REGIANE MATHIAS

Internalização de imunoglobulinas por células endoteliais do fígado, pulmão e rim na leishmaniose visceral em hamster

Dissertação apresentada
à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências. Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

São Paulo

2001

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mathias, Regiane

Internalização de imunoglobulinas por células endoteliais do fígado, pulmão e rim na leishmaniose visceral em hamster / Regiane Mathias. — São Paulo, 2001.

Dissertação(mestrado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Hiro Goto.

Descritores: 1.HAMSTERS 2.IMUNOGLOBULINAS 3.ENDOTÉLIO/
imunologia 4.LEISHMANIOSE VISCERAL/patologia

USP/FM/SBD-152/01

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e contou com o suporte financeiro de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo no. 98/15414-3/ bolsa de mestrado) e apoio do Laboratório de Investigação Médica (LIM-38 HC-FMUSP).

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários pertencentes ao reino Protista, especificamente ao filo Mastigophora, que inclui todos os protozoários que possuem um ou mais flagelos e reprodução assexuada por divisão binária. Pertencem à ordem Kinetoplastida, caracterizada pela presença de um cinetoplasto, e à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1987). Todas as espécies de *Leishmania* exibem um ciclo de vida heteroxênico semelhante. São encontradas como formas flageladas extracelulares, promastigotas, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e como formas arredondadas e sem flagelo externo, amastigotas, intracelulares obrigatórias de hospedeiros vertebrados, e sua multiplicação se dá por divisão binária. O tamanho da forma promastigota varia muito; o corpo mede, em geral, 10,0 a 20,0 x 1,5 a 3,0 μm , com um flagelo freqüentemente muito maior que o corpo. A forma amastigota mede de 2,5 a 1,5 x 6,8 a 4,5 μm , dependendo da espécie do parasito (Lainson & Shaw, 1987).

As principais espécies causadoras de leishmanioses são classificadas, segundo Lainson & Shaw (1987), de acordo com o seu desenvolvimento dentro do vetor, em dois subgêneros: *Leishmania* (parasitos que têm seu desenvolvimento limitado ao estômago do vetor) e *Viannia* (parasitos que se aderem pelo flagelo às paredes do piloro e/ou do íleo). O subgênero *Viannia* está dividido em quatro complexos: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *naiffi* e L. (V.) *lainsoni*. Já o subgênero *Leishmania* está dividido em 11 complexos: *Leishmania (Leishmania) hertigi*, L. (L.) *mexicana*,

L. (L.) amazonensis, *L. (L.) enrietti*, *L. (L.) arabica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) gerbilli*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Thomas–Soccol et al., 1993). Para Lainson & Shaw (1987) as espécies *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* também pertencem ao subgênero *Viannia* e *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) aristidesi* e *L. (L.) venezuelensis* ao subgênero *Leishmania*.

A ocorrência das espécies de *Leishmania* é normalmente limitada à distribuição do vetor, que é determinada geograficamente. Os vetores pertencem à subfamília Phlebotominae, que é dividida em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Na Europa, na Ásia e na África (Velho Mundo) os vetores das espécies causadoras das leishmanioses visceral e cutânea são do gênero *Phlebotomus*. Nas Américas (Novo Mundo) os vetores são do gênero *Lutzomyia* (Pearson & Queiroz Sousa, 1996). A *Lutzomyia longipalpis* é o vetor da *Leishmania (L.) chagasi* e outras espécies de *Lutzomyia* são vetores dos agentes das leishmanioses tegumentares americanas. Certas espécies do vetor são encontradas em florestas, outras são endêmicas em regiões de deserto e algumas são peridomiciliares, residentes em restos de lixo ou entulhos próximo às casas ou construções em áreas rurais (Lainson & Shaw, 1987), e recentemente foram encontradas em áreas urbanas, como é o caso da cidade de Araçatuba no Estado de São Paulo, onde foram registrados surtos de leishmaniose visceral em cães.

Entre os hospedeiros vertebrados incluem-se uma grande variedade de mamíferos. As infecções mais comuns ocorrem em roedores e canídeos, sendo conhecidas também em edentados (tamanduá, preguiça e tatu), marsupiais (gambá), procionídeos (mão-pelada e quati) e primatas (inclusive o homem) (Lainson & Shaw, 1987).

Existem diferentes formas clínicas de leishmaniose, sendo as principais as formas tegumentar e visceral, determinadas por espécies diferentes do parasito.

No Velho Mundo a leishmaniose tegumentar está associada principalmente às espécies *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*. No Novo Mundo as espécies causadoras de leishmaniose tegumentar são a *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1987).

O agente etiológico da leishmaniose visceral no Velho Mundo (Índia e leste da África) é a *Leishmania (L.) donovani*, na China, na Ásia Central, no sudeste da Europa e Mediterrâneo é a *Leishmania (L.) infantum* e no Novo Mundo (América Latina) é a *Leishmania (L.) chagasi* (Lainson & Shaw, 1987 e 1992). No Brasil a leishmaniose visceral ocorre em 19 dos 27 Estados brasileiros (Fundação Nacional de Saúde, 1999). A região com o maior número de casos (89%) é a Nordeste, seguida pela região Sudeste (6%), pela região Norte (4%) e pela região Centro-Oeste (1%) (Monteiro et al., 1994). Por ser uma doença endêmica, constitui-se em um crescente e importante problema de saúde pública e sócio-econômico. O aumento na incidência da doença, associado à alta taxa de mortalidade, à disseminação para novas áreas geográficas e a sua urbanização, é motivo de preocupação crescente para as autoridades de saúde pública do País (Brandão-Filho & Shaw, 1994).

