KLEBER GIOVANNI LUZ

**Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino
delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Nicodemo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte

São Paulo

2005

KLEBER GIOVANNI LUZ

**Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino
delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Nicodemo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte

São Paulo

2005

Dedico esta Tese aos meus pais Candido e Teresinha que me deram a vida, a minha esposa Lúcia que é minha companheira há 17 anos e soube compreender e colaborar nos momentos de afastamento e de estudo, a Daniel, meu filho que cada vez mais pensa de forma lógica e a Eduardo que é especialista em cativar as pessoas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos pacientes casos e controles que mesmo diante do sofrimento da doença colaboraram para uma melhor compreensão da patogenia do calazar.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. *Antônio Carlos Nicodemo* pela prestimosa orientação na elaboração desta Tese;

A Profa. Dra. *Maria Irma Seixas Duarte* pela dedicação à análise das amostras teciduais;

A Profa. *Maria Aparecida Shikanai* e todos os professores da Universidade de São Paulo;

Ao meu grande amigo *Guilherme Mariz Maia* que sem a sua colaboração não seria possível a realização desta Tese;

Ao colega *Paulo Matos* e sua equipe pela colaboração nas coletas de amostras;

A minha amiga *Neide Montenegro*, pelas inúmeras viagens que fizemos;

A *Humberto* que me recebeu como um amigo na USP;

A *Elizabeth Calich* pela tradução dos textos e a *Mário e Edith Calich* pela acolhida recebida;

A equipe de funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica de Doenças Tropicais da Universidade de São Paulo, pelo incansável apoio a um médico clínico;

A Profa. Dra. *Ana Maria Ramos Oliveira* e sua equipe de funcionários do Laboratório Médico de Patologia Dr. Getúlio de Oliveira Sales;

A *Luis*, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte;

Aos colegas professores do Departamento de Infectologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte;

Ao amigo *Sebastião Farias* e sua equipe pela colaboração na análise das amostras;

Aos médicos e funcionários do Hospital Infantil Varela Santiago;

A *Rose* e *Roseli*, secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias;

A *Valeria de Vilhena Lombardi* pela revisão das Referências Bibliográficas.

*“Dizer que é o que não é, ou o que não é o que é, é falso;
dizer que é o que é, e que não é o que não é, é o
verdadeiro.”*

(Aristóteles)

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Histórico e etiologia.....	1
1.2 - Epidemiologia.....	3
1.3 - Patogenia.....	4
1.4 - O duodeno.....	10
1.5 - O intestino e o calazar.....	12
1.6 - Biópsia intestinal.....	13
1.6.1 - Alterações morfológicas observadas na biópsia duodenal.....	14
1.6.2 - Biópsia intestinal sob microscopia óptica.....	15
1.6.3 - Utilidade da biópsia intestinal.....	17
1.7 - O intestino como órgão do sistema imune.....	18
1.7.1 - Resposta imune do intestino.....	20
1.8 - Quadro clínico da leishmaniose visceral americana.....	23
1.9 - Achados laboratoriais inespecíficos da leishmaniose visceral americana..	24
1.9.1 - Diagnóstico da leishmaniose visceral americana.....	25
1.10 - Tratamento da leishmaniose visceral americana.....	26
2 - JUSTIFICATIVA.....	28
3 - OBJETIVOS.....	29
3.1 - Objetivo Geral.....	29
3.1.1 - Objetivos específicos.....	29
4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	30
4.1 - População estudada.....	30
4.2 - Critérios de inclusão dos casos.....	30
4.3 - Critérios de exclusão dos casos.....	31
4.4 - Procedimentos relacionados com os pacientes casos.....	31

4.5 - Critérios de inclusão dos pacientes controles.....	33
4.6 - Dos procedimentos realizados com os pacientes controles.....	33
4.7 - Das técnicas utilizadas nas biópsias dos casos e controles.....	34
4.7.1 - Da contagem de células e citocinas das amostras.....	35
4.8 - Cálculo do tamanho da amostra.....	37
4.9 - Aspectos éticos.....	37
4.10 - Variáveis e escores selecionados para avaliar o fragmento de duodeno na microscopia de luz.....	37
4.11 - Métodos imunohistoquímicos.....	41
4.11.1 - Imunomarcção para determinação do fenótipo das células inflamatórias.....	41
4.11.2 - Imunomarcção para detecção de citocinas.....	43
4.11.3 - Métodos e estreptavidina-biotina peroxidase para detecção de antígenos de leishmania.....	44
5 - RESULTADOS.....	46
6 - DISCUSSÃO.....	72
6.1 - Introdução.....	72
6.2 - O infiltrado inflamatório na mucosa duodenal.....	72
6.3 - Estudos com outras leishmanioses que não a <i>L. donovani</i>	74
6.4 - Estudos com modelos animais.....	74
6.5 - O paradigma da resposta Th1/Th2.....	75
6.6 - A inoculação das leishmanias pela picada pelo flebotomíneo.....	75
6.7 - A mucosa duodenal como ambiente tolerante à presença das leishmanias por ausência de IL-10.....	76
6.8 - A ausência de produção de IL-4.....	77
6.9 - O infiltrado macrófago (CD68).....	78
6.10 - O infiltrado de linfócitos CD4+.....	80
6.11 - O infiltrado de linfócitos CD8+.....	81
6.12 - A ausência de produção de IFN- γ	81
6.13 - A ausência de produção do TNF- α	82
6.14 - Considerações finais (contextualizando).....	82
7 - CONCLUSÕES.....	97
8 - ANEXOS.....	98
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - *Antigen presenting cell*

DC - *Dendritic cell*

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assays*

GALT - *Gut associated lymphoid tissue*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HIV - *Vírus da imunodeficiência humana*

ICAM-1 - *Intercellular adhesion. molecule-1*

IL - *Interleucina*

IFN- γ - *Interferon-gamma*

MHC II - *Major histocompatibility complex class II*

MIP-1 - *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

PAMPs - *Moléculas Padrão Associado ao Patógeno*

STAT - *Transducer and activator of transcription*

TGF - *Fibroblast growth factor*

Th1 - *T helper cell type 1*

Th2 - *T helper cell type 2*

TNF- α - *Fator de necrose tumoral alfa*

TLRs - *Toll-like receptors*

USP - *Universidade de São Paulo*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificações técnicas de anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas do material parafinado.....	35
Tabela 2	Dados demográficos dos casos.....	46
Tabela 3	Dados demográficos dos controles.....	47
Tabela 4	Imunohistoquímica para detecção de antígeno de leishmania nos casos.	48
Tabela 5	Imunohistoquímica para detecção de antígeno de leishmania nos controles.....	50
Tabela 6	Comparação de médias da contagem de linfócitos CD68 entre casos e controles.....	60
Tabela 7	Comparação de médias da contagem de linfócitos CD4/mm ² entre casos e controles.....	62
Tabela 8	Comparação de médias da contagem de linfócitos CD8 entre casos e controles.....	64
Tabela 9	Comparação de médias da contagem de linfócitos da expressão INF- δ /mm ² entre casos e controles.....	65
Tabela 10	Frequência do encontro de INF- δ em casos e controles.....	66
Tabela 11	Comparação entre a média de expressão da IL-10/mm ² entre casos e controles.....	68
Tabela 12	Comparação das médias de encontro de IL-4/mm ² entre casos e controles.....	69
Tabela 13	Média da expressão de TNF- α /mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	71
Tabela 14	Frequência da expressão de TNF- α nos casos e controles.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama para contagem semiquantitativa de células ou citocinas marcadas.....	36
Figura 2	Mucosa duodenal de um caso.....	38
Figura 3	Marcante presença de leishmanias em um caso.....	49
Figura 4	Imunomarcção de linfócito CD68 em um caso.....	61
Figura 5	Imunomarcção para linfócitos CD4.....	63
Figura 6	Imunomarcção de IL-10 em um caso.....	66
Figura 7	Imunomarcção de IL-10 em um controle.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Grau de autólise de casos e controles: Zero - ausência de autólise nos casos e controles.....	51
Gráfico 2	Relação vilo/cripta: 0 - normal 4:1 ou 5:1; 1 - entre 4:1 e 2:1; 2 < 2:1.....	52
Gráfico 3	Tamanho da vilosidade: 0 normal: 1- vilos presentes com relação vilo/cripta < 4:1; 2 - poucos vilos presentes, com rela V:C < 2:1; 3 - atrofia completa.....	53
Gráfico 4	Tamanho da cripta: 0 - normal, com raras mitoses 40x; 1 - hiperplasia discreta, com 2-3 mitoses/campo 40x; 2 - hiperplasia evidente.....	54
Gráfico 5	Intensidade do infiltrado inflamatório: 0 - poucas células inflamatórias na lâmina própria e vilosidades estreitas; 1 - aumento discreto; 2 - aumento significativo do infiltrado inflamatório na LP e vilosidades.....	55
Gráfico 6	Presença de mononucleares: 0 - raros e esparsos linfócitos; 1 - pequeno número de linfócitos e plasmócitos na LP; 2 - aumento do número de mononucleares na LP e nas vilosidades.....	56
Gráfico 7	Presença de neutrófilos: 0 - ausência; 1 - poucos neutrófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas em mais de 5 campos de 40x).....	57
Gráfico 8	Presença de eosinófilos: 0 - ausência; 1 - poucos eosinófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas em mais de 5 campos de 40x).....	58
Gráfico 9	Presença de linfócitos intraepiteliais: 0 - até 2/100 enterócitos; 1 - entre 2 a 5/enterócitos; 2 > 6/100 enterócitos.....	59
Gráfico 10	Contagem da expressão de CD68/mm ² em mucosa duodenal de casos e controles.....	60
Gráfico 11	Contagem da expressão de CD4/mm ² em mucosa duodenal de casos e controles.....	62
Gráfico 12	Contagem da expressão de CD8/mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	64
Gráfico 13	Contagem da expressão de INF-δ/mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	65
Gráfico 14	Contagem da expressão de IL-10/mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	68
Gráfico 15	Contagem da expressão de IL-4/mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	69
Gráfico 16	Contagem da expressão de TNF-α/mm ² de mucosa duodenal de casos e controles.....	70

RESUMO

Luz, KG. *Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 107p.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral é uma doença que acomete cerca de 500 mil pessoas por ano no mundo e se caracteriza principalmente por um quadro de febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Há uma imunossupressão específica frente a *Leishmania chagasi*. Classicamente esta resposta é modulada pelas células dendríticas, que são as primeiras células que entram em contato com o parasita. Estas células, a partir de vários determinantes, elaboram uma resposta do tipo Th1, com a produção de citocinas capazes de ativar os macrófagos a eliminar o parasita ou uma resposta do tipo Th2, que se caracteriza por uma produção de citocinas que são incapazes de ativar o macrófago parasitado. Com o objetivo de se estudar a resposta imune tecidual, esta investigação avaliou a resposta imune na mucosa duodenal de crianças portadoras da leishmaniose visceral plenamente manifesta.

MÉTODOS: Um grupo de 13 crianças com calazar foi submetido à biópsia perioral de duodeno, com cápsula de Watson. Nove crianças assintomáticas foram utilizadas como controles e foram submetidas à biópsia duodenal endoscópica. Ambos os grupos foram submetidos a pesquisa do parasita, a análise morfológica e a análise semiquantitativa da produção local de TNF- α , δ -interferon, IL-4 e IL-10 e fenotípica das seguintes células imunes: CD4, CD8, CD68.

RESULTADOS: A análise morfológica revelou que nos casos havia um infiltrado linfoplasmocitário com discreta atrofia vilositária. Não se verificou a presença de eosinófilos ou neutrófilos. A presença de leishmania foi verificada em todos os casos e esteve ausente nos controles. A análise da produção de citocinas revelou que tanto nos casos como nos controles havia uma média de produção de IL-10 semelhante, com $p=0,8968$ (teste T de *Student*); que não se detectou IL-4 nos casos e nos controles; que a frequência da produção de δ -interferon nos controles foi maior que nos casos, com $p=0,046$ (teste de *Fischer*); que a frequência da produção de TNF- α foi semelhante nos casos e controles (teste de *Fischer*) com $p=0,41$; havia um infiltrado macrófágico significativamente superior nos casos com $p=0,005757$ (teste T de *Student*); a média de contagem de CD4 nos casos foi significativamente maior que nos controles, utilizando-se o teste de Mann-Whitney com $p=0,040$, teste da mediana $p=0,019$; e que a média da contagem de CD8 foi semelhante nos casos e controles com $p=0,396$ (teste T de *Student*).

CONCLUSÕES: A mucosa duodenal por ser um ambiente imunotolerante, pela produção natural de IL-10, permitiria a presença e multiplicação da leishmania. Que o infiltrado linfoplasmocitário composto por células CD4, CD8 e CD68 foi incapaz de montar uma resposta imune eficaz contra o parasita, principalmente pela baixa produção local do δ -interferon.

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL/imunologia 2. DUODENO 3. INTERLEUCINAS

SUMMARY

Luz, KG. *Evaluation of the immunohistological alterations of the thin intestine mucosa in patients with visceral leishmaniasis* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 107p.

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis is a disease that strikes around 500 thousand people in the world per year and its major characteristics are fever hepatoesplenomegaly and pancytopenia. There is a specific immunosuppression in face of the *Leishmania chagasi*. Classically this response is modulated by the dendritic cells that are the first cells to get in contact with the parasite. These cells, from various determinants, elaborate a Th1 type response, with the production of cytokines capable of activating the macrophages and eliminate the parasite or a Th2 type response, that is characterized by cytokines production that are incapable of activating the macrophages under the parasite action. With the purpose of studying the tissue immune response this investigation evaluated the immune response on the duodenal mucosa of children carrying fully manifested visceral leishmaniasis.

METHODS: A group of 13 children carrying kala-azar was submitted to a duodenal perioral biopsy, with Watson's capsule. Nine asymptomatic children was used as control group and submitted to an endoscopic duodenal biopsy. Both groups were submitted to the parasite research, the morphometric analysis and the semi quantitative analysis of the local production of TNF- α , δ -interferon, IL-4 e IL-10 and phenotypic analysis of the following immune cells: CD4, CD8, CD68.

RESULTS: The morphometric analysis revealed that there was a lymphoplasmocytic infiltrate with discrete villous atrophy in the cases. The presence of eosinophils and neutrophils were not verified. The presence of leishmania was verified in all cases and was absent in the controls. The cytokine production analysis showed that both in the cases and in the controls there was a similar mean IL-10 production, with $p=0.8968$ (T Student test); that the IL-4 was not detected in the cases nor in the controls; that the δ -interferon production frequency in the controls was higher with $p=0.046$ (Fischer test); that the TNF- α production frequency was similar in the cases and in the controls with $p=0.41$ (Fischer test); that there was a macrophagic infiltrate significantly higher in the cases with $p=0.005757$ (T Student test), that the mean CD4 in the cases was higher than in controls, Mann-Whitney test with $p=0.040$, median test, $p=0.019$, and CD8 infiltrate was similar in the cases and in the controls with $p=0.396$ respectively (T Student test).

CONCLUSIONS: The duodena mucosa, being an immunotolerant environment due to the natural IL-10 production, would allow the presence and the multiplication of leishmania. That the lymphoplasmocytic infiltrate composed of CD4, CD8 and CD68 cells was incapable of providing an effective immune response against the parasite, mostly because of the low δ -interferon local production.

Descriptors: 1. VISCERAL LEISHMANIASIS/immunology 2. DUODENUM 3. INTERLEUKINS

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico e etiologia

A leishmaniose visceral também conhecida como calazar é uma doença causada pela *Leishmania donovani* (Wilson et al., 2005).

A mais antiga descrição do calazar foi feita por Clarke, na *Rapport Sanitaire de Lássam* em 1882; nesta descrição relatou que a atenção das autoridades sanitárias estava voltada para uma doença conhecida pelos indígenas como Kala-azar, fato corrido em 1869 (Manson, 1908).

A primeira descrição do agente etiológico do calazar foi realizada por William Leishman (Wurtz et Thiroux, 1905), cientista britânico que descreveu o caso de um soldado irlandês morto da conhecida febre Dum-Dum. O soldado havia morrido no Royal Victoria Hospital, em Netley, Inglaterra. Ele acreditava que os parasitas visualizados fossem na verdade tripanossomos que tivessem sofrido alterações *post-mortem*; a morte do soldado ocorreu no ano de 1900, mas a publicação somente ocorreu em 1903 (Rodrigues da Silva, 1957; Murray, 2002).

Ainda em 1903, Donovan descreveu em esfregaços de polpa esplênica de pacientes com clínica compatível com calazar, corpúsculos semelhantes àqueles descritos por Leishman. Donovan, posteriormente examinando material obtido de pacientes vivos, afastou a possibilidade de tratar-se de tripanossomos degenerados (Manson, 1908).

Embora descrito o parasita, ainda faltava a exata correlação entre o parasita e a doença, fato estabelecido somente por Manson & Low, no Seamen's Hospital de Londres, no mês de dezembro do ano de 1903, quando encontraram os corpúsculos em pacientes portadores do calazar (Rodrigues da Silva, 1957).

