

CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS FARMACOLOGICAMENTE COMO MODELO PARA ESTUDO DE INFECÇÕES PARASITÁRIAS OPORTUNISTAS

ADRIANO PEREIRA^{1,2}; RONALDA S. DE ARAÚJO³; RONNI R. BRITO⁴; JOSÉ G. XAVIER¹; EDUARDO F. BONDAN¹; JULIANA PEREIRA²; MARIA A. LALLO¹

ABSTRACT:- PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.S. DE; BRITO, R.R.; XAVIER, J.G.; BONDAN, E.F.; PEREIRA, J.; LALLO, M.A. [Pharmacologically immunosuppressed mice as a model for study of opportunistic parasite infections]. Camundongos imunossuprimidos farmacologicamente como modelo para estudo de infecções parasitárias oportunistas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 292-295, 2008. Curso de Pós-Graduação em Imunopatologia, Universidade Paulista, Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP 04026-002, Brasil. E-mail: biomedadriano@yahoo.com.br

Immunodeficient animals are important research models for studies in parasitology, oncology and immunology. Immunosuppressive drugs have been experimentally used to obtain a state of immunodeficiency in mice. This investigation aimed to quantify the circulating T and B cells of mice treated with the immunosuppressive agents dexamethasone (Dx), cyclosporine (CsA) and cyclophosphamide (CY), as well as to observe the behaviour of lymphocytic populations in the spleen of these animals. Blood samples were collected for counting the total peripheral blood leukocytes and T and B lymphocytes using flow cytometry. Total leukocytes of mice treated with the three drugs during all study showed a significant decrease when compared to the results of the control group. The proportion of B and T lymphocytes from the treated animals also decreased significantly. Spleen sections revealed a moderate decrease in the cellularity of the white pulp and the development of lymphocyte apoptosis in mice from groups treated with CY and Dx. Results showed that the proposed experimental models demonstrated to be suitable for studies of murine immunodeficiency.

KEY WORDS: Cyclophosphamide, dexamethasone, cyclosporine, immunosuppressive murine models, mice.

RESUMO

Animais imunodeficientes são amplamente utilizados como modelos para pesquisas nas áreas de parasitologia, oncologia e imunologia. Atualmente, fármacos com ação imunossupressora têm sido usados experimentalmente para a obtenção de camundongos imunossuprimidos. Com o objetivo de obtenção de modelos animais imunossuprimidos farmacologicamente, foram avaliadas as populações de linfócitos de camundon-

gos imunossuprimidos com dexametasona (Dx), ciclosporina (CsA) ou ciclofosfamida (CY). Para tal, amostras de sangue dos camundongos foram colhidas para a contagem de leucócitos totais e análise de populações de linfócitos T e B por de citometria de fluxo. Adicionalmente, o baço foi submetido à análise histopatológica. Os resultados revelaram que os leucócitos totais dos camundongos tratados com as três drogas, seguindo os respectivos protocolos, apresentaram uma diminuição significativa quando comparados com os resultados dos animais do grupo controle. A proporção de linfócitos T e B dos animais tratados também diminuiu significativamente em todo o período do experimento. A análise histopatológica do baço revelou uma moderada redução celular da polpa branca e ocorrência de células em apoptose nos grupos tratados com CY e Dx. Os resultados mostraram que os modelos de imunodeficiência propostos neste experimento podem ser empregados para infecções parasitárias oportunistas.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclofosfamida, dexametasona, ciclosporina, modelos murinos imunossuprimidos, camundongos.

¹ Curso de Pós-Graduação em Imunopatologia, Universidade Paulista, Rua Dr Bacelar, 1212, São Paulo, SP 04026-002, Brasil. E-mail: adpee@uol.com.br, bondan@uol.com.br

² Laboratório de Imunopatologia, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo (USP), Av Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, sala 61, São Paulo, SP 05403-000, Brasil. - Bolsista CAPES. E-mail: adpee@uol.com.br

³ Laboratório de Práticas de Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, USP, Avenida Dr. Arnaldo, 715, São Paulo, SP 01246-904, Brasil. E-mail: ronaldi@usp.br

⁴ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, 6º andar, São Paulo, SP 04029-901, Brasil.

