

EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE ENDOTOXINA PRODUZIDA POR *ESCHERICHIA COLI*, NA MORFOLOGIA TÍMICA E NO DESENVOLVIMENTO PONDERAL DE CAMUNDONGOS JOVENS *

Marcos Kenzo FUNATSU **
Rodrigo Brito ERLICH **
Marcos Luís MONTAGNINI **
Carlos Alberto FERRANDEZ **
Cesar Augusto OGAWA **
Roberto A. Pinto PAES ***

RIALA6/598

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por *Escherichia coli*, na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

RESUMO: Este estudo descreve o efeito da injeção única, intraperitoneal de dose subletal de endotoxina, produzida por *Escherichia coli* na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. Os animais foram separados em grupos de doze, sacrificados a cada 24 horas durante cinco dias e ao final de cada experimento, um grupo controle recebeu injeção intraperitoneal de solução salina. Observou-se, neste experimento, nítida redução de peso corpóreo nas primeiras 48 horas, com recuperação após esta fase e redução no peso dos timos, assim como alterações histológicas importantes. Um outro grupo, formado por oito camundongos, teve seu desenvolvimento ponderal acompanhado durante dois meses. Neste experimento foram constatados sinais de recuperação após as primeiras horas, mas cujo desenvolvimento não chegou a alcançar níveis normais como os controles.

DESCRITORES: *Escherichia coli*, endotoxina; timo, morfologia; camundongos, desenvolvimento ponderal.

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos e experimentais indicam que existe evidente associação entre infecção e alterações morfológicas do timo (CHANDRA¹, 1972; SMYTHE et alii², 1971; FAULK et alii³, 1976; PAES et alii⁴, 1982). Sabe-se, também, que o timo está sujeito a alterações provocadas por agentes diversos, tais como raios X (TROWELL⁵, 1964), corticosteróides (SCHELINGER & MARK⁶, 1964), epinefrina (WILKES et

alii⁷, 1963), norepinefrina (WILKES & BRUNSON⁸, 1964) e reserpina (DRASKO-CI & JANKOVIC⁹, 1964). Mais recentemente, tem-se estudado a ação de endotoxinas bacterianas na estrutura tímica (KIND⁷, 1967, e ROWLANDS¹¹, 1965).

O presente estudo é uma descrição do efeito de injeção única intraperitoneal de dose subletal de endotoxina bacteriana, na morfologia tímica de camundongos jovens e sua ação no desenvolvimento ponderal de camundongos.

* Realizado no Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

** Da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

*** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, e do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos isogênicos da cepa A/SN, aclimatados no biotério da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP. Estes camundongos foram selecionados de ninhadas com idade e peso semelhantes.

Um grupo de animais sofreu inoculação intraperitoneal de endotoxina para avaliação das doses (DL-100) e subletal (DL-50) que foram, respectivamente, 500 e 250 microgramas. A endotoxina utilizada foi obtida de *E. coli* 026:B6*.

Sessenta camundongos foram separados em diversos grupos e sacrificados doze a cada 24 horas, durante cinco dias. Para cada experimento houve um grupo-controle de seis animais no qual foi injetado intraperitonealmente solução salina. Um outro grupo, formado por oito camundongos, foi igualmente injetado com 250 microgramas de endotoxina e não sacrificado, sendo acompanhado seu desenvolvimento ponderal durante dois meses. Após a obtenção de peso corpóreo, procedeu-se ao sacrifício dos animais de cada grupo, determinando-se o peso do timo e colhendo-se amostras deste órgão para exame histológico. O material foi fixado em formol neutro tamponado a 10%, desidratado por passagens sucessivas em álcool e diafanizado pelo xilol. Os fragmentos foram emblocados em parafina e submetidos a técnicas histológicas rotineiras, e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

Em relação ao grupo mantido para observação do desenvolvimento ponderal, os pesos dos animais foram tomados após 24 horas iniciais e, semanalmente, durante dois meses.

