

E D A M I R A N D A V A Z

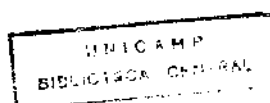
ANTICORPOS DA CLASSE IgE NO CAMUNDONGO:

PRODUÇÃO E REGULAÇÃO

)

Tese de doutoramento apresentada
ao Departamento de Microbiologia
e Imunologia do Instituto de Bio-
logia da Universidade Estadual
de Campinas.

1 9 7 5



AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Humberto Rangel e Ivan Mota pela orientação e estímulo.

Ao Dr. Nelson Monteiro Vaz pela minha iniciação em Imunologia e constante estímulo durante a minha formação.

Ao chefe do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal Fluminense, Dr. Cláudio Yurgensen e ao Coordenador da Cadeira de Imunologia Dr. Silvio Thales Torres, pelas facilidades proporcionadas durante a preparação desta tese.

À Dra. Najla Restum Miguel pela incansável ajuda na realização de muitos experimentos desta tese.

Aos inúmeros colegas do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense pela ajuda e apoio contínuos.

Aos meus amigos pelo estímulo de sempre.

Às Srtas. Ana Alice Amorim e Hermínia Muzanek pela dedicação na parte datilográfica.

C O N T E Ú D O

Págs.

INTRODUÇÃO	1
Formação do anticorpo IgE do camundongo	3
Influência da dose de antígeno	3
Controle genético do anticorpo IgE em camundongos	4
Mecanismo de regulação da produção dos anticorpos	5
Mecanismo de retroação	5
Com relação ao mecanismo de tolerância	6
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS	13
1. Efeito de altas doses de Ovalbumina não-agrega da na produção de IgG ₁ e IgE na resposta primá ria e secundária	13
2. Efeito de doses prévias de antígeno, Ovalbumi- na não-agregada, na produção de IgG ₁ e IgE ...	17
3. Efeito do soro hiperimune sobre a produção de IgE e IgG ₁ na resposta primária	28
DISCUSSÃO	30
RESUMO E CONCLUSÕES	36
BIBLIOGRAFIA	37

Aos meus filhos André, Bruno e Mabel
pela sua paciência e compreensão.

INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido feitos com a finalidade de classificar os diferentes anticorpos quanto à sua estrutura, propriedades físicas, químicas e biológicas e, no semtido de se estudar o mecanismo de produção e regulação.

Com relação ao anticorpo reagínico (IgE), já em 1921, PRAUSNITZ & KÜSTNER descreveram, pela primeira vez a existência de um anticorpo no soro de um deles (Küstner, que era alérgico a peixe cozido), capaz de sensibilizar pas-sivamente a pele de outro que não era alérgico ao mesmo alimento. Duas propriedades permitiram, desde logo, dife-renciar o novo anticorpo dos até então conhecidos: a sua termolabilidade e a capacidade de persistir por um longo tempo na pele homóloga após sensibilização passiva. Contudo, a caracterização deste anticorpo só foi possível bem mais tarde, graças aos trabalhos de ISHIZAKA & ISHIZAKA (1967), nos quais eles demonstraram que o anticorpo rea-gínico do homem pertencia a uma nova classe de imunoglobulina, apresentando propriedades físicas, químicas e bioló-gicas diferentes das imunoglobulinas já conhecidas, e que foi denominada de IgE.

Evidências indicando a existência de um anticorpo semelhante em outras espécies acumularam-se rapidamente : no rato (MOTA, 1963), no coelho (ZVAIFLER & BECKER, 1966), no cão (ROCHEY & SCHWARTZMAN, 1967), no macaco (ISHIZAKA & col., 1969 e WEISZER & col., 1968), no carneiro (HOGGART

SCOTH, 1969), no camundongo (MOTA & PEIXOTO, 1966), e no cobaio (CATTY, 1969; MOTA & PERINI, 1970).

Para a caracterização da IgE no homem foi muito importante o trabalho de JOHANSSON & BENNICH (1967). Estes Autores descreveram em pacientes um mieloma atípico, que foi mais tarde caracterizado por BENNICH e colaboradores (1969) como sendo da classe IgE, possibilitando, então, a determinação da estrutura química básica desta imunoglobulina e uma análise mais segura de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Na maioria das espécies estudadas, o anticorpo reagínico foi caracterizado também como uma nova classe de imunoglobulina, semelhante à IgE humana: no coelho por ISHIZAKA & col. (1970), no rato por STECHSCHULTE & col. (1970), no camundongo por PROUVOST-DANON (1972) e no cobaio por MARGNI & HASOS (1973). Anticorpos produzidos contra esses anticorpos apresentam reação cruzada com o IgE humano, mostrando a existência de similaridades antigênicas entre eles (ISHIZAKA & col., 1969; KANEYREZI & col., 1971).

Por um mecanismo que se desconhece ainda, os anticorpos reagínicos são facilmente induzidos por infestação com parasitas, como demonstrado em ratos (OGILVIE, 1964), em macacos (WEISZER & col., 1968), em coelhos (SCHOENBECKLER & SADUN, 1968), e em camundongos (MOTA & col., 1969). Níveis elevados destes anticorpos foram também observados em pacientes portadores de infestação por Asca-ris e Schistosoma (SMITHERS, 1967).

Formação do anticorpo IgE do camundongo

A produção de um anticorpo semelhante ao IgE humano foi obtida no camundongo por MOTA & PEIXOTO (1966), que usaram, para imunização, ovalbumina como antígeno e uma suspensão de Bordetella pertussis como adjuvante. Este anticorpo era termolábil, capaz de se fixar na pele por um longo período e tinha uma existência transitória no soro, aparecendo durante os primeiros dias posteriores à imunização e desaparecendo cerca de um mês após a imunização. Estas características o diferenciavam bem do anticorpo IgG₁ do camundongo descrito anteriormente por NUSSENZWEIG & col. (1964), que também possui atividade homocitotrópica. Recentemente, PROUVOST-DANNON (1972) conseguiu caracterizar este anticorpo como pertencente à classe IgE.

Influência da dose de antígeno

A produção do anticorpo IgE obtida pelos esquemas usuais de imunização artificial, usando doses elevadas de antígeno resulta em nível baixo e transitório deste anticorpo no soro (MOTA, 1967). Isto contrasta com os níveis relativamente elevados e persistentes do anticorpo IgE observado em pacientes alérgicos.

LEVINE & VAZ (1970), trabalhando com diferentes linhagens de camundongos isogênicos e usando baixas doses de antígeno protéico adsorvido em gel de hidróxido de alumínio, conseguiram obter, em determinadas linhagens, uma produção de IgE de nível e curso semelhantes ao deste anticorpo em pacientes alérgicos. Doses extremamente peque-

nas e administradas a intervalos de quatro semanas, resultavam em uma produção persistente do anticorpo reagínico.

Posteriormente, VAZ & col. (1971) obtiveram uma formação persistente de anticorpo reagínico detectável por vários meses, inoculando uma única dose de 0,1 µg de ovalbumina mais gel de $Al(OH)_3$ em camundongos Swiss 55. Os Autores tentaram esta mesma técnica em coelhos e cobaias, mas só conseguiram produção persistente após doses secundárias do antígeno com adjuvante.

Controle genético do anticorpo IgE em camundongos

O estudo da resposta imunológica em várias linhagens isogênicas de camundongos, com diferentes proteínas e haptenos conjugados a proteínas, mostrou diferenças significantes na produção de IgG_1 e IgE, dependendo da linhagem utilizada (LEVINE & VAZ, 1970).

VAZ & col. (1971 a), usando ovalbumina e ovomucóide, encontraram linhagens que eram boas produtoras de anticorpos para um dado antígeno e más para outro antígeno, e vice-versa. Quando os animais foram agrupados em bons e maus produtores em relação a um dos antígenos, estes Autores observaram que havia uma associação entre os alelos de histocompatibilidade do animal e a sua capacidade em responder bem ou mal a um determinado antígeno, demonstrando assim um controle genético na síntese do anticorpo reagínico (IgE), o qual está ligado ao locus autossômico H-2 presente pelo menos no par cromossômico IX.

Mecanismo de regulação da produção dos anticorpos

O controle genético da produção de anticorpos é feito por um sistema poligênico que regula a expressão deste caráter quantitativo (BIOZZI & col., 1971). Existem trabalhos tentando demonstrar um mecanismo que regula a fase produtiva da síntese de imunoglobulinas através de um sistema de retroação exercido pelo próprio anticorpo, ou por tolerância, utilizando baixas ou altas doses do antígeno não agregado.

Mecanismo de retroação

Theobald Smith, já em 1909, enfatizara o papel do excesso de anticorpo na diminuição da resposta imune. Todavia, somente após os estudos feitos sobre supressão dos anticorpos 19S e 7S, foi possível chegar à conclusão de que os seguintes fatores são importantes para este fenômeno: a natureza do antígeno utilizado na produção destes anticorpos (UHR & BAUMAN, 1961 a), o anticorpo utilizado na supressão, isto é, de baixa ou alta afinidade (EISEN & SISKIND, 1964), bem como a dose e o período da administração do antígeno (FINKELSTEIN & UHR, 1964).