A leishmaniose visceral é uma doença espectral com manifestações clínicas que podem ser agrupadas em três formas. A forma assintomática é caracterizada por sorologia positiva para leishmaniose mas sem nenhuma manifestação clínica, sendo encontrada em áreas endêmicas. A forma

oligossintomática, também encontrada em áreas endêmicas, é caracterizada por sorologia positiva e presença de sinais e/ou sintomas discretos como febre, hepatomegalia e/ou esplenomegalia de pequeno grau. A forma clássica é a doença plenamente manifesta, caracterizada por hepatoesplenomegalia volumosa, febre, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e grande comprometimento do estado geral (Badaró et al., 1986). A leishmaniose tegumentar apresenta-se nas formas cutânea, muco-cutânea e cutânea difusa (Lainson & Shaw, 1994), está presente principalmente no continente americano, não cicatriza com o tempo e apresenta o teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (reação de Montenegro) negativo (Bryceson et al., 1970).

No estudo da leishmaniose visceral experimental o modelo animal mais utilizado é o de camundongo de linhagens isogênicas, das quais algumas se comportam como suscetíveis e outras como resistentes a infecção por *Leishmania donovani*. Segundo Bradley (1987), camundongos da linhagem BALB/c e algumas linhagens congênicas de C57BL/10 são considerados suscetíveis a infecção por *Leishmania donovani*. Nessas linhagens, porém, há progressão da infecção somente nas primeiras semanas, ocorrendo controle posterior da replicação do parasito com formação de granuloma (Murray et al., 1987 e Barbosa Júnior et al., 1987). Quando os camundongos da linhagem C57BL/10 são comparados aos DBA/2, considerados resistentes, o que se observa é a demora na formação do granuloma na linhagem suscetível, porém não se estabelece uma progressão da doença como forma clássica de leishmaniose visceral humana (Barbosa Júnior et al., 1987).

Outro modelo para estudar leishmaniose visceral e que desenvolve alterações semelhantes à doença humana é o cão. No cão as leishmanioses são causadas pelos mesmos agentes que provocam a doença no homem (Schaefer et al., 1994). As manifestações clínicas no cão também são classificadas como forma assintomática, quando somente apresenta sorologia positiva para leishmaniose; como forma oligossintomática, quando apresenta sinais inespecíficos (adenopatia, perda de peso e esplenomegalia leve), e como sintomática, com ulcerações cutâneas, ceratoconjuntivite, unhas crescidas, esplenomegalia evidente e comprometimento do estado geral (Pozio et al., 1981).

Para o estudo da doença propriamente dita, em sua forma manifesta, o hamster é considerado um bom modelo experimental para o estudo da leishmaniose visceral. Sua utilização é decorrente da descoberta de sua suscetibilidade à infecção por *Leishmania donovani*, fato observado inicialmente por Young et al. (1919). Um estudo sistematizado do hamster em relação a outros animais foi publicado em 1958 por Stauber. Nesse estudo, o hamster foi considerado, ao lado do chinchila, como extremamente suscetível à infecção por leishmânia, ao contrário de coelhos e ratos brancos, que são resistentes à infecção. Hamsteres desenvolvem doença comparável à humana, com perda de peso, hipertrofia do baço e fígado (Melleney, 1925 e Stauber, 1958), hipergamaglobulinemia e uma depressão da resposta imune celular específica e inespecífica (Bunn-Moreno et al., 1985 e Pearson et al., 1992). Recentemente, Requena et al. (2000), inoculando promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* por via intracardíaca, mostraram que hamsteres podem desenvolver dois tipos de infecção: sintomática e assintomática. A

forma clínica assintomática foi dividida em dois subgrupos: oligossintomático e assintomático propriamente dito. O grupo de animais que não desenvolveram sinais externos da doença mas que apresentaram esplenomegalia e moderada carga parasitária no baço e no fígado foi considerado oligossintomático. O outro grupo de hamsteres foi considerado assintomático, com base na ausência de sinais clínicos da doença e pelo fato de anticorpos formadores de imunocomplexos, como um sinal potencial da patologia, não estarem presentes no tecido renal. Esses mesmos autores acreditam que hamsteres são excelentes modelos experimentais para a pesquisa de um grande número de doenças infecciosas humanas e que são apropriados para o desenvolvimento de vacinas.

Quando inoculado na pele do hospedeiro, o parasito multiplica-se em células do sistema fagocítico mononuclear, acometendo principalmente órgãos como o baço e o fígado, que fazem parte desse sistema, podendo contudo atingir praticamente todos os órgãos (Wilcocks e Manson-Bahr, 1972; Corbett et. al., 1992; Duarte et al. 1983 e 1989; Duarte & Corbett 1987). A infecção compromete também órgãos do trato gastro-intestinal, do sistema nervoso central, do sistema genital e do sistema urinário (Alencar, 1959; Evans e Rebêlo, 1996). No baço e no fígado a alteração predominante é a hiperplasia e a hipertrofia de células do sistema fagocítico mononuclear (Wilcocks e Manson-Bahr, 1972; Duarte & Corbett, 1987), onde ocorre proliferação dos parasitos. Em outros tecidos, a alteração apresenta-se sob forma de processo inflamatório intersticial (Duarte et al., 1983; Duarte et al., 1989).

Na descrição anátomo-patológica da leishmaniose visceral no homem feita por Duarte (2000) verificaram-se as alterações histopatológicas nos