RESULTADOS

Varição do peso corpóreo de camundongos após inoculação intraperitoneal de 250 microgramas de endotoxina

Conforme pode-se observar na figura 1, uma nítida variação no peso corpóreo dos camundongos ocorreu em relação aos respectivos controles. Verificou-se que a redução mais acentuada do peso deu-se após 48 horas. A partir deste momento houve nítida recuperação, atingindo o peso inicial em torno do quinto dia após a inoculação.

Varição ponderal dos timos de camundongos após inoculação intraperitoneal com 250 microgramas de endotoxina

Como pode ser verificado na figura 2, uma variação importante no peso dos timos dos

camundongos inoculados ocorreu em relação aos timos dos camundongos-controle. Nos primeiros, a redução ponderal mais importante aconteceu no terceiro dia após a inoculação, ocorrendo a partir desta data, como acima mencionado, recuperação do peso do órgão.

Varição do desenvolvimento ponderal dos camundongos após dose única de 250 microgramas de endotoxina, durante período de nove semanas

Verifica-se na figura 3, a ocorrência de um retardo importante no desenvolvimento ponderal dos camundongos, recuperando níveis iniciais a partir da segunda semana sem, entretanto, atingir níveis normais, como os controles. Nota-se, inclusive, que mesmo após a nona semana, não há sinais de que esta relação mude.

Alterações histológicas observadas no timo, após injeção de dose única de endotoxina

O exame histológico dos timos dos camundongos tratados com endotoxina revela alterações regressivas e degenerativas importantes, sendo mais acentuadas naqueles sacrificados dentro das primeiras 24 horas. Observam-se extensas áreas de necrose celular, predominantemente dos pequenos linfócitos corticais. Nessas áreas há acentuada cariorexis e presença de numerosos macrófagos com restos celulares em seu citoplasma (figuras 5 e 6. Comparar com figura 4, timo normal).

Nos dias subsequentes houve aumento da atividade macrofágica na zona cortical, com evidente diminuição da população celular. Ao completar 72 horas da administração da endotoxina, a depleção linfocítica atingiu o máximo. Nesse momento observou-se uma inversão córtico-medular, pois os linfócitos medulares foram aparentemente menos atingidos do que aqueles corticais (figura 7). Os lóbulos tímicos são pequenos e irregulares. A partir deste dia observou-se sinais de recuperação do órgão.

DISCUSSÃO

Na literatura médica especializada encontram-se poucas publicações sobre relações entre presença de endotoxinas bacterianas e desenvolvimento ponderal e do timo de camundongos (ROWLANDS¹¹, 1965; GAD & CLARK⁶, 1965; EKSTEDT⁴, 1964; KIND⁷, SALVIN et alii¹³, 1965). Todos esses autores descrevem alterações idênticas ou semelhantes às encontradas no presente trabalho.

* Fornecida comercialmente por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA.