UHR & BAUMAN (1961 a), administrando anticorpo passivamente, sugeriram um mecanismo de retroação. Estes mesmos Autores (1961 b) foram os primeiros a verificar que a resposta secundária era mais difícil de ser suprimida. Posteriormente, FINKELSTEIN & UHR (1964) demonstraram que o anticorpo 7S é mais eficaz que o 19S para inibir a produção do anticorpo 7S em animais inoculados pelo bac-

teriófago X174. Ao mesmo tempo, EISEN & SISKIND (1964) e WALKER & SISKIND (1968), demonstraram que a afinidade dos anticorpos aumenta durante a imunização, levantando a hipótese de existência de células com receptores de alta e baixa afinidade.

Com relação à supressão do anticorpo IgE em coelhos, STRANNEGARD & BELIN (1970) evidenciaram a existência de um mecanismo de retroação pelos anticorpos 7S, que também foi demonstrado em ratos, por TADA & OKUMURA (1971) e em camundongos, por ISHIZAKA & OKUDAIRA (1972).

Com relação ao mecanismo de tolerância

Para a indução de tolerância também é necessário levar em consideração a idade do animal, a natureza e o estado do antígeno (DRESSER, 1962), a via de inoculação (BATTISTO & MILLER, 1962) e a dose do antígeno (MITCHISON, 1964; 1968).

MITCHISON (1964), NOSSAL & AUSTIN (1966) demonstraram que um estado de tolerância e imunidade pode coexistir, principalmente quando induzido por baixa dose. Ao mesmo tempo, EISEN & SISKIND (1964), THEIS & SISKIND (1968) demonstraram que os linfócitos envolvidos na produção dos anticorpos de alta afinidade se tornam mais facilmente tolerantes, baseando-se para isto nos estudos da afinidade dos anticorpos produzidos em coelhos parcialmente tolerantes.

WEKSLER & col. (1973), estudando o controle da

síntese de anticorpos em camundongo adulto, administrando uma única dose tolerogênica, seguida de uma dose imunizante, viram que a baixa produção de anticorpos dependia da dose indutora de tolerância e do intervalo entre esta e a dose imunizante. Ainda neste trabalho eles estudaram a afinidade dos anticorpos formados após este tratamento.

Fazendo uma análise dos trabalhos que estudaram a produção do anticorpo reagínico, foi verificado que quando eram usadas altas doses de antígeno, a produção de IgE era transitória e de baixo título, enquanto que o IgG₁ apresentava título alto e, após uma segunda dose de antígeno, só se obtinha resposta secundária para IgG₁.

Com base nestas observações, foi possível estudar diversos aspectos da produção do IgE, dando margem a serem formuladas várias questões: Por que doses elevadas de antígeno resultam em títulos baixos e transitórios de IgE enquanto o IgG₁ alcança títulos elevados? Qual a razão da ausência de produção de IgE nestas condições após o estímulo secundário, quando nas mesmas condições ocorre uma produção elevada de IgG₁? Por que doses baixas de antígeno resultam em títulos elevados e persistentes de IgE e IgG₁, mesmo após subseqüentes estímulos antigênicos?

A abordagem a estas questões poderia ser através de estudos dos mecanismos de retroação e de tolerância.

Formulamos a hipótese de um mecanismo de tolerância classe-específico, no qual as células envolvidas na produção de IgE se tornariam mais facilmente tolerantes

que as envolvidas na produção de IgG_1 , e/ou um mecanismo de retroação através do anticorpo IgG_1 , que estaria suprimindo a produção de anticorpo IgE .

Hipótese de tolerância classe-específica - Esta hipótese foi abordada imunizando camundongos com antígenos não agregados, os quais induzem tolerância (DRESSER, 1962).

Hipótese de retroação por IgG_1 - Esta hipótese foi abordada imunizando camundongos isogênicos inoculados posteriormente com soros hiperimunes comprovadamente ricos em IgG_1 e, em seguida, titulados os anticorpos IgG_1 e IgE em seus soros.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Camundongos fêmeas, da linhagem isogênica DBA/1J e congênicos B10.D2 e B10.BR, pesando $\approx$ 22 g, foram utilizados para imunização.

Como animais receptores para o teste de anafilaxia passiva cutânea foram utilizados camundongos fêmeas SW₅₅ ("outbred") e camundongos AKR/J (isogênicos).

Estes animais foram fornecidos pelo Laboratório de Imunologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense e do Centro de Pesquisas e Formação em Imunologia da OMS/OPS situado no Instituto Butantan.

Substâncias usadas

Antígenos

Ovalbumina (de galinha) cristalizada cinco vezes (Ova, Pentex Inc., Kankakee, Ill.) foi utilizada nas formas: solúvel adsorvida em gel de hidróxido de alumínio e não agregada (centrifugada a 30.000 g/30 min) (DRESSER, 1962).

Adjuvantes

- Adjuvante completo de Freund, preparado pela Difco (Detroit, Mich).

137
- Gel de Hidróxido de Alumínio - $\text{Al}(\text{OH})_3$ - preparado como descrito por LEVINE & VAZ (1970): solução de sulfato de alumínio 2N foi misturada com igual volume de uma solução de NaOH 2N até gelificação e o gel assim obtido foi lavado dez vezes em água destilada e ressuspenso em salina (NaCl 0,15 M) e 0,01 M tris e o pH ajustado para 7,5 com NaOH 1 M. Uma solução estoque contendo 100 mg/ml foi preparada e mantida à temperatura ambiente.

Azul de Evans - E. Merck A.G., Darmstadt, Alemanha.

Esquema de imunização

Para a produção de antisoro contendo IgE, o esquema básico de imunização foi o de injetar o antígeno adsorvido em hidróxido de alumínio por via intraperitoneal utilizando-se 1 μg ou 0,1 μg de Ovalbumina em 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, ou 10 μg de Ovalbumina em 5 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (LEVINE & VAZ, 1970). Os grupos de animais submetidos aos diversos esquemas de imunização constavam usualmente de seis e, em alguns casos, de quatro animais.

Preparo de soro hiperimune

Para obtenção do soro hiperimune contendo IgG_1 foram usados camundongos congênicos B10.D2 imunizados por via subcutânea com 50 μg de Ovalbumina em adjuvante de Freund completo em duas doses dadas com intervalo de 30 dias. O título de IgG_1 dos soros destes animais

foi determinado por anafilaxia passiva cutânea (APC), usando-se um período de latência curto. Este soro possuía um título de 1/2560.

Técnica de sangria

Os animais foram sangrados por punção do plexo orbital, com micropipeta de Lang-Levy (H.O. Pederson, Copenhagen, Denmark) de 200 μ l, e o sangue colocado em tubos contendo 0,4 ml de salina. Após coagulação, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi separado e conservado a -20°C . A diluição dos soros assim obtida foi considerada como equivalente a 1:5.

Anafilaxia passiva cutânea (APC)

Os antisoros foram testados pela técnica de APC segundo OVARY (1958).

Camundongos SW₅₅ foram depilados no dorso 4 a 6 horas antes de serem injetados, para evitar que a irritação causada pela depilação viesse a interferir no teste.

Estes animais foram injetados intradermicamente em dois pontos, de cada lado da pele do dorso, com 30 μ l de diferentes diluições do antisoro.

Após um período de sensibilização adequado, os animais foram injetados por via intravenosa com 0,2 ml de salina contendo 100 μ g de Ova e 0,5 mg de Azul de Evans. Após 15 minutos eram sacrificados, a pele destacada e invertida, e as reações avaliadas medindo-se os diâmetros das manchas azuis.

Somente foram consideradas positivas as reações com mais de 4 mm de diâmetro. O teor em anticorpos dos antisoros foi expresso pela maior diluição ainda capaz de produzir uma reação mínima.

Caracterização dos anticorpos IgG₁ e IgE em camundongos

Os anticorpos IgG₁ e IgE foram diferenciados usando-se reações de APC com períodos de sensibilização diferentes, ou seja, um período curto (2 a 4 horas) para o IgG₁ e um período longo (48 a 72 horas) para o IgE (MOTA, 1967).

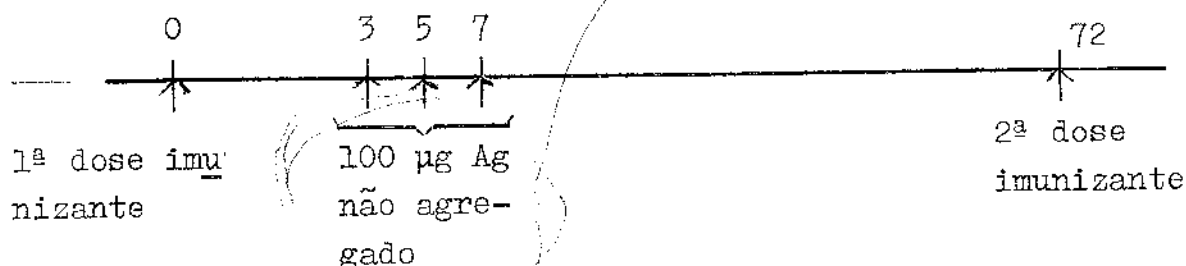
R E S U L T A D O S

1. Efeito de altas doses de Ovalbumina não-agregada na produção de IgG₁ e IgE na resposta primária e secundária

Para este estudo foram usados camundongos DBA/1J. Estes animais foram divididos em dois grupos:

O grupo experimental foi injetado, conforme esquema abaixo, por via intraperitoneal, no dia 0, com uma primeira dose imunizante de 1 μ g de Ovalbumina mais 1 mg de hidróxido de alumínio, e 72 dias após, injetado por via intraperitoneal com uma segunda dose igual à primeira. Nos dias 3, 5 e 7, após a primeira dose imunizante, foi injetado, por via intravenosa, com 100 μ g de Ovalbumina, não agregada, contida em 0,2 ml de salina.