vários órgãos expostas a seguir. No baço foi observada esplenomegalia acentuada decorrente da reatividade do sistema fagocítico mononuclear, com muitos macrófagos parasitados por amastigotas. Verificou-se diminuição dos linfócitos dos folículos linfóides, redução dos linfócitos T e infiltração de plasmócitos e macrófagos. Focos de amiloidose na polpa branca ou nos sinusóides foram eventualmente observados. As alterações hepáticas foram classificadas em três padrões: típico ou clássico, nodular e fibrogênico. No padrão típico ou clássico, o órgão está aumentado de volume, amastigotas são observadas em células de Kupffer hipertrofiadas e em hiperplasia à microscopia óptica. Nos lóbulos e nos espaços porta existe infiltrado linfoplasmocitário focal e fagocitose de parasitos. No padrão nodular observa-se, além de hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, formação de agregados de células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) com pequeno número de amastigotas fagocitadas. No padrão fibrogênico verifica-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear portal e intralobular, focos múltiplos de fibrose intralobular e hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer e raras amastigotas. No pulmão foi observada pneumonia intersticial caracterizada por espessamento dos septos alveolares por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células intersticiais com inclusões lipídicas. O infiltrado de células mononucleares não mostrou preferência por nenhuma área específica do parênquima. Congestão de capilares septais e edema discreto foram observados. O comprometimento septal encontrado foi multifocal. A etiologia leishmaniótica dessa pneumonia intersticial foi confirmada pela presença de material antigênico no citoplasma dos macrófagos e livre no interstício septal. Amastigotas foram pouco encontradas e quando presentes

eram visualizadas no citoplasma de macrófagos ou livres na luz alveolar. O acometimento renal é expresso clínica e laboratorialmente por proteinúria, hematúria macroscópica, aumento de uréia e creatinina no soro, acidificação urinária e diminuição do *clearance* de creatinina. Ocorre insuficiência renal provocada por nefrite intersticial de intensidade variada, cujos achados principais são edema e múltiplos focos de infiltrado de mononucleares. Amastigotas são raramente encontradas. Alterações morfológicas ocorrem essencialmente no mesângio, que sofre espessamento membranoso ou hialino da matriz acompanhado de hipertrofia e hiperplasia de células mesangiais, as quais raramente fagocitam amastigotas.

Há evidências de que na leishmaniose visceral as lesões são mediadas imunologicamente devido a escassez de parasitos em alguns órgãos onde há injúria. Na leishmaniose visceral a imunidade celular é considerada importante tanto na proteção quanto na suscetibilidade (Sacks et al., 1993; Reiner, 1995 e Murray et al., 1987). No entanto, no homem e em modelo experimental ocorre hipergamaglobulinemia devido à ativação policlonal de linfócitos B (Campos-Neto et al. 1982; Galvão Castro et al., 1984, Bunn-Moreno et al., 1985). Os anticorpos anti-*Leishmania* não têm efeito protetor evidente na infecção (Sacks et al., 1993), mas esses anticorpos podem estar envolvidos potencialmente na patogenia das lesões tissulares. O mecanismo patogênico até hoje aceito na leishmaniose visceral é o mediado por imunocomplexos. No pulmão a lesão foi correlacionada com a presença de antígeno de *Leishmania* (Duarte et al. 1989). No rim as lesões glomerulares na leishmaniose visceral tanto no homem quanto em modelos experimentais têm sido atribuídas a deposição de imunocomplexos (Weisinger et al., 1978;

Sartori *et al.*, 1987; Poli *et al.*, 1991), porém a presença de antígeno não foi demonstrada por Brito *et al.* (1975). Entretanto, a escassez de antígeno e o tipo de infiltrado celular não são totalmente compatíveis com esse mecanismo.

Em modelo murino de lupus eritematoso sistêmico, lesões glomerulares foram induzidas por anticorpos (IgG3) derivados de clones de hibridomas, resultando em lesões glomerulares proliferativas e em alça de arame com características semelhantes às que são encontradas na nefrite lúpica humana (Itoh *et al.*, 1993). A análise da sequência do gene dessas imunoglobulinas desencadeadoras de lesões lúpicas mostrou que há poucas mutações somáticas na região variável da cadeia pesada (Ono *et al.*, 1995), diferindo de outros autoanticorpos como anticorpos IgG anti-DNA e fatores reumatóides IgG observados nesses modelos (Shlomchik *et al.*, 1990, 1987), que se supõem causadores de lesões por imunocomplexos (Theofilopoulos *et al.*, 1985). Observou-se que esses anticorpos eram internalizados por células endoteliais (Nose, comunicação pessoal). A internalização de imunoglobulinas por células vivas foi relatada inicialmente por Alarcón-Segovia *et al.* (1979), que observaram esse fenômeno em linfócitos T, e na ocasião foi correlacionada a autoperpetuação da doença autoimune. O estudo desse mecanismo tinha sido abandonado na última década, tendo sido retomado nos últimos anos. Recentemente, têm surgido relatos de internalização de imunoglobulinas envolvendo diferentes células. Yanase *et al.* (1997) observaram a internalização de anticorpos monoclonais anti-DNA, provenientes de modelo experimental de lupus eritematoso sistêmico, em células da linhagem de hepatoma. Imunoglobulinas de soros de pacientes com mieloma foram internalizadas por células de túbulos renais proximais (Batuman *et al.*, 1997).

No estudo realizado por Ronda et al. (1997) verificou-se a internalização de imunoglobulinas normais em células endoteliais humanas.

Nossos dados preliminares utilizando soros de pacientes com leishmaniose visceral indicam a possibilidade da existência de mecanismo de internalização de imunoglobulinas pelas células endoteliais vinculada à patogenia da inflamação na leishmaniose visceral (Goto et al. 1997).

Os fenômenos que ocorrem no processo inflamatório são caracterizados como irritativos, vasculares e exsudativos. Os fenômenos irritativos ocorrem em resposta ao agente inflamatório, resultando na liberação de mediadores químicos, perdurando por tempo variável durante a inflamação, variando de caso para caso. Os mediadores de liberação imediata são responsáveis pelo início dos fenômenos vasculares, que são representados por modificações hemodinâmicas e reológicas da microcirculação dirigidas pelos mediadores químicos durante os fenômenos irritativos e, menos freqüentemente, por ação direta dos agentes desencadeadores de inflamação. As modificações são atribuídas à vasoconstrição e vasodilatação arteriulares. A vasoconstrição arteriolar é imediata ao estímulo inflamatório e pode ser mediada pela ação do agente agressor sobre fibras nervosas vasoconstritoras. Na lesão vascular direta pode haver liberação de endotelina-1, que participa ativamente da vasoconstrição. Na vasodilatação arteriolar induzida pela ação da histamina, da substância P, da bradicinina, da PGE_2 , da PGI_2 e do PAF (mediadores químicos) aumenta o fluxo sanguíneo para a área agredida, levando a hiperemia e ao aumento da pressão hidrostática na microcirculação. Os mediadores das alterações hemodinâmicas aumentam a permeabilidade vascular, iniciando a transudação plasmática que precede a migração celular.

