

AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE AO DINITROCLORO BENZENO EM RATOS TRATADOS OU NÃO COM CICLOSPORINA

Luis Carlos SPOLIDORIO*
Mário Roberto VIZIOLI**
Oslei Paes de ALMEIDA**

- RESUMO: Avaliou-se nesse trabalho a resposta imunológica de ratos Wistar, através da hipersensibilidade tipo IV, celular ou retardada, provocada pelo DNCB em cinco grupos de 10 ratos. Para a imunização, aplicou-se sobre a pele dos animais 50 µl de DNCB, e a reação foi desencadeada com concentrações crescentes de 10, 20, 30, 50 e 100 mg/ml na superfície da orelha esquerda e, após 24 horas, foi feita uma relação de peso das orelhas esquerda/direita (controle). Todos os animais desenvolveram reações de hipersensibilidade tipo IV num mesmo padrão clínico. O mesmo teste foi aplicado em cinco grupos de 5 ratos que receberam doses de 5, 7, 10, 30 e 50 mg/kg/dia de ciclosporina. Todos os animais tratados não responderam ao teste, deduzindo-se que eles estavam imunossuprimidos pela ciclosporina.
- PALAVRAS-CHAVE: Ciclosporinas; dinitroclorobenzeno.

Introdução

A ciclosporina é um polipeptídeo cíclico contendo 11 aminoácidos de fórmula C₆₂H₁₁₁O₁₂, que começou a ser desenvolvida na década de 1970, a partir dos fungos *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpo lucidum*, possuindo peso molecular 1202.6.¹³ A ciclosporina é largamente utilizada na profilaxia e no tratamento da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos.^{4, 7, 18}

Atualmente, a ciclosporina é também utilizada no tratamento de doenças auto-imunes como o pênfigo vulgar e bolhoso;² líquen plano oral;⁹ síndrome de Behcet;¹⁵ lúpus eritematoso sistêmico;¹¹ diabete Tipo I;¹⁹ artrite reumatóide;¹⁴ psoríase;¹⁰ alopecia areata;¹⁷ micoses fungóides;¹² e doença de Crohn's.¹ O efeito da ciclosporina, em

* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – Unicamp – 13414-018 – Piracicaba – SP.

face do desenvolvimento da hipersensibilidade tardia pelo DNCB, ainda não tem sido estudado com detalhe, entretanto os autores sugerem que a ciclosporina mostra efeito supressivo na sensibilidade de contato a vários sensibilizadores.^{5,22}

O objetivo deste estudo é observar a ocorrência de hipersensibilidade tardia produzida pelo DNCB em ratos e estudar os mesmos efeitos em ratos tratados com diferentes doses de ciclosporina.

Material e método

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), adultos, machos, pesando em média 220 gramas, alimentados com água e ração *ad libitum*.

Avaliação da hipersensibilidade ao dinitroclorobenzeno (DNCB)

Para análise da resposta imunológica dos ratos, usou-se o teste de hipersensibilidade retardada, provocado pelo DNCB. Os 50 ratos, distribuídos em cinco grupos de 10, foram sensibilizados, aplicando-se com uma micropipeta na pele da região abdominal, previamente tricotomizada, 50 µl da solução de dinitroclorobenzeno a 50 mg/ml, dissolvido em acetona e azeite de oliva na proporção de 1:1. Decorridos 5 dias, a reação de hipersensibilidade foi desencadeada, aplicando-se 5 µl da solução desencadeante com concentrações crescentes de 10, 20, 30, 50 e 100 mg/ml na superfície da orelha esquerda, nos cinco grupos, respectivamente. Um grupo de 10 animais foi submetido aos mesmos procedimentos, tendo solução de NaCl a 0,9% como substituto do DNCB, de acordo com Vadas et al.,²¹ e serviu como controle.

Após 24 horas, os animais foram sacrificados, através de inalação de éter etílico, e as orelhas retiradas com o auxílio de uma tesoura curva. A avaliação da resposta imunológica foi feita, de acordo com Corsini et al.,⁸ pela relação dos pesos da orelha que recebeu a dose desencadeante (orelha esquerda) e da orelha normal (orelha direita). Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando-se a orelha direita padrão.

Efeito da ciclosporina na reação de hipersensibilidade ao DNCB

Trinta ratos foram distribuídos em seis grupos de 5 animais, dos quais cinco grupos foram tratados com concentrações crescentes de ciclosporina, 5, 7, 10, 30 e 50 mg/kg de peso corporal/dia e o grupo controle, que recebeu solução de NaCl 0,9%.

Inicialmente, a ciclosporina recebida em ampolas para uso clínico, numa concentração de 50 mg/ml, foi diluída em solução de NaCl a 0,9%, até obter-se

concentração final de 10 mg/ml. A ciclosporina foi injetada intraperitonealmente, diariamente durante 7 dias, e o grupo controle recebeu a solução fisiológica pelo mesmo período de tempo.