Dias:



Os animais foram sangrados 9, 14, 26 e 69 dias após a primeira dose imunizante, e 11, 19, 28 e 50 dias após a segunda dose imunizante.

Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo tratamento, com substituição da inoculação de antígeno não agregado por 0,2 ml de salina, pela mesma via, tendo sido

sangrados segundo o mesmo esquema do grupo experimental.

Os soros obtidos foram testados por APC para detecção dos anticorpos IgG_1 e IgE , e os resultados estão resumidos nas figuras 1 e 2.

A figura 1 mostra os níveis de IgG_1 nos grupos controle e experimental; como se vê, as três doses adicionais de antígeno diminuíram muito pouco a produção deste anticorpo, tanto na resposta primária como na secundária.

A figura 2 resume os resultados da mesma experiência em relação ao anticorpo IgE ; neste caso, as injeções adicionais do antígeno produziram uma drástica redução do nível do anticorpo na resposta primária, e uma redução menor, porém bastante significativa, na resposta secundária.

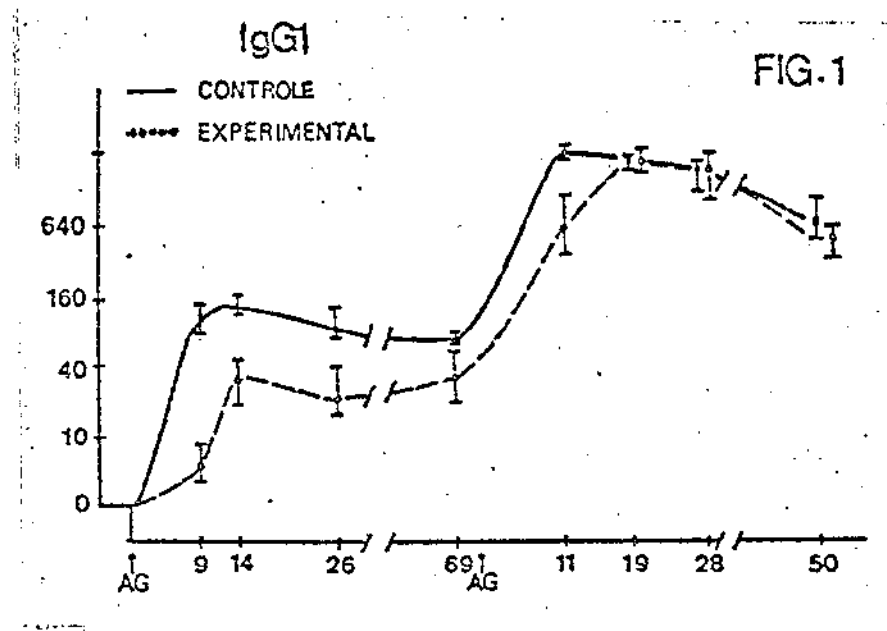


Fig.1 - Efeito de doses adicionais do antígeno sobre a resposta primária e secundária do anticorpo IgG_1 . O antígeno (Ovalbumina não agregada) foi injetado 3, 5 e 7 dias após a primeira dose imunizante. Os animais foram reinjetados com a dose imunizante (1 μg de Ovalbumina + 1 mg de $Al(OH)_3$) 72 ^{dias} horas após a dose imunizante inicial. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento imunizante que o grupo experimental, sendo que 3, 5 e 7 dias após a dose imunizante foi injetado com salina.

———— representa a média e o desvio padrão dos títulos de IgG_1 individuais dos camundongos do grupo controle nos diferentes.

----- representa a média e o desvio padrão dos títulos de IgG_1 individuais dos camundongos do grupo experimental nos diferentes dias.

abscissa: representa os dias de sangria.

ordenada: representa os títulos de APC.

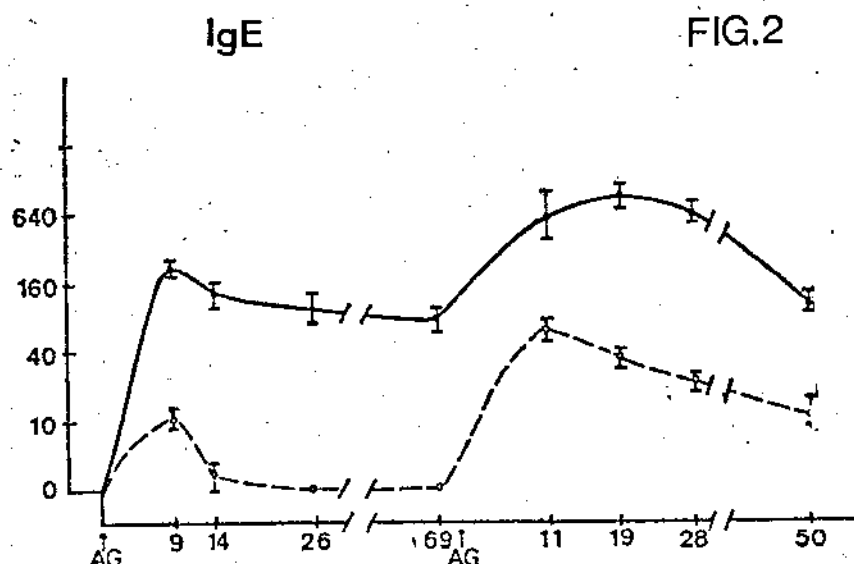


Fig. 2 - Efeito de doses adicionais do antígeno sobre a resposta primária e secundária do anticorpo IgE. O antígeno (Ovalbumina não agregada) foi injetado 3, 5 e 7 dias após a primeira dose imunizante. Os animais foram reinjetados com a dose imunizante (1 µg de Ovalbumina + 1 mg de $Al(OH)_3$) 72 ^{dias} horas após a dose imunizante inicial. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento imunizante que o grupo experimental, sendo que 3, 5 e 7 dias após a dose imunizante foi injetado com salina.

———— representa a média e o desvio padrão dos títulos de IgE individuais dos camundongos do grupo controle nos diferentes dias.

----- representa a média e o desvio padrão dos títulos de IgE individuais dos camundongos do grupo experimental nos diferentes dias.

abscissa: representa os dias de sangria.
ordenada: representa os títulos de APC.

2. Efeito de doses prévias de antígeno, Ovalbumina não agregada, na produção de IgG1 e IgE

Nestas experiências foram utilizadas duas linhagens de camundongos "inbred": B10.D2 (bom produtor) e B10.BR (mau produtor), que receberam os mesmos tratamentos.

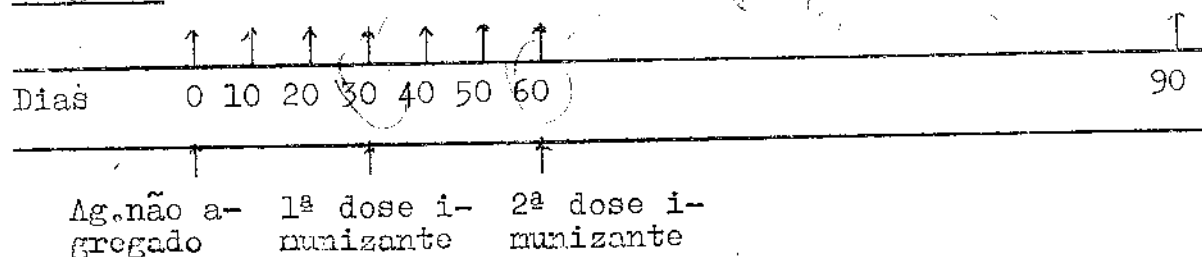
Grupo experimental:

Os animais foram subdivididos em três grupos: A, B e C e injetados, por via intraperitoneal, com 0,5 ml de salina contendo, respectivamente, 1, 10 ou 1000 µg de Ovalbumina não agregada, e cada um destes três grupos foi dividido em dois subgrupos: 1 e 2.

Os subgrupos 1 (A1, B1 e C1), 30 e 60 dias após a dose inicial, foram injetados, por via intraperitoneal, com a dose imunizante de 0,5 ml de salina contendo 0,1 µg de Ovalbumina mais 1 mg de hidróxido de alumínio.