Ainda nessa fase, há produção de substâncias vasodilatadoras, como a prostaciclina (PGI_2) e o óxido nítrico (NO). Na exsudação celular, ocorre deslocamento dos leucócitos da região central da corrente sanguínea para a periferia do vaso (marginação leucocitária), onde inicia o evento de aderência desses ao endotélio (Pereira, 2000). A mais importante atividade pró-inflamatória do endotélio é a expressão de receptores para as várias famílias de moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos, sendo caracterizadas a molécula-1 de adesão leucocitária (E-selectina ou ELAM-1), a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula-1 de adesão à células vasculares (VCAM-1). A E-selectina participa ativamente da fase inicial da resposta inflamatória, tendo papel primordial na fixação inicial de neutrófilos nas vênulas dos tecidos periféricos, e também pode contribuir para a ligação inicial a outros tipos de células inflamatórias. VCAM-1 participa em uma fase mais tardia mediando a fixação inicial de linfócitos T de memória e de leucócitos que expressem molécula de integrina. Semelhante à VCAM-1, a ICAM-1 é induzida no mesmo curso de tempo, porém é mais crítica para a transmigração de leucócitos. As células inflamatórias, os linfócitos T e os neutrófilos interagem com ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente através de LFA-1 e de Mac-1. As alterações que ocorrem na superfície das células endoteliais são mediadas por citocinas e levam à adesão de neutrófilos, linfócitos e monócitos, seqüencialmente, que participam ativamente do processo inflamatório.

O fator de necrose tumoral (TNF), produzido por linfócitos e macrófagos, participa de todas as fases do processo inflamatório. Estimula as células endoteliais a liberarem quimiocinas (IL-8 e proteína quimiotática para

neutrófilo), que agem separadamente sobre os leucócitos aumentando o tropismo de Mac-1 e LFA-1 pelo ICAM-1. Também estimula a migração dos leucócitos, bem como a locomoção celular, o que desencadeia o extravasamento leucocitário (Abbas et al., 1998; Ballermann, 1997; Rosenberg e Gallin, 1999). As células endoteliais têm papel importante, tanto nas fases de vasoconstrição e vasodilatação arteriolas quanto na exsudação plasmática e celular, no desencadeamento do processo inflamatório.

Considerando a importância das células endoteliais no processo inflamatório e considerando a possibilidade da presença de um mecanismo alternativo de lesão na leishmaniose visceral, avaliamos neste trabalho a internalização de imunoglobulinas por células endoteliais na leishmaniose visceral em hamsteres.

OBJETIVO GERAL

Estudo da participação de imunoglobulinas na patogenia dos processos inflamatórios no fígado, no pulmão e no rim de hamsteres infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Objetivos Específicos

- Estudar a evolução da infecção em hamsteres com leishmaniose visceral.
- Avaliar os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de hamsteres durante a evolução da leishmaniose visceral.
- Avaliar o tipo de reação inflamatória, a distribuição da lesão e a intensidade da reação no fígado, no pulmão e no rim de hamsteres com leishmaniose visceral.
- Detectar IgG, complemento (C3) e antígeno de *Leishmania* no fígado, no pulmão e no rim nos vários tempos de infecção.
- Estudo ultraestrutural da localização do depósito de imunoglobulinas em fígado, pulmão e rim de hamsteres com leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) *out bred*, machos, de 45 a 60 dias de idade e camundongos isogênicos BALB/c, machos, de 45 a 60 dias de idade fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) foram mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo durante o experimento, recebendo ração e água à vontade.

Parasitos

Parasitos da cepa de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) foram mantidos em hamsteres por inoculação intraperitoneal de homogeneizado de baço de hamster infectado com o parasito, a cada dois ou três meses.

Parasitos da cepa de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* IOC - L 185 (WHOM/BR/ OO-LTB-0016) foram mantidos por inoculação subcutânea de amastigotas semipurificadas de lesão cutânea de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar de camundongos BALB/c.

Preparo de amastigotas de *L. (L.) chagasi* purificadas para inoculação em hamsteres

Hamsteres com aproximadamente dois a três meses de infecção foram sacrificados sob anestesia com éter etílico, sendo o baço retirado assepticamente, pesado, macerado e as amastigotas purificadas segundo

Dwyer (1976) modificado. Resumidamente, os baços foram homogeneizados em meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA) frio, a suspensão celular foi deixada por 10 minutos em gelo para sedimentação, em seguida filtrada em gaze, passada quatro vezes por agulha fina (24G) e centrifugada a 250g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 250g por 10 minutos e o sobrenadante resultante centrifugado a 2100g por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio RPMI 1640 e a concentração de parasitos ajustada para 2×10^7 /ml em meio RPMI 1640.

Preparo do antígeno para sorologia

A lesão de pele de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* foi removida assepticamente, cortada em fragmentos pequenos que foram colocados em meio NNN coberto com meio LIT. O cultivo em massa prosseguiu em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (Imunoquímica, RJ) inativado pelo calor. Os parasitos foram processados na fase estacionária de crescimento. Foram lavados em solução de salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,4 (PBS) por três vezes a 1200g por 10 minutos. Após incubação do sedimento por 18 horas numa solução de formalina a 2% em PBS, à temperatura ambiente, as formas foram lavadas por três vezes em PBS e ressuspensas no mesmo tampão, ajustada a concentração para se ter aproximadamente 40 formas por campo microscópico (aumento 40X), e gotejadas em lâminas próprias para reação de imunofluorescência. Depois de secas a 37 °C, foram armazenadas a -20 °C até o uso.

