
ARTIGO ORIGINAL

Desenvolvimento de um modelo animal de conjuntivite alérgica: importância de fatores genéticos e da concentração de alérgenos na resposta imunológica

Development of an animal model of allergic conjunctivitis: the role of genetic factors and sensitizing-antigen concentration in the immune response

Pedro Giavina-Bianchi¹, Jorge Kalil², Luiz Vicente Rizzo³

Resumo

Objetivo: Os objetivos da pesquisa são: 1. Desenvolver um modelo animal que simule a conjuntivite alérgica humana. 2. Estudar como a resposta alérgica pode ser influenciada pela dose de alérgeno utilizada na imunização e pela genética do animal imunizado.

Métodos: Sessenta camundongos da linhagem C57Bl/6 e sessenta da linhagem BALB/c foram imunizados com o extrato de ácaro (Dpt), recebendo 5, 50 ou 500 µg deste. Após a provocação ocular, foram analisados: os níveis séricos das imunoglobulinas IgE e IgG1 totais e específicas, a proliferação linfocítica específica para Dpt com dosagem das citocinas do sobrenadante e a histopatologia da conjuntiva.

Resultados: Desenvolveu-se um modelo murino de conjuntivite alérgica que se assemelha à doença humana do ponto de vista clínico e laboratorial. A alergia ocular associou-se à secreção de citocinas do padrão Th2, com exceção da IL-10, que juntamente com o IFN-γ podem participar do bloqueio da resposta alérgica.

Conclusões: Com o modelo desenvolvido, possibilita-se o estudo da fisiopatogênese da doença, o desenvolvimento e a avaliação de intervenções terapêuticas e de seus efeitos sobre o sistema imunológico. A utilização de camundongos BALB/c e C57Bl/6, demonstrou que fatores genéticos determinam não só a suscetibilidade ou resistência à doença atópica, mas também, influem na concentração ideal de antígeno para desencadeá-la. Os dados observados no estudo indicam

Abstract

Objective: The aims of the present study are: 1: to develop an animal model that simulates human allergic conjunctivitis; and 2: to study how the allergic response may be influenced by the allergen dose used for immunization and by genetic factors.

Methods: Sixty mice of the C57Bl/6 strain and sixty of the BALB/c strain were immunized, receiving 5 µg, 50 µg, or 500 µg of allergen. After ocular challenge, mice were examined in order to clinically verify the occurrence or not of conjunctivitis. The material obtained from the animals was used for total and specific IgE and IgG1 dosage, for assays of Dpt-specific lymphocyte proliferation and supernatant cytokine dosage, and for histopathological evaluation of the conjunctiva.

Results: We have developed a murine model of allergic conjunctivitis induced by the *Dermatophagoides pteronyssinus*. The model is similar to human disease clinically and from laboratory findings. In the mouse, conjunctivitis was associated with a Th2 cytokine profile. However, IL-10 seemed involved with disease blockade in association with IFN-γ.

Conclusions: The murine model developed is suitable for the study of immunopathogenesis and as a template for future therapies. Using BALB/c and C57Bl/6 mice, we demonstrated that genetic factors play a role in both determining susceptibility and resistance but also to establish the allergen concentration needed to induce or to block disease development.

que existe uma dose limiar na sensibilização que deve ser atingida para o desencadeamento da resposta alérgica e uma dose de bloqueio, ou seja, uma quantidade excessiva de alérgenos que impediria a reação.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(5):176-184 conjuntivite alérgica, hipersensibilidade imediata, camundongos, mucosas, ácaros.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(5):176-184 allergic conjunctivitis, immediate hypersensitivity, mice, mucosae, mites

1 - Doutor em Imunologia Clínica e Alergia, Médico-Assistente do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da FMUSP; 2 - Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP, Coordenador do Curso de Pós Graduação "Sensu Lato" da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP, Coordenador do Instituto do Milênio III; 3 - Professor Livre Docente do Departamento de Imunologia, ICB-IV, FMUSP. Instituição: Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP

Introdução

A conjuntivite alérgica foi reconhecida clinicamente pela primeira vez como uma doença em 1819, por Bostock¹. Posteriormente, trabalhos demonstraram que esta se tratava de uma reação de hipersensibilidade do tipo I², havendo a participação de clones de linfócitos T que secretam preferencialmente citocinas do perfil Th2³.

Estima-se que a prevalência da conjuntivite alérgica seja cerca de 20% na população japonesa⁴, de 25% na população norte-americana⁵ e de 18% nas crianças do Reino Unido⁶. Embora esta enfermidade esteja geralmente associada a bom prognóstico, podem ocorrer complicações em decorrência da inflamação crônica, com graus variados de morbidade⁷. Nos EUA, em 1996, os gastos médicos diretos com a rinoconjuntivite alérgica somaram aproximadamente 5.9 bilhões de dólares⁸.