Os subgrupos 2 (A2, B2, e C2), 30 e 60 dias após a dose inicial, foram injetados, por via intraperitoneal, com a dose imunizante de 0,5 ml de salina contendo 10 µg de Ovalbumina mais 5 mg de hidróxido de alumínio.

Sangrias:



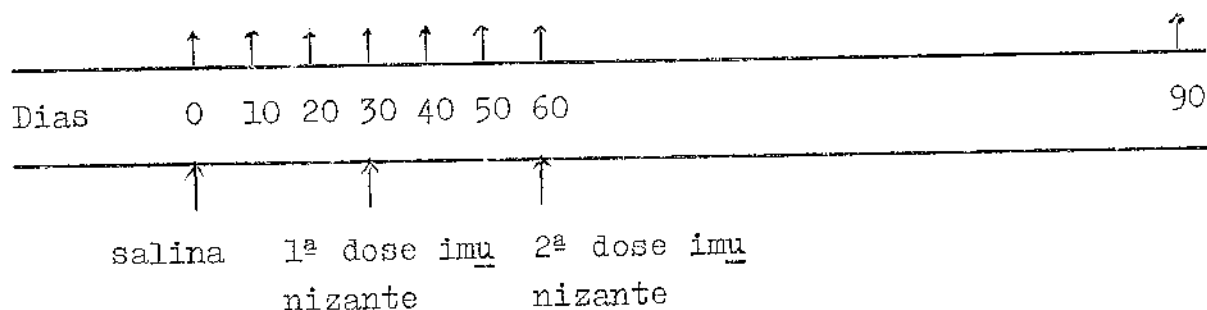
Grupo controle: F

Recebeu, em lugar do antígeno não agregado, 0,5 ml de salina por via intraperitoneal, e foi dividido em dois subgrupos: F1 e F2.

O subgrupo F1, 30 e 60 dias após, recebeu o mesmo tratamento dos subgrupos experimentais 1: 0,1 µg de Ovalbumina + 1 mg de hidróxido de alumínio, por via intraperitoneal.

O subgrupo F2, 30 e 60 dias após, recebeu o mesmo tratamento dos subgrupos experimentais 2: 10 µg de Ovalbumina + 5 mg de hidróxido de alumínio, por via intraperitoneal.

Sangrias:



Os animais, quer do grupo experimental quer do controle, foram sangrados 10, 20 e 30 dias após, a primeira e a segunda dose injetada, e 30 dias após a terceira dose.

Foram feitos "pools" do soro de cada grupo e subgrupo, do experimental e do controle, que foram testados por anafilaxia passiva cutânea para detecção dos anticorpos IgG₁ e IgE.

Os resultados obtidos nessas experiências estão resumidos nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

Estes resultados não foram submetidos a uma análise estatística, uma vez que a restrição dos graus de liberdade impediu a aplicação de testes estatísticos não paramétricos.

Fig.3 - Comparação entre as linhagens B10.BR e B10.D2 em relação à produção de IgE e IgG₁, quando imunizadas com baixa dose de antígeno precedida de doses do antígeno não agregado.

Diagramas F₁ e F'₁ - representam o subgrupo controle F₁; mostram os títulos de APC dos anticorpos IgE e IgG₁ de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de salina e imunizados nos dias 30 e 60 com 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃.

Diagramas A₁ e A'₁ - representam o subgrupo experimental A₁; mostram, respectivamente, os títulos de APC dos anticorpos IgE e IgG₁ dos "pools" dos soros individuais de camundongos injetados por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de uma solução de 1 µg de ovalbumina não agregada. Nos dias 30 e 60 foram injetados com 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal.

Diagramas B₁ e B'₁, C₁ e C'₁ - as representa-

ções são as mesmas dos diagramas A_1 e A'_1 . Os subgrupos diferem somente no tratamento com o antígeno não agregado: o subgrupo B_1 foi injetado, por via intraperitoneal, no dia 0, com 0,5 ml de uma solução de 10 μ g de ovalbumina não agregada; o subgrupo C_1 foi injetado por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de uma solução de 1000 μ g de ovalbumina não agregada.

== Títulos de "pools" de soros individuais dos camundongos B10.D2

~~====~~ Títulos de "pools" de soros individuais dos camundongos B10.BR

abscissa - representa os dias de sangria

ordenada - representa os títulos de APC

Ag - ovalbumina não agregada

DI - ovalbumina + $Al(OH)_3$

↑ - dias de administração do antígeno.

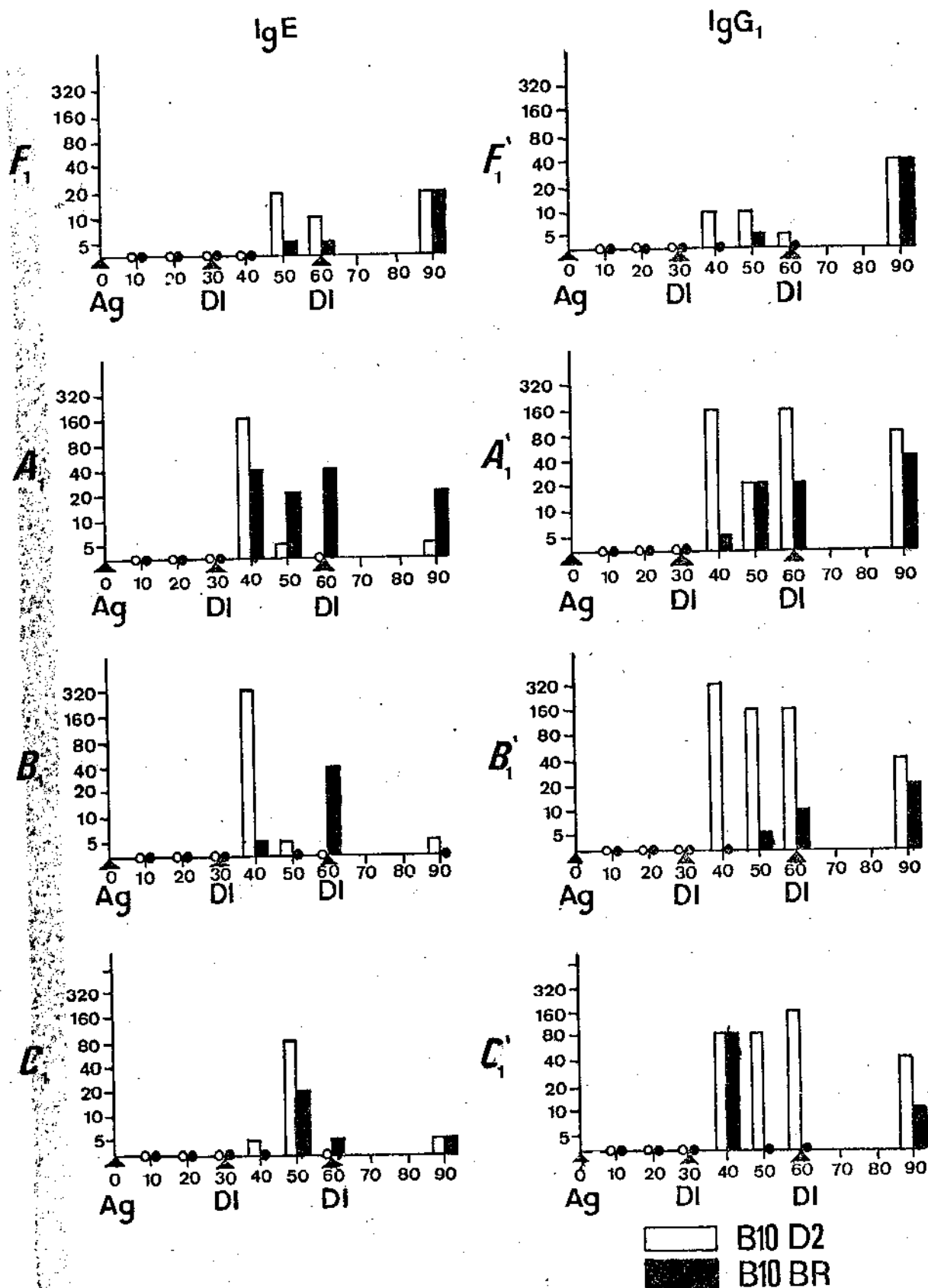


Fig.4 - Comparação entre as linhagens B10.BR e B10.D2 em relação à produção de IgE e IgG₁, quando imunizadas com alta dose de antígeno precedida de doses do antígeno não agregado.

Diagramas F₂ e F'₂ - representam o subgrupo F₂; mostram, respectivamente, os títulos de APC dos anticorpos IgE e IgG₁ de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de salina, e imunizados nos dias 30 e 60 com a alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃.

Diagramas A₂ e A'₂ - representam o subgrupo experimental A₂; mostram, respectivamente, os títulos de APC dos anticorpos IgE e IgG₁ dos "pools" dos soros individuais de camundongos injetados por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de uma solução de 1 µg de ovalbumina não agregada. Nos dias 30 e 60 foram injetados com a alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃ por via intraperitoneal.

