

NEUROCRIPTOCOCOSE E IMUNOSSUPRESSÃO

MODELO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

*L. R. MACHADO **

*DENISE FECCHIO ***

*J. C. P. LIMONGI **

*A. BERGER **

*J. A. LIVRAMENTO **

*A. SPINA-FRANÇA ****

O crescente interesse pelo estudo dos mecanismos envolvidos nos fenômenos de natureza inflamatória, sobretudo em doenças de evolução crônica, tem como fundamento primordial o reconhecimento de seu perfil evolutivo no tempo e a possibilidade de interferir em sua evolução natural. Condições patológicas, algumas de reconhecimento e conceituação recentes, bem como condutas que envolvem indução iatrogênica de imunodeficiência ou mesmo de imunossupressão, favorecem o aparecimento de infecções mediadas por agentes ditos oportunistas, em relação aos quais os meios diagnósticos são insuficientemente padronizados e os recursos terapêuticos ainda precários^{1,5,17,19}. Embora nem sempre acessíveis, modelos experimentais de imunossupressão em laboratório podem, de algum modo, qualificar a suscetibilidade a infecção por agentes oportunistas fornecendo, ao mesmo tempo, substrato para ensaios terapêuticos em condições de patologia.

O presente estudo tem por objetivo, utilizando animais de pequeno porte, com tempo curto de amadurecimento biológico, de fácil obtenção e manejo, padronizar modelo de imunossupressão experimental capaz de fornecer subsídios passíveis de serem aplicados ao diagnóstico e à terapêutica da neurocriptococose humana, pelo menos.

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo estudado abrange dois experimentos que foram desenvolvidos sucessivamente.

Experimento 1 — Foram selecionados 50 camundongos da linhagem Swiss, impúberes, sadios e em boas condições gerais de nutrição. Foram eles divididos em 5 grupos de

Trabalho do Centro de Investigações em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio de FINEP — Financiadora de Estudos e Projetos (Convênio 4.3.83.0707-00): * Médico Assistente; ** Biologista; *** Professor Titular.

10 animais cada um, tendo havido o cuidado de neles distribuir os animais aleatoriamente (Grupos I a V). Todos foram alimentados com ração balanceada, com suplementação vitamínica adequada a seu peso e idade. Excetuando-se os animais do grupo I, considerados como controle e que, por esse motivo, receberam suprimento normal de água, todos os outros consumiram *ad libitum* e exclusivamente água com dexametasona em diferentes graus de diluição: para os animais do grupo II, a concentração de dexametasona foi de 2,0mg por dl; para os do grupo III, 1,0mg por dl; para os do grupo IV, 0,75mg por dl; para os do grupo V, 0,5mg por dl. Todos foram mantidos em local limpo e arejado, tendo sido feita troca diária do material de revestimento do piso das gaiolas, procedendo-se da mesma forma com a ração e com os frascos de suprimento hídrico, cujos bicos foram esterilizados também diariamente. Em todos os grupos foram considerados os seguintes critérios para avaliar a imunossupressão induzida: variação de peso; ocorrência de ericamento de pelos; perfil leucocitário; verificação de alterações de comportamento, como passividade, excitabilidade e, mesmo, fagia de outros animais do grupo; condições gerais de vitalidade e estado nutricional; peso e histologia do baço, ao final do prazo de observação (30 dias).

Experimento 2 — Foram selecionados também 50 camundongos da linhagem Swiss, de características comparáveis às referidas para os animais utilizados na primeira fase. Foram considerados também 5 grupos (grupos I a V). Os grupos I, III, IV e V foram semelhantes aos considerados no primeiro experimento. O grupo II recebeu tratamento em tudo semelhante ao grupo I, sendo utilizado como segundo controle. No décimo quinto dia do experimento, os animais de todos os grupos, com exceção do primeiro, receberam, por via intraperitoneal, número aproximado de 10^6 leveduras provenientes de culturas de cepas de *Cryptococcus neoformans*, isoladas do líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocriptococose, em suspensão em 0,5ml de solução fisiológica. Nos animais do primeiro grupo foi inoculado, pela mesma via, o mesmo volume de solução fisiológica estéril. As condições de manutenção e manejo, bem como os critérios de avaliação considerados foram semelhantes aos referidos para os animais estudados no primeiro experimento.