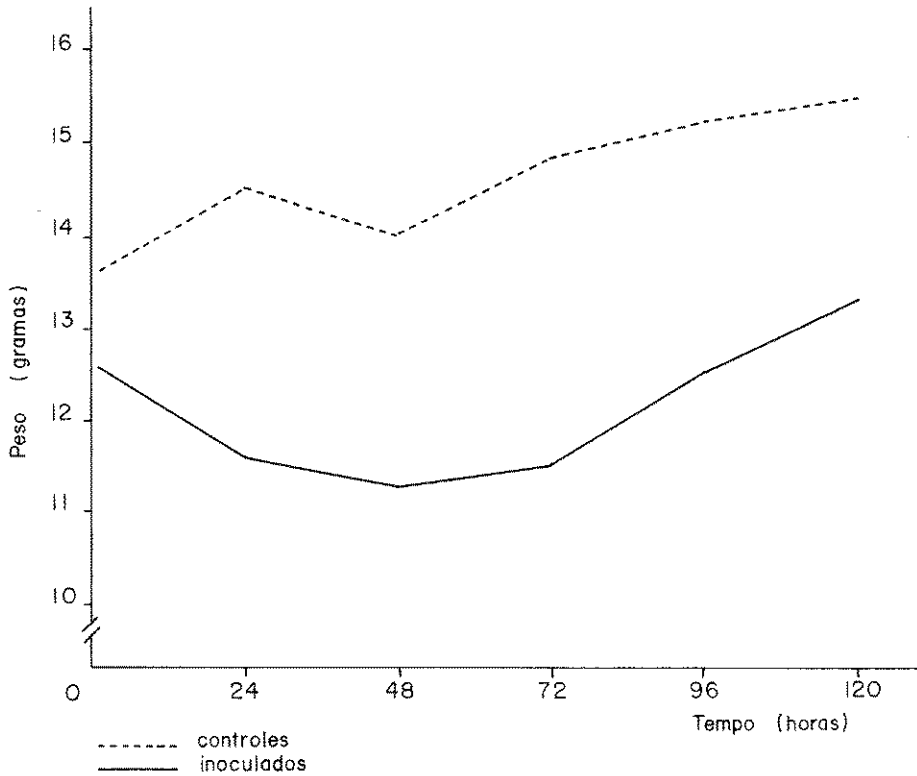


FIGURA 1 — Variação do peso dos camundongos após inoculação intraperitoneal de 250 μ g de endotoxina de *E. coli* e controles.

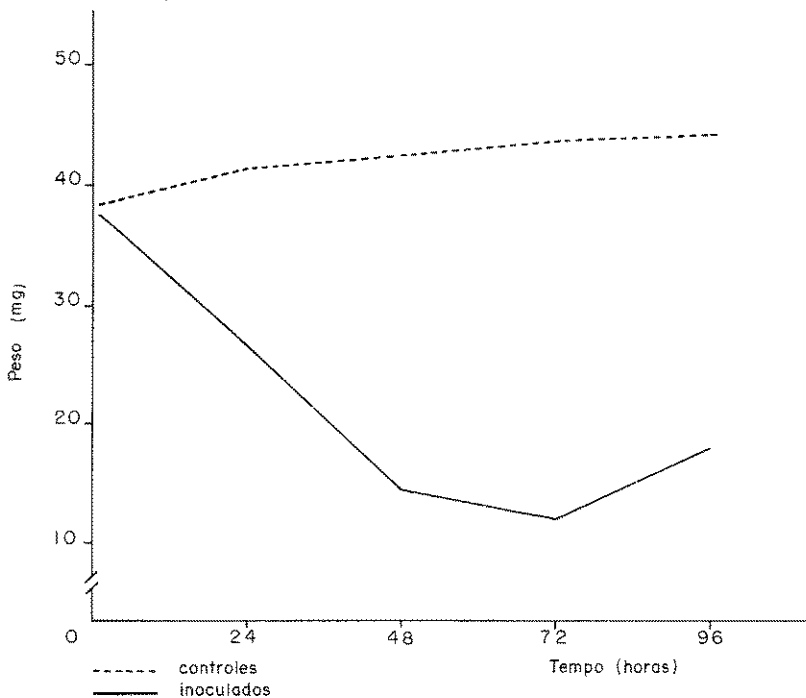


FIGURA 2 — Variação do peso do timo de camundongos inoculados i.p. com 250 μ g de endotoxina de *E. coli* e controles.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