Diagramas B₂ e B'₂, C₂ e C'₂ - as representações são as mesmas do diagrama imediatamente acima. Os subgrupos diferem somente no tratamento com o antígeno não agregado: o subgrupo B₂ foi injetado por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de uma solução de 10 µg de ovalbumina não agregada; o subgrupo C₂ foi injetado por via intraperitoneal no dia 0 com 0,5 ml de uma solução de 1000 µg de ovalbumina não agregada.

== Títulos de "pools" dos soros individuais dos camundongos B10.D2.

~~=====~~ Títulos de "pools" dos soros individuais dos camundongos B10.BR.

abscissa - representa os dias de sangria

ordenada - representa os títulos de APC

Ag - ovalbumina não agregada

DI - ovalbumina mais Al(OH)₃

↑

- dias de administração do antígeno

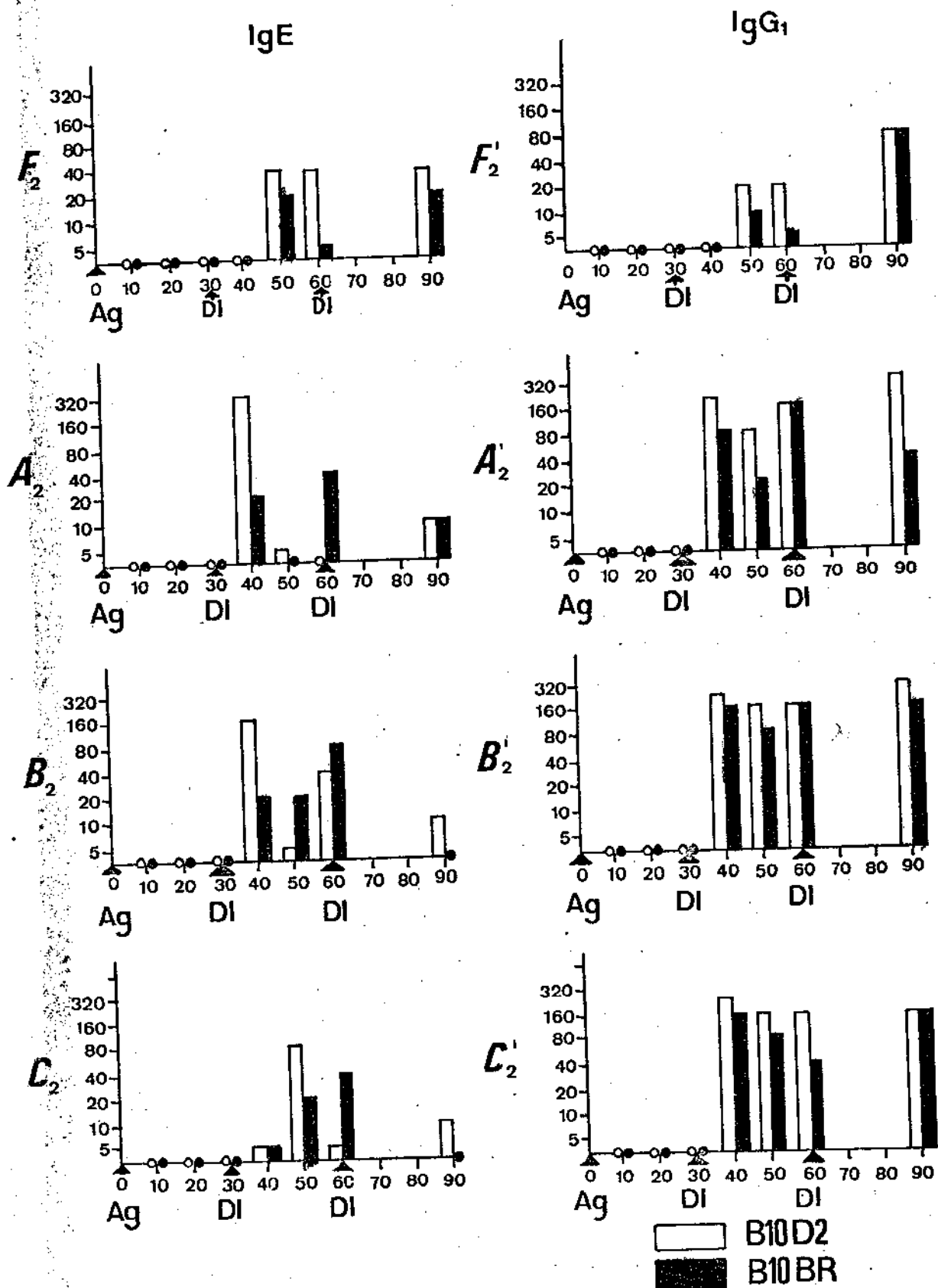


Fig. 5 - Comparação entre alta e baixa dose imunizante em camundongos da linhagem B10.D2 em relação à produção de IgE e IgG₁ precedidas de doses de antígeno não agregado.

Diagramas F₂ e F'₂ - representam resultados dos subgrupos controle F₁ e F₂; mostram, respectivamente, os títulos dos anticorpos IgE e IgG₁ dados por APC de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados no dia 0 com 0,5 ml de salina por via intraperitoneal, e nos dias 30 e 60 com: subgrupo F₁ - baixa dose de 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal; subgrupo F₂ - alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal.

Diagramas A e A' - representam resultados dos subgrupos A₁ e A₂. Mostram, respectivamente, os títulos dos anticorpos IgE e IgG₁ dados por APC de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados no dia 0 com 0,5 ml de salina contendo 1 µg de ovalbumina não agregada, por via intraperitoneal, e nos dias 30 e 60 o subgrupo A₁ recebeu por via intraperitoneal a baixa dose de 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃, e o subgrupo A₂ recebeu, por via intraperitoneal, a alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃.

Diagramas B e B', C e C' - diferem do anterior somente no tratamento com ovalbumina não agregada, administrada no dia 0: o subgrupo B foi injetado com 0,5 ml de salina contendo 10 µg de ovalbumina não agregada por via intraperitoneal; o grupo C foi injetado com 0,5 ml de salina contendo 1000 µg de ovalbumina não agregada, por via intraperitoneal.

===== Títulos de "pools" dos soros individuais de camundongos que receberam alta dose imunizante.

XXXXX Títulos de "pools" dos soros individuais de camundongos que receberam baixa dose imunizante.

abscissa - dias de sangria

ordenada - títulos de APC

Ag - ovalbumina não agregada

DI - ovalbumina + Al(OH)₃

↑ - Dias de administração do antígeno

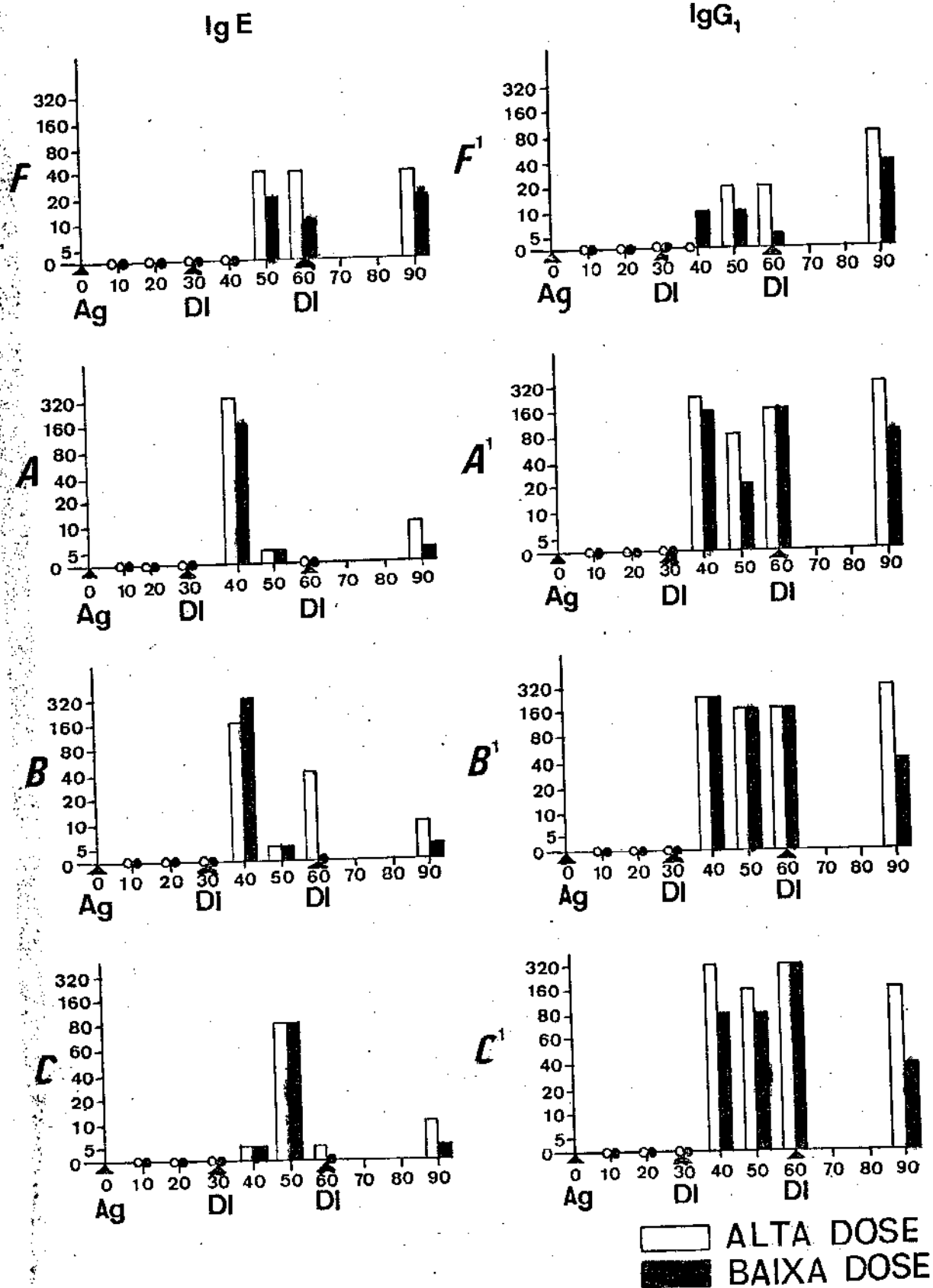


Fig. 6 - Comparação entre alta e baixa dose imunizante em camundongos da linhagem B10.BR em relação à produção de IgE e IgG₁ precedidas de doses do antígeno não agregado.