Protocolo Experimental

Hamsteres foram inoculados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* em meio RPMI 1640 e sacrificados após 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 102 dias de infecção. Foram mantidos animais controles injetados com meio RPMI 1640 e sacrificados nos mesmos tempos. No momento do sacrifício foram coletados sangue e órgãos: baço, fígado, pulmão e rim.

Determinação da carga parasitária no baço e no fígado (Stauber, 1958)

O baço e o fígado de todos os animais foram pesados. Dos animais infectados foram feitos *imprints* em lâminas, fixados em metanol por dois minutos e corados com Giemsa. Em vários campos de cada lâmina contou-se o número de células e de parasitos correspondentes até que se chegasse à quantidade de mil células ou parasitos. A carga parasitária no órgão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$(\text{n}^\circ \text{ parasitos} / \text{n}^\circ \text{ células}) \times \text{peso do órgão (em mg)} \times 2 \times 10^4$$

Deteccção de anticorpos anti-*Leishmania*

O sangue foi coletado por via retroorbital no momento do sacrifício e foi separado o soro, que foi mantido a -20°C até o uso. Diluições seriadas do soro em PBS foram incubadas com antígenos preparados em lâminas, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após serem lavadas três vezes em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo de coelho fluoresceinado anti-imunoglobulina de hamster (produzido em nosso laboratório) diluído em azul de Evans 2 mg % em PBS, por 30 minutos, a 37°C , em câmara úmida. Após

nova lavagem por três vezes em PBS, as lâminas foram fixadas com glicerina tamponada com solução carbonato-bicarbonato e a leitura foi realizada em microscópio de fluorescência de epiluminação (Olympus, Japão).

Processamento para histopatologia

Fragmentos de fígado, pulmão e rim, fixados em formol 10% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4, foram processados pela técnica histológica de rotina e corados com Hematoxilina/Eosina (HE). A avaliação histopatológica foi feita ao microscópio óptico. O tipo de reação inflamatória e a distribuição da lesão foram observados e a intensidade da reação foi avaliada semiquantitativamente numa escala de 0 a 4+ onde: 0 = normal, 1 = mínima ou duvidosa, 1+ = média, 2+ = moderada, 3+ = moderadamente severa e 4+ = severa.

Detecção de imunoglobulina e complemento em tecidos de hamster pela técnica de imunofluorescência direta

Fragmentos de fígado, pulmão e rim foram embebidos em Tissue-Teck II (Leica, Alemanha) e congelados em N₂ líquido e armazenados a -70 °C até o uso. Os fragmentos foram submetidos a cortes histológicos de 4 μ de espessura em criostato D6900 (Heidelberg Microm) e armazenados a -20 °C até o uso. Para a feitura de reações as lâminas foram fixadas em solução de álcool-éter (1:1 vol/vol) por três minutos, lavadas em PBS contendo 0,05% Tween 20 por 10 minutos. As amostras congeladas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, em câmara úmida, com anticorpos de coelho fluoresceinados anti-imunoglobulina de hamster na diluição 1:10 em azul de Evans 2 mg % e

anti-C3 de hamster (Laurenti, 1996) na diluição 1:20 em azul de Evans 2 mg %, lavadas em PBS-0,05% Tween 20, fixadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato e a leitura realizada em microscópio de fluorescência.

Detecção de IgG e antígeno de *Leishmania* em tecido de hamster por técnica imunoenzimática

As amostras de tecido (fígado, rim e pulmão) foram desparafinadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico. Foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol por 30 minutos no escuro e tratadas em forno de microondas (Sanyo, Brasil) na potência máxima em solução Tris-HCl, pH 1,0, por 15 minutos (Shi et al., 1998).

Para detecção de antígeno de *Leishmania* em fígado e rim de hamsteres com leishmaniose visceral, as amostras foram processadas utilizando o sistema *immunoperoxidase catalyzed signal amplification* (CSA – Dako Corporation). O bloqueio de reações inespecíficas, para detecção de antígeno de *Leishmania*, foi realizado de acordo com protocolo preconizado pelo fabricante (Dako Corporation). Os tecidos foram incubados em câmara úmida *overnight* a 4 °C com anticorpo policlonal de camundongo anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (produzido no nosso laboratório) na diluição de 1:1600 em PBS. Seguiram-se as etapas de amplificação da reação, seguindo as instruções do fabricante. As incubações foram feitas em câmara úmida a 37 °C, intercaladas por lavagens em PBS. Para detecção de antígeno de *Leishmania* no pulmão, utilizou-se anticorpo biotinilado de cabra anti-imunoglobulina de camundongo (Dako Corporation), na diluição de 1:1600

em PBS, como anticorpo secundário em substituição ao anticorpo de ligação do sistema CSA.

Para a detecção de IgG utilizou-se o sistema streptavidina/peroxidase. As amostras foram tratadas com reagentes do Blocking Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) e incubadas com soro normal de cabra diluído 1:20 em PBS. As amostras foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4 °C com anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de hamster (Rockland, EUA) na concentração de 20 µg/ml em PBS. Em seguida foram incubadas com o complexo streptavidina/peroxidase na diluição 1:100 em PBS. As incubações foram feitas em câmara úmida a 37 °C, intercaladas por lavagens em PBS.

Tanto os cortes processados para detecção de antígeno de *Leishmania* quanto os para detecção de IgG foram revelados com solução 3,3'-diaminobenzidina 0,3 mg/ml em PBS com 0,06% de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical, USA) e a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harrys (Sigma Chemical, USA).