INTRODUÇÃO

Algumas enfermidades parasitárias ocorrem, preferencialmente em indivíduos com imunossupressão natural ou adquirida. Dessa forma, o estudo de tais doenças fica restrito ao uso de modelos animais com deficiências imunes que reproduzam essas condições. Camundongos portadores de deficiências imunológicas adquiridas geneticamente, tais como os animais atímicos (também chamadas de nude) e os camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID), são frequentemente usados como modelos animais imunossuprimidos, contudo sua criação e manutenção têm alto custo, sendo restrita no aspecto financeiro (STANLEY; VIRGIN, 1993; DIDIER et al., 1994; SEYDEL; STANLEY, 1996). Nesse sentido, o emprego de camundongos com imunossupressão determinada por fármacos pode ser uma alternativa de modelo biológico.

Drogas imunossupressoras podem ser utilizadas em pesquisas para diminuir a resposta imune em animais. Entre os agentes imunossupressores empregados, estão a dexametasona (Dx), a ciclosporina (CsA), a ciclofosfamida (CY), entre outras (LALLO, 1998; CASTRO, 1999; LALLO et al., 2002).

A Dx é um glicocorticóide amplamente utilizado por suas propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias, possuindo atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T. A Dx pode induzir apoptose em diferentes células do sistema imunológico, incluindo os precursores de linfócitos T e B imaturos e linfócitos T maduros. Esse glicocorticóide também inibe a transcrição de importantes citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e o interferon-gama (IFN- γ), que são essenciais para a proliferação de linfócitos T (LILL-ELGHANIAN et al., 2002).

Já a CsA, um potente imunossupressor, exerce seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as demais células da linhagem mielóide, conferindo-lhe certa seletividade. A CsA inibe a ativação de linfócitos T, bloqueando a expressão de vários genes de citocinas, tais como a IL-2 e a IL-4, que são normalmente secretadas na ativação de tais células (MATSUDA; KOYASY, 2000).

A CY é uma mostarda nitrogenada usada no tratamento de diversos tipos de câncer e de doenças autoimunes. A droga é um potente imunossupressor, atuando em células com alta atividade mitótica e inibe tanto a resposta imune humoral quanto a celular (GARCIA et al., 2004).

Considerando-se a necessidade de modelos animais imunodeficientes mais acessíveis para a realização de estudos experimentais, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da CY, Dx e CsA sobre os compartimentos celulares responsáveis pela resposta imune humoral e celular de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos isogênicos Balb/c, livres de patógenos específicos, machos, com 5 semanas de idade, foram divididos em 4 grupos da seguinte forma – o grupo Co (n=9) recebeu

apenas água destilada estéril, por via intraperitoneal (ip); o grupo CY (n=15) recebeu duas doses semanais de 75 mg/kg de CY (ip), administradas com intervalo de, no mínimo 72 horas; o grupo Dx (n=15) recebeu 5 mg/kg de Dx (ip) diariamente; e o grupo CsA (n=15) recebeu 10 mg/kg de CsA (ip), 3 vezes por semana, por todo o período experimental.

Durante o desenvolvimento do experimento, os animais permaneceram isolados em biotério, onde foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha previamente esterilizada. Receberam água e ração peletizada previamente esterilizada *ad libitum*.

O sacrifício dos animais foi realizado aos 7, 14 e 28 dias após o início dos tratamentos imunossupressivos por meio do aprofundamento da anestesia com éter etílico. Cinco animais dos grupos CY, Dx, CsA e 3 animais do grupo Co foram sacrificados nos respectivos dias. Durante o aprofundamento da anestesia inalatória, antes da parada respiratória, foi coletado o sangue dos animais pela punção da artéria braquial esquerda, com seringa contendo o anticoagulante EDTA. O leucograma foi feito em câmara de Neubauer com contagem diferencial em esfregaços sangüíneos e análise das populações de linfócitos T e B circulantes por citometria de fluxo.