Ainda do ponto de vista histórico, destaca-se o papel de um brasileiro, o jovem cientista Gaspar Vianna, que em 1912, aplicou o tártaro emético no tratamento da leishmaniose tegumentar obtendo sucesso. Posteriormente, o tártaro emético foi aplicado aos portadores do calazar por Castellani em 1914, iniciando desta forma a terapia com os antimoniais, que na grande maioria dos casos interrompe a evolução natural da doença para a morte (Rodrigues da Silva, 1957).

A *L. donovanni* faz parte de um grupo de parasitas intracelulares (Melby, 2002) pertencendo à família *Trypanosomatidae* e ordem *Kinetoplastida*. Taxonomicamente, as leishmanias podem ser divididas em dois subgêneros: a *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. chagasi* no novo mundo. Estudos moleculares têm evidenciado que a *L. infantum* e *L. donovani* podem ser, na realidade, uma mesma espécie (Wilson et al., 2005).

Embora haja uma divisão entre as manifestações clínicas a partir da espécie de leishmania, como por exemplo: *L. amazonensis* e *L. tropica* produzindo lesão cutânea e *L. chagasi* e *L. infantum* produzindo lesão visceral, elas podem produzir tanto doença visceral como tegumentar, embora seja comum a separação clínica entre as espécies (Wilson et al., 2005).

1.2 - Epidemiologia

A leishmaniose no mundo envolve diferentes entidades eco-epidemiológicas variando desde uma doença exclusivamente zoonótica, antroozoonótica ou ambas as condições juntas (WHO, 1995; Arias et al., 1996).

A doença está presente em cerca de 88 países sendo 66 no “velho mundo” e 22 no “novo mundo” (Desjeux, 2001). Estima-se a incidência anual de um a um e meio milhão de casos novos de leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil casos novos de leishmaniose visceral no mundo (Melby, 2002). Calcula-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam em área de risco para desenvolver alguma forma de leishmaniose. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) há uma prevalência de 12 milhões de casos (Desjeux, 2001; Murray, 2002).

A forma epidemiológica zoonótica ocorre principalmente na América Latina, na bacia do Mediterrâneo (Fernandez Cotarelo et al., 2003) e na Ásia. No novo mundo, o parasita isolado é a *L.(L) chagasi*, sendo a *L. longipalpis* o vetor, e o cão doméstico o principal reservatório. Há ainda a participação das raposas como reservatórios silvestres (Desjeux, 2001; Fernández-Guerrero et al., 2004).

Um dos principais fatores responsáveis pelo aumento do número de casos de leishmaniose é a migração populacional de áreas rurais para áreas urbanas. Este fenômeno de urbanização está presente no Brasil, assim como em outros países da América Latina como a Colômbia e a Venezuela (Jerônimo et al., 1994; WHO, 1995; Arias et al., 1996; Desjeux, 2001). A associação com o vírus da imunodeficiência adquirida tem contribuído para o aumento do número de casos em áreas urbanas de países pobres (Kumar et al., 2003).

No estado do Rio Grande do Norte a doença tem sua série histórica registrada desde o ano de 1983. Nesta época a média anual de casos era de 30 casos por ano, sendo na sua grande maioria procedente de áreas rurais (Jerônimo et al., 1994). Nos últimos anos houve um incremento do número de casos e a média anual encontra-se em torno de 200 casos. Um fato chama a atenção: tem ocorrido um aumento gradual na letalidade nacional por calazar. Este aumento foi de 0,04/100000 no ano de 1980 para 0,09/100000 no ano de 1990 (Vieira e Coelho, 1998). No ano de 2000 ocorreram 280 casos de calazar no Rio Grande do Norte com uma alta letalidade, 16 em cada 100 pacientes foram a óbito, sendo esta a mais alta taxa de óbito no Brasil no ano de 2000.

No ano de 2004, em dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância do Ministério da Saúde do Brasil, 3.503 casos foram notificados a este Ministério. Destes, 187 evoluíram para o óbito. No estado do Rio Grande do Norte 74 casos foram notificados, com quatro óbitos, em 2004.

O controle dos casos humanos depende fundamentalmente do controle dos casos caninos, do controle do vetor e da identificação dos casos humanos (Ozensoy, 1998). Embora não haja vacinas licenciadas para uso em humanos, este campo de prevenção é promissor (Borja-Cabrera et al., 2002).

1.3 - Patogenia

As leishmanias são transmitidas para os humanos a partir da picada de dípteros que se infectam de outros humanos infectados, como no caso do calazar indiano, ou a partir de vertebrados não humanos como o cão (*Canis familiares*), a raposa

(*Lycalopex (Dusicyon) vetulus*) ou o chacal (*Canis aureus*), que funcionam como reservatórios do parasita, no caso do calazar do novo mundo. O inseto transmissor pertence ao gênero *Lutzomia* nas Américas e *Phlebotomus* no restante do mundo (Badaró e Duarte, 1986).

Durante o repasto sangüíneo a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos parasitados com leishmanias, que no intestino do vetor, são liberadas (Tanner, 1996). Segue-se então uma divisão como amastigota, esta divisão ocorre dentro da membrana peritrófica. Esta membrana é secretada pelas células abdominais do inseto com o objetivo de englobar o sangue aí chegado, isto ocorre antes dos aflagados se transformarem em flagelados no intestino médio (Melby, 2002). As promastigotas se dividem por cerca de sete dias, estas possuem um flagelo que está em íntimo contato com as microvilosidades do intestino do mosquito. Após este período os parasitas seguem para as porções bucais do flebotomíneo (*L. longipalpis*), de onde pequenos promastigotas se ligam às paredes da faringe. Daí deslocam-se e se movem para a probócida do inseto. Na forma de promastigotas metacíclicas são transmitidas para os humanos através da picada da fêmea do flebotomíneo. As leishmanias são inoculadas na epiderme ou derme superficial (Tanner, 1996).

A primeira resposta a esta invasão é modulada pelo complemento que é ativado pela via clássica ou alternativa. Entretanto, muitas amastigotas escapam da lise pelo complemento. Este escape se dá pela fosforilação do complemento, principalmente da fração C3, feito pela presença de ectoproteínocinasas que se encontram na superfície da leishmania. O complemento é ativado, através da fração C5a, que induz a uma maior permeabilidade vascular. Os ceratinócitos também participam da

resposta imune através da produção de interleucinas 1, 3, 6, 8, GM-CSF, TGF e TNF- α , além de expressarem moléculas ICAM-1 & MHC-II (Tanner, 1996).

Há migração de leucócitos para o local onde se encontram as leishmanias, esta migração se faz pela ação de fatores quimiotáticos. Os leucócitos polimorfonucleares estão ligados ao endotélio através da interação entre a selectina E do endotélio e as moléculas Sialil Lewis X, esta ligação é frouxa e permite a rolagem do leucócito (Tanner, 1996).

Uma vez migrando para o local da infecção os polimorfonucleares degradam as formas amastigotas através do sistema mieloperoxidase-H₂O₂-halide assim como pela liberação de metabólitos tóxicos do O₂ (Tanner, 1996).

As quimocinas (RANTES & MIP-1) e linfotaxinas atraem leucócitos e interferem no desenvolvimento e ativação da angiogênese e das células T (Tanner, 1996).

As promastigotas se ligam aos macrófagos através de receptores próprios que existem na membrana celular ou flagelo. Várias moléculas funcionam como ligantes: C3b, Fc, receptores de fibronectina, gp 63 e LPG. O parasita é englobado pelo macrófago situando-se em fagossomos. Experimentalmente, independente de o animal inoculado com o parasita ser resistente (C57L) ou susceptível C57BL/6 e do número de promastigostas inoculadas, que seja somente cinco ou 500, apenas de três a seis amastigotas serão identificadas no macrófago nos primeiros três dias que se seguirão à inoculação (Tanner, 1996).

É possível que a internalização da leishmania seja facilitada por alguma organela do parasita (Tanner, 1996).

Uma vez no fagossomo do macrófago há uma redução no tamanho do flagelo da leishmania. Há uma resistência do parasita às potentes enzimas do macrófago que são injetadas no interior do fagossomo (Melby, 2002). Tal fato pode se dever à ação de inibidores destas enzimas ou desativadores de pro-oxidantes dentro dos lisossomos (Melby, 2002). O parasita pode interferir de várias formas no metabolismo do macrófago, seja inibindo a expressão de genes oncogênicos ou inibindo a ativação de genes responsáveis pela apoptose. O parasita é o responsável pelo aumento da longevidade do macrófago infectado aumentando, portanto a sua própria sobrevivência (Davies et al., 2003).

Os macrófagos constituem um grupo de células do sistema de defesa do hospedeiro e embora classificados assim apresentam diferenças marcantes entre subpopulações. Tal fato pode justificar diferentes funções e propriedades encontradas no hospedeiro (Davies et al., 2003). Isto é verificado pelo fato de que cerca da metade dos macrófagos é infectada, mesmo após uma inoculação de um grande número de parasitas. Após o oitavo dia de inoculação cerca de 100% dos macrófagos estão infectados. Possivelmente um fator celular contribuiria para o aumento da infecção (Tanner, 1996).

Experimentalmente pode-se determinar um ciclo de crescimento da leishmania no interior dos macrófagos. Inicialmente há uma fase em que praticamente não há multiplicação do parasita, esta fase dura cerca de três a quatro dias, e posteriormente uma fase de multiplicação rápida, que atinge o pico em torno do sétimo dia. A multiplicação do parasita ocorre em células que deveriam ser responsáveis pelo bloqueio à proliferação parasitária (Tanner, 1996).

Após a infecção pela leishmania a proliferação ou não do parasita é determinada pela resposta linfocitária tipo Th1 ou Th2. Há uma disfunção das células T, das células natural *Killer* e dos macrófagos. A determinação da resposta inicial dependerá do papel desempenhado pelas células dendríticas (Sacks et Noben-Trauth, 2003).

As células dendríticas representam uma pequena população de leucócitos que possuem um importante papel no início da reposta imune contra as leishmanias. Elas são as principais células apresentadoras de antígenos (APC) e possuem uma importante habilidade de resposta a antígenos tanto *in vitro* como *in vivo*. São as células dendríticas que direcionam a resposta do tipo Th1 através da produção da IL-2 (Julia et al., 2000). As células de *Langherans* da epiderme, que fazem parte da família das células dendríticas, têm o primeiro contato com as leishmanias inoculadas pelo flebotomíneo (Basu et al., 2000).

Relatos recentes têm evidenciado que a infecção no baço de camundongos BALB/c, está associado à perda de células dendríticas foliculares e centros germinativos de células B. São as células dendríticas e não os macrófagos os responsáveis pela produção da IL-12, esta produção se faz imediatamente após a infecção pela leishmania em camundongos BALB/c (Basu et al., 2000).

No modelo murino da leishmaniose visceral o papel das células dendríticas é fundamental como fonte inicial da produção de IL-12 que se segue à infecção, na infecção crônica há uma destruição destas células (Basu et al., 2000).

O antígeno DEC-205 está ativado nos macrófagos após a infecção pela *L. donovani*. No camundongo BALB/c a infecção pela *L. donovani* não é fatal e ao final de cerca de 8 a 10 semanas, haverá a resolução da infecção. No baço destes animais a

carga parasitária declina lentamente após um período de quatro meses após a infecção. A função das células dendríticas CD11C+ do baço está relacionada com a replicação parasitária nestes animais (Basu et al., 2000).

O modelo de resposta Th1/Th2 é explicado da seguinte forma: as células dendríticas imaturas são as que primeiro entram em contato com as leishmanias, as leishmanias são fagocitadas e as células dendríticas são ativadas para apresentar os antígenos ao linfócito CD4 *naive*. A interação de várias moléculas co-estimuladoras com seus respectivos ligantes, tais como o CD40-CD40L, OX40-OX40L, CD80-CTLA4/CD28, juntamente com um “ambiente de interleucinas” levam a diferenciação dos linfócitos CD4 *naives* em linfócitos secretores de IFN- γ na resposta Th1 ou em secretores de IL-4, na resposta Th2. Existe ainda a possibilidade de existir subpopulações de células dendríticas conhecidas como DC1 e DC2 as quais podem direcionar a resposta para linfócitos Th1 ou Th2 (Basu et al., 2000).

Na diferenciação e desenvolvimento do linfócito tipo Th1 alguns patógenos ou moléculas padrão associado ao patógeno (PAMPs) atingem células apresentadoras de antígenos. Através de *Toll-like receptors* (TLRs) as APC secretam IL-12 que levam as células CD4 *naive* a se diferenciarem em células secretoras de IFN- γ , sendo tipo Th1. Há também a ativação do *transducer and activator of transcription 4* (STAT4) e STAT1 pela IL-12 e interferon- γ , respectivamente. O T-bet, um *T-box transcription factor* também é um fator específico da linhagem Th1 (Basu et al., 2000).

A diferenciação para o linfócito CD4 com resposta Th2 se deve a uma inabilidade das células dendríticas em produzir IL-12. Desta forma há uma diferenciação para resposta Th2 com produção de IL-4. Além disso, o ambiente local

de interleucinas leva a uma ativação de células dendríticas para a produção de IL-4 e IL-10, o que também contribui para a diferenciação para uma resposta tipo Th2. O STAT6 será especificamente ativado pela ligação ao receptor de IL-4. O GATA3 (*Th2 lineage-specific transcription factor*) liga-se ao AGATAG (*consensus GATA binding*). O fator c-Maf e o NFATc (nuclear factor of activated T cells) também tem sido associado à diferenciação celular tipo Th2. Uma regulação negativa para a diferenciação tipo Th2 é exercida pelo Bcl-6, ROG, que é um repressor do GATA e pelo FOG-1 (que é relacionado ao GATA1). Estes levam a uma regulação negativa tipo Th2 reprimindo a atividade do STAT6 e GATA3 (Basu et al., 2000).

O linfócito Th1 tem uma função ativadora dos macrófagos e estimuladora do linfócito B para a produção de imunoglobulinas. A imunoglobulina IgG2a é capaz de fixar o complemento e neutralizar vírus. Em contrapartida os linfócitos Th2 colaboram na produção de IgG1, IgE, e IgA e ainda produzem citocinas inibidoras de Th1 (Wilson et al., 2005).

Além dos fatores relacionados à resposta imune, outros poderiam contribuir para o desenvolvimento do calazar. A desnutrição protéico-energética (Badaró et al., 1986), a deficiência de oligoelementos também colaboram para a visceralização das leishmanias (Melby e Yang, 1998; Gregory et al., 2001). A deficiência da vitamina A também está associada com casos de calazar em crianças (Luz et al., 2001).

1.4 - O duodeno

O duodeno é a mais proximal das quatro porções do intestino delgado. O limite proximal é o piloro e o distal é o jejuno. Forma um “C” em torno da cabeça do

pâncreas. Em um adulto possui uma extensão de cerca de 30 cm ou doze polegadas, daí ser chamado de *duodenum*. O duodeno é ainda subdividido em 4 partes: primeira, segunda, terceira e quarta, de acordo com mudanças determinadas por angulações (Segal e Petras, 1997).

Na superfície luminal do duodeno há dobras conhecidas como *plicae circulares*. Embriologicamente o duodeno se desenvolve a partir da quarta semana de gestação, o epitélio se desenvolve a partir do endoderma e o tecido conectivo a partir do mesoderma (McGuigan e Ament, 1983).

O suprimento sangüíneo da porção proximal se faz a partir do tronco celíaco, enquanto a porção distal é suprida pela artéria mesentérica superior. A drenagem venosa se faz pela veia pancreaticoduodenal que se liga à veia jejunal e desemboca na mesentérica superior. A drenagem linfática mantém relação com a drenagem venosa. Os canais linfáticos drenam para os nódulos linfáticos pancreaticoduodenais (McGuigan e Ament, 1983).

A microscopia do duodeno é caracterizada por uma mucosa vilositária rodeada por criptas de *Lieberkuhn* e a submucosa com as glândulas de Brunner. Uma única camada de células epiteliais constitui a interface entre o lúmen duodenal e a mucosa. As áreas profundas da camada epitelial contêm as células absortivas, as células de Paneth, que secretam lisozimas e outros fatores de defesa, células mucosas e endócrinas (McGuigan e Ament, 1983).

As vilosidades próximas ao estômago são distorcidas pela acidez gástrica e aquelas da porção distal têm forma mais regular. Histologicamente, a razão entre vilosidades e criptas no duodeno é de 4:1 ou 5:1. Dentro da submucosa do duodeno encontramos as glândulas de Brunner, as quais secretam fator de crescimento

epidermóide, pepsinogênio II e muco rico em bicarbonato (McGuigan e Ament, 1983).

1.5 - O intestino e o calazar

Em 1904, Christophers publicou três casos de autópsias de adultos e adolescentes com calazar que apresentavam graves alterações intestinais. No primeiro caso havia grandes ulcerações em todo intestino grosso, sendo que uma das ulcerações apresentava uma perfuração. No segundo caso as lesões localizavam-se no reto e também havia ulcerações. No terceiro caso havia congestão em toda a mucosa intestinal e, assim como nos casos anteriores, também ocorreram perfurações. Manson & Low também descreveram ulcerações intestinais em 1904 (Rodrigues da Silva, 1957).