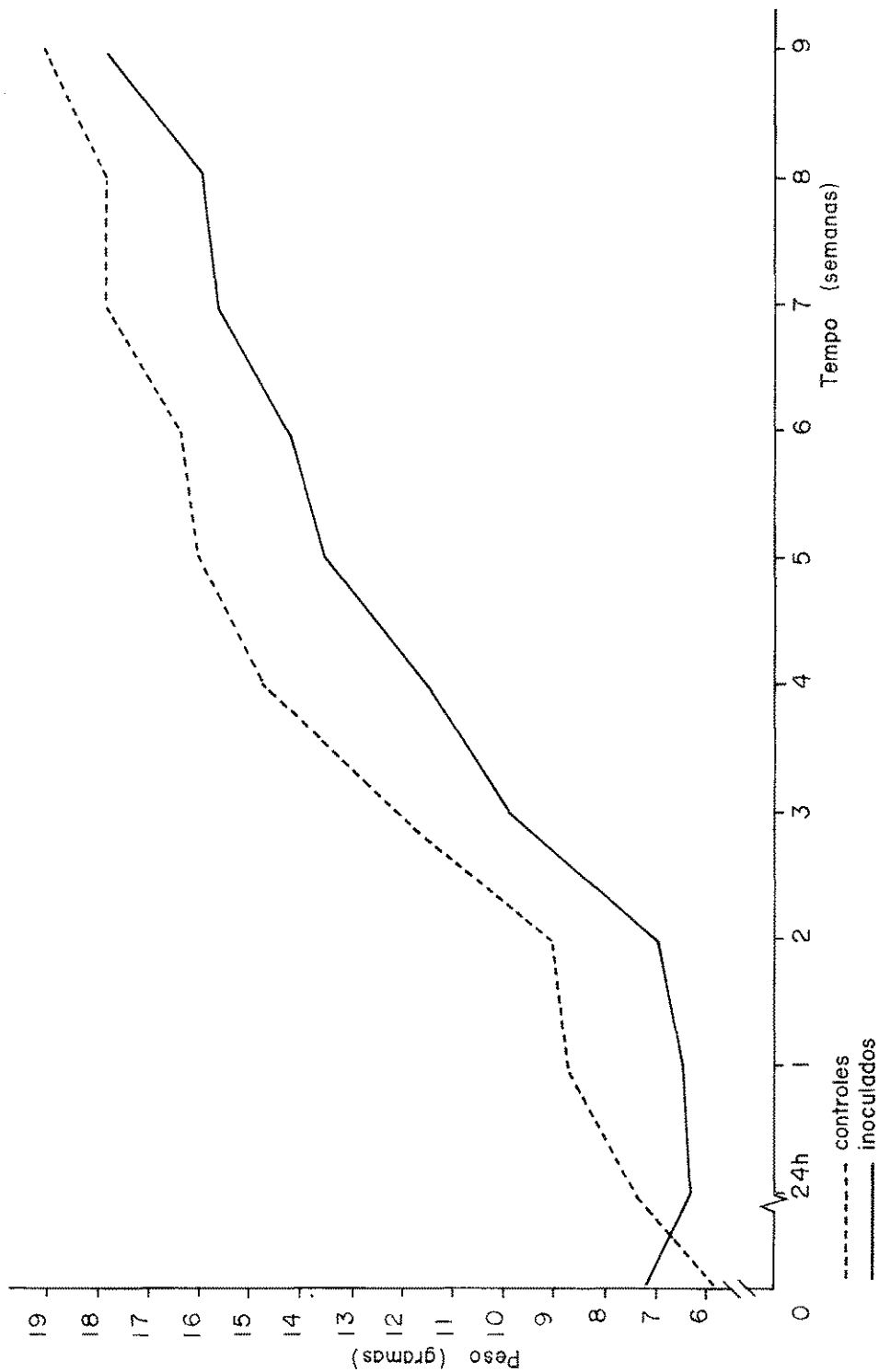


FIGURA 3 — Variação do desenvolvimento ponderal de camundongos A/SN, após dose de 250 µg de endotoxina.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