Para a identificação dos linfócitos T e B, a partir do sangue total, foram utilizadas as marcações dessas populações celulares com os anticorpos monoclonais anti-camundongo-CD3 e conjugado ao fluorocromo alofococianina (*Allophycocyanin* - APC; Pharmingen, EUA) e CD19 conjugado ao fluorocromo R-ficoeritrina (*phycoerythrin* - R-PE, Pharmingen, EUA), respectivamente, e realizada a técnica de imunofluorescência direta por citometria de fluxo. Para aquisição, análise dos dados e determinação das porcentagens de linfócitos T e B foi utilizado o programa CellQuest do citômetro de fluxo FACSCalibur.

A análise histopatológica dos baços dos animais foi feita por microscopia de luz, após fixação do órgão com solução de formaldeído a 10% e processamento histológico, empregando-se a coloração de hematoxilina-eosina (HE).

A análise estatística foi feita pelo teste ANOVA, de um critério, realizado com o programa GraphPad Prisma (versão 4.01), com o nível de confiança $p < 0,05$. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), dentro das normas que regulamentam a pesquisa envolvendo animais.

RESULTADOS

Conforme demonstrado na Tabela 1, o número total de leucócitos e a porcentagem de linfócitos dos animais tratados com CY, Dx e CsA, em todas as datas de sacrifícios, apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados com os resultados dos animais que não receberam o tratamento imunossupressor (grupo Co). O mesmo foi observado na Tabela 2 quanto à proporção de linfócitos B CD19⁺ e de linfócitos T CD3⁺ nos animais tratados com as drogas (grupos CY, Dx e CsA) em relação ao grupo controle (Co).

Tabela 1. Leucograma: médias dos leucócitos de acordo com os grupos estudados Os resultados se referem à média \pm desvio padrão.

Parâmetros Hematológicos	Grupo Co (controle)	Grupo CY			Grupo Dx			Grupo CsA		
		7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,1 \pm 0,8	2,2 \pm 0,9*	0,1 \pm 0,03*	0,5 \pm 0,07*	2,0 \pm 0,7*	1,07 \pm 0,7*	4,4 \pm 1,4*	2,6 \pm 1,9*	0,4 \pm 0,1*	3,3 \pm 0,4*
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,9 \pm 0,9	1,8 \pm 0,8*	0,6 \pm 0,1*	0,4 \pm 0,05*	1,2 \pm 0,3*	1,5 \pm 0,5*	2,3 \pm 0,6*	1,9 \pm 1,3*	1,5 \pm 0,5*	2,5 \pm 0,5*
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,03	0,1 \pm 0,03	0,8 \pm 0,6	1,1 \pm 0,7	2,0 \pm 1,4	0,8 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,09
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,4 \pm 0,1	0,02 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,0 \pm 0,0	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	0,02 \pm 0,03	0,02 \pm 0,03	0,02 \pm 0,02	0,0 \pm 0,0
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,04 \pm 0,02	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,01 \pm 0,01	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,04 \pm 0,05	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,02
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, em relação ao grupo I (controle).

Tabela 2. Valores Porcentuais de linfócitos T CD3⁺ e B CD19⁺ obtidos por citometria de fluxo Os resultados se referem à média \pm desvio padrão.

Porcentagem de linfócitos	Grupo Co (controle)	Grupo CY			Grupo Dx			Grupo CsA		
		7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Linfócitos T CD3 ⁺ (%)	14,7 \pm 3,6	7,6 \pm 3,4*	5,3 \pm 2,1*	1,9 \pm 1,6*	8,6 \pm 3,6*	2,2 \pm 0,6*	2,7 \pm 1,8*	7,6 \pm 3,4*	2,8 \pm 2,0*	4,9 \pm 2,8*
Linfócitos B CD19 ⁺ (%)	28,5 \pm 7,4	4,7 \pm 2,1*	9,1 \pm 7,6*	0,15 \pm 0,1*	12,8 \pm 5,4*	7,2 \pm 1,1*	1,0 \pm 0,7*	4,7 \pm 2,1*	1,1 \pm 1,3*	13,1 \pm 6,6*

* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, em relação ao grupo I (controle).