Após 24 horas da primeira injeção intraperitoneal, os animais foram sensibilizados com DNCB e, depois de 5 dias, a reação de hipersensibilidade foi desencadeada na orelha esquerda, como descrito anteriormente. A quantificação dos resultados foi feita pela relação dos pesos entre as orelhas com hipersensibilidade (esquerda) e normal (direita).

Resultado

Avaliação da hipersensibilidade ao denitroclorobenzeno (DNCB)

As médias percentuais da relação entre os pesos das orelhas (esquerda/direita) dos grupos de animais que foram submetidos aos testes com DNCB foram maiores quando comparadas às do grupo controle. Verificou-se ainda que, com doses desencadeantes crescentes de DNCB, a relação dos pesos das orelhas teve aumento respectivo até a aplicação da dose de 50 mg/ml, tendendo, a partir dessa dosagem, a permanecer constante. Esses valores podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões dos percentuais da relação entre os pesos das orelhas (esquerda/direita) de ratos imunizados com DNCB e que receberam crescentes doses desencadeantes da mesma droga

Dose de DNCB mg/ml	Médias em % da relação dos pesos das orelhas esquerda/direita
Zero	0,5 + 0,3
10	16,4 + 2,6
20	15,8 + 2,0
30	17,8 + 3,0
50	18,9 + 2,8
100	18,1 + 2,5

Efeito da ciclosporina na reação de hipersensibilidade ao DNCB

Tomando-se por base os dados obtidos na Tabela 2, verificou-se que a relação em porcentagem dos pesos das orelhas (esquerda/direita) dos animais tratados com doses crescentes de ciclosporina e submetidos ao teste com DNCB é menor quando

comparado ao grupo controle (zero), indicando que não houve reação de hipersensibilidade com o referido teste.

Tabela 2 - Médias e desvios padrões dos percentuais da relação entre os pesos das orelhas esquerda/direita de ratos tratados com diversas concentrações de ciclosporina e ratos controles, submetidos à imunização pelo DNCB

Ciclosporina mg/kg/dia	Relação dos pesos das orelhas esquerda/direita
Zero	19,6 + 1,6
5	0,5 + 0,3
7	0,5 + 0,1
10	0,3 + 0,1
30	0,2 + 0,2
50	*

* Os animais tratados com 50 mg/kg/dia de ciclosporina morreram depois do 3º dia do tratamento, impossibilitando a avaliação.

Discussão

A avaliação da hipersensibilidade retardada (tipo IV) nos ratos deu-se pelo teste cutâneo do DNCB. Com essa metodologia, verificou-se que os ratos respondem positivamente ao teste cutâneo, conforme se observa na Tabela 1, em que 100% dos animais tiveram as orelhas esquerdas com peso mais acentuado. O DNCB é um haptemo capaz de, por si só, interagir com anticorpos e, possivelmente, com células T sensibilizadas, previamente formados por intermédio da imunização feita com o complexo haptemo molécula carreadora.⁶

Aplicando o mesmo teste em animais tratados com dose igual ou superior a 5 mg/kg de peso corporal/dia de ciclosporina, os ratos tiveram resposta reduzida ao teste, com aumento em média de 0,5% (Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos por Nakagawa et al.,¹⁶ que relatam que o uso tópico de ciclosporina em porcos da guiné, previamente sensibilizados com 2,4 denitroclorobenzeno (DNCB), inibiu a resposta à sensibilidade de contato. Alguns outros trabalhos similares mostraram que a ciclosporina é capaz de inibir reação alérgica e/ou reações de dermatite de contato.³

Todas essas reações de hipersensibilidade tardia e mesmo de dermatites de contato têm como fundamento a ação de células T; isto é, são reações imunológicas mediadas por células.⁶ Ao que parece, a ciclosporina bloqueia os linfócitos durante as fases G0 ou fase G1 do ciclo celular e inibe a liberação desencadeada por antígenos de linfocinas de células T ativadas.²⁰

Os dados deste trabalho sugerem que a ciclosporina, atuando na supressão das células T, inibiu a reação de hipersensibilidade tardia; entretanto, com a metodologia utilizada, não foi possível verificar o mecanismo de ação da ciclosporina, na inibição dessas reações, ante o DNCB.

Acreditamos que outras avaliações devem ser feitas para melhor compreender esses fenômenos, através de provas *in vitro* como a determinação das porcentagens de linfócitos T e B em sangue periférico e mesmo cultura de linfócitos T ante o DNCB e a ciclosporina.

Agradecimentos

Aos funcionários Artur Mendonça e Maria da Glória Vieira Celli, que auxiliaram na obtenção das biópsias e na confecção das lâminas; e a Herminia Bassi Maio, pelo auxílio no preparo do manuscrito.