Os modelos animais de doença são de extrema importância para o estudo da fisiopatogenia das doenças humanas e para o teste de novas intervenções terapêuticas. Os modelos experimentais de conjuntivites alérgicas existentes podem variar quanto ao animal utilizado, o alérgeno sensibilizante e a via de sensibilização, entre outros fatores⁹.

No Brasil, os ácaros, principalmente o *Dermatophagoides pteronyssinus* e a *Blomia tropicalis*, são os principais agentes etiológicos da doença

ocular alérgica¹⁰. Por isto, no presente trabalho, optou-se pelo desenvolvimento de um modelo murino de conjuntivite alérgica desencadeada pelo ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Foram escolhidas duas linhagens de camundongos, C57Bl/6 e BALB/c, para serem sensibilizadas por via subcutânea, o que permite maior chance de se conseguir um modelo "ideal", além de possibilitar estudar a genética como um dos fatores de interferência na resposta alérgica. Estudos têm demonstrado que existem diferenças entre as repostas imunológicas dos camundongos C57Bl/6 e BALB/c, os primeiros tendo um perfil mais Th1 e os últimos mais Th2¹¹.

Os objetivos da pesquisa foram: 1. Desenvolver um modelo animal que simule a conjuntivite alérgica humana. 2. Estudar como a resposta alérgica pode ser influenciada pela dose de alérgeno utilizada na imunização e pela genética do animal imunizado.

Material e métodos

Procedeu-se a imunização de camundongos com solução preparada a partir do extrato do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) no dia zero. Passados dez dias, realizou-se a provocação ocular para indução da conjuntivite alérgica. A análise clínica e a obtenção do material para a análise laboratorial foram realizadas, respectivamente, vinte minutos e vinte e quatro horas após o desafio ocular. Cada etapa da pesquisa será detalhada a seguir.

Sessenta camundongos da linhagem C57Bl/6 e sessenta da linhagem BALB/c foram estudados. Os animais tinham entre 4 e 8 semanas de vida, sendo utilizados machos e fêmeas. Os mesmos foram obtidos e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do ICB da USP, em condições padronizadas.

O extrato de Dpt, o alérgeno da pesquisa, foi gentilmente doado pelo Laboratório IPI-ASAC do Brasil. Este extrato, que é padronizado e estava liofilizado, foi pesado e diluído em salina tampoadada com fosfato (pH 7.2) para uma concentração de 4,18 µg/µl (peso total/volume). Após a diluição, retiraram-se desta solução inicial os volumes necessários para que os camundongos recebessem 5 µg, 50 µg, e 500 µg de alérgeno no ato da imunização, aos quais foram acrescentados 100 µl de hidróxido de alumínio, utilizado como adjuvante. Como placebo utilizou-se 100 µl de hidróxido de alumínio associado a 120 µl de salina. Como solução para provocação, utilizou-se a própria solução inicial com 4,18 µg/µl de alérgeno.

Camundongos de ambas as linhagens foram separados em quatro grupos. O grupo controle recebeu placebo e os outros três grupos receberam uma das soluções de imunização, com 5, 50 ou 500 µg de alérgeno, sendo designados respectivamente grupo I, II e III. Ao final da pesquisa foram estudados, para cada linhagem, 15 animais no grupo controle, 20 animais no grupo I, 5 animais no grupo II e 20 animais no grupo III. As soluções de sensibilização foram administradas por via subcutânea na base das duas coxas e na região inferior do abdômen. Um quarto da dose foi injetado em cada coxa e a metade restante no abdômen. Dez dias após a sensibilização, os camundongos, incluindo os controles, foram desafiados com a aplicação de duas gotas em cada olho da solução de alérgeno (4,18 µg/µl).

Vinte minutos após a provocação, os camundongos foram examinados para constatar-se clinicamente a ocorrência ou não de conjuntivite, sendo observado quatro sinais clínicos: edema de conjuntiva, hiperemia de conjuntiva, edema de pálpebra e lacrimejamento. Utilizou-se uma graduação de zero a três cruzes para cada sinal, adaptando-se uma tabela de escore desenvolvida por Ballas *et al*¹². Portanto, cada animal recebeu um escore clínico total de zero a doze cruzes, proporcionalmente à intensidade da conjuntivite. O observador não sabia se estava avaliando um camundongo placebo ou um imunizado.