Perrey, em 1922, descreveu espessamento jejunal, sem ulcerações e com poucas leishmanias na submucosa dentro de células endoteliais. Há ainda o achado de parasitas livres possivelmente devido a rupturas de células parasitadas (Rodrigues da Silva, 1957).

Bogliolo, em 1956, relatou achados discretos com “pequenos corpos leishmaniformes”, um pouco maior que as leishmanias e que foram encontrados no tecido conjuntivo das vilosidades do intestino delgado (Timerman, 1990).

Estudo sobre absorção de vitamina A, em pacientes com calazar foi realizado em 1983, evidenciou sensível melhora da absorção da vitamina após tratamento com antimonial. Esta deficiência de absorção era possivelmente secundária ao parasitismo em vilosidades intestinais, assim como pela diarreia (Muigai et al., 1983).

Artur Timerman, em dissertação de mestrado apresentada à Universidade de São Paulo, avaliou através de biópsia intestinal em portadores do calazar antes do tratamento, que em 13 pacientes biopsiados havia o encontro de leishmanias no intestino e que em apenas um único paciente foi encontrado leishmania na biópsia pós-tratamento (Timerman, 1990).

1.6 - Biópsia intestinal

Foi Shiner, em 1957, que realizou o maior avanço no sentido da realização de biópsia intestinal em crianças. Uma cápsula que permitisse a biópsia por via oral foi simultaneamente desenvolvida por Crosb e Kugler a partir de 1956. Assim, foi possível aperfeiçoar o estudo da morfologia intestinal permitindo também melhor conhecimento sobre as doenças que comprometem o intestino (Walker-Smith et al., 1991).

A biópsia intestinal é realizada através do uso de sonda-cápsula ou através de um fibroscópico (Walker-Smith et al., 1991).

A coleta de amostra por sonda-cápsula é realizada às cegas. São utilizados, na prática, dois tipos de sonda-cápsula: a mais antiga é a de Crosby-Kugler, e atualmente se utiliza a de Watson (Walker-Smith et al., 1991).

Habitualmente, a introdução da sonda-cápsula é realizada através da cavidade oral. Utiliza-se um abaixador de língua para manter a cavidade oral aberta, às vezes, a sonda-cápsula pode ser introduzida pelo nariz, quando há necessidade de se estudar porções distais do delgado. Após cerca de quatro a cinco horas dispara-se a cápsula (Walker-Smith et al., 1991).

O preparo do fragmento coletado constitui-se na etapa mais importante do procedimento. A amostra deve ser colocada em papel de filtro de forma que a superfície das vilosidades fique voltada para cima e a seguir deve ser colocada em um fixador (Walker-Smith et al., 1991).

A amostra é enviada para inclusão em parafina e depois para o laboratório de anatomia patologia para as análises necessárias: histologia convencional e imunohistoquímica (Walker-Smith et al., 1991).

Complicações podem ocorrer quando da realização da biópsia jejunal, e entre elas o hematoma intraduodenal. As complicações são raras e usualmente se restringem a sangramento ou perfuração intestinal. Em recente publicação, foram encontrados 16 casos publicados na literatura de hematoma após a realização da biópsia, sete casos ocorreram após biópsia perioral e nove após biópsia endoscópica. A idade dos pacientes variou de 11,7 + ou - 1,2 ano. A manifestação clínica foi de dor abdominal intensa e vômitos. A dor estava freqüentemente associada a pancreatite (Walker-Smith et al., 1991).

1.6.1 - Alterações morfológicas observadas na biópsia duodenal

Os fragmentos devem ser primeiramente observados em microscópicos para facilitar a orientação para futuras secções. A observação inicial facilita a observação de lesões anatômicas e a presença ou não de uma mucosa plana. Estas observações são de fundamental importância em casos de doença induzida pelo glúten. Entretanto, o exame microscópico posterior pode ser prejudicado por esta observação inicial, que pode resultar em um retardo na fixação do material (Walker-Smith et al., 1991).

Em adultos normais a mucosa intestinal se caracteriza por apresentar vilosidades *finger-like*, sendo algumas tipo folhas (*leaflike*). Entretanto, em crianças as vilosidades tendem a ser mais largas. Neste caso são parecidas com línguas (*tonguelike*). Em crianças até os cinco anos de idade pode haver verdadeiros sulcos lembrando largos sulcos na terra (*thin ridgelike vili*) (Walker-Smith et al., 1991).

Quando se realiza biópsia *pos-mortem*, alterações significativas podem ocorrer (Walker-Smith et al., 1991).

Desde o início do desenvolvimento da criança até a idade de dez anos, as vilosidades tipo *finger-like* são pouco comuns e largas vilosidades são encontradas. O aspecto da vilosidade, sob a microscopia, é considerada normal nas crianças mesmo se apresentar qualquer um dos dois tipos. Nas crianças, quando se observa mitose, o índice mitótico é maior que nos adultos (Walker-Smith et al., 1991).

Erros de coleta da amostra ou erros na fixação do material no cartão podem levar a erros de interpretação do aspecto da mucosa. Coleta da mucosa gástrica também pode ocorrer. Cerca de 50% das biópsias podem apresentar hiperemia ao exame histológico. Esta hiperemia é secundária à técnica de sucção, fato menos observado nas biópsias endoscópicas, porém estas podem ser inapropriadas para o correto exame histopatológico (Walker-Smith et al., 1991).

1.6.2 - Biópsia intestinal sob microscopia óptica

O fragmento de biópsia é rotineiramente examinado sob microscopia óptica, sendo que há controvérsias sobre a terminologia a ser utilizada nestes casos. Os primeiros relatos classificavam a mucosa em: atrofia vilositária total ou subtotal. Alguns autores classificam a mucosa como atrofia vilositária parcial como leve ou

grave. É também utilizado o termo atrofia total da mucosa (Walker-Smith et al., 1991).

Os principais aspectos a serem observados na mucosa são: a altura das vilosidades e a profundidade das criptas (Walker-Smith et al., 1991).

Dentre as anormalidades vistas na biópsia, a mais comum é a diminuição do tamanho das vilosidades e as criptas alongadas. Pode-se utilizar o termo anormalidade leve quando as criptas têm o mesmo tamanho das vilosidades. Quando as criptas são maiores que as vilosidades é dito haver uma anormalidade moderada. Quando há um aplanamento da mucosa é dito haver uma anormalidade grave. É ainda possível se encontrar atrofia vilositária com importante hiperplasia das criptas ou atrofia vilositária com criptas normais (Walker-Smith et al., 1991).

Finalmente, hiperplasia tanto das criptas como das vilosidades pode ser evidenciada (Walker-Smith et al., 1991).

Outros aspectos além do estudo das dimensões das criptas e vilosidades podem ser observados:

- A pesquisa de parasitas ligados à mucosa, tais como: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* e *E. coli* enteropatogênica.
- O grau de vacualização do enterócito, assim como do epitélio, e o tamanho dos enterócitos.
- O número e a presença de outras células intraepiteliais e epiteliais, tais como: eosinófilos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e *goblet cells*.
- A densidade de linfócitos no epitélio, através da contagem de linfócitos, que é feita em relação a 100 células epiteliais vilositárias. Estes linfócitos são intercelulares, isto é, são encontrados entre os enterócitos. Phillips encontrou uma

relação de 23,4 linfócitos por 100 células epiteliais em crianças normais e com dieta normal. Algumas doenças podem se caracterizar pelo aumento dos linfócitos epiteliais, como ocorre na giardíase (Walker-Smith et al., 1991).

- A lâmina própria para estudo do grau e tipo de infiltrado linfocitário.

É possível, neste caso, se estabelecer a linhagem dos linfócitos, através de marcadores dos receptores celulares.

Finalmente, é difícil determinar o que é normal na biópsia duodenal de uma criança, pois não seria ético biopsiar crianças ditas normais (Walker-Smith et al., 1991).

1.6.3 - Utilidade da biópsia intestinal

Por princípio a biópsia intestinal tem duas utilidades no grupo pediátrico: a demonstração de uma enteropatia e a possibilidade de permitir a realização de testes para a avaliação de deficiências enzimáticas (Walker-Smith et al., 1991).

A doença celíaca, abetalipoproteinemia, agamaglobulinemia, enteropatia autoimune, atrofia microvilositária, alactasia congênita e deficiência de sucrase-isomaltase são exemplos de indiscutível importância da biópsia intestinal. Casos de giardíase, estrogiloidíase, linfangectasia do intestino delgado, linfoma intestinal, hipogamaglobulinemia e de infecção pela *E. coli* enteroaderente são exemplos de situações onde a biópsia pode ser útil. Finalmente, para algumas doenças, a biópsia tem pouca utilidade pela baixa especificidade: *sprue* tropical, enterite por radiação e desnutrição protéico-energética (Walker-Smith et al., 1991).

1.7 - O intestino como órgão do sistema imune

O sistema imune do homem é composto por vários órgãos, sendo o intestino um dos componentes deste sistema. Neste órgão há a presença de uma grande quantidade de antígenos e agentes biológicos produtores de doenças ou não. Esta grande variedade de estímulos pode levar à ativação ou supressão da resposta imune (McGuigan et Ament, 1983).

A mucosa do trato gastrointestinal revela um infiltrado linfocitário. Estes linfócitos encontram-se disseminados pela lâmina própria, entre células epiteliais ou organizados em nódulos linfóides; esta última organização é conhecida como GALT (McGuigan e Ament, 1983).

O tecido linfóide do trato digestivo constitui 25% da mucosa intestinal e é parte significativa do sistema imune do indivíduo. Comparativamente ao baço e ao fígado, o intestino possui tanto tecido imune como estes órgãos (McGuigan e Ament, 1983).

O tecido linfóide intestinal é dividido em três populações distintas: placas de Peyer, células linfóides da lâmina própria e linfócitos intraepiteliais. Esta divisão é baseada em características anatômicas, funcionais e morfológicas (McGuigan e Ament, 1983).

As placas de Peyer são um conjunto de pequenos folículos linfóides. Os linfócitos que povoam estes aglomerados respondem a estimulação antigênica intestinal. É a partir desta primeira estimulação que é montada a resposta imune na lâmina própria da mucosa (McGuigan e Ament, 1983).

Na lâmina própria há um grande número de linfócitos e de células plasmáticas. As células plasmáticas são as responsáveis pela produção de imunoglobulina principalmente da subclasse IgA (McGuigan e Ament, 1983).

Os linfócitos que estão entre as células epiteliais, conhecidos como linfócitos intraepiteliais, são predominantemente linfócitos tipo T. Embora anatomicamente distantes, os linfócitos dos gânglios mesentéricos e do fígado funcionam como parte integrante deste sistema (Sartos, 2002).

O sistema imune do intestino é uma das interfaces entre o meio ambiente e o indivíduo, daí sua importância. Ligações finas entre os enterócitos separam os linfócitos intraepiteliais da luz intestinal.

As células M, células epiteliais especializadas, conhecidas como células membranosas, separam a luz intestinal dos linfócitos da placa de Peyer (Sartos, 2002). São as células M que levam os antígenos até os folículos linfóides. Elas são encontradas entre os enterócitos colunares e apresentam pregas ao invés de vilosidades em direção a luz intestinal. Nelas, se evidencia pinocitose e muitas vesículas (Sartos, 2002).

Os linfócitos e as células plasmáticas da lâmina própria estão separados da luz intestinal pelas células epiteliais da mucosa e pela membrana basal. Em torno da lâmina própria há vasos linfáticos e sangüíneos. Outros fatores mecânicos ainda compõem a barreira que reduz o contato de antígenos com os órgãos linfóides intestinais: a peristalse, as células epiteliais intestinais, o glicocálix e a cobertura da mucosa (Sartos, 2002). Em condições normais nenhuma destas barreiras será totalmente eficaz e em caso de processo inflamatório terão seus papéis francamente comprometidos.

As placas de Peyer surgem ainda na idade fetal em torno da vigésima quarta semana de gestação e localizam-se principalmente no íleo. As placas aumentam em tamanho e número até a idade de 12 a 14 anos, diminuem com o passar do tempo, embora indivíduos com até 90 anos de idade possam ainda apresentá-las. São encontradas tanto na superfície mucosa como na serosa e se estendem da mucosa até a submucosa. A chegada dos linfócitos até as placas de Peyer se faz através da passagem pelo endotélio alto das vênulas (Sartos, 2002).

No interior das placas de Peyer os linfócitos se organizam em dois compartimentos: os folículos linfóides e a área interfolicular timo-dependente (Sartos, 2002).

1.7.1 - Resposta imune do intestino

A mucosa do intestino tem a capacidade de coexistir com muitos agentes infecciosos. Deve reconhecer entre os muitos antígenos ou agentes infecciosos aqueles que são patogênicos ou não. Na mucosa existe uma regulação negativa cujo objetivo é não reconhecer antígenos do próprio hospedeiro ou aqueles não lesivos. Este mecanismo de tolerância é mediado pela regulação dos linfócitos T e pela detecção precoce de agentes invasores pelas células epiteliais as quais liberam substâncias quimiotáticas (Sartos, 2002).

Muito da função do sistema linfático do intestino estaria ligada a uma função absorptiva, formando o que se chama de ALPA (*apparatus lymphaticus periphericus absorvens*) (Sansonetti, 2004).

Várias são as funções do intestino: absorver nutrientes e transportá-los, realizar trocas iônicas e de eletrólitos, produzir hormônios, possuir receptores para

hormônios, mas diferente de outros órgãos, possui um contato íntimo com o meio externo através de uma barreira epitelial. A barreira é estabelecida pelas células epiteliais e as células dendríticas. Como todo o sistema imune, há a participação do sistema imune inato e adaptativo (Sansonetti, 2004).

Três sistemas: as células epiteliais, o sistema imune adaptativo e o sistema imune inato compõem esta barreira (Sansonetti, 2004).

A barreira é apenas parcial, pois na verdade muitos microorganismos podem ultrapassá-la. Os agentes microscópicos atravessam esta barreira e entram em contacto via células epiteliais com tecidos da mucosa intestinal. A maioria dos que cruzam, são agentes não patogênicos e entre muitas funções podem modular a resposta imune. Eles funcionam no sentido de maturarem este importante sistema (Sansonetti, 2004).

O intestino dos mamíferos convive de forma tolerante com um grande número de agentes infecciosos, a tolerância é dirigida para estes agentes e não em sentido amplo, pois apesar da tolerância há a produção de imunoglobulinas. Os comensais são reconhecidos e parcialmente tolerados levando a um estado de inflamação fisiológica, os mais patogênicos teriam a capacidade de romper este estado de equilíbrio levando a uma inflamação (Sansonetti, 2004).

Teremos, portanto dois estágios de resposta imune: um caracterizado por um estado de não inflamação, mas sempre preparado para um desencadear inflamatório e um outro estado de inflamação propriamente dita. A intensidade da inflamação poderia levar até a formação de úlceras, caracterizando um estado de verdadeira guerra inflamatória (Sansonetti, 2004).

Esta barreira é na verdade uma barreira interativa e dinâmica. O sistema imune é composto por células que entram e saem deste sistema na dependência de vários fatores. Estas células podem sofrer uma divisão mais rápida ou mais lenta dependendo da demanda inflamatória. Da mesma forma, células imunes da cripta podem ter uma taxa de migração mais ou menos rápida. Os agentes comensais estão presentes para ajudar na montagem de uma rápida resposta imune caso se necessite (Sansonetti, 2004).

A barreira física é composta por microviosidades das células e estas junções são caracterizadas pela presença de proteínas chamadas transmembranas. As bactérias podem quebrar estas barreiras e ter sua penetração facilitada. Um outro componente é formado pela mucina, uma fina camada de muco que pode ser destinado a aderir a uma bactéria, a qual é posteriormente eliminada pela peristalse (Sansonetti, 2004).

A imunidade inata é um componente do sistema imune que é formado pela produção de peptídeos antibacterianos e pela atividade neutrofílica. Estes peptídeos levariam a uma lise bacteriana e são conhecidos como defensinas. As defensinas são divididas em duas famílias as defensinas α e as defensinas β (Sansonetti, 2004).

Quando ocorre invasão bacteriana no intestino há uma ativação das células epiteliais e produção de citocinas com migração dos neutrófilos para a luz intestinal (Sansonetti, 2004).

O sistema imune adaptativo é mantido na mucosa com a participação das células epiteliais. Elas interagem com as células apresentadoras de antígenos e com as células linfóides. Esta interação e colaboração ocorrem nos folículos linfóides e é caracterizado pela presença das células M. Estas células têm a capacidade de translocar antígenos da luz intestinal para o lado basolateral desta célula, colocando

esse antígeno em contato com sistema imune. Este sistema seria mais complexo com a participação de fatores humorais, principalmente a secreção de IgA; fatores celulares com participação de células B e células T, as únicas relacionadas ao GALT, como são as células intraepiteliais e da lâmina própria (Sansoneetti, 2004).