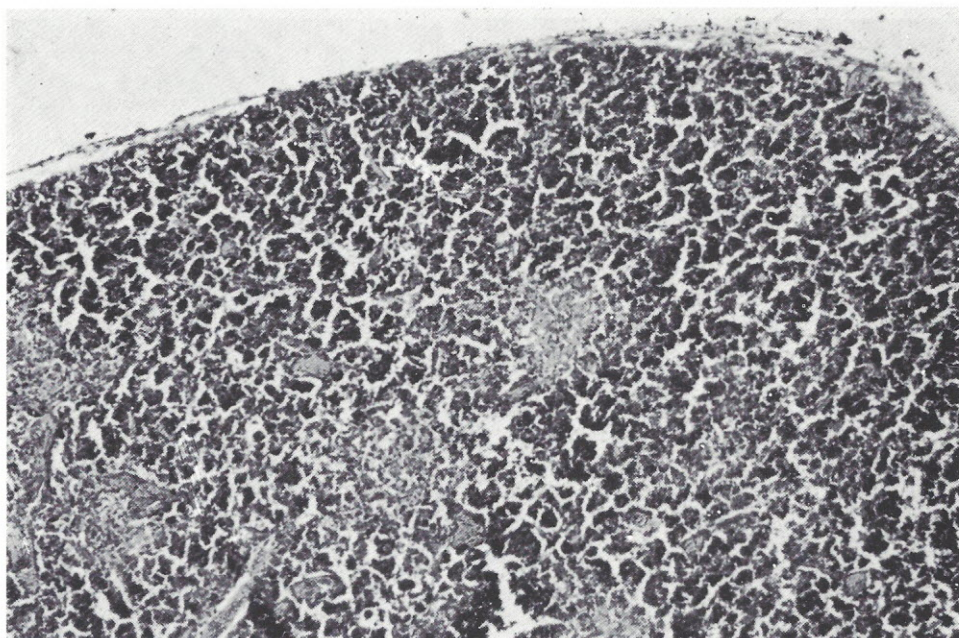


FIGURA 4 — Timo normal. Notar diferenciação nítida entre a cortical e a medular, H.E. 190 x, ampliada.

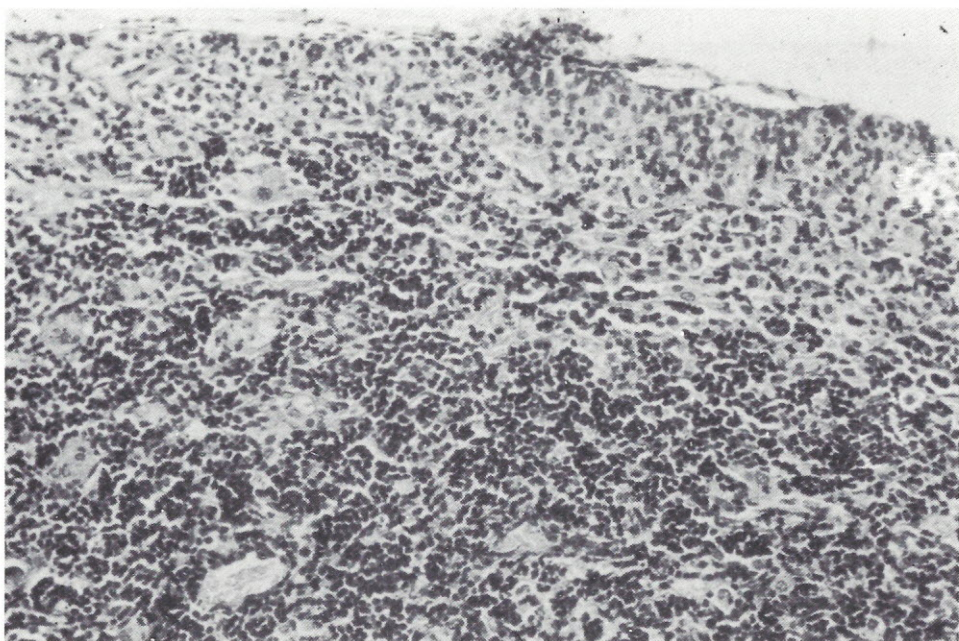


FIGURA 5 — Timo, 24 horas após injeção de endotoxina. Verificar rarefação da população celular cortical. H.E. 190 x, ampliada.