Tratamento estatístico — Foi efetuado utilizando-se, para o estudo de duas variáveis, o teste *t* de Student; para o estudo de mais de duas variáveis conjuntamente, análise de variância, com dois critérios de variação. Nos testes referentes ao número de células nos leucogramas, foi feita transformação das variáveis para \log_{10} por resultar normal a distribuição das variáveis transformadas. Em todos os testes, foi considerado $\alpha = 0,1$.

RESULTADOS

Experimento 1 — Seu objetivo foi estabelecer padronização de condições de imunossupressão. Constam da tabela 1 os valores (média e desvio padrão) da variação de peso para cada grupo de animais. Ericamento de pelos não ocorreu nos animais do grupo controle; ocorreu a partir do oitavo dia nos animais do grupo II; a partir do décimo dia nos do grupo III; a partir do décimo segundo dia nos do grupo IV; a partir do décimo quinto dia nos animais do grupo V. Os dados referentes ao estudo do perfil leucocitário constam das tabelas 2, 3 e 4. Da tabela 2 constam os valores (média e desvio padrão) da contagem do número de leucócitos em cada um dos grupos, semanalmente. Nas tabelas 3 e 4 são referidos os valores percentuais médios para

Dia		Grupo I Controle	Grupo II 2,0mg	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
04-08	\bar{x}	22,7	22,3	22,1	22,5	22,8
	s	2,37	1,95	2,07	1,83	2,16
02-09	\bar{x}	30,0	19,0	21,7	23,2	21,9
	s	3,28	1,34	1,54	2,12	1,44

Tabela 1 — Experimento 1: variação de peso (em g) dos camundongos (\bar{x} , média; s, desvio padrão) distribuídos conforme não estivessem (controle) ou estivessem ingerindo dexametasona em concentrações diversas (mg) por di.

Dia		Grupo I Controle	Grupo II 2,0mg	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
05-08	\bar{x}	14.890	13.500	13.800	14.200	14.310
	s	1.278,6	1.231,7	1.885,6	1.786,1	1.076,2
12-08	\bar{x}	14.800	5.500	5.040	6.200	6.550
	s	1.058,3	817,8	1.265,1	1.419,2	1.851,1
19-08	\bar{x}	14.010	3.510	4.870	5.160	5.770
	s	1.364,7	888,8	944,1	718,3	737,9
26-08	\bar{x}	13.980	3.422	3.189	4.810	3.800
	s	1.273,2	1.104,3	1.072,2	1.329,2	456,1
02-09	\bar{x}	14.236	4.222	3.477	4.270	4.218
	s	929,6	1.714,5	1.273,5	1.266,7	2.469,4

Tabela 2 — Experimento 1. Leucograma: número de leucócitos por mm³. Legenda: vide tabela 1.

Dia		Grupo I Controle	Grupo II 2,0mg	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
05-08	\bar{x}	79,2	78,3	77,4	76,9	79,1
	s	6,74	8,91	6,09	4,14	4,23
12-08	\bar{x}	77,1	16,4	13,3	43,2	48,7
	s	5,03	7,88	5,28	10,81	9,25
19-08	\bar{x}	76,4	13,0	11,5	28,2	24,3
	s	5,06	8,41	5,36	9,87	11,60
26-08	\bar{x}	77,6	7,9	8,7	19,6	22,1
	s	4,18	3,44	3,31	9,03	6,49
02-09	\bar{x}	78,4	7,1	8,2	11,9	12,3
	s	5,21	3,23	2,98	4,02	2,95

Tabela 3 — Experimento 1: valores percentuais para linfócitos. Legenda: vide tabela 1.

