.. Delayed hypersensitivity reactions. In: **Immunology**. 3ª Ed., Philadelphia, Saunders, 1992. p.270-72.

Correspondência: prof. Luiz Carlos F. Andrade - Rua Padre Vieira nº 33- São Mateus - Cep 36025-070 Juiz de Fora- MG.