Diagramas F e F' - representam os resultados dos subgrupos controle F₁ e F₂. Mostram, respectivamente, os títulos dos anticorpos IgE e IgG₁ dados por APC de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados no dia 0 com 0,5 ml de salina por via intraperitoneal, e nos dias 30 e 60 com: subgrupo F₁: baixa dose de 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃ por via intraperitoneal; subgrupo F₂: alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal,

Diagramas A e A' - representam os resultados dos subgrupos experimentais A₁ e A₂. Mostram, respectivamente, os títulos dos anticorpos IgE e IgG₁ dados por APC de "pools" dos soros individuais de camundongos injetados por via intraperitoneal; nos dias 30 e 60 o grupo A₁ recebeu a baixa dose de 0,1 µg de ovalbumina + 1 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal, e o subgrupo A₂ recebeu a alta dose de 10 µg de ovalbumina + 5 mg de Al(OH)₃, por via intraperitoneal.

Diagramas B e B', C e C' - diferem do anterior somente no tratamento com ovalbumina não agregada administrada no dia 0: o grupo B foi injetado com 0,5 ml de salina contendo 10 µg de ovalbumina não agregada, por via intraperitoneal; o grupo C foi injetado com 0,5 ml de salina contendo 1000 µg de ovalbumina não agregada, por via intraperitoneal.

— Títulos de "pools" dos soros individuais de camundongos que receberam alta dose imunizante.

--- Títulos de "pools" dos soros individuais de camundongos que receberam baixa dose imunizante.

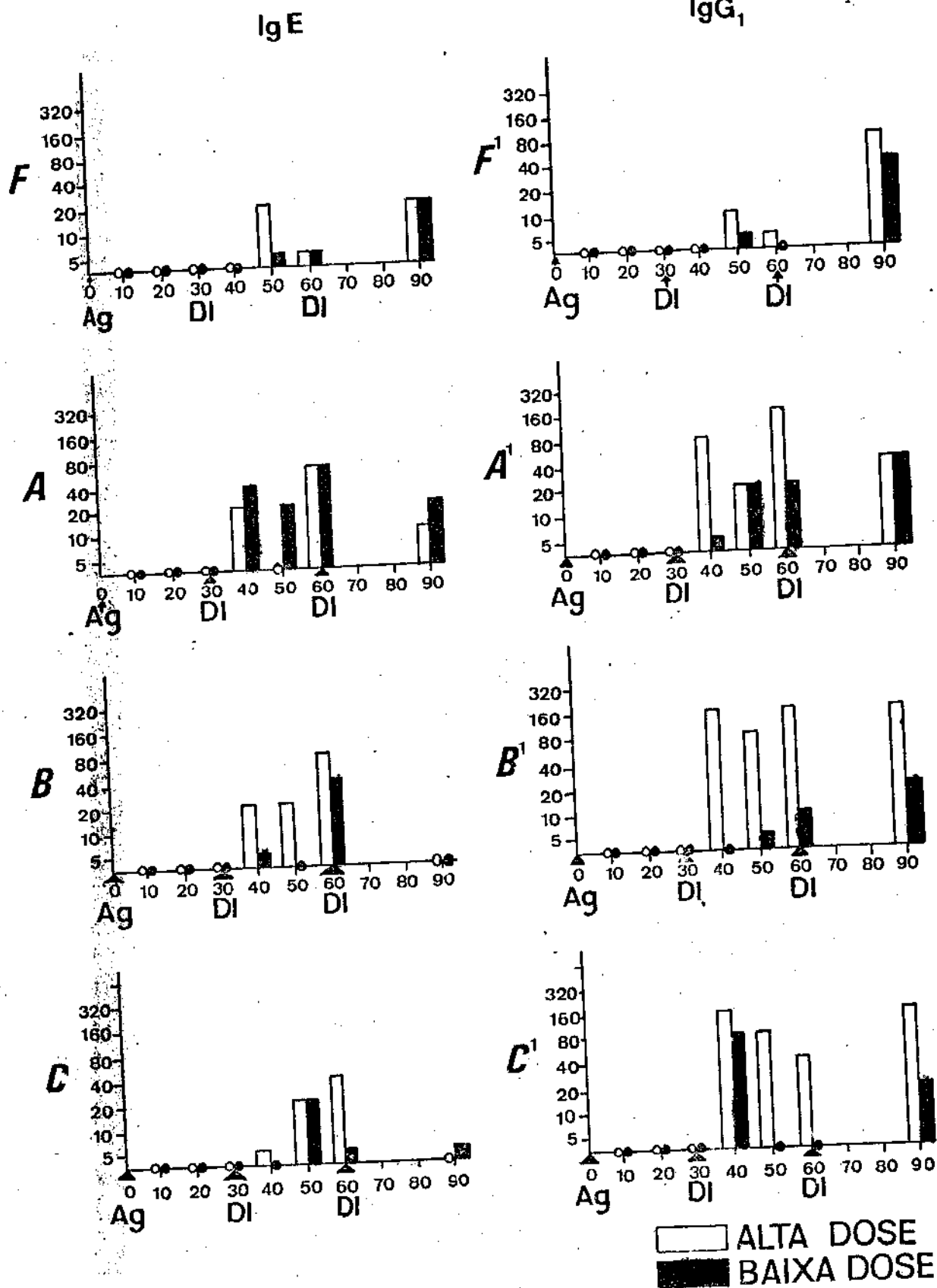
abscissa - dias de sangria

ordenada - títulos de APC

Ag - ovalbumina não agregada

DI - ovalbumina mais Al(OH)₃

↑ - dias de administração do antígeno.

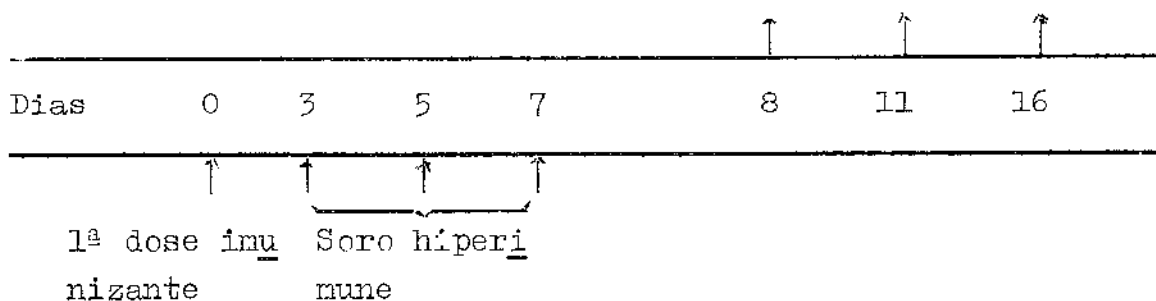


3. Efeito do soro hiperimune sobre a produção de IgE e IgG₁ na resposta primária

Nesta experiência foram usados camundongos fêmeas DBA/1J. Estes animais foram divididos em dois grupos:

O grupo experimental - "E" - foi injetado por via intraperitoneal no dia 0 com a dose imunizante de 0,5 ml de salina contendo 1 µg de ovalbumina + 1 mg de hidróxido de alumínio. Três, cinco e sete dias após a dose imunizante, estes animais foram injetados, por via intravenosa, com 0,2 ml de soro anti-ovalbumina hiperimune.

Sangrias:



O grupo controle - "C" - foi injetado com a mesma dose imunizante do grupo experimental, porém, 3, 5 e 7 dias após, em vez do soro hiperimune, foi injetado com 0,2 ml de salina por via intravenosa.

Os grupos foram sangrados individualmente, 8, 11 e 16 dias após a dose imunizante, e os soros testados por anafilaxia passiva cutânea, para detecção dos anticorpos IgE e IgG₁.