Dia		Grupo I Controle	Grupo II 2,0mg	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
05-08	\bar{x}	12,6	13,5	14,8	16,6	16,6
	s	3,95	2,91	5,42	4,05	4,13
12-08	\bar{x}	12,7	79,8	80,3	49,8	44,9
	s	4,98	8,80	7,28	9,82	11,37
19-08	\bar{x}	14,2	71,9	76,4	61,5	64,3
	s	3,91	7,01	4,80	10,04	11,97
26-08	\bar{x}	10,2	80,3	81,8	65,8	68,2
	s	3,82	3,95	4,35	9,74	7,80
02-09	\bar{x}	13,5	79,5	77,8	73,2	70,2
	s	3,07	7,04	9,33	3,93	10,80

Tabela 4 — Experimento 1: valores percentuais para neutrófilos. Legenda: vide tabela 1.

linfócitos e neutrófilos em cada um dos grupos, também semanalmente. Não houve alterações apreciáveis no padrão de comportamento dos animais em qualquer dos grupos passíveis de serem relacionadas à indução de imunossupressão. O estado geral dos animais permaneceu bom em todos os grupos até o final do estudo sendo patente, no entanto, o maior desenvolvimento dos do grupo controle, como se depreende da análise da tabela 1. Constam da tabela 5 os valores (média e desvio padrão) referentes ao peso do baço dos animais, ao término do estudo. O estudo histológico desses órgãos mostrou hipoplasia generalizada de todas as estruturas linfóides em todos os animais aos quais foi administrada dexametasona, não havendo diferença apreciável entre os animais de qualquer destes grupos.

	Grupo I Controle	Grupo II 2,0mg	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
\bar{x}	104,6	15,4	18,4	24,9	20,8
s	27,37	4,46	4,51	7,63	5,08

Tabela 5 — Experimento 1: peso do baço (em mg) ao término do experimento.

Experimento 2 — Seu objetivo primordial foi verificar a ocorrência de criptococos no sistema nervoso central (SNC) de animais considerados em vigência de imunossupressão, consoante os parâmetros estabelecidos no experimento 1. Constam da tabela 6 os valores médios referentes ao número de leucócitos, de linfócitos e de neutrófilos, em cada um dos grupos. Nessa mesma tabela está assinalada a data da inoculação do agente patogênico. Na tabela 7 está referido o número de óbitos em cada um dos grupos em relação ao tempo decorrido após a inoculação. Da tabela 8 constam os dados

Dia		Grupo I Controle-1	Grupo II Controle-2	Grupo II 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
	L	75,8	78,2	80,3	77,1	76,9
14-09	G	13.081	13.263	13.945	13.400	13.472
	N	11,0	13,0	12,8	10,3	11,9
28-09	G	13.591	12.382	4.127	5.445	4.827
	L	77,4	79,8	12,8	24,9	27,8
	N	13,1	12,9	74,3	60,9	59,8
29-09	Inoculação intraperitoneal de <i>Cryptococcus neoformans</i>					
05.10	G	14.140	13.150	2.250	3.367	3.067
	L	75,8	60,3	9,6	10,9	13,8
	N	13,8	28,3	79,0	78,8	74,9

Tabela 6 — Experimento 2: valores médios no leucograma do número de leucócitos por mm³ (G), do percentual de linfócitos (L) e do percentual de neutrófilos (N). Animais distribuídos conforme não estivessem (controle) ou estivessem ingerindo dexametasona em concentrações diversas (mg) por dl.

Tempo	Grupo I Controle-1	Grupo II Controle-2	Grupo III 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
até 12 horas	0/11	0/11	5/11	7/11	5/11
5º dia	0/11	0/11	1/6	0/4	0/6
6º dia	0/11	0/11	0/5	1/4	0/6
7º dia	0/11	0/11	1/5	0/3	0/6
Total	0/11	0/11	7/11	8/11	5/11

Tabela 7 — Experimento 2: número de óbitos entre os animais em relação ao tempo após inoculação de *Cryptococcus neoformans* nos animais dos grupos de II a V. Legenda: vide tabela 6.