Há um equilíbrio dinâmico entre os agentes comensais e a mucosa intestinal. Na verdade parece existir um paradoxo. Para que se evite uma inflamação importante, é necessário haver uma inflamação crônica. Agentes comensais seriam fagocitados e destruídos. Seus antígenos seriam apresentados por células especializadas que induziriam uma resposta imune adequada evitando assim um processo inflamatório grave. Na verdade existiria um processo pró-inflamatório se contrapondo a um processo antiinflamatório (Sansoneetti, 2004).

1.8 - Quadro clínico da leishmaniose visceral americana

O período de incubação da leishmaniose visceral, que nem sempre é fácil de se determinar na zona endêmica, varia em média de três a oito meses. Há relatos em indivíduos que foram visitar a zona endêmica, nos quais as manifestações clínicas surgiram em um curto período de dez dias, entretanto há descrição de períodos de incubação de até 24 meses (Badaró e Duarte, 1996).

Após a infecção, a maioria dos indivíduos permanece assintomática, caracterizando assim uma infecção subclínica. Aqueles que desenvolvem a doença apresentam inicialmente um quadro febril diário. Há aumento do volume abdominal secundário aumento do volume do fígado e do baço. As vísceras nos indivíduos não

tratados atingem volumes de grandes proporções, principalmente o baço. Há ainda perda de peso, astenia, anorexia e palidez cutâneo-mucosa (Badaró e Duarte, 1996).

No início da doença a febre pode ser mais elevada. Em casos com doença prolongada a febre pode ser baixa ou até inexistente. Períodos de apirexia podem se intercalar a períodos febris (Badaró e Duarte, 1996).

Ao exame clínico o baço se apresenta de consistência fibro-elástica e seu crescimento se faz em direção à cicatriz umbilical, podendo até mesmo atingir a fossa ilíaca direita (Badaró e Duarte, 1996).

Embora encontrada no calazar que ocorre na Índia a linfadenopatia significativa é um achado pouco comum no Brasil (Ozensoy, 1998).

Em geral ao final de seis meses de evolução o paciente entra no estado final da doença e as complicações surgem, como por exemplo: hemorragia digestiva alta ou baixa, sangramentos cutâneos ou epistaxe, infecções bacterianas como: pneumonia, infecção do trato urinário, otites e sepse. As infecções bacterianas serão responsáveis por cerca de 85-90% dos óbitos (Badaró e Duarte, 1996).

As manifestações clínicas em um paciente co-infectado com o HIV podem ser muito diferentes das encontradas classicamente. Pode haver comprometimento exclusivo do sistema respiratório, do intestino ou ainda a forma clássica com febre associada a hepatoesplenomegalia (Badaró e Duarte, 1996).

1.9 - Achados laboratoriais inespecíficos da leishmaniose visceral americana

Classicamente o calazar apresenta alterações laboratoriais que, embora sejam inespecíficas, são muito sugestivas. O hemograma inicialmente revela anemia

normocrômica e normocítica, posteriormente surgem leucopenia e plaquetopenia. A hipoalbuminemia associada a hipergamaglobulinemia são achados característicos. Elevação de enzimas hepáticas e alterações do sedimento urinário podem ser encontradas (Badaró e Duarte, 1996).

1.9.1 – Diagnóstico da leishmaniose visceral americana

O diagnóstico da leishmaniose visceral é sempre baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Fernández-Guerrero et al., 2004). O diagnóstico laboratorial de certeza é feito pelo encontro do parasita pelo exame direto ou isolamento em cultura (Davies et al., 2003). A visualização do parasita pelo exame direto é de baixo custo, rápido e de fácil realização, embora haja a necessidade de um examinador experiente. A pesquisa pode ser feita em aspirado de medula óssea, linfonódio ou baço. O aspirado de medula é de uso comum e praticamente desprovido de risco para o paciente. Sua positividade se situa em torno de 54 a 86%. O aspirado esplênico pode, em raras situações, levar a quadros de hemorragias graves e óbitos (Badaró e Duarte, 1996).

Devido às dificuldades na realização do exame direto, os métodos sorológicos têm adquirido maior importância nos últimos anos facilitando o diagnóstico no campo. A presença de anticorpos anti-leishmania que em geral estão presentes em altos títulos nos pacientes com calazar pode ser detectada pela técnica do ELISA, testes de imunofluorescência indireta e testes de aglutinação direta. Em todos os testes anteriores resultado falso reativo pode ocorrer, pois outras doenças endêmicas como a doença de Chagas, hanseníase, malária, esquistossomose, toxoplasmose e a

própria leishmaniose tegumentar podem interferir nos resultados (Badaró e Duarte, 1996).

Especificamente os pacientes portadores da AIDS podem ter leishmaniose visceral sem que haja a detecção de anticorpos anti-leishmania. Um teste realizado em uma fita para pesquisa de anticorpos antiantígeno rK39, que é um antígeno conservado da *leishmania infantum*, tem revelado sensibilidade de 67-100% e especificidade de 93-100% . De uma forma geral, a falta de resposta imune específica em alguns pacientes, a persistência de anticorpos após a cura e a presença de anticorpos em pessoas saudáveis são aspectos que limitam o uso da sorologia como ferramenta diagnóstica (Badaró e Duarte, 1996).

A detecção de antígeno na urina de pacientes com calazar, realizada pelo método de aglutinação pelo látex, também tem sido utilizado como ferramenta diagnóstica. A reação em cadeia pela polimerase tem um alto potencial diagnóstico, pois é muito sensível e específica. Seu uso, limitado no campo por razões técnicas, impede a sua disseminação como arma diagnóstica. Em pacientes com AIDS tanto a pesquisa direta como a hemocultura tem sido úteis. Há alguns relatos de diagnóstico em pacientes com AIDS através da biópsia duodenal (Olofinlade, 2000; Fernández-Guerrero et al., 2004).

1.10 - Tratamento da leishmaniose visceral americana

A base do tratamento da leishmaniose visceral é a utilização de antimoniatos por via parenteral e por tempo prolongado (Davies et al., 2003). A duração total do tratamento é de cerca de 20 a 28 dias. Em geral, se respeita o limite de duas ampolas

ao dia de Glucantime[®]. Mais recentemente o uso de até quatro ampolas por dia tem sido utilizado, cada ampola de Glucantime[®] possui 401mg/5mL de droga ativa.

Durante o tratamento com os antimoniais podem surgir dores articulares, anorexia, náuseas, vômitos e cefaléia. Pode ainda ocorrer elevação de amilase e lipase, embora apenas uma minoria dos pacientes apresente sintomas relacionados a pancreatite. Alterações eletrocardiográficas podem surgir, como inversão da onda T e aumento do espaço QT. Caso o paciente apresente elevação das escórias nitrogenadas a droga deverá ser suspensa, visto não se dispor de esquemas para insuficiência renal e não ser o antimonial dialisável (Murray, 2001) (Sundar, 2002).

A segunda linha de drogas utilizadas no tratamento do calazar é composta pelo deoxicolato de anfotericina B e pela pentamidina, sendo a segunda usada mais raramente (Murray, 2001). A dose ideal de anfotericina ainda está por ser determinada (Kafetzis, 2005). A formulação lipossomal, em casos especiais, poderá também ser utilizada (Sundar, 2003).

Em março de 2002, a metilfosina, uma droga inicialmente utilizada com antineoplásica, foi liberada como a primeira droga que poderia ser utilizada por via oral no tratamento do calazar (Murray, 2001).

O tratamento em portadores do vírus da imunodeficiência humana tem se mostrado ineficaz pelo alto número de recidivas. O coreto uso da medicação antirretroviral altamente potente seria a melhor forma de se controlar a doença (Murray, 2001), (Fernandez-Cotarelo et al., 2003).

A imunoterapia com o IFN- γ em associação com o antimonial foi utilizada com boa resposta (Badaró et al., 1990).

2 - JUSTIFICATIVA

O estudo da relação entre o parasita e o hospedeiro é de fundamental importância na compreensão das doenças e em especial das doenças tropicais. Os estudos prévios sobre o calazar foram realizados com linfócitos retirados de sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral plenamente manifesta, ou destes mesmos pacientes na convalescença, ou ainda de indivíduos apenas infectados, mas assintomáticos.

A resposta tecidual, órgão específica, pode ser diferente a partir de cada órgão estudado. Neste sentido e considerando que o encontro de leishmanias no duodeno é um evento comum nos portadores do calazar e que com o advento da AIDS o encontro de leishmanias na mucosa intestinal se tornou um evento mais freqüente. A necessidade de se estudar a resposta ao nível da mucosa duodenal dos portadores do calazar se reveste de grande importância.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Estudar a resposta imune frente as leishmanias na mucosa duodenal em casos humanos de calazar antes da terapêutica específica com antimonial.

3.1.1 - Objetivos específicos

1. Avaliar a presença ou ausência de alterações morfológicas no nível da mucosa duodenal em pacientes com leishmaniose visceral plenamente manifesta, com ênfase a:

- a) Relação vilo/cripta;
- b) Morfologia das vilosidades intestinais;
- c) Morfologia das criptas intestinais;
- d) Presença de infiltrado inflamatório caracterizando os tipos celulares envolvidos na resposta imune.

2. Avaliar a resposta imune tecidual do hospedeiro frente a leishmania, através da quantificação de algumas subpopulações celulares e da análise da presença de citocinas que caracterizem uma resposta tipo Th1: IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa e interleucina 2; ou uma resposta tipo Th2: IL-10 e IL-4.

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 - População estudada

Foram estudados 13 pacientes portadores da leishmaniose visceral internados no Hospital Infantil Varela Santiago. Este é um hospital exclusivamente pediátrico, que funciona como referência para tratamento do calazar e localizado na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte. Presta assistência exclusivamente a pacientes do Sistema Único de Saúde. Os controles foram selecionados no Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.2 - Critérios de inclusão dos casos

1. Ter o diagnóstico da leishmaniose visceral confirmado clínica e laboratorialmente pelo encontro da leishmania em aspirado de medula óssea;
2. Ter o responsável lido e compreendido o termo de informação e consentimento. No caso em que o responsável legal fosse analfabeto, o termo de informação era lido por uma assistente social da unidade hospitalar. A assistente social não estava envolvida no estudo;
3. Ter idade compreendida entre seis meses e 12 anos de idade.

4.3 - Critérios de exclusão dos casos

1. Recusar-se a participar da investigação em qualquer momento do seguimento;
2. Está no momento do diagnóstico da leishmaniose visceral com quadro clínico muito comprometido como: nível de hemoglobina inferior a 6gr/dL; insuficiência renal; insuficiência hepática; insuficiência cardíaca ou alteração da coagulação;
3. Estar em período gestacional (embora pouco provável, existe a possibilidade de uma menina estar grávida aos 12 anos);
4. O responsável legal não compreender os termos de informação e consentimento;
5. Se durante o período do estudo, o seguimento não puder ser realizado por razões de mudança de domicílio para região muito distante, pelo desejo do responsável legal em interromper a investigação, impossibilidade de ser acompanhado com visitas regulares, para acompanhar a evolução da biópsia duodenal.

4.4 - Procedimentos relacionados com os pacientes casos

1. Exame clínico para detecção de co-morbidades;
2. Tratamento com antimicrobianos caso houvesse diagnóstico estabelecido ou presuntivo de infecção bacteriana;

3. Tratamento com Glucantime[®] - antimonio de N-metil-glucamina na dose de 20mg/kg/dia. A droga foi administrada em dose única diária por 20 dias. A dose inicial do antimonial foi administrada somente após a realização da biópsia duodenal;
4. Biópsia duodenal perioral antes do início do tratamento.

Dos exames coletados:

1. Hemograma com contagem de plaquetas e exames de bioquímica foram coletados na admissão e com periodicidade semanal. Foram realizados no laboratório de análise clínicas do Hospital Infantil Varela Santiago;
2. Todas as biópsias do duodeno foram realizadas por um mesmo gastroenterologista pediátrico: Dr. Guilherme Mariz Maia, CRM-RN 2203, e-mail: maia@digicom.br, médico da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte, lotado no Hospital Infantil Varela Santiago.

Do manuseio das amostras coletadas:

1. As amostras dos casos foram emblocadas em parafina no Laboratório Médico de Patologia Dr. Getúlio de Oliveira Sales - conveniado com o Hospital Infantil Varela Santiago. O estudo histopatológico rotineiro foi feito pela Dra. Ana Maria Oliveira Ramos;
2. Um novo estudo microscópico e a imunohistoquímica foram realizados no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.5 - Critérios de inclusão dos pacientes controles

Os controles foram selecionados a partir do Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Pediatria da UFRN. O serviço é chefiado pelo médico Paulo Matos, CRM-RN 2749, gastroenterologista pediátrico, lotado no Hospital de Pediatria da UFRN. O Dr. Paulo Matos realizou a endoscopia digestiva alta em todos os controles. Os controles tiveram os seguintes critérios de inclusão:

1. Ter idade compreendida entre seis meses e 12 anos;
2. Não apresentar sinais clínicos de leishmaniose visceral (febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, palidez cutâneo-mucosa);
3. Não apresentar co-morbidade ameaçadora a vida, como hemorragia digestiva alta, varizes esofágicas, sinais clínicos de insuficiência hepática. Estes dados inviabilizariam a endoscopia digestiva alta com biópsia;
4. Estar rotineiramente agendado para ser submetido à endoscopia digestiva alta. A endoscopia digestiva alta realizada em crianças independentemente da indicação inicial sempre envolve biópsia de esôfago, estômago e do duodeno;
5. Ter o responsável legal assinado o termo de consentimento.

4.6 - Dos procedimentos realizados com os pacientes controles

1. Os casos controles tiveram os dados demográficos registrados em protocolo;
2. Um fragmento da biópsia duodenal foi enviado para estudo microscópico e imunohistoquímica realizado no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias

Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte. O emblocamento em parafina foi realizado no laboratório de Anatomia Patológica da UFRN;

3. O exame anátomo-patológico rotineiro foi realizado pelo laboratório de anatomia patológica da UFRN e seguiu os trâmites normais de cada paciente.

4.7 - Das técnicas utilizadas nas biópsias dos casos e controles

Os fragmentos de biópsia dos casos e controles foram submetidos à coloração rotineira com hematoxilina e eosina para posterior identificação morfométrica.

Os anticorpos primários utilizados com os respectivos códigos, marcas e diluição estão enumerados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Especificações técnicas de anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas do material parafinado

DESCRIÇÃO DO ANTICORPO	DILUIÇÃO	MARCA/ CÓDIGO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	CONTROLE POSITIVO UTILIZADO
Ac anti-CD68	1:50	Dako/ M876	Calor úmido	Camundongo
Ac monoclonal de camundongo anticélula T CD4+ humana (OPD4)	1:1000	Dako/ M834	CSA	Linfonódio tuberculose
Ac monoclonal de camundongo anticélula T CD8+ humana (OPD4)	1:50	Dako/ M7103	CSA	Linfonódio tuberculose
Ac policlonal de coelho anti-IFN- γ humano	1:300	Genzyme/ IP500	Tripsina	Hanseníase tuberculóide (pele)
Ac de cabra anti-IL-4 humana	1:40	R&D systems/ AB-204-NA	Tripsina	Dermatite atópica (pele)
Ac. monoclonal de camundongo anti-IL-10 humana	1:10	R&D systems/ MAB-217	Tripsina	Dermatite atópica (pele)

4.7.1 - Da contagem de células e citocinas das amostras

A contagem de células que expressavam os marcadores estudados foi realizada através de microscopia óptica em aumento de 400 vezes; a área a ser examinada foi a do fragmento de biópsia utilizado. Em caso do corte histológico ter sido realizado de forma que não permitisse o exame das vilosidades e criptas, com pelo menos uma

contagem de cinco vilosidades, a amostra era considerada inadequada para contagem e desprezada.

Os cortes imunomarcados para avaliação do fenótipo das células inflamatórias e de citocinas, com ocular de 10X, objetiva de 40X e graticulo graduado com 1cm^2 , cuja área é de $0,0625\text{mm}^2$. Foi calculado o valor médio de células imunomarcadas por campo. Chegou-se ao número médio de células positivas por área dividindo-se esse valor médio pela área de $0,0625\text{mm}^2$.

A extensão da área foi determinada através da utilização de um graticulo milimetrado colocado na ocular. A área do graticulo era de 1cm^2 . Ele era subdividido em 100 pequenos quadrados de áreas iguais, conforme Figura 1 a seguir. Quando a amostra tocava o cruzamento de duas linhas perpendiculares era contada uma unidade de área, conforme a Figura 1 abaixo.

Figura 1 - Diagrama para contagem semiquantitativa de células ou citocinas marcadas

Desta forma a contagem sempre era determinada por número de células que expressavam determinado marcador por unidade de área examinada.

Para casos de expressão de citocinas com pouca marcação como IL-10, IL-4, TNF- α e INF- γ toda a análise foi feita em aumento de 400 vezes e revista em aumento de 1000 vezes, ou seja, na objetiva de imersão.