Vinte e quatro horas após o desafio, os camundongos foram anestesiados com éter e submetidos a punção cardíaca para obtenção de sangue. Posteriormente, ainda sob efeito da anestesia, os ani-

mais foram sacrificados por secção da medula espinhal através da fratura da coluna vertebral, sendo então realizada a dissecação dos gânglios ilíacos e para-aórticos e a enucleação dos olhos. Utilizou-se o material obtido para a dosagem das imunoglobulinas IgE e IgG1 totais e específicas, para a realização da proliferação linfocítica específica para Dpt com dosagem das citocinas do sobrenadante e para a realização do estudo histopatológico da conjuntiva. Utilizou-se o soro do sangue coletado por punção cardíaca para mensuração dos níveis de anticorpos IgE e IgG1 totais e específicos para Dpt, o que foi realizado pelo método de ELISA. Na avaliação da proliferação específica, células de linfonodo foram cultivadas em microplacas de fundo chato, com ou sem o estímulo do extrato de Dpt a 4,18 µg/µl. Foi mantida uma concentração de 3×10^6 células/ml, com um volume final de 0,2 ml por poço. Com a utilização de um meio padronizado, as células foram cultivadas por 90 horas e durante as últimas 16 horas foram pulsadas com timidina tritiada. A incorporação de radioatividade foi medida em cpm por técnica padronizada de cintilação líquida por um contador de cintilação β . As culturas foram feitas em triplicata. Calculou-se o índice de estimulação pela divisão da média das três culturas de células estimuladas com Dpt pela média das três culturas de células controles que não receberam estímulo. Um índice maior ou igual a três foi considerado positivo. Nas culturas de linfócitos onde foram dosadas as citocinas, o sobrenadante foi colhido após 48 horas do início da cultura e os níveis de citocinas foram medidos pelo método de ELISA. Inicialmente, foram dosadas as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Posteriormente, acrescentou-se a pesquisa de IL-12 e IFN- γ em 10 camundongos de cada linhagem, cinco destes imunizados com 5 µg e cinco com 500 µg. Para o estudo histopatológico, os olhos dos camundongos foram retirados com a conjuntiva intacta, fixados por 30 minutos em glutaraldeído a 4% e depois transferidos para formaldeído a 10%, onde permaneceram por pelo menos 24 horas. A secção dos mesmos foi feita, após embebição em parafina, através do plano vertical na região central. Retiraram-se cerca de cinco espécimes de tecido contendo conjuntiva e córnea. Foram utilizados os corantes Giemsa, ácido periódico de Schiff e

hematoxilina e eosina para avaliar o infiltrado inflamatório. Uma oftalmologista treinada em patologia ocular, sem saber da procedência dos tecidos, realizou a contagem celular (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos e células caliciformes) e atribuiu um escore histopatológico ao processo inflamatório, baseando-se no escore desenvolvido pelo Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Imunologia do ICB da USP.

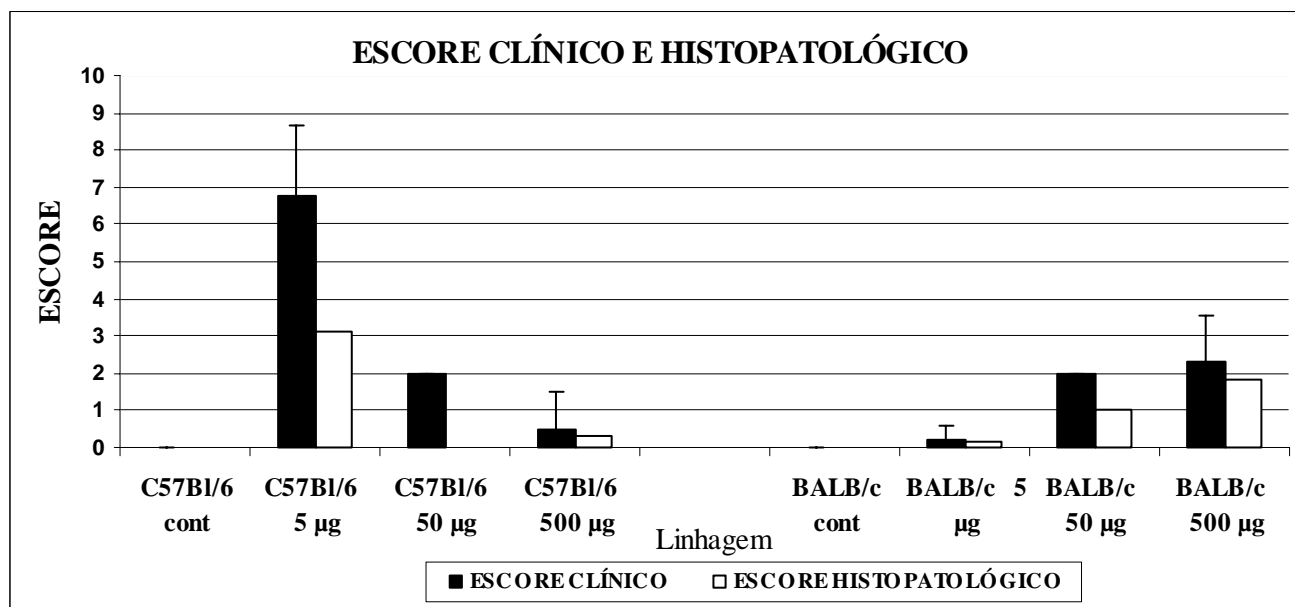
Utilizou-se o teste t de “Student” pareado bi-caudal na avaliação das diferenças observadas entre os grupos estudados, com o intuito de se determinar se estas são estatisticamente significantes. O grupo I e o grupo III foram comparados com o grupo controle e entre si. Diferenças que apresentaram testes com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