Órgão	Grupo I Controle-1	Grupo II Controle-2	Grupo II 1,0mg	Grupo IV 0,75mg	Grupo V 0,5mg
Cérebro	0/11	0/11	7/11	8/11	5/11
Baço	0/11	11/11	11/11	11/11	11/11
Pulmão	0/11	11/11	11/11	11/11	11/11
Fígado	0/11	11/11	11/11	11/11	11/11

Tabela 8 — Experimento 2: identificação de leveduras com os caracteres morfológicos do *Cryptococcus neoformans*, em cortes histológicos. Legenda: vide tabela 6.

de anatomopatologia relativos à identificação de leveduras com os caracteres morfológicos do *Cryptococcus neoformans* no cérebro, baço, pulmão e fígado de cada um dos animais por ocasião do óbito, ou ao término do estudo, 10 dias após a inoculação.

Testes estatísticos — Permitiram eles caracterizar os eventos de ambos os experimentos e seu estudo comparativo. No *primeiro experimento*, não existia diferença significativa entre os valores dos pesos dos animais, no início do experimento, em todos os grupos. Existiu diferença significativa, com relação ao peso, ao se compararem os valores iniciais e finais para os animais do grupo controle. O mesmo não pôde ser verificado nos animais dos 4 grupos submetidos a ingestão de dexametasona. Os dados referentes ao número de leucócitos não mostraram diferença significativa entre os valores obtidos para os animais de todos os grupos, no primeiro leucograma. Após a primeira semana, pode ser constatada diferença significativa do número de leucócitos nos animais dos 4 grupos aos quais foi administrada dexametasona. Não há diferença significativa entre os valores obtidos nos leucogramas dos animais do grupo I durante todo o estudo. A partir da primeira semana, também não pode ser constatada diferença significativa entre os valores obtidos para os 4 grupos restantes, até o fim do experimento. Com relação aos valores percentuais médios para linfócitos e neutrófilos, não houve diferença significativa entre os valores obtidos para todos os animais em todos os grupos, no primeiro leucograma. Entre os animais do grupo controle, esses valores não apresentaram diferença significativa durante todo o estudo. Nos outros 4 grupos, existe diferença do ponto de vista estatístico entre os valores obtidos para cada grupo e para cada leucograma. Os valores obtidos para os pesos dos baços mostram diferença significativa quando comparados os provenientes dos animais do grupo controle e os restantes, submetidos a imunossupressão. Estes, por sua vez, considerados em conjunto, não apresentam diferença discernível do ponto de vista estatístico. Com relação ao *segundo experimento*, o número de leucócitos e os valores percentuais para linfócitos e neutrófilos apresentam comportamento estatístico semelhante ao referido para os dados da primeira fase, havendo, além disso, congruência de dados em todos os grupos e em todas as etapas do estudo, em ambas as fases. Deve ser ressaltado, ainda, o fato de ter sido observada relação estreita e de tipo biunívoco entre a presença de leveduras no cérebro e a ocorrência de óbito dos animais em todos os grupos e, em contrapartida, o comprometimento generalizado dos outros órgãos estudados na vigência de condições gerais preservadas até a conclusão do experimento.

COMENTARIOS

Embora a dexametasona não seja, entre os glicocorticóides, a droga com maior atividade imunossupressora, sua escolha justifica-se não só pela facilidade de administração e pela boa difusibilidade em órgãos e tecidos mas, sobretudo, por seu efeito cumulativo e pela possibilidade de induzir fenômenos de imunossupressão de tipo crônico, objeto deste estudo. Como pode ser observado pela análise da tabela 1, embora em fase de crescimento, não houve ganho de peso nos animais submetidos a ingestão de dexametasona, como ocorre em condições de real imunossupressão^{4,8,13}. O número de leucócitos sofreu redução significativa nos animais aos quais foi administrada dexametasona, como pode ser verificado na tabela 2. Esta redução ocorreu à custa da diminuição do número

absoluto de linfócitos, cujos valores percentuais caíram drasticamente em comparação aos observados para neutrófilos (Tabelas 3 e 4). Estes não sofreram alteração significativa em qualquer dos grupos: seu aumento percentual deve-se à diminuição dos valores de linfócitos. Eriçamento de pelos ocorreu apenas nos animais submetidos a ingestão de dexametasona, com relação de tipo inverso entre o teor da droga e o tempo decorrido até sua manifestação clínica. O peso e estrutura histológica dos baços confirmam a vigência de imunossupressão sistêmica, ao final do experimento.

