

“IMUNOSSUPRESSÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES APÓS TRATAMENTO COM DEXAMETASONA E INOCULAÇÃO DE *Candida Albicans*”

Adriana Aigotti Haberbeck BRANDÃO*

*RESUMO: Foi realizada imunossupressão experimental com corticosteróides em camundongos usando 1 mg/kg/dia de dexametasona durante uma semana. Para verificar os efeitos imunossupressores da droga, sobre os tecidos linfóides, inoculamos 1 ml de 1.10^6 de *Candida albicans*, por via endovenosa, após o tratamento. Observamos a instalação e evolução da infecção durante doze dias e analisamos os aspectos histológicos do baço, timo, linfonodos, rins, fígado, pulmões e pele, que foram retirados, em intervalos regulares, de animais tratados somente com dexametasona e somente com *Candida albicans*, ou com ambos os dois tratamentos. Os resultados obtidos nos levaram a concluir que ocorre imunossupressão com essa dosagem de dexametasona e que o baço foi o órgão mais atingido. A candidíase isoladamente também provocou imunossupressão, afetando principalmente o timo. Os efeitos imunossupressores dos dois tratamentos se somaram quando houve a associação dos mesmos.*

UNITERMOS: Imunossupressão experimental; dexametasona; candidíase; órgãos linfóides.

INTRODUÇÃO

Os corticóides vêm sendo usados como agentes terapêuticos, em larga escala, como moduladores ou supressores das respostas inflamatória e imune, nos homens e nos animais. Seus efeitos na inibição da inflamação são profundos e rápidos, estando a diminuição da fase vascular da inflamação – através de vasoconstrição, diminuição da permeabilidade capilar, menor liberação de cininas vasoativas e queda da histamina tecidual, além de indução de um menor afluxo de eosinófilos e de inibição da função dos macrófagos – entre os mais importantes e mais citados ^{2, 6, 18}.

Em relação à influência sobre a resposta imune sabe-se que afetam a distribuição e a função das células linfáticas e dos macrófagos e que produzem lise de linfócitos. Estes efeitos são seletivos para determinados linfócitos e se refletem de modo diferente nos órgãos linfóides, como timo, baço e linfonodos, no sangue circulante e na medula óssea^{1, 2, 3, 5, 6, 7, 18, 19, 21}.

A presença, a intensidade e a duração desses efeitos variam de acordo com a dosagem e a frequência do uso dos corticóides e de acordo com a espécie animal observada¹¹.

Assim sendo, o uso de corticosteróides pode inibir ou modificar a intensidade e a qualidade das respostas reativas defensivas do organismo, tornando-o mais vulnerável à ação de doenças infecciosas.

Nesse trabalho pretendemos verificar os efeitos imunossupressores da dexametasona, um glicocorticóide sintético, em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para esse trabalho utilizamos 34 camundongos *Mus musculus* machos, com peso entre 26 e 32 g, divididos em três grupos. O primeiro grupo, com 14 animais, foi tratado com 21-fosfato dissódico de dexametasona injetável (Decadron da Merck, Sharp & Dohme), na dosagem de 1 mg/kg de peso do animal, injetada por via intraperitoneal, a cada 24 horas, durante sete dias consecutivos. Sacrificamos 2 animais de cada vez, com intervalos de 2, 3, 6, 13, 18, 23 e 34 dias após o término do tratamento. O segundo grupo, com 10 camundongos, foi tratado com dexametasona, do mesmo modo que o primeiro grupo, e no 16º dia após o início do uso da droga foi inoculado, por via endovenosa, com 1 ml de 1.10^6 de *Candida albicans*. Sacrificamos 2 animais de cada vez, com intervalos de 3, 5, 7, 10 e 12 dias após a inoculação do fungo. O terceiro grupo, com 10 camundongos, foi inoculado com 1 ml de 1.10^6 de *Candida albicans* por via endovenosa e não recebeu tratamento com dexametasona. Sacrificamos 2 animais de cada vez, com intervalos de 3, 5, 7, 10 e 12 dias após a inoculação. Todos os animais foram examinados diariamente durante o experimento, mantidos segundo as rotinas do biotério da F.O.S.J.C. – UNESP e sacrificados com éter. Retiramos para estudo histológico fragmentos de baço, timo, linfonodos inguinais, abdominais e axilares, fígado, pulmões, rins e pele. Todo o material foi fixado em formol neutro a 10% e corado por H.E. e parte dele também por P. A. S.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o tratamento semanal com 1 mg/kg/dia de dexametasona, em camundongos, não observamos alterações clínicas no comportamento, emagrecimento ou lesões externas. Morfologicamente, o órgão mais afetado foi o baço, que apresentou, no terceiro dia, depleção de cerca de 50% dos pequenos linfócitos da polpa vermelha (Fig. 2), seguida de repovoamento parcial por linfócitos pequenos acrescidos de linfócitos