Resultados

Conseguiu-se induzir conjuntivite alérgica desencadeada pelo *Dermathophagoides pteronyssinus* nos camundongos das duas linhagens. Observou-se que a dose ideal para a sensibilização dos

animais variou, sendo de 5 μg para a linhagem C57Bl/6 e de 500 μg para a linhagem BALB/c. Ou seja, os camundongos C57Bl/6 apresentavam conjuntivite alérgica com maior frequência e intensidade quando imunizados com a menor dose de alérgeno, enquanto que com os camundongos da outra linhagem ocorria o inverso. No caso da linhagem C57Bl/6, aumentando-se a quantidade de alérgeno injetado, notou-se um possível bloqueio da resposta alérgica. Já em relação à linhagem BALB/c, foi necessário o aumento da dose de sensibilização para que se atingisse o limiar para desencadeamento da reação alérgica. O escore clínico e o histopatológico foram compatíveis em demonstrar os achados acima mencionados (gráfico 1). No estudo histopatológico, observou-se um processo inflamatório da conjuntiva e da córnea com lesão do epitélio de revestimento destas estruturas, edema e infiltrado com predomínio de neutrófilos e eosinófilos. Verificou-se também uma presença importante de linfócitos e um aumento discreto de mastócitos na substância própria da conjuntiva dos animais.

Gráfico 1



Grupos: cont – controle; 5 μg – grupo I; 50 μg – grupo II; 500 μg grupo III

Número de camundongos por grupo: cont – 15; grupo I – 20; grupo II – 5; grupo III – 20

* $p < 0.05$ em relação ao controle

** $p < 0.05$ na comparação entre grupos I e III

Na análise da IgE total e da IgE específica para Dpt, concentrações maiores foram observadas nos animais imunizados em relação aos controles. Porém, a elevação da IgE total só foi estatisticamente significativa para os animais BALB/c imunizados com 500 µg de alérgeno. O aumento da IgE específica nos camundongos do grupo I (5 µg) e III (500 µg), assim como a diferença nos níveis de anticorpos existente entre estes dois grupos, foram significantes, tanto na linhagem BALB/c ($p < 0,01$), como na C57Bl/6 ($p < 0,05$). No estudo da IgE específica constatou-se que, em concordância com os resultados dos escores clínicos e histopatológicos, dependendo da dose de imunização têm-se respostas maiores ou menores. Enquanto a linhagem C57Bl/6 produziu níveis de IgE específica maiores frente a uma sensibilização com 5 µg de Dpt, a linhagem BALB/c produziu níveis maiores quando sensibilizada com 500 µg. Comparando os animais controles entre si, foi constatado que as concentrações sanguíneas médias de IgE total eram pelo menos cinco a dez vezes maiores nos camundongos BALB/c.