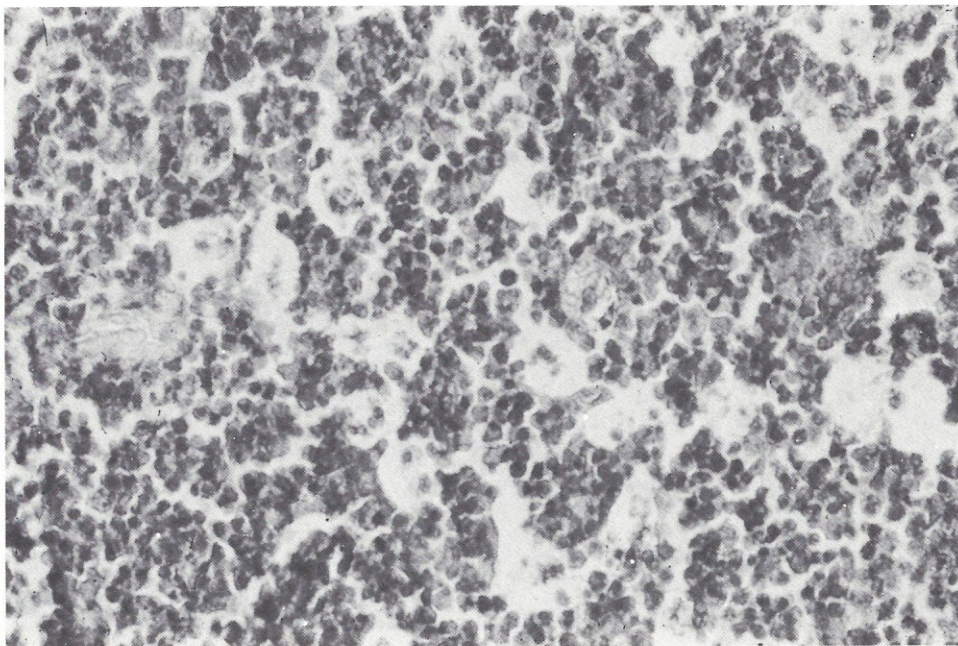


FIGURA 6 — Timo, 24 horas após injeção de endotoxina. Maior aumento da figura 5, para mostrar rarefação celular e atividade macrofágica aumentada, com restos celulares intracitoplasmáticos.

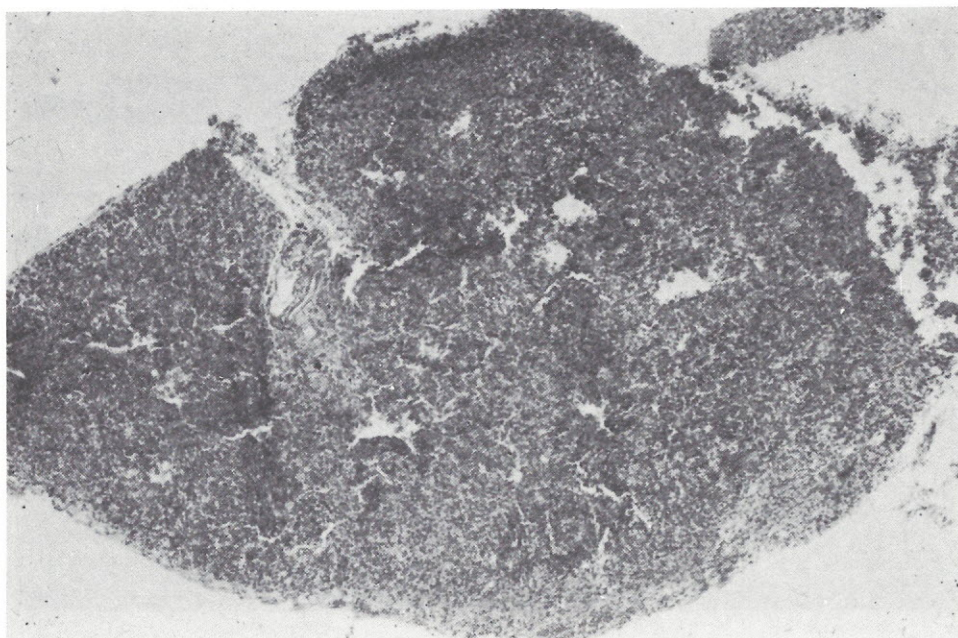


FIGURA 7 — Timo, 72 horas após injeção de endotoxina. Observar redução acentuada do lóbulo tímico, por rarefação celular máxima. H.E. 190 x, ampliada.