grandes e macrófagos. Os linfonodos, inicialmente em repouso, mostraram aumento de atividade dos centros germinativos do 13º ao 23º dia (Fig. 3), iniciando então diminuição gradativa dessa atividade. O timo parece não ter sido afetado por esse tratamento, uma vez que não apresentou alterações morfológicas até o final do experimento (Fig. 1). Cerca de um mês após o tratamento o baço e os linfonodos ainda não haviam retornado ao aspecto morfológico do início do experimento, o que nos levou a considerar o efeito do tratamento com doses pequenas e fracionadas de dexametasona como de ação prolongada e seletiva para os linfócitos pequenos da polpa vermelha do baço, em camundongos.

Esses aspectos observados por nós estão de acordo com a literatura internacional, uma vez que entre os efeitos mais citados dos corticóides sobre os órgãos linfóides estão a atrofia destes devido à lise de linfócitos^{2, 6, 19, 21}, com características seletivas para linfócitos pequenos tipo T^{1, 2, 7, 21}, redistribuição de células linfóides e repovoamento dos órgãos linfóides⁷. Testes para verificar a função linfocitária tem demonstrado supressão prolongada após o uso de corticóides^{5, 7, 8, 19, 21}.

Após inocular 1 ml de 1.10⁶ de *Candida albicans*, por via endovenosa, tanto os camundongos tratados com dexametasona como os camundongos-controle desenvolveram candidíase sistêmica. Nos animais tratados o quadro clínico se desenvolveu mais rápido e com maior gravidade. Clinicamente, assim como outros autores^{4, 9}, observamos alterações do comportamento e da postura, dificuldade de movimentação, inapetência, emagrecimento e lesões cutâneas. Esse quadro atingiu o máximo entre o 5º e o 7º dia. Os rins foram os órgãos mais gravemente atingidos pela infecção, o que vem sendo repetidamente observado na literatura^{4, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17}. As lesões renais se iniciaram logo após a inoculação do fungo, chegando ao nível máximo em 5 a 7 dias. Acompanhando a evolução dessas verificamos que os fungos foram retidos nos túbulos renais e nestes se multiplicaram e formaram pseudohifas, que atravessaram a parede dos túbulos e alcançaram o interstício da cortical e da medular, formando, por volta do 5º dia, abscessos ricos em fungos, com formação de numerosas pseudohifas, necrose extensa e por vezes de aspecto mal delimitado, distribuídos difusamente nos rins (Figs. 9 e 10). Ao mesmo tempo se desenvolveu um volumoso abscesso dentro da pelve renal, distendendo-a e insinuando-se no ureter. Esse mesmo comportamento é citado por diversos autores, que concordam em afirmar que o sistema tubular e a pelve dos rins oferece "proteção" aos fungos, impedindo ou dificultando a ação da resposta inflamatória e garantindo a proliferação local dos mesmos^{4, 9, 10, 11, 12, 14}. Após o 7º dia, o quadro clínico amenizou-se e os abscessos formados na cortical e na medular dos rins apresentaram regressão rápida, porém o abscesso localizado dentro da pelve teve duração mais prolongada, sendo ainda observado e contendo pseudohifas no 12º dia, o que também está de acordo com a literatura^{4, 9, 14}. Chamou-nos atenção as alterações morfológicas dos órgãos linfóides, que foram muito maiores do que aquelas observadas nos animais tratados apenas com dexametasona. O timo foi o órgão mais atingido, apresentando depleção linfocitária muito acentuada, do 5º ao 7º dia após a inoculação de *Candida* (Fig. 4), seguida de repovoamento celular muito discreto, estando o timo no 12º dia ainda com cerca de