4.8 - Cálculo do tamanho da amostra

Foi utilizado para cálculo da amostra o programa *EpiInfo Version 6*, para uma confiança de 99%, o tamanho da amostra calculado para em erro alfa de 0,01% e beta de 20% seria de cinco casos e cinco controles. Entretanto para este estudo 13 pacientes, foram submetidos a uma biópsia duodenal no pré-tratamento, os controles foram em número de nove.

4.9 - Aspectos éticos

Esta investigação foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.10 - Variáveis e escores selecionados para avaliar o fragmento de duodeno na microscopia de luz

As amostras foram analisadas seguindo o protocolo a seguir, a Figura 2 é um exemplo de uma mucosa de um caso.

Figura 2 - Mucosa duodenal de um caso

Grau de autólise:

- 0 - nenhuma alteração de autólise
- 1 - trechos sem epitélio recobrindo a mucosa
- 2 - pequenos trechos recobertos por epitélio
- 3 - autólise completa

Relação vilo:cripta: (V:C): normal 4:1 ou 5:1 até 0:1 (ausência de vilosidade):

- 0 - relação V:C maior que 4:1
- 1 - relação V:C entre 4:1 e 2:1
- 2 - relação V:C inferior a 2:1
- 3 - relação V:C invertida

Tamanho da vilosidade:

- 0 - vilosidades altas, afiladas no ápice e estreitas, com relação V:C igual ou superior a 4:1
- 1 - vilos freqüentemente presentes e com relação V:C menor que 4:1
- 2 - poucos vilos presentes, com relação V:C inferior a 2:1
- 3 - atrofia completa da vilosidade

Cripta:

- 0 - cripta de tamanho e celularidade normal, com raras mitoses/campo 40x
- 1 - hiperplasia discreta, com 2 ou 3 mitoses/campo 40x
- 2 - hiperplasia evidente, alongamento e tortuosidade, com até 5 mitoses/campo 40x
- 3 - hiperplasia e hipertrofia máxima, alongadas até mais de 4 vezes o tamanho normal, tortuosidade e ramificações, com mais de cinco mitoses/campo de 40x

Processo inflamatório:a) *Intensidade:*

- 0 - poucas células inflamatórias na lamina própria (LP) e vilosidades estreitas
- 1 - aumento discreto do número de células inflamatórias na LP e vilosidades
- 2 - aumento significativo do infiltrado inflamatório na LP e vilosidades

3 - aumento significativo do infiltrado inflamatório, que ultrapassa a muscular da mucosa

b) *Mononucleares:*

0 - raros e esparsos linfócitos

1 - pequeno numero de linfócitos e plasmócitos na LP

2 - aumento do número de mononucleares na LP e nas vilosidades

3 - aumento significativo do número de mononucleares na LP e vilosidades, que ultrapassa a muscular da mucosa

c) *Neutrófilos:*

0 - ausência

1 - poucos neutrófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas e mais de 5 campos de 40x)

2 - aumento moderado (mais de 5 células por campo de 40x)

3 - aumento significativo (numerosos neutrófilos presentes difusamente na LP)

d) *Eosinófilos:*

0 - ausência

1 - poucos eosinófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas e mais de 5 campos de 40x)

2 - aumento moderado (mais de 5 células por campo de 40x)

3 - aumento significativo (numerosos eosinófilos presentes difusamente na LP)

e) *linfócitos intraepiteliais:*

0 - número inferior ou igual a 2 linfócitos intraepiteliais:100 enterócitos

1 - número entre 2 e 6 linfócitos intraepiteliais:100 enterócitos

2 - número superior a 6 linfócitos intraepiteliais:100 enterócitos

4.11 - Métodos imunohistoquímicos

A caracterização fenotípica da resposta inflamatória celular e de citocinas teciduais foi feita através do método imunohistoquímico da estreptavidina-biotina peroxidase conforme técnica habitualmente efetuada e padronizada no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.11.1 - Imunomarcação para determinação do fenótipo das células inflamatórias

Cortes histológicos com 4µm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com solução adesiva de 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO/USA, cód. A3648) e deixados em estufa a 60° C por 24h objetivando a melhor adesão dos cortes.

As lâminas com cortes histológicos foram submetidas a processos de desparafinização em xilol e hidratação em seqüência de álcool com concentração decrescente e água destilada. Posteriormente foram lavadas em PBS.

A eventual peroxidase endógena foi bloqueada através da utilização da solução de água oxigenada a 3%, submetendo-se as lâminas a três banhos de 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e solução de PBS pH 7.4.

Objetivando-se a melhor visualização de linfócitos CD4+ e CD8+, macrófagos CD68+, realizou-se a exposição antigênica através da utilização de calor úmido. As lâminas foram incubadas em tampão citrato 0,01M, pH 6.0 pré-aquecido a 85-90⁰C, por 20 minutos. Após esfriarem a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em tampão PBS, pH 7.4.

Para bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido, as lâminas foram incubadas com leite desnatado 10% (leite Molico Nestlé®) por 30 minutos a temperatura ambiente.

A etapa seguinte consistiu da incubação dos espécimes com os anticorpos primários, específicos aos antígenos a serem estudados, diluídos em solução de albumina bovina (BSA, SERVA cód. 11930) a 1% e permanecendo em geladeira a 4° C por 18h.

A seguir os cortes foram lavados em tampão PBS por 5 minutos e procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti a espécie animal do anticorpo primário, marcado com biotina com diluição de 1:1000 por 30 minutos a 37° C. Posteriormente foram lavados em PBS duas vezes por 5 minutos.

O próximo passo consistiu na incubação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO K 492) por 30 minutos a 37° C com posterior lavagem dos cortes em PBS por duas vezes durante 5 minutos.

Para a pesquisa de linfócitos TCD4+ e TCD8+ foi utilizado o sistema de amplificação de sinal denominado *Catalyzed Signal Amplification System* (CSA, DAKO cód. K1500), objetivando a obtenção de melhores resultados na detecção (Bobrow et al., 1989).

As reações foram reveladas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação.

A etapa final consistiu na lavagem dos cortes em água corrente por 10 minutos, contra-coloração com Hematoxilina de Mayer por 10 segundos, lavagem em água corrente por 5 minutos, desidratação em concentrações crescentes de álcoois e diafanização em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP 15-100).

4.11.2 - Imunomarcacão para detecção de citocinas

Após desparafinização, hidratação e bloqueio da peroxidase endógena como descrito anteriormente, foi feita a recuperação antigênica com solução de tripsina 0,02% em PBS pH 7.4, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em água destilada e em tampão PBS contendo saponina a 0,1% (SIGMA Chemical Co.; St. Louis, MO/USA, cód. S7900) durante 5 minutos.

Foi feita incubação com leite desnatado 10% (Molico, Nestlé®) em água destilada por 30 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti TNF α , IFN γ , IL-4, IL-10 diluídos em BSA 1%, “over night” a 4° C.

Após essa etapa foi feita lavagem em PBS + saponina 0,1% duas vezes 5 minutos cada e incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho ou camundongo ou cabra durante 45 minutos a 37° C.

Após nova lavagem em PBS + saponina 0,1% foi feito novo bloqueio de peroxidase endógena com 3 passagens de 5 minutos cada em solução de água oxigenada 3% e em seguida foi feita a lavagem em água corrente, água destilada em tampão PBS.

Foi realizada incubação com complexo SABC 1:1000 em PBS durante 30 minutos a 37° C. A revelação da reação foi feita como descrita anteriormente.

Como controle positivo das reações para as diferentes citocinas foram utilizados cortes histológicos de linfonodo reativo.

4.11.3 - Método de estreptavidina-biotina peroxidase para detecção de antígenos de leishmania

Descrevemos a seguir a metodologia para a detecção de antígeno de leishmania:

1. desparafinar as lâminas em um banho de xilol a 56° C por 30 minutos e um segundo banho em xilol a t.a. por 20 minutos;
2. hidratar as lâminas em seqüência de etanol absoluto, 95%, 80% e 70% por aproximadamente 5 minutos em cada um;
3. lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS;
4. bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3%, com três incubações de 10 minutos cada;
5. lavar em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS;

Neste momento faz-se a recuperação antigênica em panela a vapor (steam) a 85-90° C por 20 minutos em solução retrieval (DAKO pH baixo).

6. lavar em água corrente, água destilada e PBS;
7. incubação com o anticorpo primário coelho anti-L chagasi diluído 1:1000 em solução BSA 1% (4° C over-night);
8. lavar em PBS por 2 vezes de 5 minutos cada;
9. incubar com o sistema Envision (DAKO K1491) durante 30 minutos a 37°;
10. lavar em PBS por 2 vezes de 5 minutos cada;
11. revelar a reação com o substrato 3,3' Diaminobenzidine (DAB);
12. lavar em água corrente por 5 minutos;
13. contracorar com Hematoxilina de Mayer;
14. desidratar em álcool (70% - 100%) e colocar em xilol;
15. montar com resina.

Valoriza-se como positivo, além de formas amastigotas, material antigênico de padrão granular no citoplasma de células macrofágicas.

Esse anticorpo que foi utilizado foi produzido no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. (hfandrad@usp.br).

5 - RESULTADOS

Tabela 2 - Dados demográficos dos casos

IDENTIFICAÇÃO	NOME	IDADE	SEXO	ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA
03010800*	A B S X	3 anos	Feminino	Positivo
03016910*	T S	9 anos	Feminino	Positivo
03020024*	M T	1 ano	Masculino	Positivo
03011841*	D S	4 anos	Feminino	Positivo
PMT-0345**	J A	5 anos	Masculino	Positivo
03015165*	F A J N	2 anos	Masculino	Positivo
PMT-0368**	S R J	1 ano	Masculino	Positivo
03017477*	D C N	9 meses	Feminino	Positivo
03017478*	G G R S	3 anos	Feminino	Positivo
03019578*	C M S	4 anos	Feminino	Positivo
03019284*	R I F S	2 anos	Feminino	Positivo
04002487*	J F C	1 ano	Masculino	Positivo
03011293*	E C O	2 anos	Feminino	Positivo
04002996*	W G S	6 anos	Masculino	Positivo

*Identificação no Laboratório Médico de Anatomia Patológica Dr. Getúlio Sales

**Identificação no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias
Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP

A idade dos pacientes casos variou de nove meses a nove anos, sendo a média de 3,14 anos. A relação masculino/feminino foi de 6/8.

Tabela 3 - Dados demográficos dos controles

IDENTIFICAÇÃO	NOME	IDADE	SEXO
142094*	W F S	3 anos	Masculino
142095*	R J C	8 anos	Masculino
142096*	L B M	5 anos	Masculino
142458*	E R O S	4 anos	Masculino
142459*	A C P	8 anos	Masculino
142460*	T A S	8 anos	Feminino
142461*	M G VF	12 anos	Feminino
PMT-03-70**	L B S	10 anos	Masculino
PMT-03-71**	Y B	9 anos	Feminino

*Identificação no Laboratório de Anatomia Patológica da UFRN

**Identificação no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP

A idade dos pacientes controle variou de três a 12 anos, sendo a média de 7,6 anos. A relação masculino/feminino foi de 6/3.

Tabela 4 - Imunohistoquímica para detecção de antígeno de leishmania nos casos

IDENTIFICAÇÃO	PRESENÇA DO ANTÍGENO
03010800*	Positivo
03016910*	Positivo
03020024*	Positivo
03011841*	Positivo
PMT-0345**	Positivo
03015165*	Positivo
PMT-0368**	Positivo
03017477*	Positivo
03017478*	Positivo
03019578*	Positivo
03019284*	Positivo
04002487*	Positivo
03011293*	Positivo
04002996*	Positivo

*Identificação no Laboratório Médico de Patológica Dr. Getúlio de Oliveira Sales

**Identificação no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP

A presença do antígeno foi detectada em todos os casos.

Figura 3 - Marcante presença de leishmanias em um caso

Nesta Figura 3 se observa a riqueza de parasitas presentes na mucosa duodenal de um caso.

Tabela 5 - Imunohistoquímica para detecção de antígeno de leishmania nos controles

IDENTIFICAÇÃO	PESQUISA DO ANTÍGENO
142094*	Negativo
142095*	Negativo
142096*	Negativo
142458*	Negativo
142459*	Negativo
142460*	Negativo
142461*	Negativo
PMT-03-70**	Negativo
PMT-03-71**	Negativo

*Identificação no Laboratório de Anatomia Patológica da UFRN

**Identificação no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP

A pesquisa do antígeno de leishmania foi negativa em todos os controles.

Os resultados da análise morfométrica descritiva de casos e controles estão relacionadas nos Gráficos de número 1 a 9.

Gráfico 1 - Grau de autólise de casos e controles: Zero - ausência de autólise nos casos e controles

Neste Gráfico 1 verificamos que nenhuma das amostras analisadas apresentaram autólise. O que tornou as análises dos casos e controles factíveis.

Gráfico 2 - Relação vilo/crípta: 0 - normal 4:1 ou 5:1; 1 - entre 4:1 e 2:1; 2 < 2:1

A relação vilo/crípta estava anormal em todos os casos e de uma forma mais intensa em dois dos casos. Nos controles estava normal em dois dos nove.

Gráfico 3 - Tamanho da vilosidade: 0 normal; 1 - vilos presentes com relação vilo/crípta < 4:1; 2 - poucos vilos presentes, com relação V:C < 2:1; 3 - atrofia completa

Em todos os casos havia discreta atrofia das vilosidades e em um único esta atrofia foi mais intensa. Em três dos controles a vilosidade estava de tamanho normal.

Gráfico 4 - Tamanho da cripta: 0 - normal, com raras mitoses 40x; 1 - hiperplasia discreta, com 2-3 mitoses/campo 40x; 2 - hiperplasia evidente

Em sete dos 13 casos evidenciou-se uma hiperplasia discreta das criptas. Este fato foi observado em quatro dos nove controles.

Gráfico 5 - Intensidade do infiltrado inflamatório: 0 - poucas células inflamatórias na lâmina própria e vilosidades estreitas; 1 - aumento discreto; 2 - aumento significativo do infiltrado inflamatório na LP e vilosidades

O infiltrado inflamatório estava aumentado na quase totalidade dos casos, enquanto nos controles este fato somente ocorreu em dois pacientes.

Gráfico 6 - Presença de mononucleares: 0 - raros e esparsos linfócitos; 1 - pequeno número de linfócitos e plasmócitos na LP; 2 - aumento do número de mononucleares na LP e nas vilosidades

Neste Gráfico 6 observamos que em todos os casos houve um aumento considerável da presença de mononucleares na lâmina própria, fato que ocorreu somente em um único controle.

Gráfico 7 - Presença de neutrófilos: 0 - ausência; 1 - poucos neutrófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas em mais de 5 campos de 40x)

Com exceção do caso controle número 14, não se observou a presença de neutrófilos na mucosa duodenal dos casos e controles estudados.

Gráfico 8 - Presença de eosinófilos: 0 - ausência; 1 - poucos eosinófilos na LP (2 a 4 células facilmente observadas em mais de 5 campos de 40x)

A presença de eosinófilos não foi evidenciada em nenhum dos casos e apenas de forma discreta em dois casos controles.

Gráfico 9 - Presença de linfócitos intraepiteliais: 0 - até 2/100 enterócitos; 1 - entre 2 a 5/enterócitos; 2 > 6/100 enterócitos

Neste Gráfico 9 se observa que nos casos havia um aumento na contagem de linfócitos intraepiteliais em todos os casos. Enquanto que este fato ocorreu em apenas três crianças controles.

Os resultados da análise fenotípica está descrita nos Gráficos de número 10 a 12.

Gráfico 10 - Contagem da expressão de CD68/mm² em mucosa duodenal de casos e controles

Observamos neste Gráfico 10 que a média da contagem de CD68 está acima da contagem dos controles.

Tabela 6 - Comparação de médias da contagem de linfócitos CD68 entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	81,17
Controles	36,71

A média de contagem de CD68 nos casos foi significativamente maior que nos controles, utilizando-se o teste *T de Student* com $p=0,005$.

Figura 4 - Imunomarcação de linfócito CD68 em um caso

Na Figura 4 verificamos a imunomarcação de vários macrófagos na mucosa de um caso.

Gráfico 11 - Contagem da expressão de CD4/mm² em mucosa duodenal de casos e controles

Observamos neste Gráfico 11 que a contagem de linfócitos CD4/mm² foi maior nos casos que nos controles.

Tabela 7 - Comparação de médias da contagem de linfócitos CD4/mm² entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	230,4
Controles	156,9

A média de contagem de CD4 nos casos foi significativamente maior que nos controles, utilizando-se o teste de Mann-Withney com $p=0,040$. Teste da mediana $p=0,019$.

Figura 5 - Imunomarcação para linfócitos CD4

Na Figura 5 verificamos além da presença de formas amastigotas de leishmanias, a presença de CD4 marcados.

Gráfico 12 - Contagem da expressão de CD8/mm² de mucosa duodenal de casos e controles

Neste Gráfico 12 observamos que existe uma tendência, embora sem significado estatístico de um infiltrado de linfócitos CD8 maior na mucosa dos casos.