Detecção de imunoglobulina em tecido por técnica de imuno-eletrônica

Fragmentos de tecido de cerca de 0,3 mm³ foram fixados por duas horas em paraformaldeído 4% e aldeído glutárico 0,2%, ácido pícrico 0,2% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 com sacarose 2,5%. Foram lavados quatro vezes por 30 minutos cada com tampão fosfato 0,1M com 3,5% de sacarose, pH 7,4 por duas horas a 0 °C. Para bloqueio dos grupos aldeídicos livres usou-se cloreto de amônia 50 mM em tampão fosfato 0,1 M com 3,5% de sacarose, pH 7,4 por uma hora a 0 °C. Para iniciar a desidratação, os fragmentos de tecidos

foram lavados brevemente com etanol 50% a 0 °C. Em seguida, lavaram-se duas vezes em etanol 70% por 10 minutos cada lavagem, etanol 90% duas vezes por 15 minutos cada, etanol 95% por 15 minutos e etanol 100% por 15 minutos. Após a desidratação seguiu-se o processo de inclusão em LR White hard grade (Sigma, EUA) / etanol 1:1 (vol:vol) por 30 minutos, LR White:etanol 3:1 (vol:vol) duas vezes por 30 minutos cada, LR White:etanol 3:1 (vol:vol) *overnight* na geladeira, LR White puro duas vezes por 30 minutos, LR White puro *overnight* na geladeira e antes da inclusão em cápsula de gelatina trocou-se a resina mais uma vez e deixou-se em temperatura ambiente por uma hora. Após incubação em LR White os fragmentos foram colocados em cápsulas de gelatina que foram preenchidas até a borda com LR White puro e conservadas em estufa a 52 °C por três a cinco dias, para polimerização.

Cortes ultrafinos foram colocados em telas de níquel (Sigma, EUA) cobertos com formvar. Após hidratação com tampão fosfato de Sorensen (TPS) pH 7,4 por cinco minutos, as telas foram bloqueadas com TPS pH 7,4, 0,05% Tween 20, 10% de soro fetal bovino, quatro vezes por 15 minutos cada. Foram incubadas *overnight* em câmara úmida na geladeira com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de hamster diluído em TPS pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1% de albumina bovina sérica purificada (BSA- Sigma, EUA), foram lavadas de quatro a cinco vezes em TPS pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1% BSA. Antes da incubação com proteína A-ouro 10 nm (Sigma, EUA) diluída 1:50 em TPS 0,02M pH 7,4 – 1% BSA por uma hora em câmara úmida a temperatura ambiente, foi feito bloqueio com gelatina de peixe (Sigma, EUA) 0,5% em TPS 0,02M pH 7,4, três vezes por cinco minutos cada. Após quatro lavagens de quatro minutos em TPS pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1% de BSA purificada,

lavaram-se por um minuto em água destilada, fixaram-se em glutaraldeído aquoso 2% por 15 minutos, lavaram-se novamente três vezes em água destilada. Incubaram-se por cinco minutos com tetróxido de ósmio aquoso 2% lavaram-se três vezes em água destilada por 15 minutos. Secaram-se a temperatura ambiente e em seguida foram incubadas, para contraste, com uranila ultrafiltrada por 10 minutos, lavadas várias vezes rapidamente em água destilada e por três minutos com chumbo, sendo novamente lavadas em água destilada. Os cortes ultrafinos processados foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL. Os campos de interesse foram eletromicrografados, analisados e submetidos a análise morfométrica.

Morfometria

As eletromicrografias foram analisadas para quantificação de imunoglobulinas depositadas nos tecidos, marcadas por partículas de proteína A-ouro. Para isso, utilizou-se uma folha transparente quadriculada (cada quadriculado de 1 cm²) que foi sobreposta às eletromicrografias. Delimitou-se a área de cada estrutura e foram contadas as partículas de proteína A-ouro a cada cinco quadrados, contando assim 20% da área. Como as células endoteliais ocupam uma área pequena, foram contadas integralmente. Para avaliar os depósitos inespecíficos de proteína A-ouro, foram contadas partículas encontradas sobre o núcleo das células que foram consideradas não específicas e subtraídas da contagem de outras estruturas. Utilizaram-se cortes de tecidos de fígado, pulmão e rim de 3 a 5 animais infectados com 30 e 60 dias e de 1 a 3 animais controles não infectados. A análise morfométrica foi

realizada num total de 43 eletromicrografias de fígado, em 39 de pulmão e em 79 de rim.

Análise estatística

Os dados de imunodeteção de imunoglobulinas em tecidos analisados à microscopia eletrônica foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Sigma Stat (Sigma, EUA). Foram analisados pelos testes One way ANOVA e de Student-Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis e Dunn.

RESULTADOS

Evolução da infecção em hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi*

A carga parasitária foi avaliada nos tempos de 7 (n=20), 15 (n=26), 30 (n=18), 60 (n=10) e 90 (n=5) dias pós-infecção (PI), observando-se um aumento progressivo, tanto no baço quanto no fígado, com a evolução da infecção (Tabela 1).

Tempo pós-infecção (dias)	Carga Parasitária ($\times 10^4$)	
	Baço	Fígado
07 (n=20)	0,25 $\pm$ 0,32	7,89 $\pm$ 9,21
15 (n=26)	0,69 $\pm$ 0,58	25,69 $\pm$ 24,36
30 (n=18)	7,92 $\pm$ 6,73	175,38 $\pm$ 112,36
60 (n=10)	21,77 $\pm$ 11,02	434,49 $\pm$ 206,63
90 (n=5)	567,70 $\pm$ 254,00	8425,04 $\pm$ 4863,38

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão da carga parasitária ($\times 10^4$) no baço e no fígado de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas purificadas de *L. (L.) chagasi* em diferentes tempos de infecção. N= número de animais.

Evolução do título de anticorpos anti-*Leishmania* em hamsteres com leishmaniose visceral

Determinou-se o título de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de hamsteres e observou-se um aumento progressivo dos níveis com a evolução da infecção (Figura 1).