50% do seu total (Fig. 5). O baço apresentou depleção linfocitária atingindo o máximo no 5º – 7º dias (Fig. 6), com posterior repovoamento parcial, semelhante ao observado no grupo tratado apenas com dexametasona. Os linfonodos apresentaram pequena depleção linfocitária até o 7º dia (Fig. 7), seguida de aumento de atividade dos centros germinativos do 10º dia em diante (Fig. 8). Lesões cutâneas foram observadas do 7º ao 10º dia e eram superficiais, crostosas, hiperkeratóticas, contendo células leveduriformes e pseudohifas e com infiltração inflamatória muito discreta. Acreditamos que elas se devem mais à contaminação externa causada pelos fungos viáveis eliminados na urina do que por disseminação hematogênica e que tem relação com a imunossupressão então presente. Os pulmões e o fígado apresentaram apenas congestão. Analisando esses dados verificamos que o nível máximo de depleção linfocitária coincide com o nível máximo da infecção clínica e com o auge das lesões renais. Notamos ainda que o timo, aparentemente preservado no tratamento apenas com dexametasona, na vigência da candidíase foi intensamente atingido. À medida que a infecção renal regride ocorre um repovoamento gradativo dos órgãos linfóides.

Os animais inoculados com *Candida* e não tratados com dexametasona apresentaram alterações semelhantes aos animais que receberam os dois tratamentos. No entanto a evolução da infecção e das lesões renais foi mais lenta. No 5º dia após a inoculação os microabscessos começaram a se formar. Em comparação com os tratados com dexametasona estes eram menores, mais circunscritos, com menos necrose e com fungos de aspecto mais leveduriforme e com menos pseudohifas (Figs. 11 e 12). No 12º dia ainda haviam vários microabscessos na cortical e medular renais, e o abscesso da pelve ainda era muito volumoso, provocando grande distensão. A rarefação linfocitária no timo, baço e linfonodos foi de menor intensidade e apareceu mais tardiamente, acompanhando o curso da candidíase. Os autores consultados também relatam imunossupressão induzida pela *Candida albicans* e citam que de acordo com a quantidade de fungo viável inoculado podemos ter supressão da hipersensibilidade de tipo retardada e da resposta humoral T – dependente e que o inverso ocorre se os fungos forem inoculados mortos^{14, 20}.

Comparando os animais, constatamos que a associação de dexametasona e candidíase sistêmica antecipa e intensifica a infecção e que leva à depleção linfocitária mais intensa no timo, baço e linfonodos do que qualquer dos dois tratamentos isoladamente.