Tabela 8 - Comparação de médias da contagem de linfócitos CD8 entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	53,23
Controles	39,3

A média de contagem de CD8 nos casos foi semelhante aos controles, utilizando-se o teste T de student, com $p=0,396$.

O resultado da análise de citocinas está representada nos Gráficos de número 13 a 16.

Gráfico 13 - Contagem da expressão de INF- δ /mm² de mucosa duodenal de casos e controles

Observamos que em apenas um único caso foi detectada a presença de INF- δ em uma intensidade considerável. Quatro dos nove controles expressaram esta citocina.

Tabela 9 – Comparação de médias da contagem de linfócitos da expressão INF- δ /mm² entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	1,85
Controles	2,0

A média de contagem de INF- δ /mm² nos casos foi semelhante aos controles, utilizando-se o teste T de *Student* com $p = 0,8267$.

Tabela 10 - Frequência do encontro de INF- δ em casos e controles

ENCONTRO	CASOS	CONTROLES	TOTAL
INF- δ +	1	5	6
INF- δ -	12	4	16
TOTAL	13	9	22

A frequência da expressão de INF- δ nos casos foi menor que os controles, utilizando-se o teste de *Fischer*, com $p=0,023$, IC 0- 0,97, risco relativo de 0,22 (0,04 < RR < 1,36).

Figura 6 - Imunomarcção de IL-10 em um caso

Na Figura 6 se observa a presença de um linfócito que expressa a IL-10.

Figura 7 - Imunomarcção de IL-10 em um controle

Na Figura 7 se observa linfócitos que expressão IL-10 em um caso controle.

Gráfico 14 - Contagem da expressão de IL-10/mm² de mucosa duodenal de casos e controles

A presença de IL-10 foi verificada tanto em casos como nos controles, em apenas dois casos não se encontrou IL-10.

Tabela 11 - Comparação entre a média de expressão da IL-10/mm² entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	13,6
Controles	30,2

A média de contagem de IL-10/mm² nos casos foi semelhante aos controles, utilizando-se o teste *T de student* com $p=0,8968$.

Gráfico 15 - Contagem da expressão de IL-4/mm² de mucosa duodenal de casos e controles

A presença de IL-4 não foi verificada em nenhum dos casos ou controles.

Tabela 12 - Comparação das médias de encontro de IL-4/mm² entre casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	0,0
Controles	0,0

Não se observou diferença entre casos e controles na imunomarcagem de IL-4.

Gráfico 16 - Contagem da expressão de TNF- α /mm² de mucosa duodenal de casos e controles

A citocina TNF- α foi detectada em 3 casos e em apenas um único controle.

Tabela 13 - Média da expressão de TNF- α /mm² de mucosa duodenal de casos e controles

DESCRIÇÃO	MÉDIA/mm ²
Casos	0,0
Controles	0,0

A média de contagem de TNF- α /mm² nos casos e nos controles foi semelhante.

Tabela 14 - Frequência da expressão de TNF- α nos casos e controles

ENCONTRO	CASOS	CONTROLES	TOTAL
INF- δ +	3	1	4
INF- δ -	9	8	17
TOTAL	12	9	21

A frequência da expressão de TNF- α nos casos foi igual a dos controles, utilizando-se o teste de *Fischer*, com $p=0,41$, razão de *Oddis* = 2,67, CI 0,17 < IC < 82,24.

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Introdução

A leishmaniose visceral é uma doença de alta prevalência mundial e estudos que facilitem a compreensão da sua patogênese se fazem necessários (Melby, 2002). Neste estudo realizado em humanos poderemos compreender que a resposta imune frente a *L. donovani chagasi* pode ser compartimentalizado. Haveria respostas diferentes da imunidade celular e estas respostas dependeriam de vários fatores e dentre eles da resposta tecidual específica (Ajax et al., 1998).

6.2 - O infiltrado inflamatório na mucosa duodenal

Após a análise dos resultados morfológicos, evidenciamos, embora não se tenha submetido a uma análise estatística, que as leishmanias podem ter produzido algumas alterações inflamatórias inespecíficas na mucosa duodenal dos casos humanos de calazar.

Inicialmente detectamos que em nenhum dos casos a relação vilo/crípta estava normal, todos tiveram uma atrofia vilositária, sendo mais evidente em dois casos. Este fato poderia contribuir para uma redução da capacidade absorptiva de nutrientes, que facilitaria o estado de desnutrição não raro encontrado em crianças com calazar. Também há uma atrofia vilositária, embora em nenhum dos casos tenha se

encontrado uma atrofia vilositária total como se encontra na doença celíaca. Esta atrofia, de forma semelhante a alteração da relação vilo/cripta pode também contribuir para comprometimento do estado nutricional dos portadores do calazar.

Quando se analisou o tamanho das criptas não foi encontrado uma hiperplasia importante nos casos. As criptas funcionam como fonte de células que migram para as vilosidades após a morte programada das células epiteliais. Outros componentes importantes das criptas são as células com competência para a produção de hormônios, e como era de se esperar não deveriam sofrer modificações na vigência de um quadro de leishmaniose visceral plenamente manifesta.

O infiltrado inflamatório da lâmina própria foi mais evidente nos casos do que nos controles. Este infiltrado será detalhado mais adiante. A lâmina própria é um componente muito dinâmico da mucosa duodenal, ela é constituída por vários componentes: tecido conectivo, fibroblastos, células musculares, assim como vasos sanguíneos, linfáticos e nervos e é através dela que ocorre a dinâmica inflamatória da mucosa duodenal. Dentre todos os componentes citados o mais importante é o sistema imune (Segal et Petras, 1997). Este sistema é absolutamente dinâmico, havendo uma constante migração de componentes celulares do sistema imune, sendo estas células em geral imunocompetentes. Cinco tipos celulares são encontrados na lâmina própria: linfócitos B, que são os responsáveis pela produção de imunoglobulinas, linfócitos T principalmente do tipo CD4, eosinófilos, histiócitos ou macrófagos sempre em número menor que os linfócitos e *mast cells*. Os neutrófilos não são comumente encontrados na lâmina própria e os eosinófilos são encontrados apenas em um número discreto (Segal et Petras, 1997).

O que se verificou nesta investigação foi uma modificação no ambiente da lâmina própria. Esta modificação ocorreu pela presença de um infiltrado linfocítico. Não se evidenciou a presença de neutrófilos, o que marcaria uma doença bacteriana aguda ou a presença de eosinófilos o que poderia marcar uma doença parasitária por helmintos ou imunoalérgica. Este fato nos remete a uma forte possibilidade deste infiltrado ser devido a presença de um parasita que foi encontrado neste local a *Leishmania donovanni*.

Como e porque este infiltrado aconteceria? Acreditamos que devido a riqueza de vasos sanguíneos nesta região as leishmanias, após a inoculação pelos flebotomíneos, aí chegariam e encontrariam um ambiente propício a sua multiplicação.

6.3 - Estudos com Outras leishmanias que não a *L. donovani*

Muitos dos estudos sobre esta relação foram realizados com a *L. major* e as conseqüências clínicas não necessariamente poderão ser aplicadas em humanos (McMahon-Prat e Alexander, 2004), mas foram a partir deles que o modelo de uma resposta tipo Th1 ou Th2 foi estabelecido.

6.4 - Estudos com modelos animais

Modelos animais foram também utilizados, quer sejam animais resistentes à infecção pela leishmania, quer sejam muito susceptíveis (Murray, 2001). Em geral estes animais foram submetidos a inoculações artificiais por via intravenosa ou intradérmica, diferente do que ocorreria na natureza. É possível que estes

experimentos não reproduzam o que realmente ocorreria em hospedeiros humanos (Basu et al., 2000). Pelo fato de realizarem estudos produzindo artificialmente uma imunodepressão, seja desativando genes, seja administrando drogas imunossupressoras estes estudos se afastariam da realidade do campo (Murray, 2001).

6.5 - O paradigma da resposta Th1/Th2

Como citado anteriormente, o maior paradigma desta relação reside na resposta imune que pode ser do tipo Th1 ou Th2. Entretanto, os estudos que fundamentaram este tipo de resposta foram feitos com *L. major* e em camundongos, que podem ter uma resposta diferente daquela esperada em humanos (McMahon-Prat e Alexander, 2004).

Este tipo de resposta tem por base conceitos estabelecidos nos anos 80, onde ficou clara a dicotomia entre os linfócitos tipo Th1 e Th2. Na resposta Th1, haveria subpopulações de linfócitos que seriam capazes de ativar positivamente os macrófagos, assim como linfócitos B. Uma vez ativados os macrófagos seriam capazes de eliminar as leishmanias, produzindo assim a cura da infecção (Wilson et al., 2005).

6.6 - A inoculação das leishmanias pela picada pelo flebotomíneo

Durante a picada pelo flebotomíneo as leishmanias são inoculadas e, em poucas horas, mesmo antes da elaboração de uma resposta imune inata, os parasitas já são

encontrados em medula óssea e em outros órgãos do sistema monocitofagocitário. Acreditamos que neste momento algumas leishmanias poderiam chegar até a mucosa duodenal. Aquelas que permanecerem na pele serão reconhecidas pelas células dendríticas que induzirão uma resposta imune celular do tipo Th1 ou do tipo Th2 (Wilson, 2005; Cutler, Jotwani et Pulendran, 2001).

Um importante determinante desta resposta seria a genética do hospedeiro. Camundongos BALB/c susceptíveis montam uma resposta tipo Th2, com produção de IL-4, IL-10 e IL-13. Contrariamente, camundongos resistentes geneticamente fazem uma resposta tipo Th1 com produção de IL-12 e INF- γ , levando a resolução das lesões produzidas pela *L. major* (Wilson, 2005).

6.7 - A mucosa duodenal como ambiente tolerante à presença das leishmanias por ausência de IL-10

Uma vez chegando à mucosa duodenal as leishmanias encontrariam um ambiente imunotolerante. Por ser um órgão em íntimo contacto com o meio externo, a mucosa intestinal, embora rica em células do sistema imune apresenta-se como um órgão com resposta tipicamente do tipo Th2. Pois somente assim, seria capaz de diante de tantos estímulos antigênicos não produzir uma resposta inflamatória exacerbada com produção de ulcerações e dano tecidual grave. Este ambiente se caracteriza pela produção local de IL-10 (Sansonetti, 2004).

Conforme verificamos na Tabela 11 tanto os casos como os controles produzem IL-10 e embora não tenhamos evidenciado diferença estatisticamente significativa a média da contagem de linfócitos que expressavam a produção local de IL-10 foi de 30,2/mm² nos controles e de 13,6/mm² nos casos, com $p=8968$ (teste T de *Student*).

A produção nos casos teve média inferior daquela encontrada nos controles, assim há uma tendência de queda da produção local de IL-10. Qual seria, portanto o significado desta diferença? Se considerarmos os estudos da resposta Th1/Th2 nas leishmanioses era de se esperar uma riqueza de produção de IL-10 na mucosa dos casos induzido pelas células dendríticas.

Parece que neste local houve uma tentativa de modificar o ambiente imunotolerante para um ambiente mais responsivo à presença dos parasitas. Fenômeno semelhante ocorre em hamsters. Nestes animais, considerados susceptíveis, há o desenvolvimento de uma doença com curso frequentemente fatal, há uma verdadeira visceralização com invasão do fígado, baço e medula óssea (Murray, 2001). Diante de um animal tão susceptível, era de esperar uma ausência de resposta tipo Th2, mas se encontra em linfócitos de baço destes animais a produção de citocinas que lembram uma resposta Th1, detectando-se INF- γ , IL-2 e RNA mensageiro de TNF- α (Murray, 2001).

Nestes animais não se conseguiu detectar IL-4, ou apenas se encontrou em pequenas quantidades. Havia grandes quantidades de TGF- β e RNAm para IL-10. Havia pouca expressão de produção de óxido nítrico, levando-se a crer que haveria uma incapacidade de se eliminar os parasitas.

6.8 - A ausência de produção de IL-4

A produção de IL-4 não foi detectada nos casos e nos controles. Isto indicaria uma resposta do tipo Th1 ou Th2? A IL-4 seria a responsável pela não resolução de lesões produzidas pela *L. mexicana* e *L. amazonensi*, neste caso uma resposta tipo

Th2. Mas nos casos de *L.donovani* seria esta citocina responsável pela não cronificação da infecção e colaboraria no papel imunoprotetor em animais. Em humanos os resultados são contraditórios, pois a ausência da capacidade de produção do INF- γ seria inibida pela adição de anti-IL-4. Assim a IL-4 seria facilitadora da doença. A sua presença marcaria, portanto uma incapacidade em responder positivamente a esta infecção (Thakur, Mitra et Narayan, 2003).

Em pacientes sudaneses que se recuperam da leishmaniose visceral plenamente manifesta, as células T teriam capacidade de expressar tanto INF- γ como IL-4, o que poderia justificar mais uma vez que estes resultados contraditórios são provavelmente secundário as possíveis diferenças de uma resposta tecidual específica em cada órgão parasitado.

Na mucosa duodenal “normal” é de se esperar uma ausência de marcação de IL-4, conforme visto nos controles, e possivelmente como no caso da IL-10, marcaria um ambiente propício a multiplicação parasitária. E mais uma vez o paradigma Th1/Th2 estaria sujeito a particularidades teciduais.

A maior fonte de produção de IL-4 são os linfócitos CD4, conforme estudos de Kemp, (1999).

6.9 - O infiltrado macrofágico (CD68)

Como era de se esperar, sendo as leishmanias parasitas intracelulares de macrófagos, os casos apresentaram um importante infiltrado macrofágico em mucosa duodenal. Em comparação aos controles, a média de contagem de macrófagos nos casos foi de 81,1/ mm² enquanto que nos controles foi de 36,7/ mm², sendo o valor

de $p=0,005757$ (teste T de *Student*), portanto muito significativo. Eles seriam recrutados para o tecido, mas teriam a sua função antiparasitária ineficaz.

Não se encontrou a formação de granulomas. Há, ainda, uma grande quantidade de parasitas na mucosa. A presença das leishmanias na mucosa estaria na dependência da presença dos macrófagos, pois sem eles, por serem as leishmanias parasitas intracelulares, não haveria sua multiplicação (Badaró e Duarte, 1986). Os macrófagos representam um verdadeiro santuário para as leishmanias, deixando-as livres dos mecanismos microbicidas.

Quando se mobiliza uma resposta celular em torno de um agente invasor, esta resposta poderá ser formadora de granuloma associada ou não com destruição tecidual. A formação deste granuloma poderá se fazer em resposta a uma grande variedade de estímulos, inclusive agentes infecciosos. Trata-se de uma resposta imune especializada, bastante distinta daquela encontrada quando da formação de um abscesso (Murray, 2001).

O primeiro passo para a formação de um granuloma é a necessidade de uma reação específica a um antígeno. É mediada por células monocíticas, em geral lenta, mas ao contrário dos abscessos, é de longa duração. Qualquer agente infeccioso pode potencialmente produzir uma resposta formadora de granuloma, mas esta é muito mais provável de ocorrer se for um agente intracelular (Adams, 1976).

O objetivo da formação de um granuloma é a circunscrição do agente infeccioso e possivelmente a sua eliminação (Murray, 2001).

As leishmanias em geral induzem uma resposta granulomatosa em fígado, baço e medula óssea. Quando isto ocorre nos casos de infecção pela *L. donovani*, indica

uma resolução do quadro infeccioso. Para que se forme um granuloma há a necessidade do recrutamento de linfócitos T-dependentes (Murray, 2001).

Embora, ainda que diante de uma infecção pela *L. donovani*, se forme um verdadeiro granuloma, o parasita pode sobreviver e entrar em um estado de verdadeiro equilíbrio com o hospedeiro, quase que em um estado de latência. Há estímulos repetidos ao sistema imune do hospedeiro para que ele perpetue a resposta frente a este agente infeccioso, evitando assim, sua disseminação (Murray, 1999).

Esta relação parasita hospedeiro é muito complexa e não completamente compreendida. Mas sabe-se que a participação de efetores imunes, solúveis ou não, têm um papel nesta resposta (Murray, 2001).

Portanto o não encontro de granulomas na mucosa, contrariamente do que pode ocorrer no fígado representaria nos nossos casos um importante marcador de imunodepressão celular que contribuiria de sobremaneira para a perpetuação da doença.

6.10 - O infiltrado de linfócitos CD4+

O infiltrado na mucosa duodenal de linfócitos CD4+ foi de 2,30/ mm² contra 1,56/ mm² nos controles. A média de contagem de CD4 nos casos foi significativamente maior que nos controles, utilizando-se o teste de Mann-Withney com $p=0,040$, com teste da mediana $p=0,019$. Estes linfócitos aí localizados poderiam representar uma tentativa de se criar um ambiente hostil a presença das leishmanias, visto que são os linfócitos CD4 a maior fonte de INF- γ e IL-4 em indivíduos que se curaram da leishmaniose visceral (Kemp, 1999).