Quanto ao efeito de endotoxina no timo de camundongos jovens, ROWLANDS¹¹ (1965), procedeu à injeção simples endovenosa de endotoxina de "Salmonella typhi" e analisou aspectos bioquímicos e estruturais do timo. As mudanças observadas mais precocemente como a necrose dos linfócitos e o aparecimento de células pironinofílicas na córtex foram acompanhadas por perda de peso do timo e diminuição dos níveis de ácidos nucleicos.

A atividade da endotoxina como agente linfocitolítico em tecidos extratímicos (ROWLANDS¹¹, 1965) não se compara, em intensidade, com seus efeitos sobre os linfócitos tímicos. Tais variações sugerem que a localização anatômica influencia certos aspectos metabólicos dos linfócitos. Este conceito é sustentado pelo trabalho de TROWELL¹⁶ (1964), onde afirma que linfócitos dos linfonodos são mais sensíveis à irradiação por raios X, do que aqueles da circulação periférica. A maior parte das lesões iniciais é dirigida diretamente para os pequenos linfócitos da córtex do timo.

A destruição dos pequenos linfócitos corticais pela endotoxina, no entanto, não é facilmente explicada, pois o efeito direto dessa droga em linfócitos *in vitro* só ocorre em altas doses. É possível que os danos celulares observados aconteçam através da liberação de hormônios adrenais, sabidamente possuidores de efeito linfocitolítico.

Alterações morfológicas do timo associadas a infecções têm sido relatadas na literatura médica, apresentando, em muito casos, comportamento sinérgico, freqüentemente não se podendo estabelecer com clareza mecanismos de causa e efeito (SMYTHE et alii¹⁵, 1971; CHANDRA², 1975, FAULK et alii⁵, 1976; PAES et alii¹⁰, 1982).

No material coletado encontramos em todos os casos grande destruição de células da córtex do timo, caracterizadas por aglutinação de pequenos linfócitos, apresentando freqüentemente alterações nucleares, como cariopícnose e, principalmente, cariorexixis.

Além da acentuada alteração morfológica tímica, demonstrou-se no presente trabalho que endotoxinas bacterianas podem ter papel, coadjuvante ou não, no desenvolvimento ponderal do animal inoculado. Em relação a este aspecto há excelente trabalho sobre a síndrome que ocorre em ratos timectomizados e inoculados com endotoxina de *S. typhi* (SALVIN et alii¹³, 1965). Estes autores sugerem que as manifestações consupativas, verificadas nos animais, sejam decorrentes de defeito na capacidade de resistência aos efeitos da endotoxina.

Perda de peso corpóreo em camundongos injetados com endotoxina foi também estudada por KIND⁷ (1967), onde demonstrou que injeções de endotoxina em camundongos recém-nascidos causam parada temporária no crescimento.

Não há uma explicação totalmente convincente para este fato, mas não podemos deixar de ter em mente que o timo não é apenas um órgão do sistema imunológico. Sabe-se que o timo tem também um papel endócrino, inclusive relacionado com o crescimento (SALVIANO et alii¹², 1983).

Não se pode afastar a possibilidade de a perda ponderal aguda, momentânea, ser devida à ação pirogênica da endotoxina. Entretanto, a perda crônica pode relacionar-se a fatores endócrinos tímicos. É possível, portanto, que o baixo peso de crianças desnutridas que freqüentemente são vítimas de infecções por germes gram-negativos esteja relacionado com a endotoxina produzida por estes microrganismos.

RIAL6/598

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Effect of the inoculation of *Escherichia coli* endotoxin on the thymus histology and weight of young mice. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

ABSTRACT: The effect of intraperitoneal injection of sub-lethal doses of *Escherichia coli* endotoxin on the thymus histology and on weight were studied in young mice. Mice were distributed into twelve groups. Each group of young mice was killed at intervals of 24 hours during five days. A control group consisting of mice of the same age was inoculated with saline solution. Another control group was weighted during two months.