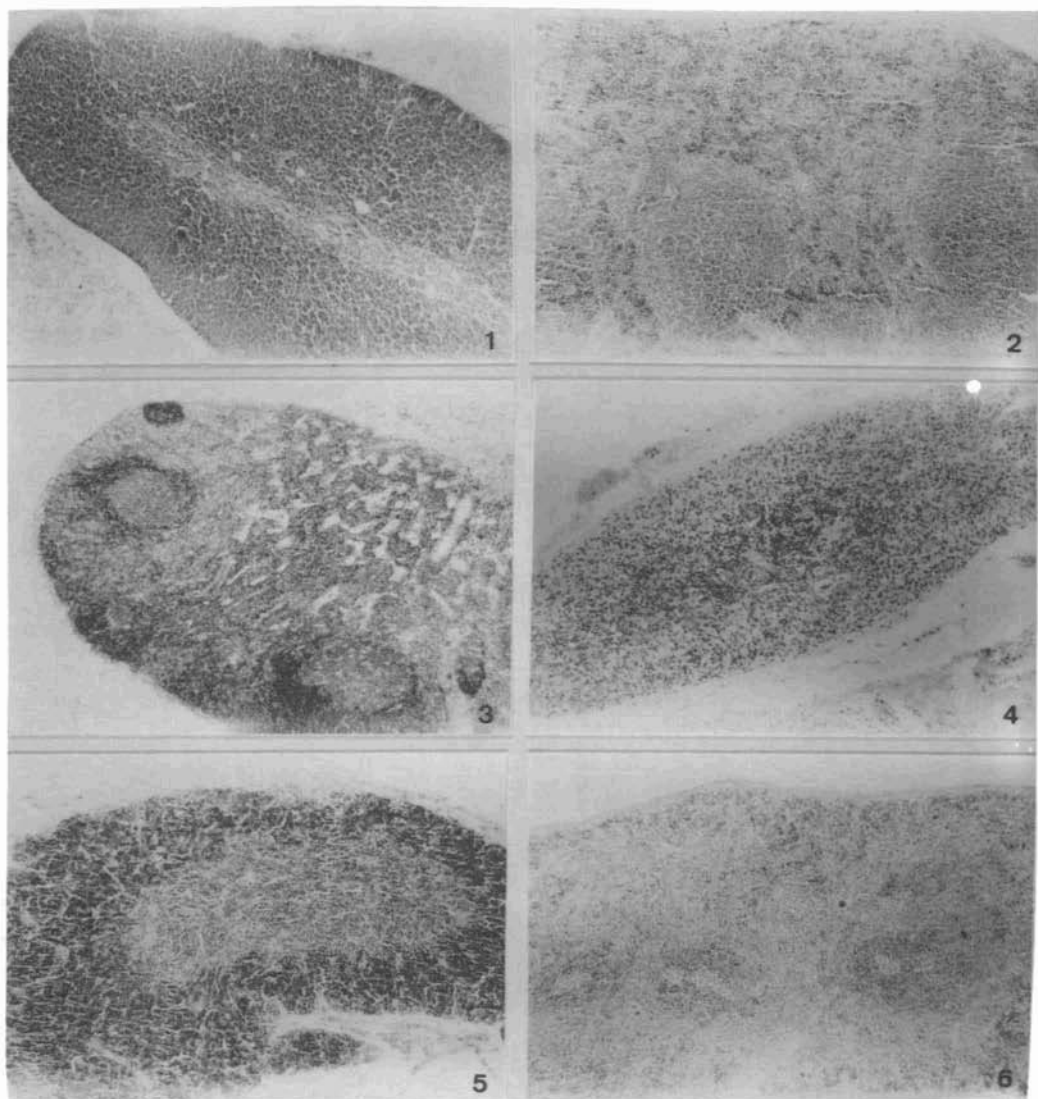


FIG. 1 – Dexametasona sem *Candida* – Timo: População linfocitária estável durante todo o experimento. H. E. 80 X.

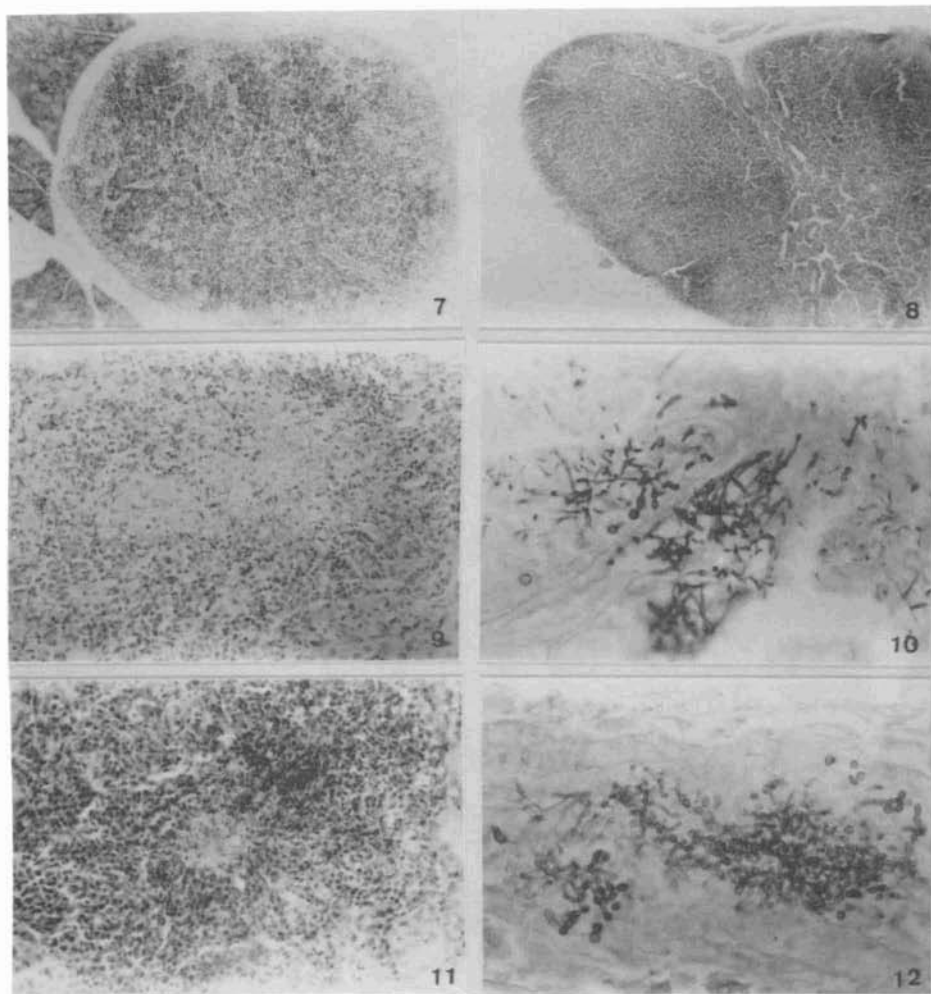
FIG. 2 – Dexametasona sem *Candida* – Baço: Grande depleção linfocitária após 3 dias. H. E. 60 X.