Os resultados podem ser vistos na Tabela I, que resume o efeito do soro hiperimune anti-ovalbumina na produção dos anticorpos IgE e IgG₁. Como se vê, as três doses de 0,2 ml do soro hiperimune, tiveram uma ação supressora, tanto na produção de IgG₁ como na produção de IgE, que baixaram significativamente.

TABELA I

Efeito de 0,2 ml de soro hiperimune B10.D2 anti-ovalbumina (IgG₁, título: 1/2560, IgE menor 1/5), sobre a produção dos anticorpos IgG₁ e IgE, injetados nos dias 3, 5 e 7 após a dose imunizante de 1 µg do antígeno ovalbumina + 1 mg de hidróxido de alumínio.

Grupo	Tratamento	IgG ₁			IgE		
		8 [§]	11	16	8	11	16
C	salina	40 ^{§§}	320	160	160	640	320
E	anti-ova	40	5	0	5	0	0

§ Dias de sangria.

§§ média aritmética dos títulos de IgG₁ e IgE individuais de camundongos dos grupos experimental (E) e controle (C) dados por APC.

D I S C U S S Ã O

Várias hipóteses têm sido apresentadas para explicar o efeito da dose do antígeno na formação do anticorpo IgE . Entre estas merecem ser citadas:

a) as células precursoras das células formadoras de IgE (células B IgE) possuiriam uma afinidade maior para o antígeno do que as células B IgG, de tal modo que uma concentração de antígeno ainda imunogênica para estas últimas células seria já tolerogênica para as primeiras, isto é, para as células B IgE (SISKIND & BENACERRAF, 1969; ISHIZAKA & col., 1974);

b) uma dose baixa do antígeno estimularia preferencialmente as células B IgE levando à formação de IgE sem uma formação simultânea apreciável do anticorpo IgG, o qual parece exercer um efeito imunossupressor sobre o IgE (OKUMURA & TADA, 1971);

c) doses baixas do antígeno, ao contrário das doses altas, não estimulariam as células T supressoras, as quais, segundo alguns Autores, possuem um efeito inibidor sobre a formação do anticorpo IgE (TADA & col., 1973). Esta última hipótese é particularmente atraente quando se sabe que a formação do IgE em camundongos por baixas doses de antígeno está associada aos alelos de histocompatibilidade do locus H-2, o qual parece estar, de algum mo

do, associado às funções das células T (McDEVITT & BENACERRAF, 1969).

Analisando os nossos resultados, dois mecanismos supressores podem ser propostos para explicar a baixa produção de anticorpos IgE quando o antígeno é usado em dose alta: tolerância das células envolvidas na produção deste anticorpo e supressão através de um mecanismo de retroação pelo anticorpo IgG₁.

Por exemplo, na experiência I, em que se usou três doses do antígeno não agregado durante o período de indução da produção do anticorpo, houve uma baixa significativa na produção do anticorpo IgE, tanto na resposta primária como na secundária, sugerindo que o tratamento com alta dose de antígeno não agregado deve ter atingido preferencialmente os linfócitos envolvidos na produção do IgE, tornando-os tolerantes. Aparentemente as células envolvidas na produção do anticorpo IgG₁ seriam mais resistentes à tolerância o que explicaria a persistência da produção deste anticorpo nestas condições. Todavia para se confirmar esta hipótese, uma experiência de transferência de linfócitos de animais tolerantes para receptores irradiados deveria ser feita.

Admitindo-se como válida a hipótese da maior facilidade de indução de tolerância das células envolvidas na produção de IgE por doses altas do antígeno, esta poderia então explicar a observação feita quando se analisou os experimentos que se tratavam da obtenção do anticorpo IgE nas diferentes espécies: os Autores que usavam doses elevadas de

antígeno obtinham uma produção de anticorpo transitória, e não conseguiam obter resposta secundária. Este fato contrastava com o que se verifica na espécie humana, em que os indivíduos atópicos apresentam um nível de IgE relativamente elevado e constante no soro.

LEVINE & VAZ (1970) e VAZ & col. (1971 a), tentando obter, em camundongos, um modelo semelhante à espécie humana, utilizaram baixas doses de antígeno na imunização e obtiveram uma produção persistente de IgE. Verificando que doses baixas de antígeno possibilitam produção permanente deste anticorpo, o que não acontece quando se administra altas doses. Verificou-se, ainda, um controle genético da imune resposta associada à produção do anticorpo IgE, alguns animais sendo bons e outros maus produtores deste anticorpo para um dado antígeno. Assim, camundongos da linhagem DBA/1J são bons produtores de IgE quando se usa ovalbumina como antígeno.

Tendo em mãos este modelo experimental planejou-se uma série de experiências para verificar a hipótese de uma possível inibição dos linfócitos envolvidos na produção do anticorpo IgE por altas doses de antígeno.

Esta hipótese encontra certo apoio nas experiências de outros autores que passamos a relatar:

EISEN & SISKIND (1964) e THEIS & SISKIND (1968), usando alta dose de antígenos demonstraram que durante a resposta imune, os anticorpos variam quanto à sua afinidade pelo antígeno: os anticorpos de baixa afinidade aparecem no início

da imunização, por necessitarem de alta concentração do antígeno para sua produção, enquanto que, com a baixa concentração do antígeno no decorrer da imunização, aparecia grande quantidade de anticorpo de alta afinidade. Com esta observação, os mesmos Autores levantaram a hipótese de que ao nível celular também deveria haver receptores de alta e baixa afinidade para o reconhecimento do antígeno. Com base nestes resultados, levantou-se a hipótese de que o camundongo DBA/1J, bom produtor a baixa dose de antígeno, deveria apresentar receptores de alta afinidade nos linfócitos envolvidos com a produção de IgE, e estes se tornariam mais facilmente tolerantes do que os linfócitos envolvidos na produção de IgG. De fato nossas experiências mostraram que o tratamento com o antígeno não agregado, interfere na produção do anticorpo IgE baixando-o significativamente, enquanto que o anticorpo IgG₁ permanece inalterado, sugerindo, assim, uma possível tolerância das células envolvidas com a produção do anticorpo IgE.

Com relação à Experiência II, em que os animais das linhagens B10.BR e B10.D2 receberam antígeno não agregado antes da imunização, com intenção de estudar a interferência na produção do anticorpo IgE, realmente os resultados sugerem que, de fato, parece existir uma interferência, principalmente no camundongo da linhagem B10.D2 como pode ser verificado nos diagramas A e B da figura 5. Infe-

lizmente, não nos foi possível estudar estatisticamente os resultados obtidos nesta experiência pois não pudemos submetê-los a uma análise estatística, uma vez que a restrição dos graus de liberdade impediu a aplicação dos testes estatísticos não paramétricos. Mesmo assim, não ficou afastada a possibilidade de um provável efeito do antígeno não agregado quando aplicado antes da dose imunizante, pois na experiência anterior o título de IgE foi significativamente reduzido pela ação do antígeno não agregado. Possivelmente o esquema utilizado nestas experiências com antígeno não agregado não foi adequado, e mais experiências são necessárias a este respeito.

O motivo de não termos utilizado, nestas experiências a mesma linhagem de animais da experiência anterior, a DBA/1J foi devido ao fato de termos em nosso laboratório camundongos congênicos B10.BR e B10.D2 que diferem somente no locus H-2 (respectivamente $H-2_{k/k}$ e $H-2_{d/d}$) e que sendo maus e relativamente bons produtores do anticorpo IgE, nos permitiria abordar também o aspecto genético, com maior possibilidade de esclarecer o mecanismo de produção do anticorpo IgE.

No terceiro grupo de experiências nós nos propusemos a estudar a ação supressora do anticorpo IgG_1 , na produção do anticorpo IgE. A hipótese de trabalho foi baseada em observações anteriores que mostravam uma relação inversa entre os níveis dos anticorpos IgE e IgG_1 (MOTA, 1967; LEVINE & VAZ, 1970). Um mecanismo de retroação de uma classe de anticorpo sobre a outra já havia sido demonstrado

por vários Autores, entre eles UHR & BAUMAN (1961). Estes Autores estudaram a ação supressora do anticorpo IgE sobre a produção do anticorpo IgM, que segundo eles, ocorria ao nível da interação antígeno-anticorpo, e, possivelmente, ao nível dos próprios receptores nos linfócitos. Estudos mais recentes feitos em coelhos (STRANNEGARD & BELIN, 1970), ratos (TADA & OKUMURA, 1971) e camundongos (ISHIZAKA & OKUDAIRA, 1972) demonstraram, também, uma supressão da produção do anticorpo IgE pelo anticorpo IgG₁.

Nossos resultados concordam com os dos Autores citados acima, confirmando a existência de um mecanismo de retroação exercido pelo anticorpo IgG₁ sobre o anticorpo IgE em camundongos.

Nossos resultados permitem-nos sugerir que existe um mecanismo de retroação exercido pelo anticorpo IgG₁, sobre a produção de IgE e que talvez possa ocorrer, também, um mecanismo de tolerância, classe específica, quando altas doses de antígenos não agregados são usadas. Dependendo das circunstâncias um ou outro mecanismo poderia operar, regulando a produção do anticorpo IgE do camundongo.