Não pode, no entanto, ser afirmada com segurança, nesta fase, a existência de imunossupressão a nível do SNC. De fato, estudos sobre distribuição de dexametasona em tecido cerebral, *in vivo*, por técnicas de autorradiografia e estudos de fracionamento de células, mostram existência de barreira hêmato-encefálica ativa com relação à droga, sobretudo em receptores nucleares mapeáveis globalmente, mas com predomínio nítido nos locais em que a função barreira é menos efetiva ^{6,7,9,14,20,26}. As modificações na produção local de glicocorticóides, determinadas pelo excesso de dexametasona nos receptores celulares cerebrais ^{16,24} em relação à função barreira, bem como a interação com elementos do sistema imune aí sediados, não são bem conhecidas ^{6,11,15}. Uma vez atingidos níveis imunossupressores no SNC, passam a ocorrer os efeitos da droga também sobre os elementos celulares mais diretamente ligados à defesa local ^{1,2,5,16,17,18,25}.

O efeito da dexametasona sobre os linfócitos provoca intensa depressão na ativação destes elementos celulares frente a heteroantígenos ¹⁸, sobretudo os que demandam resposta do tipo celular, possivelmente bloqueando não só a proliferação de linfócitos, mas também alterando o equilíbrio entre suas subpopulações auxiliadoras e supressoras e sua diferenciação em elementos citotóxicos, sobretudo em condições de cronicidade ².

Os dados obtidos no segundo experimento, além de confirmarem os resultados do primeiro, permitem duas considerações principais. A primeira diz respeito à possibilidade de utilização do modelo como teste diagnóstico de certeza, já que, mesmo em boas condições gerais, são visualizadas leveduras em todos os órgãos estudados. Neste ponto é importante realçar que o número de criptococos inoculados é muito grande, mas guarda proporção com os números preconizados para modelos experimentais com outros tipos de microorganismos. Mesmo nestas condições, o número de leveduras encontradas no segundo grupo controle é muito pequeno, ao contrário do que ocorre nos grupos submetidos a imunossupressão, nos quais havia infestação maciça por *Cryptococcus neoformans*. É possível que, em condições de uso clínico do modelo, com número estimado de leveduras muito mais reduzido em cada inoculação, esta diferença quantitativa possa assumir caráter qualitativo de discriminação diagnóstica.

Chama a atenção, em segundo lugar, pelo seu grau de consistência, a correlação entre a presença de leveduras no SNC e o óbito dos animais. Este fato apresenta algum grau de correspondência com o observado na neurocriptococose humana, cuja morbidade e mortalidade são muito mais elevadas do que as que ocorrem nas outras formas sistêmicas, mesmo disseminadas ¹⁹. Verifi-

ca-se que nem todos os animais submetidos a ingestão de dexametasona foram a óbito, e que, quando este ocorreu, foi, quase invariavelmente, nas primeiras 12 horas após a inoculação. Tal fato sugere que em alguns animais tenha havido resistência à entrada das leveduras no SNC, o que propiciou sua sobrevivência até o final do prazo de observação. A explicação para a ocorrência deste fenômeno comporta, a nosso ver, duas hipóteses principais.

De acordo com a primeira hipótese, a dexametasona não teria de fato, atingido níveis de imunossupressão no SNC, graças a particularidades da função barreira com relação à dexametasona^{3,12,27}; neste caso, apenas os animais imunossuprimidos teriam apresentado a forma nervosa da criptococose. De acordo com a segunda hipótese, graças à duplicidade de ação da dexametasona sobre elementos celulares nervosos, inclusive células da glia e, concomitantemente, sobre células encarregadas da vigilância e da resposta imunológica sediadas no SNC, teria ocorrido algum tipo de alteração da barreira hêmato-encefálica que foi capaz de bloquear, em alguns animais, a entrada de criptococos.