In the first experiment, the inoculated mice showed weight loss in the first 48 hours and a later recovery. The thymus of these animals showed significant alterations of weight and of histological structure. In the second control group, the weight loss was maintained during the observation period, despite some recuperation after the initial hours.

DESCRIPTORS: *Escherichia coli*, endotoxin; thymus, morphology; mice, weight development.

FUNATSU, M.K.; ERLICH, R.B.; MONTAGNINI, M.L.; FERRANDEZ, C.A.; OGAWA, C.A. & PAES, R.A.P. — Efeitos da inoculação de endotoxina produzida por "escherichia coli", na morfologia tímica e no desenvolvimento ponderal de camundongos jovens. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):65-72, 1985.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANDRA, R.K. et alii — Immunocompetence in undernutrition. *Trop. Pediatrics*, 81: 1194, 1972.
2. CHANDRA, R.K. — Reduced secretory antibody response to live attenuated measles and poliovirus vaccines in malnourished children. *Br. Med. J.*, 2:583-5, 1975.
3. DRASKOCI, M. & JANKOVIC, B.D. — Involution of thymus and suppression in rats treated with reserpine. *Nature*, Lond., 202: 408-9, 1964.
4. EKSTEDT, R.D. — Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines. *J. exp. Med.*, 120:793-804, 1964.
5. FAULK, P.; PAES, R.A.P.; MARIGO, C. & JONES, J.V. — The immunological system in health and malnutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, 35:253-61, 1976.
6. GAD, P. & CLARK, S.L., JR. — Involution and regeneration of the thymus in mice, induced by bacterial endotoxin and studied by quantitative histology and electron microscopy. *Am. J. Anat.*, 122:573-606, 1965.
7. KIND, P. — Endotoxin induced wasting disease in mice: a temporary condition explained by endotoxin tolerance. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 125:495-8, 1967.
8. PAES, R.A.P. — Anatomia patológica do sarampo com especial referência ao timo. São Paulo, 1982. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
9. PAES, R.A.P.; CHIEFFI, P.P. & D'ANDRETTA NETO, C. — Estrongiloidíase disseminada de evolução fatal em crianças desnutridas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:171-8, 1979.
10. PAES, R.A.P.; CHIEFFI, P.P.; D'ANDRETTA NETO, C. & NASCIMENTO, M.F. — Pneumonia intersticial por *Pneumocistis carinii* em crianças desnutridas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 24:188-92, 1982.
11. ROWLANDS, D.T. — The effect of endotoxin on the thymus of young mice. *Am. J. Pathol.*, 146:165-76, 1965.
12. SALVIANO, W.; SANTA ROSA, G.L. & VILLA VERDE, D.M. — O timo como glândula endócrina. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 35:1685-99, 1983.
13. SALVIN, S.B.; PETERSON, R.D.A. & GOOD, R.A. — The role of the thymus in resistance to infection and endotoxin toxicity. *J. Lab. clin. Med.*, 65:1004-22, 1965.
14. SCHELINGER, M. & MARK, R. — Wasting disease in young mice by administration of cortisol acetate. *Science*, Wash., DC, 143:965-6, 1964.
15. SMYTHE, P.M.; SCHONLAND, M.; BRETON-STILES, G.G.; COOVADIA, H. M.; GRACE, H.J.; LOENING, W.E.K.; MAFAYANE, A. & PARENT, M.A. — Thymolymphatic deficiency and depression of cell mediated immunity in protein-calorie malnutrition. *Lancet*, 2:939, 1971.
16. TROWELL, O.A. — The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation. *J. Pathol. & Bacteriol.*, 64:687-704, 1964.
17. WILKES, T.E. & BRUNSON, J.G. — Effects of levaterenol on newborn rabbits. *Lab. Invest.*, 13:112-9, 1964.
18. WILKES, T.E.; IMRIE, S.T. & BRUNSON, J.G. — Effects of epinephrine on newborn rabbits. *Am. J. Pathol.*, 43:825-36, 1963.

Recebido para publicação em 5 de maio de 1985.