O exame histopatológico dos baços dos animais pertencentes aos grupos CY e Dx, sacrificados aos 7 dias, evidenciou uma discreta redução celular da polpa branca, que se tornou mais pronunciada nos animais sacrificados com 14 e 28 dias de experimento. Por sua vez, os animais do grupo CsA mostraram discreta redução da polpa branca no 14º e no 28º dia de sacrifício. Nos animais dos grupos CY e Dx, aos 28 dias de tratamento, também foi observada uma rarefação das áreas de bainhas linfóides periarteriolas e ausência de folículos linfóides.

Pela análise histopatológica, foi evidenciada uma maior ocorrência de apoptose nos baços dos animais pertencentes aos grupos CY e Dx quando comparados aos animais dos grupos Co e CsA.

DISCUSSÃO

Infecções oportunistas experimentais foram realizadas em camundongos farmacologicamente imunossuprimidos, no entanto a deficiência imune foi apenas confirmada pelo curso das infecções, que se manifestam de forma grave nestes animais, sendo comparáveis aos modelos animais geneticamente imunodeficientes, tais como os camundongos nude e SCID (LALLO, 1998; CASTRO, 1999; LALLO et al., 2002). Nesse sentido, o presente trabalho adiciona à literatura específica esclarecimentos quanto ao envolvimento de alguns elementos da resposta imune em camundongos imunossuprimidos farmacologicamente por CY, Dx e CsA.

O efeito imunossupressor dos 3 fármacos foi evidenciado pela redução no número total de leucócitos circulantes. A leucopenia observada foi consequência direta da redução significativa de linfócitos, aferida na contagem diferencial do sangue periférico. Resultados semelhantes foram observados por Artym et al. (2003), em pesquisas realizadas com camundongos imunossuprimidos com CY, e por Soriano et al.

(2002), estudando a ação imunossupressora da CsA e da Dx em ratos.

O uso de CY na presente investigação revelou a diminuição das populações de linfócitos T e B circulantes ao longo de todo o período experimental de 28 dias, revelando os resultados mais homogêneos na redução progressiva de linfócitos. Lallo (1998), em um estudo de infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos Balb/c tratados com CsA ou CY, relatou que os animais tratados com CY foram os que mais se aproximaram dos modelos da infecção em animais atímicos e SCID.

A ação fortemente supressora da Dx se reflete principalmente na resposta imune celular, devido aos seus efeitos diretos sobre a população de linfócitos T (LILL-ELGHANIAN et al., 2002). Os resultados observados nesse estudo com a Dx confirmam esse efeito, mostrando uma diminuição significativa da população de linfócitos T circulantes, em especial no 14º dia de tratamento. Também houve diminuição significativa da população de linfócitos B CD19⁺ do compartimento circulatório. Esse efeito supressor da Dx sobre populações de linfócitos B CD19⁺ foi também demonstrado em humanos por LILL-ELGHANIAN et al. (2002). Em um estudo com infecção experimental em camundongos tratados com Dx, Lallo et al. (2002) demonstraram que seus animais imunossuprimidos também cursavam com o mesmo quadro clínico de infecção que camundongos atímicos e SCID relatado por outros autores.

Nos animais que receberam o imunossupressor CsA, foi evidente a redução do compartimento celular circulante caracterizado pela diminuição de linfócitos T CD3⁺, em especial com 14 dias de tratamento. Também se observou uma diminuição significativa do compartimento celular da resposta imune humoral, caracterizada pela redução dos linfócitos B CD19⁺ aos 7 e 14 dias de tratamento, com aumento ao final do expe-

rimento (28 dias). Apesar do mecanismo de ação sobre as populações de linfócitos B não ser conhecido, esse estudo demonstra claramente o efeito direto da CsA sobre essa população celular. O uso de CsA fica comprometido pela questão econômica, por se tratar de um fármaco de alto valor. Além disto, a CsA possui efeito antiparasitário observado em alguns trabalhos anteriores.