Na análise crítica de ambas as hipóteses surge, como denominador comum, a necessidade de reestudar aspectos específicos da função barreira hêmato-encefálica. Esta tem sido conceituada, por vezes analogicamente, como causa formal de particularização da resposta imune no SNC, inclusive em agressões infecciosas de tipo oportunístico frente a imunossupressão mantida cronicamente.

RESUMO

Com o objetivo de padronizar modelo experimental de imunossupressão foram selecionados dois lotes de 50 camundongos impúberes, cada um dividido em grupos de 10, e submetidos a ação de dexametasona. O estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento foi utilizado o primeiro lote de animais e foram estabelecidas as condições para obtenção de modelo de imunossupressão em camundongos mediante administração de dexametasona diluída na água de consumo e ingerida *ad libitum* pelos animais. Entre os critérios utilizados para avaliar a vigência de imunossupressão são realçados: a ocorrência de eriçamento de pelos, leucopenia por diminuição do número de linfócitos e hipotrofia do baço comparativamente aos controles, com hipoplasia intensa de todas as estruturas linfóides. No segundo experimento foi empregado o segundo lote de animais e foi estudado o comportamento do modelo experimental estabelecido. Os animais receberam, por via intraperitoneal, número aproximado de 10^6 leveduras com os caracteres morfológicos do *Cryptococcus neoformans*, provenientes de culturas de cepas patogênicas ao homem e isoladas do líquido cefalorraqueano de pacientes com neurocriptococose. Apesar de haverem sido identificadas leveduras em cortes histológicos de pulmão, fígado e baço em todos os camundongos inoculados, somente ocorreu o óbito naqueles em que havia acometimento do sistema nervoso central pela levedura (aproximadamente 50% dos animais). A discussão dos resultados obtidos e seu significado inclui considerações sobre o possível papel desempenhado pela função barreira hêmato-encefálica no evento constatado.

SUMMARY

Neurocryptococcosis and immunosuppression: an experimental model in mice.

In order to accomplish a model for immunosuppression in experimental conditions two lots of 50 young mice were divided into groups of 10, and submitted to dexamethasone ingestion. Two experiments were considered in the study. In the first experiment conditions for immunosuppression were established in 50 mice, by *per os* supply of several concentrations of dexamethasone in the water given for normal daily intake *ad libitum*. Criteria of immunosuppression considered include: hair standing on end; leukopenia by decrease of lymphocyte population; spleen atrophy in relation to controls, with severe hypoplasia of all lymphoid structures. In the second experiment another lot of 50 mice in similar conditions established for the first experiment and concerning the immunosuppression were submitted to intraperitoneal inoculation of near 10^6 *Cryptococcus neoformans*. Culture suspensions of cryptococci isolated from cerebrospinal fluid samples of human neurocryptococcosis cases were used for this purpose. Although fungi could be recognized in lungs, liver and spleen from every mice inoculated, only those with central nervous system involvement (near by an half of all) died. The discussion includes considerations about the role of the blood-brain barrier function in the findings registered.

REFERÊNCIAS

1. BALOW, J.E.; HURLEY, D.L. & FAUCI, A.S. — Immuno-suppressive effects of glucocorticosteroids - differential effects of acute versus chronic administration on cell mediated immunity. *J. Immunol.* 114:1072, 1975.
2. BRADLEY, L.M. & MISHELL, R.I. — Differential effects of glucocorticosteroids on the functions of helper and suppressor T lymphocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. (USA)* 78:3155, 1981.
3. CAREY, R.M. — Suppression of ACTH by cortisol in dexamethasone-nonsuppressible Cushing's disease. *N. Engl. J. Med.* 302:275, 1980.
4. CHEN, T.L. & FELDMAN, D. — Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. *J. clin. Invest.* 63:750, 1979.
5. CLAMAN, H.N. — Corticosteroids and lymphoid cells. *N. Engl. J. Med.* 287:388, 1972.
6. COUTARD, M.; OSBORNE-PELLEGRIN, M.J. & FUNDER, J.W. — Tissue distribution and specific binding of tritiated dexamethasone in vivo: autoradiographic and cell fractionation studies in the mouse. *Endocrinology* 103:1144, 1978.
7. EDELMAN, I.S. — Mechanism of action of steroid hormones. *J. Ster. Biochem.* 6:147, 1975.
8. HICHENS, M. & HOGANS, A.F. — Radioimmunoassay for dexamethasone in plasma. *Clin. Chem.* 20:266, 1974.
9. ISHIMITSU, H.; MATSUMOTO, A. TAKEMOTO, M.; ARMITSU, T. & NISHIMOTO, A. — Effect of various kinds of glucocorticoids on experimental brain edema. *Neurol. Surg.* 8:951, 1980.
10. KATZ, J. — Failure of dexamethasone suppression in adrenal hyperplasia. *Arch. int. Med.* 118:265, 1966.
11. KRAFT, N.; HODGSON, A.J. & FUNDER, J.W. — Glucocorticoid receptor and effector mechanisms: a comparison of the corticosterone sensitive mouse with the corticosterone resistant guinea pig. *Endocrinology* 104:344, 1979.