Figura 1. Título de anticorpos (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) anti-*Leishmania* de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* nos vários tempos de infecção. Teste de imunofluorescência indireta. * $P < 0,05$ em comparação aos tempos anteriores de infecção (testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls).

Histopatologia do fígado, pulmão e rim de hamsteres com leishmaniose visceral

Os aspectos histopatológicos de fígado, pulmão e rim (3-4 animais), corados por Hematoxilina-Eosina (HE) foram analisados em cada tempo de infecção. O tipo de reação inflamatória, a distribuição da lesão e a intensidade da reação foram analisados. Alterações progressivas foram observadas, mas com constituição diferente do infiltrado inflamatório nos vários tempos de infecção. Nos animais controles não infectados não se observou nenhuma alteração significativa.

Observou-se no fígado um aumento progressivo da hipertrofia e hiperplasia difusa das células de Kupffer aos 7 dias PI até 80 dias PI (Figuras 2 e 3). Aos 102 dias PI a hiperplasia tornou-se menos evidente. Focos de células mononucleares foram observados aos 7 dias PI, inicialmente nos espaços periportal e centrolobular e tornando-se mais disseminados sem preferência por nenhuma zona em particular nos tempos posteriores (Tabela 2) (Figuras 4, 5, 6 e 7).

ALTERAÇÕES		
Dias PI	Hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer	Células do Infiltrado Inflamatório
7 – 15	+	Mononucleares
30 – 45	+	Mononucleares e Polimorfonucleares Neutrófilos
45 – 80	+	Mononucleares
102	-	Mononucleares

Tabela 2. Alterações histopatológicas em fígado de hamsteres com leishmaniose visceral nos diferentes tempos de infecção. Número de animais: 3 a 4 por grupo. Coloração: HE.

Figura 2. Fígado de hamster controle não infectado. Ausência de alterações histopatológicas. HE. 440x.

Figura 3. Fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 45 dias PI. Hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer. 440x. Em destaque (no canto inferior esquerdo), células de Kupffer hipertrofiadas ($\uparrow$) HE. 690x.

Figura 4. Fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* aos 7 dias PI, apresentando infiltrado inflamatório focal periportal de células mononucleares (↑). HE. 440x.

Figura 5. Fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* aos 30 dias PI, apresentando infiltrado inflamatório focal periportal de células mononucleares e polimorfonucleares. 440x. Em destaque (no canto inferior esquerdo), células mononucleares (→) e polimorfonucleares (↑). HE. 690x.

Figura 6. Fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 80 dias PI, apresentando focos de infiltrado inflamatório de células mononucleares disseminados ($\uparrow$). HE. 440x.

Figura 7. Fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 102 dias PI, apresentando infiltrado inflamatório macrofágico focal periportal. 440x. Em destaque (no canto inferior esquerdo), presença de macrófagos ($\rightarrow$). HE. 690x.

No pulmão, focos de espessamento septal pela congestão, edema e um misto de infiltrado inflamatório de polimorfonucleares neutrófilos e células mononucleares foram observados aos sete dias PI (Figuras 8 e 9). A inflamação aumentou progressivamente e gradualmente os polimorfonucleares neutrófilos foram substituídos por infiltrado de células mononucleares. Dos 30 dias PI aos 102 dias PI somente células mononucleares estavam presentes (Tabela 3) (Figura 10).

ALTERAÇÕES		
Dias PI	Espessamento do septo	Células do Infiltrado Inflamatório
7 – 15	+	Mononucleares e Polimorfonucleares Neutrófilos
30 – 102	+	Mononucleares

Tabela 3. Alterações histopatológicas em pulmão de hamsteres com leishmaniose visceral nos diferentes tempos de infecção. Número de animais: 3 a 4 por grupo. Coloração: HE.

Figura 8. Pulmão de hamster controle não infectado. Ausência de alterações histopatológicas. HE. 440x.

Figura 9. Pulmão de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 7 dias PI, apresentando espessamento septal por congestão, edema e infiltrado inflamatório de polimorfonucleares neutrófilos e células mononucleares. HE. 440x.

Figura 10. Pulmão de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* aos 102 dias PI, apresentando espessamento septal e infiltrado inflamatório caracterizado principalmente por células mononucleares. HE. 440x.

No rim, observaram-se hipercelularidade glomerular e aumento da matriz mesangial aos 30 (Figuras 11 e 12) e 45 dias PI, diminuindo nos tempos 60-80 dias PI. Aos 102 dias PI observou-se substituição da matriz mesangial por depósito de substância eosinofílica amorfa (Tabela 4) (Figura 13).

ALTERAÇÕES		
Dias PI	Hipercelularidade (glomérulo)	Matriz mesangial
7 – 15	Ausência	Normal
30 – 45	Aumento	Aumento
60 – 80	Diminuição	Diminuição
102	Ausência	Diminuição

Tabela 4. Alterações histopatológicas em rim de hamsteres com leishmaniose visceral nos diferentes tempos de infecção. Número de animais: 3 a 4 por grupo. Coloração: HE.

Figura 11. Rim de hamster controle não infectado. Ausência de alterações histopatológicas. HE. 440x.

Figura 12. Rim de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 30 dias PI, apresentando hiper celularidade glomerular e aumento da matriz mesangial. HE. 440x.

Figura 13. Rim de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, apresentando hipocelularidade glomerular e substituição da matriz mesangial por depósito de substância amorfa eosinofílica (↑) aos 102 dias PI. HE. 440x.

Deteccão de imunoglobulina e complemento em tecidos de hamster infectado com *L. (L.) chagasi* com a técnica de imunofluorescência direta

Foram realizados seis experimentos de infecção em hamsteres com *L. (L.) chagasi* e os depósitos de imunoglobulina e C3 nos tecidos foram observados.

No fígado, foram detectadas imunoglobulinas aos 15 e 30 dias PI acompanhando o sinusóide (Figura 14). Nos tempos posteriores quase não se observaram depósitos de imunoglobulina. Depósitos de C3 foram de pequena intensidade, não diferindo dos controles não infectados.