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho estudamos a produção de anticorpos da classe IgE em camundongos isogênicos de diferentes linhagens. A cinética da produção do anticorpo IgE após imunização com doses altas e baixas do antígeno foi estudada e comparada com a produção dos anticorpos da subclasse IgG₁.

As possíveis causas para a transitoriedade do anticorpo IgE no soro após imunização com dose alta de antígeno e a persistência do mesmo após imunização com dose baixa de antígeno foram abordadas. Para isto estudou-se em várias linhagens de camundongos o efeito de doses elevadas de antígeno não agregado, aplicadas antes e após a dose imunizante, sobre a produção do IgG₁ e do IgE. Além disto, estudou-se, também, o possível efeito da retroação exercido pelo anticorpo IgG₁ sobre o IgE. Observando-se o efeito da transferência do soro homólogo contendo elevado teor de IgG₁ sobre a produção de IgE em camundongos produzindo ativamente IgE.

Nossas experiências permitem sugerir que as células envolvidas na produção do anticorpo IgE possivelmente se tornam mais facilmente tolerantes do que as células precursoras do IgG₁ e, além disto, que parece existir também um mecanismo de retroação exercido pelo anticorpo IgG₁ sobre o anticorpo IgE. Entretanto, mais experiências são necessárias para uma conclusão final para este assunto.

B I B L I O G R A F I A

- BATTISTO, J.R. & MILLER, J. - Immunological unresponsiveness produced in adult guinea pigs by parental introduction of minute quantities of hapten or protein antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 111: 111, 1962.
- BENNICH, H., ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & JOHANSSON, S.G.O. - A comparative antigenic study of E globulin and myeloma IgND. *J. Immunol.*, 102: 826, 1969.
- BIOZZI, G., STIFFEL, C., MOUTON, D., BOUTHILLIER, Y. & DE-CREUSEFOND, C. - Genetic regulation of the function of antibody producing cells. *Progress in Immunology*, 1: 529, 1971.
- CATTY, D. - Immunology of nematode infections. Trichinosis in guinea pig as a model. S. Karger, Basel, 1969.
- DRESSER, D. W. - Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in mice by small quantities of protein antigen. *Immunology*, 5: 378, 1962.
- EISEN, H.N. & SISKIND, G. W. - Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*, 3: 996, 1964.
- FINKELSTEIN, M.S. & UHR, J.H. - Specific inhibition of antibody formation by passively administered 19S and 7S antibody. *Science*, 146: 67, 1964.
- HOGARTH-SCOTH, R.S. - Homocytotropic antibody in sheep. *Immunology*, 16: 543, 1969.
- ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. - Identification of Gamma E antibodies as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.*, 99: 118, 1967.
- ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & HORNBROOK, M.M. - A unique rabbit immunoglobulin having homocytotropic antibody activity.

ty. Immunochemistry, 7: 515, 1970.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, I., KISHIMOTO, T. & OKUDAIRA, H. - Biosynthesis of IgE antibodies and mechanisms of sensitization. Progress in Immunology, 2: 7, 1974.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & TADA, T. - Immunoglobulin E in the monkey. J.Immunol., 103: 445, 1969.

ISHIZAKA, K. & OKUDAIRA, H. - Reaginic antibody formation in the mouse. I. Antibody-mediated suppression of reaginic antibody formation. J. Immunol., 109: 84, 1972.

JOHANSSON, S.G.C. & BENNICH, H. - Immunologic studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. J.Immunol., 13: 381, 1967.

KANEYREZI, B., JATON, J.C. & BLOCK, K.J. - Human and rat IgE: Serologic evidence of homology. J.Immunol., 106:1411,1971.

LEVINE, B.B. & VAZ, N.M. - Effect of combination in 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, 39: 156, 1970.

MARGNI, R.A. & HASES, S.E. - Guinea pig reaginic antibody. I. Isolation and purification of an antibody protein with characteristics of IgE. Immunology, 25: 323, 1973.

McDEVITT, H.O. & BENACERRAF, B. - Genetic control of specific immune responses. Advances in Immunology, 2: 31, 1969.

MITCHISON, N.A. - Induction of immunological paralysis in two zones dosage. Proc. Roy. Soc. B. 161: 275, 1964.

MITCHISON, N.A. - The dosage requirements for immunological paralysis by soluble proteins. Immunol., 15: 509, 1968.

MOTA, I. - Biological characterization of "mast cell sensitizing" antibodies. Life Science, 1: 465, 1963.

- MOTA, I. - Biological characterization of mouse 'early' antibodies. *Immunology*, 12: 343, 1967.
- MOTA, I. & PEIXOTO, J.M. - A skin sensitizing and thermolabile antibody in the mouse. *Life Science*, 5:1723, 1966.
- MOTA, I. & PERINI, A. - A heat labile mercapto, ethanol susceptible homocytotropic antibody in guinea pig. *Life Science*, 9: 923, 1970.
- MOTA, I., SADUN, E.H., BRADSLAW, R.M. & GOSE, R.W. - The Immunological response of mice injected with Trichinella spiralis. Biological and physico-chemical distinction of two homocytotropic antibodies. *Immunology*, 16: 71, 1969.
- NOSSAL, G.J.V. & AUSTIN, C.M. - Mechanism of induction of immunological tolerance. II. Simultaneous development of priming and tolerance. *Austr.J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 44:327, 1966.
- NUSSENZWEIG, R., MERRYMAN, C. & BENACERRAF, B. - Electrophoretic separation and properties of mouse antihapten antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis. *J.Exp.Med.*, 120: 315, 1964.
- OGILVIE, B.M. - Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites. *Nature*, 204: 91, 1964.
- OKUMURA, K. & TADA, T. - Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VI. Inhibitory effect of thymocytes on the homocytotropic antibody response. *J. Immunol.*, 107: 1682, 1971.
- OVARY, Z. - Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.*, 81: 355, 1958.
- PRAUSNITZ, C. & KÜSTNER, H. - Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Centralb. f. Bakt. I. Abt. Originale*, 86: 160, 1921.
- PROUVOST-SANON, A. - Anticorps reaginiques de la souris. Production et propriétés physico-chimiques, immunologiques et

biologiques. Paris, Univ. de Paris, 1972. Tese de doutoramento.

ROCHEY, J.H. & SCHWARTZMAN, R.M. - Skin sensitizing antibodies: a comparative study of canine and human antibodies and PCA antibodies and a canine myeloma protein. J.Immunol., 98: 1143, 1967.

SHOENBECKLER, M.J. & SADUN, E.H. - In vitro histamine release from blood cellular elements of rabbits injected with Schistosoma mansoni. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127: 601, 1968.

SISKIND, G.W. & BENACERRAF, B. - Cell selection by antigen in the immune response. Advances in Immunology, 10:1, 1969.

SMITHERS, S.R. - The induction and nature of Ab response to parasites. Immunologic aspects of parasitic infections. Pan American Health Organization, 1967.

STECHSCHULTE, D.J., ORANGE, R.P. & AUSTEN, K.F. - Immunochemical and biologic properties of rat IgE. I. Immunochemical identification of rat IgE. J.Immunol., 105:1082, 1970.

STRANNEGARD, O. & BELIN, L. - Suppression of reagin synthesis in rabbits by passively administered antibody. Immunol., 18: 775, 1970.

TADA, T. & OKUMURA, K. - Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. I. Feed-back regulation by passively administered antibody. J.Immunol., 106: 1002, 1971.

TADA, T., OKUMURA, K. & TANIGUCHI, M. - Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. J.Immunol., 111: 952, 1973.

THEIS, G.A. & SISKIND, G.W. - Selection of cell populations in induction of tolerant rabbits. J.Immunol., 100: 138, 1968.

UHR, J.W. & BAUMAN, J.B. - Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. J.Exp.Med., 113: 935, 1961 a.

- UHR, J.W. & BAUMAN, J.B. - Antibody formation. II. The specific anamnestic response. J.Exp.Med., 113: 959, 1961 b.
- VAZ, N. M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M., LEVINE, B.B. & VAZ, E.M. H-2 linked genetic control of immune responsiveness to ovalbumin and ovomucoid. J.Exp.Med. 134: 1335, 1971 a.
- VAZ, E.M., VAZ, N.M. & LEVINE, B.B. - Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin. Immunology, 21: 11, 1971.
- WALKER, J.G. & SISKIND, G.W. - Studies on the control of antibody synthesis. Effect of antibody affinity upon its ability to suppress antibody formation. J.Immunol., 14:21,1968.
- WEISZER, J., PATTERSON, R. & PRUZANSKY, J.J. - Ascaris hypersensitivity in the Rhesus monkey. J. Allergy, 41:14,1968.
- WEKSLER, M.E., MERRITTS, L.L., WERBLIN, T.P. & SISKIND, G.W.- Studies on the control of antibody synthesis. IV. Effect of tolerance induction in adult rabbits on antibody-binding affinity. J. Immunol., 110: 897, 1973.
- ZVAIFLER, N.J. & BECKER, E.L. - Rabbit anaphylactic antibody. J. Exp. Med., 123: 936, 1966.