Acreditamos que este infiltrado de CD4 representaria uma tentativa de infiltrar o local com células potencialmente produtoras de citocinas com papel protetor contra as leishmanias.

6.11 - O infiltrado de linfócitos CD8+

Diferentemente da situação anterior não detectamos diferença estatisticamente significativa entre a contagem de linfócitos CD8 nos casos, que foi de 53,2/ mm² e dos controles, que foi de 39,3/ mm², com valor de $p = 0,396$ (teste T de *Student*). Mas poderíamos dizer que havia uma tendência de haver um infiltrado maior nos casos. O papel a ser desempenhado pelos linfócitos CD8 poderia ser semelhante ao do CD4, pois ambos poderiam produzir as mesmas citocinas. O que diferenciaria um do outro seria que os CD8 teriam uma menor capacidade de produção de citocinas.

6.12 - A ausência de produção de INF- γ

Conforme observamos na Tabela 9 a produção de INF- γ foi de 1,85/mm² nos casos e de 2,00/ mm² nos controles. Não houve diferença entre as médias com valor de $p=0,8267$ (teste T de *Student*). Entre os 13 casos, em somente um (PMT-03-45), havia a produção de INF- γ . A análise individual deste caso nada revelou de diferente dos outros casos selecionados de leishmaniose visceral. Entre os controles a produção de INF- γ foi verificada entre cinco dos oito controles. Quando se analisa a frequência da produção de INF- γ aplicando-se o teste de Fischer verifica-se que a frequência da produção do INF- γ foi significativamente maior nos controles que nos

casos com $p=0,0230791$, aplicado a correção de *Yates*. O valor do *Odds ratio* foi de 0,07, com intervalo de confiança de $(0,00 < OR < 0,97)$; o risco relativo foi de 0,22 com IC $(0,44 < RR < 1,36)$. Portanto embora não tenhamos verificado de uma forma quantitativa, pois o caso PMT-03-45 fez com que a média fosse mais alta entre os casos, quando verificamos a frequência da expressão tecidual de INF- γ ela é de forma significativa mais presente entre os controles, de acordo com a Tabela 10. Desta forma as leishmanias teriam um papel imunomodulador, impedindo a produção local do INF- γ .

6.13 - A ausência de produção do TNF- α

A produção de TNF- α não foi detectada nos portadores de leishmaniose visceral estudados assim como nos controles. Esta produção na mucosa intestinal em geral ocorre em resposta a uma agressão aguda que levaria a uma ativação dos macrófagos com a possibilidade de se produzir até necrose tecidual. Não seria de fato esperado que um órgão com tamanha imunotolerância produzisse TNF- α seja de forma natural ou em resposta a uma agressão pela leishmania.

6.14 - Considerações finais (contextualizando)

O hospedeiro poderá ser capaz de produzir uma resposta imune, mas uma causa externa poderá contribuir negativamente nesta modulação. A ausência de um oligoelemento, a desnutrição, o uso de medicação imunossupressora, uma infecção viral recente ou até mesmo a infecção pelo HIV podem desequilibrar esta relação e

justificar o desenvolvimento do agente infeccioso e a doença ocorreria de forma plenamente manifesta (Murray, 2001). A desnutrição está relacionada a disseminação do parasita pela baixa produção a nível do linfonódio de prostaglandina E2, IL-10 e óxido nítrico. Este fato não está relacionado a uma incapacidade de eliminar o parasita, mas há presença de uma fenda no linfonódio que facilitaria a disseminação do parasita (Melby, 2002). O adoecer depende de vários fatores. Por exemplo, camundongos ainda que susceptíveis as leishmanias, na dependência do número maior ou menor de parasitas inoculados podem ou não ter uma resposta que elimina os parasitas (Kebaier et al., 2001).

Era de se esperar que na mucosa duodenal de casos de calazar não se evidenciasse uma resposta inflamatória importante (Tanner, 1996). A resposta imune estudada em humanos em relação as leishmanias, foi evidenciada *in vitro* pela estimulação de linfócitos retirados do sangue periférico. Os linfócitos foram então estimulados artificialmente com antígenos de leishmania. Outros estudaram a resposta à leishmanias não produtoras de doença visceral, como a *L. major* (McMahon-Prat e Alexander, 2004).

Modelos animais foram também utilizados, quer sejam resistentes à infecção pela leishmania, quer sejam muito susceptíveis (Murray, 2001). Em geral foram submetidos a inoculações artificiais por via intravenosa ou intradérmica. Diferente do que ocorreria na natureza, é possível que estes experimentos não reproduzam o que realmente ocorre em hospedeiros humanos (Basu et al., 2000) pelo fato de realizarem estudos produzindo artificialmente uma imunodepressão, seja desativando genes, seja administrando drogas imunossupressoras estes estudos se afastariam da realidade do campo (Murray, 2001).

Muitos estudos de resposta tecidual em humanos utilizaram como base casos que evoluíram para óbito (Badaró e Duarte, 1986). E, como se sabe, esta evolução pode se dever a outros fatores associados à infecção pela leishmania, como por exemplo, infecções bacterianas graves, tipo sepsis, infecções virais graves como as hepatites infecciosas ou ainda a sangramentos vultuosos do trato digestivo. Alguns destes pacientes podem ter sido submetidos a tratamento prévio com antimoniais, usado antimicrobianos ou até mesmo corticosteróides.

Estudos de resposta imune, feitos em pacientes adultos (Carvalho et al., 1994) podem refletir queda da imunidade específica para a leishmania. Por outro lado, podem refletir casos de reativação de uma infecção subjacente. Este é um fato conhecido de outras infecções de caráter intracelular, como o que ocorre com a micobacteriose pelo *Micobacterium tuberculosis*. O adoecer de tuberculose pode dever-se a uma re-infecção ou reativação de um foco previamente controlado, sendo a reativação relacionada a desnutrição, uso abusivo de álcool, infecção pelo HIV, entre outras causas (Adams, 1996).

Então, um bom modelo para que se estude a verdadeira resposta imune seria a resposta em hospedeiros humanos, recentemente infectados, como o são as crianças. Esta foi a principal razão de se efetuar este estudo em crianças pequenas e moradoras de zona endêmica para a leishmaniose visceral.

E sabido que o intestino é afetado pelas leishmanias, esta demonstração já está estabelecida desde o século XX (Rodrigues da Silva, 1956). Mas, algumas perguntas frente a este fato, deverão ser feitas: em que momento as leishmanias atingiriam a mucosa duodenal? E de que maneira isto ocorreu? Como seria o comportamento da resposta imune?

Após a picada pelo flebotomíneo as leishmanias são fagocitadas pelas células dendríticas. Estas seriam incapazes de produzir uma resposta imune capaz de eliminar o parasita e, portanto haveria uma proliferação do parasita na pele. Esta resposta permitiria a existência de uma verdadeira parasitemia subclínica que poderia ser auto-limitada.

Por ser autolimitada, acreditamos que a maioria dos pacientes teriam um quadro clínico pobre que não o motivaria a ser submetido a consulta médica. Mas ainda que procurasse o serviço de saúde, esta possibilidade diagnóstica seria difícil de ser levantada, pois este diagnóstico habitualmente não é feito na unidade básica de saúde. O modelo de leishmaniose visceral conhecido na rede de saúde é o modelo de doença com febre prolongada, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (Badaró e Duarte, 1986).

Independente do modelo experimental utilizado, se animal ou estimulação *in vitro* deveremos pensar na dicotomia Th1/Th2. Nos pacientes com leishmaniose plenamente manifesta, os linfócitos tipo Th2 teriam a capacidade de inibir a resposta do tipo Th1. Haveria ainda um grupo de células capazes de expressar IL-10, subunidade CD25 e TGF- β , que seriam as células Th3, localizadas no intestino de animais de experimentação (Wilson et al., 2005).

Desta forma somando-se a dicotomia Th1/Th2 que teríamos do raciocínio anterior, possivelmente teremos três tipos de respostas: Th1, Th2 e Th3. A primeira caracterizada por uma produção de γ -interferon e TNF- α , a segunda pela produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 caracterizando uma resposta tipo Th2 e finalmente a produção de grande quantidade de TGF- β , caracterizando uma resposta, que poderia ser chamada de Th3 (Wilson et al., 2005).

Como a leishmaniose visceral tem um componente eminentemente crônico é de se esperar uma resposta polarizada (Alexander et Bryson, 2005).

Um importante determinante desta resposta seria a determinação genética. Camundongos BALB/c susceptíveis montam uma resposta tipo Th2, com produção de IL-4, IL-10 e IL-13. Contrariamente, camundongos resistentes geneticamente fazem uma resposta tipo Th1 com produção de IL-12 e γ -interferon, levando a resolução das lesões produzidas pela *L. major* (Wilson, 2005).

O motivo pelo qual os linfócitos Th2 perdem a capacidade de responder a IL-12 é devido à perda de expressão de receptores Beta1 e Beta2 para IL-12 (Wilson et al., 2005).

A resposta tecidual também tem um modelo tipo Th1 & Th2. Os camundongos são susceptíveis a infecção pelas leishmanias, mas ainda que sejam susceptíveis todos irão cicatrizar a lesões. Eles constituem um modelo ideal para que se estude doença auto-limitada ou sub-clínica produzida por uma determinada espécie de leishmania, no caso, tanto *L. chagasi* como *L. infantum* (Wilson et al., 2005). Contrariamente, os *hamsters* desenvolvem uma doença com curso freqüentemente fatal. Nestes animais há uma verdadeira visceralização com invasão do fígado, baço e medula óssea (Murray, 2001).

Nos *hamsters* a doença é muito parecida com os humanos. Entretanto, nestes animais quando próximo ao óbito, se encontra uma clínica secundária a produção excessiva de imunocomplexos que justifica uma lesão renal. Esta lesão se traduz por uma verdadeira glomerulonefrite e amiloidose disseminada. Além deste comprometimento há a presença de volumosa ascite. Embora se encontre glomerulonefrite em animais e em humanos, casos clássicos de glomerulopatias, são

eventos poucos comuns. Desta forma mais uma vez não poderemos apenas transpor este modelo experimental para os casos humanos. Casos humanos de calazar não evoluem com glomerulonefrite grave. E a ascite poderia se dever muito mais a uma hipoproteinemia grave, comumente vista nos casos de longa evolução, do que a uma glomerulopatia perdedora de proteínas (Wilson et al., 2005).

Estes fatos falam a favor de que este modelo é muito útil no entendimento da doença em humanos, mas ainda não seria um modelo perfeito. Estudos da relação parasita/ hospedeiro em humanos são, portanto de grande valia.

Na verdade deveremos sempre contextualizar os fatos. Pensar que a interação vai da capacidade do parasita em produzir infecção e doença, da susceptibilidade da espécie hospedeira, assim como dos seus determinantes genéticos e de fatores externos facilitadores ou atenuadores do evento adoecer.

Os determinantes genéticos parecem ser importantes determinantes na resposta a infecção. Cura, doença leve, doença grave e morte após a infecção pela leishmania podem ter razões genéticas. A susceptibilidade a leishmania, não seria específica a ela, mas seria uma susceptibilidade a muitos outros parasitas intracelulares como micobactérias, *Salmonella typhimurum*, *micobacteiium leprae*, *bovis*, entre outros (Wilson et al., 2005).

Existem alelos marcados, que determinariam a susceptibilidade a leishmania, o Lsh para leishmania, o Ity e o Bcg, cada um determinando uma susceptibilidade específica (Wilson, 2005).

Quando se observa a resposta orgânica frente a leishmania é possível que haja uma resposta órgão específica, ou seja, a resolução da infecção em um determinado órgão não seria suficiente para resolver a doença em outros órgãos (Wilson, 2005).

Nos *hamsters* após a inoculação de promastigotas na pele, em torno da quarta e sexta semana haverá a formação de um granuloma, com resolução do quadro. Entretanto, neste momento, já terá ocorrido a disseminação do parasita para outros órgãos. Portanto a resolução do quadro na pele não foi suficiente para resolver a visceralização e produção da doença e óbito tempo depois. Ter resposta imune contra as leishmanias não significa de modo algum ter uma resposta curativa (Alexander e Bryson, 2005).

Nos camundongos há um tropismo tecidual e orgânico das leishmanias inoculadas. Elas têm um crescimento maior no fígado em contraste com uma velocidade de crescimento menor no baço e na medula óssea (Murray, 2001).

Este fato está bem demonstrado tanto para *L. chagasi* como para *L. infantum*, tanto após a inoculação por via venosa, como pós inoculação intradérmica. Isto levaria a uma suposição de que o fígado seria um órgão de multiplicação inicial, enquanto o baço seria um órgão de perpetuação da doença.

É possível que estas respostas diferentes em cada órgão de fato ocorram. Assim, cada órgão, de cada mamífero susceptível, teria uma forma especial de se defender da invasão pelas leishmanias (Wilson et al., 2005).

A multiplicação dos parasitas no fígado e baço se daria em um momento em que a produção tecidual de γ -interferon e IL-12 estivesse ocorrendo em baixas quantidades (Wilson et al., 2005).

Experimentalmente a resposta em C57BL/6 e IL-12p40 de camundongos depletados é similar. Isto sugere que a resolução da infecção mediada por IL-12 teria um papel mais tardio (Wilson et al., 2005).

A formação de granulomas seria uma forma eficiente de resolver a infecção, entretanto isto não ocorre em animais ou pacientes imunocomprometidos. Estudos demonstraram que para que haja a formação de granulomas haverá a necessidade de participação de células CD4, CD8, IL-12, γ -interferon, IL-12 e IL-2. Haveria também a necessidade da participação de monócitos e produção do TNF- α (Murray, 2001).

Uma vez resolvida a infecção, um novo desafio com inoculação de leishmanias seria ineficaz, pois a resposta tecidual seria rapidamente montada e os parasitas seriam eliminados (Murray, 2001).

No baço a resposta seria sempre mais tardia, visto que o primeiro órgão alvo seria o fígado. Neste novo alvo as leishmanias poderiam sobreviver pelo resto da vida do animal (Wilson et al., 2005).

Neste órgão haveria uma produção importante de citocinas, IL-10, IL-12, γ -Interferon e TGF- β que são detectados por imunohistoquímica. Em camundongos não se encontra IL-4. O cultivo de células do baço mesmo no início da infecção revela que há uma resposta antígeno específica dos linfócitos em comparação com a resposta em células do fígado (Wilson et al., 2005).

Para que haja a destruição das amastigotas haverá a necessidade da produção do óxido nítrico que é estimulada pela ação do γ -interferon. Esta produção poderá ocorrer somente após a interação entre amastigotas e células dendríticas no baço (Wilson et al., 2005).

Na Tabela 12 observamos que tanto nos casos, como nos controles não se verificou a produção de IL-4, o que marcaria uma atividade do tipo Th2. A produção de IL-4 é fundamental na caracterização da ação Th2. Isto poderia ser justificado

pelo fato de que embora exista uma riqueza de parasitas, na verdade não haveria a representação de uma imunodepressão verdadeira. Seria a produção da IL-4 uma atribuição específica dos linfócitos circulantes em sangue periférico dos pacientes com calazar? Isto é possível, pois imaginando o GALT como um órgão linfóide independente do sistema retículoendotelial, os linfócitos aí localizados poderiam ter um comportamento diferente daqueles encontrados em outros órgãos.

Na Tabela 9 observamos que a produção do γ -interferon se fez de forma semelhante tanto em casos como controles. Entretanto a produção do γ -interferon ocorreu em apenas um único caso de todos os estudados. Nos controles observamos que habitualmente a produção desta citocina esteve presente. Neste caso poderemos imaginar que a supressão desta produção seria secundária a uma ação direta por parte das leishmanias ou que poderia haver uma outra célula capaz de inibir a produção do γ -interferon pelos linfócitos. Portanto, não seriam capazes de habilitar os macrófagos, agora repletos de leishmanias a produzirem os efeitos leishmanicidas através da produção de radicais de oxigênio. Se esta supressão se fez a partir da inoculação da leishmania na pele, no primeiro momento da infecção, ou se fez no momento em que aos parasitas chegaram no intestino será motivo da discussão a seguir.

Em primeiro lugar deveremos observar que nos controles entre os 9 analisados a presença de células que expressam a produção do γ -interferon, esteve presente em seis. Estes indivíduos estavam assintomáticos do ponto de vista infeccioso. E, como sabemos estavam em investigação de dor abdominal e que na sua grande maioria representavam casos de esofagite ou gastrite. Sabemos que, via de regra, as crianças são sempre tratadas com medicações antiparasitárias, seja para helmintos, seja para

protozoários, e às vezes até mesmo medicadas com ranitidina antes de serem submetidas a estudo endoscópico. Isto está de acordo com os achados encontrados de mucosa intestinal com poucas alterações. Seria portanto a produção do γ -interferon um evento normal. Embora, é claro, em pequenas quantidades. Nos estudos de (Murray, 2001) ficou evidenciada a compartimentalização da resposta imune frente ao calazar. Entre todos os casos do nosso estudo em apenas um único foi detectada a produção do γ -interferon.