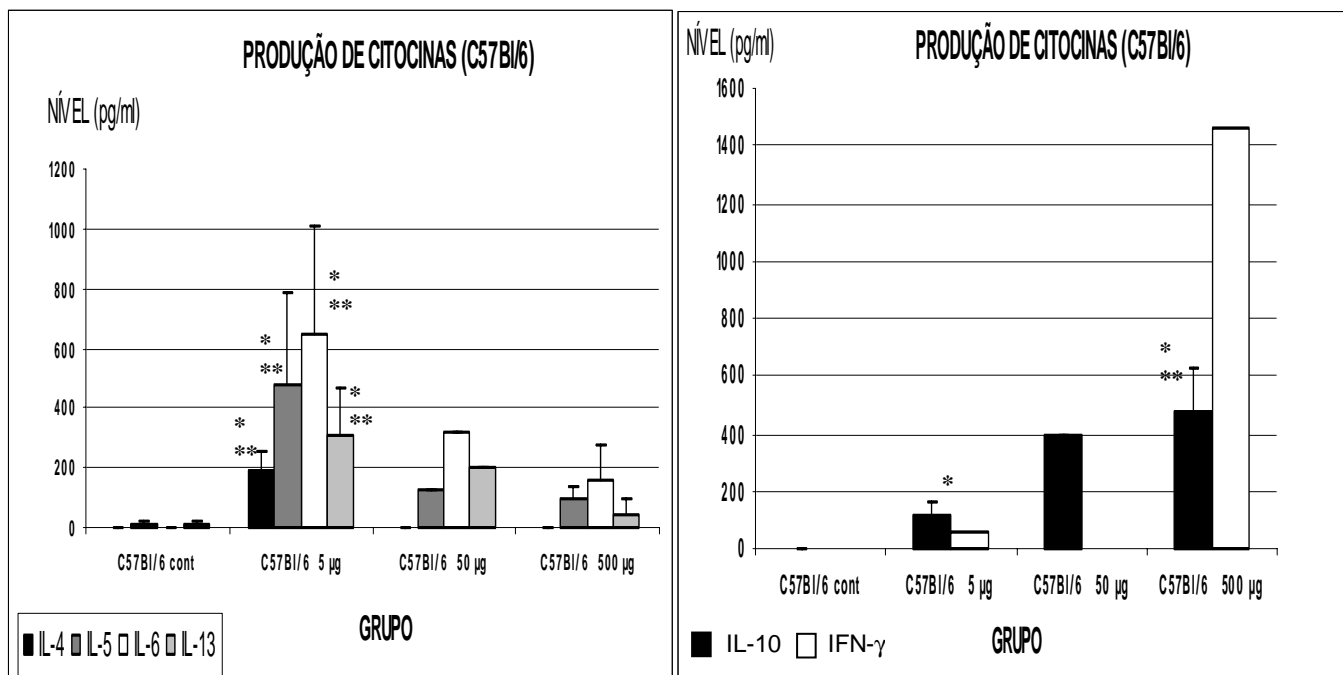
Houve um discreto aumento na concentração de IgG1 total nos camundongos imunizados quando comparados aos controles, sendo que a média dos níveis de anticorpos era aproximadamente o dobro nos camundongos BALB/c em relação aos animais C57Bl/6. Entretanto, a elevação da IgG1 total só atingiu significância estatística na linhagem C57Bl/6. Detectou-se a presença de IgG1 específica para Dpt nos animais sensibilizados das duas linhagens estudadas, em concentrações cerca de dez a vinte vezes maiores do que nos controles. Este aumento nos níveis de anticorpos obteve significância estatística nos grupos I e III da linhagem BALB/c ($p < 0,05$) e no grupo I da linhagem C57Bl/6 ($p < 0,01$). A diferença nos níveis de IgG1 específica existente entre o grupo I e III dos camundongos C57Bl/6 também foi estatisticamente significativa.

Como esperado, observou-se maior proliferação de linfócitos nos camundongos imunizados do que nos grupos controles. Esta diferença foi estatisticamente significativa para todos os grupos sensibilizados da linhagem C57Bl/6 ($p < 0,01$) e apenas para o grupo III da linhagem BALB/c, que havia sido imunizado com 500 µg ($p < 0,01$). Na análise da linhagem BALB/c, a proliferação blás-

tica foi diretamente proporcional à quantidade de alérgeno utilizada na sensibilização. Nos camundongos C57Bl/6, não se evidenciou correlação entre a dose de imunização e o índice de proliferação.