Ao exame histopatológico dos baços foi evidenciado, nos animais tratados com CY e Dx, depleção celular com rarefação da bainha linfóide periarteriolar e ausência de folículos linfóides. Stockman et al. (1973) e Lallo (1998), trabalhando com camundongos imunossuprimidos com CY, revelaram achados semelhantes, descrevendo uma evidente atrofia da polpa branca.

Lallo (1998) não verificou alteração histopatológica detectável com a administração de CsA em seus camundongos submetidos ao tratamento com este agente imunossupressor. Nesta investigação, nos animais imunossuprimidos com CsA, foi observada apenas uma discreta redução celular da polpa branca quando comparados aos animais não-tratados.

A coloração de HE foi eficaz para verificação da ocorrência de células em apoptose. Os resultados do presente trabalho revelaram maior ocorrência de apoptose nos baços dos animais imunossuprimidos com essas drogas quando comparados aos animais controle e aqueles imunossuprimidos com CsA, podendo, assim, atribuir-se a depleção celular da polpa branca a esse fenômeno nos animais tratados com CY e Dx.

CONCLUSÃO

O presente estudo revelou claramente o efeito imunossupressor da CY, da Dx e da CsA nos camundongos tratados, o que permite seu uso como possível modelo para estudos experimentais de infecções parasitárias oportunistas. Conclui-se, portanto, que qualquer um dos fármacos empregados pode ser escolhido como agente imunossupressivo já que apresentaram resultados semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTYM, J.; ZIMECKI, M.; KRUZEL, M. L. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology*, v. 207, n. 3, p. 197-205, 2003.
- CASTRO, J. M. *Eficácia do albendazol, sulfóxido de albendazol, metronidazol e ciclosporina no tratamento da infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi (protozoa: microspora) em camundongos balb/c imunossuprimidos com ciclofosfamida*. 1999. 150f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- DIDIER, E. S.; VARNER, P. W.; DIDIER, P. J.; ALDRAS, A. M.; MILLICHAMP, N. J.; MURPHEY-CORB, M.; BOFM, R.; SHADDUCK, J. A. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitologica*, v. 41, n. 1, p. 1-11, 1994.
- FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 20, supl. 2, p. 28-34, 2005.
- GARCIA, M.; SERTÓRIO, S. P.; ALVES, G. J.; CHATE, S. C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M. A. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunossupressão experimental em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 3, p. 115-9, 2004.
- LALLO, M. A. *Estudo da infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi em camundongos Balb-c tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina*. 1998. 176f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- LALLO, M. A.; SANTOS, M.J.; BONDAN, E.F. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 5, p. 621-626, 2002.
- LILL-ELGHANIAN, D.; SCHWARTZ, K.; KING, L.; FRAKER, P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, n. 9, p. 763-770, 2002.
- MATSUDA, S.; KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2000.
- SEYDEL, K. B.; STANLEY, S. L. SCID mice and study of parasitic disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 2, p. 126-134, 1996.
- SORIANELLO, E.; SCHILLACI, R.; CHAMSON-REIG, A.; LUX-LANTOS, V.; LIBERTUN, C. Actions of immunosuppressor drugs on the development of an experimental ovarian tumor. *Experimental Biology and Medicine*, v. 227, n. 8, p. 658-664, 2002.
- STANLEY, S.L.; VIRGIN, H.W. SCID mice as models for parasitic infections. *Parasitology Today*, v. 9, n. 11, p. 407-411, 1993.
- STOCKMAN, G. D.; HEIM, L. R.; SOUTH, M. A.; TRENTIN, J. J. Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. *Journal of Immunology*, v. 110, n. 1, p. 277-282, 1973.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.