Também teremos que discutir porque existe esta imunodepressão com baixa produção do γ -interferon. Não é produzido em linfócitos de sangue periférico, nem nos granulomas de animais susceptíveis. Na mucosa dos casos o ambiente era absolutamente facilitador da replicação das leishmanias. Não era um ambiente antileishmania, havia na verdade, uma verdadeira colaboração a persistência dos parasitas. Porque tanta tolerância a eles? Se anteriormente, estes pacientes eram capazes de produzir γ -interferon como verificado nos controles, se a maioria dos indivíduos na comunidade se tornam reativos ao Montenegro ou tem sorologia reativa, indicando altas taxas de infecção no campo, porque somente estes poucos adoecerão? Acreditamos ser muito pouco colocar a culpabilidade apenas nas leishmanias.

Quando o agente é absolutamente capaz de induzir doença, a maioria adoecerá. E até mesmo poderá evoluir para o óbito, como ocorre com o vírus da varicela ou da varíola no primeiro caso ou vírus da raiva ou ebola no segundo caso. Acredito ser pouco pensar assim. A relação infecção/doença no calazar pode chegar a 4-5 crianças infectadas para cada criança doente. Em estudos de campo observamos que é cerca

de 20% a taxa de prevalência de infecção assintomática em irmãos de portadores do calazar.

Determinantes genéticos têm sido recentemente implicados, mas não é a regra encontramos casos sintomáticos entre irmãos. Examinamos pessoalmente todos os irmãos dos nossos casos e não é fácil de se encontrar outros sintomáticos. O que observamos são casos esporádicos de leishmaniose visceral plenamente manifesta em comunidades onde ocorre a transmissão da doença.

Para os tropicalistas os determinantes das doenças são diferentes daqueles ditos pelos imunologistas. A visão dos antigos era muito mais complexa e contextualizada. Não poderemos reduzir uma doença como o calazar a uma simples visão da relação parasita/hospedeiro, como se aquele indivíduo fosse um elemento à parte do contexto onde ele vive.

Esta é a regra em doenças infecciosas. A taxa de transmissão do HIV é muito maior na África que nos EUA. A mortalidade por sarampo é maior nos desnutridos da Etiópia que nos bem nutridos americanos. Há nítidas diferenças na evolução de indivíduos infectados pelo HIV. Alguns evoluem de forma rapidamente progressiva, outros de forma lenta. Uns evoluem para AIDS plenamente manifesta em três ou cinco anos, outros levam até 20 anos e seguem sem sintomas clínicos. Qual a razão destas diferenças?

Porque o vírus C da hepatite tem evoluções distintas entre homens e mulheres? Porque a malária evolui de forma diversa, há casos fatais e não fatais, se a chance de infecção é a mesma para os indivíduos? Poderemos estar encontrando diferenças onde elas não existem.

Diferenças há no indivíduo, ele é único no mundo, e no seu comportamento. E no seu modo de se alimentar e nas doenças infecciosas que porventura venha a desenvolver. A exposição a radiação poderá levar ao desenvolvimento de doenças neoplásicas, o cigarro é um fator de risco para neoplasia de pulmão. O raciocínio para o calazar não poderia ser diferente (Dye et Williams, 1993).

Por princípio todos os indivíduos seriam capazes de produzir o γ -interferon. Vimos que os pacientes controles deste estudo o produz, o que nos leva a crer que os pacientes casos também o produza. Até os doentes conseguem recuperar esta capacidade, como demonstram os estudos feitos em indivíduos curados do calazar. Mas a sua incapacidade de produzir o γ -interferon ainda que no período de incubação marcaria o risco de adoecer.

A produção de γ -interferon pelo linfócito T, seria capitaneada a partir de uma ação de um linfócito CD4 *naive*, de comportamento Th1 e acreditamos que esta produção exista em todos os indivíduos. Indivíduos com incapacidade de produção do γ -interferon poderiam ser mais susceptíveis a apresentar outras doenças intracelulares como a tuberculose, mas não é comum, mesmo em epidemias de calazar, encontrarmos casos de tuberculose entre os portadores do calazar.

Quando a imunodepressão é ampla, como nos portadores do HIV, a doença oportunista é a regra. Encontramos a neurotoxoplasmose, neurocriptococose, doenças neoplásicas oportunistas como linfoma não Hodking, o sarcoma de Kaposi entre outras.

No calazar não são comuns as infecções oportunistas. O paciente não tratado morrerá ao final de seis meses ou um ano após o início da doença por uma infecção, mas a infecção será geralmente do tipo bacteriana. Ou morrerá de um importante

sangramento em uma proporção menor dos casos. Como é sabido há uma pancitopenia. Em raras situações o calazar poder simular uma doença auto-imune revelando-se como uma doença da modulação imune.

Então poderíamos crer que, o que existe não é uma imunodepressão, mas sim uma imunodepressão específica frente ao patógeno leishmania. Pelo menos no início das manifestações clínicas, que posteriormente por tratar-se de uma doença fatal, evoluiria para uma imunodepressão generalizada, mas principalmente com um forte componente de deficiência humoral e fagocítica, que justificaria as infecções bacterianas graves. O déficit de produção do γ -interferon seria específico e somente ocorreria se os linfócitos T fossem desafiados pelos antígenos das leishmanias.

O papel dos linfócitos CD4 e CD8 na leishmaniose visceral, não está muito bem estabelecido. Como já foi amplamente citado, a regra é que os pacientes com leishmaniose visceral plenamente manifesta, apresentem uma pancitopenia o que é muito claro pela coleta dos hemogramas nestes pacientes. Se eles têm uma linfopenia tão grave, muitas vezes abaixo de 1000 linfócitos, porque não veríamos tão facilmente casos de pneumonia pelo *Pneumocystis jiroveci*.

A IL-10 seria a mais potente citocina imunossupressora em casos humanos de calazar (Alexander e Bryson, 2005).

Isto significaria que possivelmente a mucosa duodenal seria um local onde a produção de citocinas com perfil Th2 seria um evento normal. Possivelmente isto ocorreria em virtude da necessidade de uma regulação negativa da resposta imune. Pelo fato de aí ser um local onde haveria uma alta possibilidade da chegada de novos antígenos seja pela alimentação ou através de novos agentes infecciosos.

Uma resposta local exagerada poderia levar estas crianças a quadros de alergia alimentar graves, que colaborariam para uma desnutrição protéico energética grave ou mesmo fenômenos alérgicos mais importantes frente aos helmintos e protozoários. O intestino seria um órgão da imunodeficiência em crianças.

Na prática médica os quadros diarréicos de origem infecciosa em populações de baixa renda são quase uma regra. E fenômenos alérgicos seriam, portanto, muito danosos às crianças. Seria preferível conviver com uma maior quantidade de parasitas sem uma importante reação imune. Na tentativa de eliminá-los, via resposta inflamatória, poderia desenvolver até mesmo lesões ulceradas ao nível da mucosa intestinal de caráter grave.

Ao chegar na mucosa duodenal via monócitos circulantes as leishmanias encontrariam um ambiente formado por macrófagos residentes com competência para fagocitá-las, mas incapazes de serem estimulados por citocinas leishmanicidas, como por exemplo, γ -interferon.

Os parasitas então, entrariam em um verdadeiro estado de multiplicação exacerbada, contribuindo para as manifestações clínicas do paciente. Contrapondo-se aquela resposta encontrada no fígado de pacientes com calazar, que embora doentes, os pacientes têm uma pobreza parasitária neste local quando comparados com o baço.

Qual seria o papel dos macrófagos, porque eles estariam tão presentes na mucosa intestinal, conforme vimos na Tabela 6 há um importante infiltrado macrofágico. Poderíamos inclusive caracterizar uma enterite macrofágica, se os macrófagos não têm função protetora, porque seriam achados na mucosa duodenal?

Seriam monócitos previamente infectados e circulantes que migrariam para a mucosa, acreditamos que isto seja pouco provável.

As leishmanias chegariam na mucosa duodenal através de uma pequena parasitemia, produzida após a inoculação na pele e proliferação em macrófagos cutâneos. Estes se romperiam e liberariam as leishmanias em corrente sanguínea. Aquelas que chegassem no fígado seriam bloqueadas pela resposta formadora de granuloma com produção de um ambiente antileishmania. Outras seriam fixadas no baço e o mesmo fenômeno poderia ocorrer, mas aquelas que chegassem no intestino pela pobreza imune se reproduziriam nos macrófagos.

Haveria posteriormente a chegada de mais macrófagos na mucosa duodenal. Estes novos macrófagos seriam incapazes de formar uma resposta efetiva, conforme já explicitado, através da formação de um granuloma eficaz. Também é possível que granulomas fossem primariamente formados, mas que poderiam posteriormente permitir a proliferação das amastigotas quiescentes. Isto poderia ser verdade principalmente nos casos de associação HIV/leishmania, onde a apresentação clínica e o diagnóstico laboratorial diferem da forma clássica da leishmaniose visceral. A ação da IL-10, que foi detectada em pequenas quantidades na mucosa duodenal, inclusive dos indivíduos normais, poderia explicar a transformação de um granuloma eficaz que se formaria após a infecção, em cerca de duas semanas, em um granuloma permissivo após este período.

Pelo menos esta é a nossa tese.

7 - CONCLUSÕES

- ✓ As leishmanias produziram um quadro de inflamação na mucosa duodenal dos portadores da leishmaniose visceral plenamente manifesta.
- ✓ A inflamação deveu-se a um infiltrado tipicamente mononuclear.
- ✓ Os linfócitos que predominaram na mucosa intestinal foram principalmente do tipo CD68 e CD4.
- ✓ O infiltrado macrofágico foi significativamente maior nos casos que nos controles.
- ✓ A mucosa duodenal por naturalmente produzir IL-10 seria um local propício a reprodução e moradia das leishmanias.
- ✓ A resposta leishmanicida através da produção de INF- δ e TNF- α esteve ausente na maioria dos casos estudados.

8 - ANEXOS

Anexo 1

PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO: “AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES IMUNOHISTOLÓGICAS DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO EM PACIENTES PORTADORES DA LEISHMANIOSE VISCERAL”

FICHA CLÍNICA

Primeira visita:

IDENTIFICAÇÃO:

1. Registro do hospital _____
2. Registro no protocolo de pesquisa _____
3. Data da coleta do material e exame clínico ____/____/____
4. Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
5. Endereço: _____
6. Ponto de referência: _____
7. Pai: _____
8. Mãe: _____
9. É portador de calazar: ____SIM____NÃO
10. Febre: ____SIM____NÃO
11. Dias de febre: _____
12. Hepatomegalia: ____SIM ____NÃO ____cm AX:____cm RCD
13. Esplenomegalia: ____SIM ____NÃO ____cm RCE
14. Termo de consentimento assinado pelo responsável legal ____SIM____NÃO

Resultados dos exames da primeira coleta:

1. Hemograma Hb____/Ht____/leucócitos____mil/dl
2. Contagem de plaquetas____mil

3. Biópsia intestinal estudo morfométrico:

Grau de autólise: _____

Relação vilo:cripta: _____

Tamanho da vilosidade: _____

Cripta: _____

Processo inflamatório:

- a) Intensidade: _____
- b) Mononucleares: _____
- c) Neutrófilos: _____
- d) Eosinófilos: _____
- e) linfócitos intraepiteliais: _____

Biópsia intestinal estudo imunohistoquímico:

CD4/mm² _____CD8/mm² _____CD68/mm² _____IL-10/mm² _____IL-4/mm² _____Gamma-interferon/mm² _____TNF- alfa/mm² _____

Pesquisa do antígeno de leishmania _____

Resultados dos exames da segunda coleta:

- 1. Hemograma Hb___/Ht___/leucócitos_____mil/dl
- 2. Contagem de plaquetas_____mil

Investigador principal _____

Natal, ___/___/___

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005 Jun 15;99(1):17-23.

Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following leishmania donovani infection. *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4709-18.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 1996 Apr-Jun;2(2):145-6.

Badaro R, Jones TC, Lorengo R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*. 1986 Oct;154(4):639-49.

Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A, Carvalho JS, Barral-Netto M, Brandely M, Silva L, et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med*. 1990 Jan 4;322(1):16-21.

Badaro R, Duarte MIS. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R, Focaccia R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1996. 1234-57.

Basu A, Chakrabarti G, Saha A, Bandyopadhyay S. Modulation of CD11C+ splenic dendritic cell functions in murine visceral leishmaniasis: correlation with parasite replication in the spleen. *Immunology*. 2000 Feb;99(2):305-13.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988 May-Jun;10(3):560-86.

Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*. 2002 Sep 10;20(27-28):3277-84.

Cutler CW, Jotwani R, Pulendran B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4703-8.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*. 2003 Feb 15;326(7385):377-82.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 May-Jun;95(3):239-43.

Dye C, Williams BG. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. *Proc Biol Sci.* 1993 Oct 22;254(1339):33-9.

Fernandez Cotarelo MJ, Abellan Martinez J, Guerra Vales JM, Martinez Sanchez P, Rodrigo Gomez De La Barcena M, Salto Fernandez E. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis.* 2003 Oct 1;37(7):973-7.

Fernandez-Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mojer F, Muniz G, de Gorgolas M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop.* 2004 Mar;90(1):11-6.

Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following leishmania donovani infection. *Infect Immun.* 2001 Aug;69(8):4709-18.

Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 Jul-Aug;88(4):386-8.

Julia V, McSorley SS, Malherbe L, Breittmayer JP, Girard-Pipau F, Beck A, Glaichenhaus N. Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with leishmania major. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5637-45.

Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Jan;25(1):26-30.

Kebaier C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild leishmania major isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4906-15.

Sinha PK, Rabidas VN, Pandey K, Verma N, Gupta AK, Ranjan A, Das P, Bhattacharya SK. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Bihar, India. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Jan 1;32(1):115-6.

Luz KG, Succi RC, Torres E. [Vitamin A serum level in children with visceral leishmaniasis] *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Jul-Aug;34(4):381-4.

Manson P. *Maladies des Pays Chauds - Manuel de Pathologie Exotique* [traduit de l'anglais par Mauric Guibaud]. 2e édition d'après la 4e édition anglaise. Paris: Masson et Cie. Éditeurs; 1908.

McGuigan JE, Amet ME. Estómago y duodeno - Anatomía, embriología y anomalías del desarrollo. In: Sleisenger MH, Fordtran JS. *Enfermedades Gastrointestinales. Fisiopatología Diagnóstico Tratamientos*. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1985. 598-617.

Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with leishmania donovani. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):18-27.

Melby PC. Recent developments in leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Oct;15(5):485-90.

Muigai R, Gatei DG, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson AD. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet*. 1983 Aug 27;2(8348):476-9.

Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Aug;45(8):2185-97.

Murray HW. Kala-azar--progress against a neglected disease. *N Engl J Med*. 2002 Nov 28;347(22):1793-4.

WHO (World Health Organization) / OPS (Organización Panamericana de la Salud). *Leishmaniasis en las Americas - situación atual y alternativas para su control*. Washington (DC): Oficina Sanitária Panamericana; 1996.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG, Ozcel MA. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Sep;59(3):363-9.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov;2(11):845-58.

Sartor RB. Mucosal immunology and mechanisms of gastrointestinal inflammation. In: Sleisenger MH, Fordtran JS. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2002. 21-34.

Segal GH, Petras RE. Small intestine. In: Sternberg SS. *Histology for Pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. 495-518.

Sigulem DM, Devincenzi MU, Lessa AC. [Diagnosis of child and adolescent nutritional status]. *J Pediatr*. 2000 Nov;76(3):S275-84.

Silva R. Tese apresentada na Cadeira de Doenças Tropicais e Infectuosas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Distrito Federal. Editado pelo Serviço Nacional de Educação Sanitária - Rio de Janeiro; 1957.

Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Dec;15(6):593-8.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis*. 2003 Sep 15;37(6):800-4. Epub 2003 Aug 28.

Tanner CE. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Feb;78(2):105-11.

Thakur CP, Sinha GP, Pandey AK, Barat D, Singh RK. Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. *Bull World Health Organ*. 1994;72(6):931-6.

Thakur CP, Mitra DK, Narayan S. Skewing of cytokine profiles towards T helper cell type 2 response in visceral leishmaniasis patients unresponsive to sodium antimony gluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 Jul-Aug;97(4):409-12.

Timerman A. *Comprometimento intestinal na leishmaniose visceral americana*. [Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1990.

Vieira JB, Coelho GE. [Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31 Suppl 2:85-92.

Walker-Smith JA, Phillips AD, Richman PI. Intestinal biopsy. In: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkin JB. *Pediatric Gastrointestinal Disease*.

Pathophysiology. Diagnosis. Management. Philadelphia: BC Decker Inc.; 1991.
1307-24.

Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing leishmania species. *Microb Pathog.* 2005 Apr;38(4):147-60.

World Health Organization - Expert Committee: Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO; 1995.

Wurtz R, Thiroux A. Calazar. In: *Diagnostic et Sémiologie des Maladies Tropicales.* Paris: Manson et cte. Paris Editeurs; 1905.