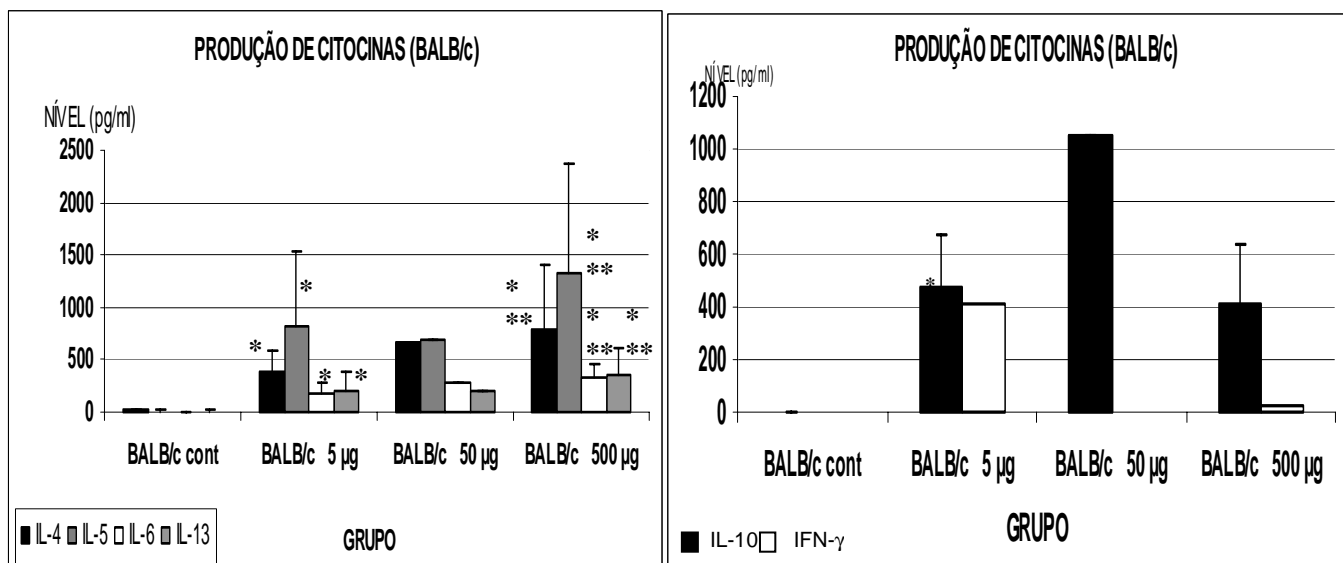
As concentrações das citocinas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos dos animais sensibilizados foram estatisticamente maiores do que os dos animais controles (gráficos 2 e 3). Verificou-se uma tendência da produção das citocinas correlacionar-se com a dose de imunização. Nos estudos da IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, observou-se uma relação inversamente proporcional na linhagem C57Bl/6, com maior produção destas citocinas nos camundongos sensibilizados com 5 µg de antígeno, enquanto o inverso foi constatado na linhagem BALB/c, com maior produção nos animais imunizados com 500 µg. Desta maneira, os grupos que apresentaram conjuntivite alérgica em maior frequência e intensidade, pelos critérios clínicos e histopatológicos, exibiam maior secreção das citocinas descritas acima, caracterizando uma resposta imunológica do padrão Th2. Por outro lado, na análise da IL-10, mediador comumente detectado em reações imunológicas do tipo Th2, constatou-se uma relação oposta nos camundongos da linhagem C57Bl/6, onde maiores dosagens desta citocina ocorreram nos camundongos imunizados com as maiores quantidades de alérgenos. Sendo assim, as maiores concentrações de IL-10 foram aferidas no grupo III (500 µg), onde a doença ocular foi menos freqüente e intensa e onde se mediram os menores níveis, excetuando-se os controles, das demais citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13). Na linhagem BALB/c também se observou um aumento da produção de IL-10 nos animais sensibilizados, mas este aumento foi independente da dose de imunização e não correlacionado com os escores clínico e histopatológico. Nas duas linhagens estudadas, a secreção de IFN- γ se comportou assim como a de IL-10 havia se comportado na linhagem C57Bl/6. Os animais C57Bl/6 e BALB/c sensibilizados com 500 µg e 5 µg respectivamente, foram os que secretaram maior quantidade desta citocina e apresentaram conjuntivite em menor frequência e intensidade. Também se constatou a produção da IL-12 no sobrenadante das culturas dos animais imunizados, embora em pequenas quantidades.

Gráfico 2 - Citocinas do sobrenadante das culturas linfocitárias da linhagem C57Bl6



Grupos: cont – controle; 5 µg – grupo I; 50 µg – grupo II; 500 µg grupo III
 Número de camundongos por grupo: cont – 15; grupo I – 20; grupo II – 5; grupo III – 20
 *p < 0.05 em relação ao controle
 **p < 0.05 na comparação entre grupos I e III

Gráfico 3 - Citocinas do sobrenadante das culturas linfocitárias da linhagem BALB/c



Grupos: cont – controle; 5 µg – grupo I; 50 µg – grupo II; 500 µg grupo III
 Número de camundongos por grupo: cont – 15; grupo I – 20; grupo II – 5; grupo III – 20
 *p < 0.05 em relação ao controle
 **p < 0.05 na comparação entre grupos I e III

Os níveis de IFN- γ e a IL-12 só foram dosados em cinco camundongos do grupo I e cinco do grupo III de cada linhagem, durante ensaio que não utilizou grupo controle, realizando-se a cultura conforme descrito anteriormente. Portanto, não foi possível a realização de análise estatística na avaliação da produção destas citocinas.

Discussão

Desenvolveu-se um modelo de conjuntivite alérgica desencadeada pelo ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c. A conjuntivite alérgica induzida no modelo assemelha-se à humana, tanto do ponto de vista clínico como laboratorial. Clinicamente, foi observado que os camundongos esfregavam os olhos e apresentavam edema de pálpebra e conjuntiva, secreção ocular e hiperemia conjuntival, correspondendo à fase imediata do processo alérgico, assim como é descrito no ser humano¹³. Na análise histopatológica, constatou-se um infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na conjuntiva dos animais estudados, correspondendo à fase tardia do processo alérgico, de maneira similar ao observado na conjuntivite humana¹⁴.

No presente trabalho, apresenta-se um modelo murino de conjuntivite alérgica que possui as vantagens de utilizar um alérgeno relevante no Brasil.

Paralelamente à doença ocular, houve uma resposta imunológica sistêmica induzida pelo ácaro, caracterizada laboratorialmente pela produção de IgG1 total e específica, produção de IgE total e específica e proliferação linfocítica específica com secreção de citocinas pertencentes ao padrão de resposta imunológica Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-13.