FIG. 3 – Dexametasona sem *Candida* – Linfonodo: Maior atividade dos centros germinativos após 13 dias. H. E. 80 X.

FIG. 4 – Dexametasona e *Candida* – Timo: Depleção linfocitária muito acentuada após 6 dias. H. E. 120 X.

FIG. 5 – Dexametasona e *Candida* – Timo: Recuperação parcial da população linfocitária após 12 dias. H. E. 110 X.

FIG. 6 – Dexametasona e *Candida* – Baço: Grande depleção linfocitária após 5 dias. H. E. 90 X.



- FIG. 7 – Dexametasona e *Candida* – Linfonodo: Discreta depleção linfocitária após 7 dias. H. E. 100 X.
- FIG. 8 – Dexametasona e *Candida* – Linfonodo: Recuperação da população linfocitária e atividade dos centros germinativos após 12 dias. H. E. 60 X.
- FIG. 9 – Dexametasona e *Candida* – Rim: Formação de microabscessos mais alargados e com necrose mais extensa que os da *Candida* sem dexametasona. H. E. 250 X.
- FIG. 10 – Dexametasona e *Candida* – Rim: Fungos apresentando maior formação de pseudohifas e distribuição mais esparsa que os da *Candida* sem dexametasona. P. A. S. 400 X.
- FIG. 11 – *Candida* sem dexametasona – Rim: Formação de microabscessos menores, mais circunscritos e com menos necrose que os da associação com dexametasona. H. E. 250 X.
- FIG. 12 – *Candida* sem dexametasona – Rim: Fungos de aspecto mais leveduriforme, com menor formação de pseudohifas, distribuídos de maneira mais circunscrita que os da associação com dexametasona. P. A. S. 400 X.

CONCLUSÕES

Concluimos que em camundongos é possível obter imunossupressão usando dexametasona na dosagem de 1 mg/kg/dia, durante sete dias consecutivos, e que o baço é o órgão linfóide mais afetado por esse tratamento. A inoculação de 1 ml de 1.10^6 de *Candida albicans*, por via endovenosa, também tem efeito imunossupressor, e o timo é o órgão linfóide mais afetado por esse tratamento. Os efeitos imunossupressores da dexametasona e da candidíase sistêmica se somam quando os dois tratamentos são associados. De todos os órgãos sistêmicos os rins são os que possibilitam um melhor desenvolvimento da *Candida albicans*.

BRANDÃO, A. A. H. Experimental immunosuppression in mice. Histological aspects of the lymphoid tissue after administration of dexamethasone and inoculation with *Candida albicans*. *Rev. Odont. UNESP*, São Paulo, v. 20, p. 9-16, 1991.

ABSTRACT: *Experimental corticosteroid immunosuppression in mice was obtained using 1 mg/kg/day of dexamethasone during a week. In order to check the immunosuppressive effects of this corticoid on the lymphoid tissue we challenged the animals endovenously with 1 ml of 1.10^6 of Candida albicans after the treatment with dexamethasone. We observed the set up and the development of the infection for 12 days and analysed the histologic aspects of the spleen, thymus, lymph nodes, kidneys, liver, lungs and skin obtained at regular intervals from animals treated only with dexamethasone, only with Candida albicans or that had received both treatments. From our data we concluded that this dosage of dexamethasone induces immunosuppression, affecting specially the spleen, that systemic candidiasis is also able to induce immunosuppression, affecting specially the thymus and that those immunosuppressive effects are added when we associate the two treatments in mice.*