12. LINN, J.E.; BOWDOIN, B.; FARMER, T.A. & MEADOR, C.K. — Observations and comments on failure of dexamethasone suppression. *N. Engl. J. Med.* 277: 403, 1967.
13. MANIN, M. & DELOST, P. — Evolution du taux de clearance metabolique du cortisol en fonction de la cortisolémie chez le cobaye adulte traité par la dexamethasone. *J. Physiol. (Paris)* 74:687, 1978.
14. McEWEN, B.S. — Interactions between hormones and nerve tissue. *Scient. amer.* 235: 48, 1976.
15. MEIKLE, A.W. & TYLER, F.H. — Potency and duration of action of glucocorticoids. *Amer. J. Med.* 63:200, 1977.
16. MUNCK, A. & FOLEY, R. — Activation of steroid hormone-receptor complexes in intact target cells in physiological conditions. *Nature* 278:752, 1979.
17. MURAKAMI, T.; BRANDON, D.; RODBARD, D.; LORIAUX, D.L. & LIPSETT, M.B. — Glucocorticoid receptor in circulating mononuclear leukocytes. *Endocrinology* 104:500, 1979.
18. NEIFELD, J.P.; LIPPMAN, M.E. & TORMEY, D.C. — Steroid hormone receptors in normal lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 252:2972, 1977.
19. NOBREGA, J.P.S.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. & SPINA-FRANÇA, A. — Criptococose do sistema nervoso central. Avaliação terapêutica por anfotericina B, 5-fluorocitosina e miconazole em 18 casos. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 37:28, 1979.
20. REES, H.D.; STUMPF, W.E. & SAR, M. — Autoradiographic studies with ³H-dexamethasone in the rat brain and pituitary. In W.E. Stumph & L.D. Grant (eds.): *Anatomical Neuroendocrinology*. Karger, Basel, 1975, pg. 262.
21. RIVAS, J.M.; RIVAS, A. & MATEOS, J.H. — Efecto de la dexametasona en lesiones experimentales de cerebro de rata. *Arch. Invest. méd. (México)* 14:153, 1983.
22. ROSENBERG, J.C. & LYSZ, K. — Suppression of the immune response by steroids: comparative potency of hydrocortisone, methylprednisolone and dexamethasone. *Transplantation* 29:425, 1980.
24. ROUSSEAU, G.G.; BAXTER, J.D.; TOMKINS, G.M. — Glucocorticoid receptors relations between steroid binding and biological effects. *J. molec. Biol.* 67:99, 1972.
25. SCHAUMBURG, B.P. — Investigation on the glucocorticoid binding protein from rat thymocytes. *Biochim. biophys. Acta* 261:219, 1972.
26. WAREMBOURG, M. — Radioautographic study of the rat brain and pituitary after injection of ³H-dexamethasone. *Cell Tiss. Res.* 161:183, 1975.
27. WESTPHAL, U. — Steroid-protein interactions. Concentration and binding affinities of corticosteroid binding globulins in sera of man, monkey, rat, rabbit and guinea-pig. *Arch. Biochem. Biophys.* 118:556, 1967.

Centro de Investigações em Neurologia, FMUSP — Caixa Postal 5199 — 01000, São Paulo, SP — Brasil.