O presente estudo indica que as características genéticas podem não só determinar a suscetibilidade ou resistência à doença alérgica, mas também definir qual a dose ideal de antígeno para desencadear a patologia. Dependendo da quantidade de antígeno estimulante, pode não se atingir o limiar necessário para o desenvolvimento da doença, ou por outro lado, se a dose for excessiva, pode haver um bloqueio da resposta patológica. Altas doses de antígenos na imunização podem induzir tolerância celular, ou induzir respostas imunológicas com formação de imunoglobulinas de outros isotipos, suprimindo a formação da IgE.

Mais que apenas o MHC, a afinidade com que a apresentação antigênica é feita influencia na determinação do padrão da resposta imunológica¹⁵. Apresentações com alta afinidade tendem a desencadear respostas imunológicas com perfil Th1, enquanto apresentações com baixa afinidade levam a respostas imunológicas com perfil Th2. Em última análise, esta afinidade é determinada pelo tripé formado por três estruturas: o antígeno, o MHC e o receptor de célula T (“TCR”). Portanto uma resposta imunológica pode variar de linhagem para linhagem, mantendo-se o mesmo antígeno sensibilizante, ou de antígeno para antígeno, mantendo-se a mesma linhagem imunizada¹⁶.

Em relação aos camundongos da linhagem C57Bl/6, os animais imunizados com 5 μ g de Dpt foram os que apresentaram conjuntivite alérgica em maior frequência e gravidade pelos critérios clínico e histopatológico. Estes animais também apresentaram maior índice de proliferação linfocítica e maior secreção de IgG1 e IgE específicas, de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Já a secreção de IL-10 pelos linfócitos destes camundongos, embora maior que a dos controles, foi menor que a dos animais sensibilizados com 500 μ g. Em relação aos camundongos da linhagem BALB/c, os animais imunizados com 500 μ g de Dpt foram os que apresentaram conjuntivite alérgica em maior frequência e gravidade pelos critérios clínico e histopatológico. Estes animais também apresentaram maior índice de proliferação linfocítica e maior secreção de IgG1 e IgE específicas, de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Por um lado, os camundongos BALB/c, tanto os controles como os sensibilizados, apresentaram maior tendência de secretar IgE total e algumas das citocinas do perfil de resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) do que os animais C57Bl/6, fato este compatível com a literatura. Entretanto, na linhagem BALB/c a conjuntivite alérgica ocorreu em menor frequência e intensidade segundo critérios clínicos e histopatológicos, além da dose ideal de sensibilização ter sido maior (500 μ g), o que poderia caracterizar a existência de um limiar para o desencadeamento da resposta alérgica. Em paralelo, no homem também existe o conceito de limiar para o desencadeamento de algumas respostas alérgicas¹⁷.

Pode-se especular que o MHC e o TCR dos animais C57Bl/6 têm grande afinidade pelos epítopos do *Dermatophagoides pteronyssinus* e, portanto, tendem a montar uma resposta imunológica padrão Th1 contra estes. Esta tendência poderia ser anulada caso os antígenos a serem apresentados estivessem presentes no meio em quantidades mínimas (5 µg). O inverso ocorreria com a linhagem BALB/c, onde uma afinidade extremamente baixa do tripé MHC – epítipo – TCR levariam a necessidade de grandes doses de alérgenos para se atingir o limiar de desencadeamento da resposta imunológica. Baseado-se nesta especulação fica a questão: qualquer indivíduo pode desenvolver uma resposta alérgica, uma vez estabelecida as condições ótimas para seu “background” genético?

Observando a secreção de citocinas dos linfócitos dos camundongos C57Bl/6, nota-se que esta é inversamente proporcional à dose de sensibilização, com exceção da IL-10 e do IFN-γ. O estudo permite a formulação da hipótese de que, nesta linhagem, uma dose excessiva de imunização poderia acarretar no bloqueio da resposta inflamatória alérgica, talvez pela ação da citocinas IL-10 e IFN-γ, as quais poderiam ser produzidas por células reguladoras. A produção de IL-10 pelos camundongos sensibilizados com 500 µg, que apresentaram doença ocular alérgica em menor frequência e intensidade, é estatisticamente maior do que a dos animais que receberam 5 µg e a dos controle. O IFN-γ apresentou o mesmo comportamento, mas como o experimento para sua detecção foi feito com um número pequeno de espécimes e sem grupo controle, não foi possível a análise estatística. Faz-se necessário a realização de novas pesquisas no modelo aqui desenvolvido, para maior definição do papel do IFN-γ neste processo alérgico.

Na linhagem BALB/c houve aumento estatisticamente significativa da secreção de IL-10 nos grupos sensibilizados em relação aos grupos controles, mas não se constatou uma relação entre o nível da citocina e a dose de imunização. Entretanto, talvez não se tenha observado uma dose de bloqueio da reação alérgica nestes animais, porque a mesma não tenha sido atingida. Assim como na linhagem C57Bl/6, nos animais BALB/c o IFN-γ foi uma citocina inibitória do perfil Th2,

estando presente em maiores concentrações nos camundongos que apresentaram reações alérgicas em menor frequência e intensidade. Conforme descrito acima, não foi possível a realização de testes estatísticos para este parâmetro.