SPOLIDORIO, L. C., VIZIOLI, M. R., ALMEIDA, O. P. de. Evaluation of hipersensibility to dinitrochlorobenzene in rats treated or not with cyclosporin-A. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.24, n.2, p.235-240, 1995.

- **ABSTRACT:** *The immunologic response induced by DNCB through the hypersensitivity type IV, were studied in five groups of 10 wistar rats each. For the immunization, it was applied on the animal abdomen skin a single dose of 50 µl of DNCB and the reactions was carried out with increasing concentrations of 10, 20, 30, 50 and 100 mg/ml in the surface of the left ear. After 24 hr, it was verified a weight relationship among the left and right (control) ears. All the animals developed hypersensitivity type IV in a same clinic pattern. The same test was applied in five groups of 5 wistar rats each, which received single doses of 5, 7, 10, 30 and 50 mg of cyclosporin-A/kg of body weigh per day. All treated animals with cyclosporin-A, did not reacted to the test, which made us to come to the conclusion that those animals were immunologic by cyclosporin.*
- **KEYWORDS:** *Cyclosporins; dinitrochlorobenzene.*

Referências bibliográficas

- 1 ALLISON, M. C., POUNDER, R. E. Cyclosporin for Crohn's disease. *Lancet*, v.1, p.902-3, 1984.
- 2 BARTHELEMY, H. et al. Treatment of nine cases of penphigus vulgaris with cyclosporine. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.18, p.851-4, 1983.
- 3 BIREN, C. A., BARR, R. J. Dermatologic application of cyclosporine. *Arch. Dermatol.*, v.12, p.1028-32, 1986.
- 4 BOREL, J. F. Basic science summary. In: KAHAN, B. *Cyclosporine: nature of the agent and its immunologic actions*. New York: Grune & Stratton, 1988. p.722-30.

- 5 BOREL, J. F., FEURER, C., MAGNEE, C. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*, v.32, p.1017-25, 1977.
- 6 CALICH, V. L. G., VAZ, C. A. C. *Imunologia básica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 1989. p.376.
- 7 CALNE, R. Y. et al. Cyclosporin A in clinical organ grafting. *Transplant. Proc.*, v.13, p.349-58, 1984.
- 8 CORSINI, A. C., BELLUCI, S. B., COSTA, M. G. A simple method of evaluating delayed type of hypersensitivity in mice. *J. Immunol. Methods*, v.30, p.195-200, 1979.
- 9 EISEN, D. et al. Effect of topical cyclosporine rinse on oral liquen planus: a doublen blind analysis. *N. Engl. J. Med.*, v.2, p.290-94, 1990.
- 10 ELLIS, C. N. et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double – blind study. *J. Am. Med. Assoc.*, v.256, p.3110-6, 1986.
- 11 FEUTREN, G. et al. The effects of cyclosporine in patients weter systence lupus. *Transplant. Proc.*, v.18, p.643-44, 1986.
- 12 JENSEN, J. H. et al. Cyclosporin A therapy for mycosis fungoides. *Arch. Dermatol.*, v.123, p.160-3, 1987.
- 13 MILPIED, B. La cyclosporine in dermatologie. *Ann. Dermatol. Venereol.*, v.115, p.391-7, 1988.
- 14 MULLER, W., HERRMANN, B. Cyclosporin A for psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, v.301, p.555, 1979.
- 15 NUSSENBLATT, R.B. et al. Effectiveness of cyclosporin therapy for Behcet's disease. *Arthrits Rheum.*, v.28, p.671-9, 1985.
- 16 NAKAGAWA, S. et al. Topical application of cyclosporine on guinea pig allergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol.*, v.124, p.907-10, 1988.
- 17 PARODI, A., REBORA, A. Topical cyclosporin in Alopecia areata. *Arch. Dermatol.*, v.123, p.165-6, 1987.
- 18 STARZL, T. E. et al. The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v.151, p.17-26, 1980.
- 19 STILLER, C. R. et al. Cyclosporine for treatment of early type I diabetes: preliminary results. *N. Engl. J. Med.*, v.308, p.1226-7, 1983.
- 20 THOMAS, S. E., GORDON, D. S. Cyclosporine. *South. Med. J.*, n.79, p.205-14, 1986.
- 21 VADAS, M. A., MILLER, J. G., WHITELAW, A. A radioisotopic method to measure delayed type hypersensitivity in the mouse. Studies in sensitized and normal mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v.49, p.670-92, 1975.
- 22 XUE, B. et al. Reversal by lymphokines of the effect of cyclosporin A on contact sensitivity and antibody production in mice. *J. Immunol.*, v.136, p.4128-33, 1986.

Recebido em 25.10.1995.