KEYWORDS: *Experimental immunosuppression; dexamethasone; candidiasis; lymphoid tissue.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACH, J.F., DUVAL, D., DARDENNE, M., SALOMON, J.C., TURSZ, T., FOURNIER, C. The effects of steroids on T cells. *Transplant. Proc.*, v. 7, p. 25-30, 1975.
2. BAXTER, J.D., FORSHAM, P.N. Tissue effects of glucocorticoids. *Am. J. Med.*, v. 53, p. 573-89, 1972.
3. BAXTER, J.D., HARRIS, A.W. Mechanism of glucocorticoid action: general features, with reference to steroid-mediated immunosuppressions. *Transplant. Proc.*, v. 7, p. 55-64, 1975.
4. BENBOUZID, A., SABBAGH, I., CLOPPET, H., GUINET, R. Purification and characterization of deep candidosis related antigens. *Mykosen*, v. 29, p. 21-33, 1986.

5. BUTLER, W.T. Corticosteroids and immunoglobulin synthesis. *Transplant. Proc.*, v. 7, p. 49-53, 1975.
6. CLAMAN, H.N. How corticoids work. *J. Allergy clin. Immunol.*, v. 55, p. 145-51, 1975.
7. FAUCI, A.S. Corticosteroids and circulating lymphocytes. *Transplant. Proc.*, v. 7, p. 37-40, 1975.
8. FOLB, P.I., TROUNCE, J.R. Immunological aspects of *Candida* infection complicating steroid and immunosuppressive drug therapy. *Lancet*, v. 28, p. 1112-4, 1970.
9. FRANSEN, J., VAN CUTSEM, J., VANDESTEENE, R., JANSSEN, J. Histopathology of experimental systemic candidosis in guinea-pigs. *Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.*, v. 22, p. 455-69, 1984.
10. HURLEY, R. Experimental infection with *Candida albicans* in modified hosts. *J. Pathol.*, v. 8, p. 57-67, 1966.
11. HURTREL, B., LAGRANGE, P.H., MICHEL, J.C. Systemic candidiasis in mice. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, v. 131c, p. 93-104, 1980.
12. HURTREL, B., LAGRANGE, P.H., MICHEL, J.C. Influence d' une réaction inflammatoire sur la résistance de la souris à l' infection par *Candida albicans*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, v. 129c, p. 843-6, 1978.
13. LAGAZ, C.S. *Candidíases*. São Paulo: EPU, Ed. da Universidade de São Paulo, 1980.
14. LQURIA, D.B., BRAYTON, R.G., FINKEL, G. Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infection in mice. *Sabouraudia*, v. 2, p. 271-83, 1963.
15. LOURIA, D.B., BROWNE, H.G. The effects of cortisone on experimental fungus infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 89, p. 39-46, 1960.
16. LOURIA, D.B., FALLON, N., BROWNE, H.G. The influence of cortisone on experimental fungus infections in mice. *J. clin. Invest.*, v. 39, n. 14, p. 35-49, 1960.
17. MATYSIAK, M. Caractéristiques et effets cliniques du *Candida albicans*. *Actual. Odontostomatol.*, v. 142, p. 365-81, 1983.
18. MILLER, O. *Farmacologia clínica e terapêutica*. 11. ed., Rio de Janeiro; Livraria Atheneu, 1979.
19. SABBELE, N.R., VAN OUDENAREN, A., BENNER, R. The effect of corticosteroids upon the number and organ distribution of "background" immunoglobulin secreting cells in mice. *Cell. Immunol.*, v. 77, p. 308-17, 1983.
20. VALDEZ, J.C., MESÓN, D.E., SIRENA, A., PETRINO, S.F., EUGENIA, M., JORRAT, B.B., VALDEZ, M.G.A. Induction of the immune response suppression in mice inoculated with *Candida albicans*. *Mycopathologia*, v. 93, p. 147-50, 1986.
21. WEBEL, M.L., RITTS Jr., R.E., TASWELL, H.F., DONADIO Jr., J.V., WOODS, J.E. Cellular immunity after intravenous administration of methylprednisolone. *J. Lab. clin. Med.*, v. 83, p. 383-92, 1974.

Recebido para publicação em 12/9/90.