Atualmente, há indícios na literatura de que a IL-10 é um dos fatores controladores atuantes no desenvolvimento e na supressão da imunidade específica, podendo inibir a proliferação e a atividade secretória de ambos os subtipos de linfócitos T^{18,19}. Também se tem demonstrado que na fisiopatogenia das doenças oculares de evolução mais grave e mais crônica, além de maior participação de células, como o eosinófilo e o linfócito Th2, pode haver também o envolvimento do padrão Th1 da resposta imunológica²⁰.

Conclui-se que o modelo murino de conjuntivite alérgica desencadeada pelo ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* desenvolvido neste trabalho simula a doença humana, é prático e fácil de ser reproduzido por outros pesquisadores. Possibilita-se, assim, o estudo da fisiopatogênese da doença ocular alérgica, o desenvolvimento de intervenções terapêuticas e a avaliação do efeito destas na resposta imunológica.

O presente trabalho é original, no sentido que não existe descrito na literatura um modelo animal experimental de conjuntivite alérgica desencadeada por *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Demonstrou-se que fatores genéticos determinam não só a suscetibilidade ou resistência à doença atópica, mas também, influem na dose ideal de antígeno para desencadeá-la. Os dados observados no estudo indicam que existe uma dose limiar na sensibilização que deve ser atingida para que haja o desencadeamento da resposta alérgica e uma dose de bloqueio, ou seja, uma quantidade excessiva de alérgenos que impediria a reação.

Referências bibliográficas

1. Bostock J. Med Chir Trans 1819;10:161.
2. Bonini S, Ghinelli E. The early and late phase of the ocular allergic reaction. Acta Ophthalmol Scand, 2000;78:41.
3. Romagnani S, Maggi E, Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Ricci M. Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991;94:133-6.

4. Yasuda M, Kato M, Nabe T, Nakata K, Cono S. An experimental allergic conjunctivitis induced by topical and repetitive applications of Japanese cedar pollens in guinea pigs. *Inflamm Res*, 1999;48:325-336.
5. Calonge M. Classification of ocular atopic/allergic disorders and conditions: an unsolved problem. *Acta Ophthalmol Scand*, 1999;77:10-13.
6. ISAAC (“The International Study of Asthma and Allergies in Childhood”). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet*, 1998;351:1225-1232.
7. Tabbara KF. Ocular complications of vernal keratoconjunctivitis. *Can J Ophthalmol*, 1999;34:88-92.
8. Ray NF, Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gergen PJ, Kaliner M, *et al.* Direct expenditures for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis in 1996, including the contributions of related airway illnesses. *J Allergy Clin Immunol*, 1999;103:401-7.
9. Magone MT, Chan CC, Rizzo LV, Kozhich AT, Whitcup SM. A novel murine model of allergic conjunctivitis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998;87:75-84.
10. Rosário Filho NA. Sensibilización al ácaro *Blomia tropicalis* en pacientes con alergia respiratoria. *Rev Alerg Mex*, 1992;39:96-100.
11. Matsushita S, Katz DH. B cell sensitivity to IgE-suppressive activity of IFN-gamma is polymorphic and controlled by a non-H-2-linked gene. *Cell Immunol*, 1992;143:212-9.
12. Ballas Z, Blumenthal M, Tinkelman DG, Kriz R, Rupp G. Clinical evaluation of ketorolac tromethamine 0.5% ophthalmic solution for the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Surv Ophthalmol*, 1993;38:141-8.
13. Friedlaender MH. Conjunctivitis of allergic origin: clinical presentation and differential diagnosis. *Surv Ophthalmol*, 1993;38:105-114.
14. Bonini S, Vecchione A, Naim DM, Allansmith MR, Balsano F. Inflammatory changes in conjunctival scrapings after allergen provocation in humans. *J Allergy Clin Immunol*, 1988;82:462-9.
15. Murray JS, Madri J, Tite J, Carding SR, Bottomly K. MHC control of CD4+ T cell subset activation. *J Exp Med*, 1989;170:2135-2140.
16. Levine BB, Vaz NM. Effect of combinations of inbred strain, antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy*, 1970;39:156.
17. Bjorgsten B, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Munir AKM. Low level to house dust mite stimulate T cell response during early childhood independent of atopy. *Clin Exp Allergy*, 1996;26:775-9.
18. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, 1993;150:353-60.
19. Akdis CA, Blaser K. Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. *Microbes Infect*, 2001;3:891-8.
20. Metz DP, Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman SL. T-cell cytokines in chronic allergic eye disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1997;100:817-824.

Endereço para correspondência

Pedro Giavina-Bianchi

R. Prof. Arthur Ramos, 178 ap. 211A

01454-010 - Jd. Paulistano - São Paulo - SP