No pulmão foram encontrados depósitos de imunoglobulinas nos septos alveolares nos tempos de sete a 30 dias PI com intensidade progressiva (Figura 15). Quanto à C3, observaram-se depósitos de pequena intensidade comparados aos controles.

No rim, aos sete dias PI foram verificados depósitos de imunoglobulina de baixa intensidade. Com 15 e 30 dias PI foram observados depósitos de imunoglobulina no glomérulo e ao redor dos túbulos, sendo de maior intensidade aos 30 dias PI (Figura 16). Nos tempos de 60 e 90 dias PI, os depósitos eram de menor intensidade. Depósitos de C3 foram observados com fraca intensidade somente nos tempos de 15 e 30 dias PI.

Figura 14. Deposição de imunoglobulinas (Igs) em tecido de fígado de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *L. (L.) chagasi* aos 30 dias PI. Imunofluorescência direta 440X

Figura 15. Depósitos de imunoglobulinas (Igs) nos septos alveolares de pulmão de hamsteres infectados com amastigotas purificadas de *L. (L.) chagasi* com 15 dias PI. Imunofluorescência direta. 440X.

Figura 16. Depósitos de imunoglobulinas (Igs) em tecido de rim de hamsteres infectados com amastigotas purificadas de *L. (L.) chagasi* aos 30 dias PI. Imunofluorescência direta. 440X

Deteccção de IgG de hamster em tecido com a técnica imunoenzimática

Para deteção especificamente de IgG nos tecidos utilizou-se anticorpo biotinilado de cabra anti-IgG de hamster por técnica imunoenzimática que permite melhor análise da localização do depósito.

Observaram-se depósitos de IgG no fígado contornando os sinusóides (Figura 17A). No pulmão, os depósitos de IgG foram encontrados nas paredes dos capilares no septo alveolar (Figura 17B). No rim observaram-se depósitos de IgG contornando as paredes dos capilares glomerulares (Figura 17C).

Amostras de dois a seis animais infectados e controles nos tempos de 7, 15, 30, 45, 80 e 102 dias PI foram analisadas. Foi observada uma certa marcação inespecífica nos animais controles, porém observou-se depósito de IgG de intensidade fraca no fígado dos animais infectados aos sete dias PI, havendo um aumento progressivo da intensidade até 45 dias PI, com declínio nas fases posteriores. No pulmão, a intensidade da reação foi moderada aos sete dias PI, aumentando consideravelmente aos 30 dias PI e declinando nos tempos finais de infecção. No rim, observou-se maior intensidade da reação aos 30 e 102 dias PI (Tabela 5).

	FÍGADO		PULMÃO		RIM	
Dias PI	Controle	Infectado	Controle	Infectado	Controle	Infectado
7	.*	+	+	++	-	+
15	+	++	+	+++	-	++
30	+	+++	+	++++	++	+++
45	+	+++	+	+++	+	++
80	++	++	+	+++	+	++
102	+	++	++	+++	-	+++

Tabela 5. Intensidade de depósitos de IgG (2-6 animais/grupo) detectados no fígado, no pulmão e no rim de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* nos diferentes tempos de infecção pela técnica de imunoperoxidase utilizando anticorpo biotinilado de cabra anti-IgG de hamster.

* - = negativo; + a ++++ graduação da intensidade da reação.

Figura 17. Depósitos de IgG no fígado, pulmão e rim de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* utilizando anticorpo biotilado de cabra anti-IgG de hamster. **A-** Depósitos de IgG contornando o sinusóide hepático de hamster infectado aos 45 dias PI. **B-** Depósitos de IgG na parede capilar no septo pulmonar de hamster infectado aos 30 dias PI. **C-** Depósitos de IgG contornando a parede capilar no glomérulo de hamst infectado aos 45 dias PI. Imunoperoxidase. Barra: 25 µm.

Detecção de antígeno de *Leishmania* em tecido de hamster com leishmaniose visceral

Foram observadas no fígado amastigotas de *L.(L) chagasi* no interior de macrófagos e no interstício, e material antigênico no interior de macrófagos e como material particulado extracelular (Figuras 18 e 19).

No pulmão, foi observado antígeno de *Leishmania* num padrão celular em células fagocíticas e raramente como material particulado extracelular (Figura 20). No animal controle não foi observada nenhuma marcação.

No rim, observou-se o antígeno em padrão celular em células fagocíticas glomerulares e como material particulado extracelular nos animais infectados (Figura 21A e B).

Figura 18. Presença de antígeno de *Leishmania* no interior de macrófagos (⇐) e material particulado extracelular (↑) em fígado de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* aos 80 dias PI. Imunoperoxidase. Barra: 25 μ m. 440X.

Figura 19. Presença de amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* no interior de macrófagos (⇐) em fígado de hamsteres infectados aos 80 dias PI. Imunoperoxidase. Barra: 25 μ m. 440X.

Figura 20. Antígeno de *Leishmania* em pulmão de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* aos 80 dias PI em células fagocíticas ($\Leftarrow$) e. como material particulado extracelular ($\Uparrow$). Imunoperoxidase. Barra: 16 μ m. 690X.

Figura 21. Antígeno de *Leishmania* em rim de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* aos 30 dias PI. **A)** Material antigênico em células fagocíticas. **B)** Material antigênico em células fagocíticas ($\Leftarrow$) e material particulado extracelular ($\Uparrow$). Imunoperoxidase. Barra: 16 μ m. 690X.

Detecção de imunoglobulina em tecido de hamster com leishmaniose visceral pela técnica de imunoeletrônica

Fígado

Analisou-se qualitativamente a presença de imunoglobulinas (partículas de proteína A-ouro) sobre as diferentes estruturas do fígado. Observou-se maior quantidade de partículas de proteína A-ouro nas amostras dos animais infectados do que nos controles não infectados (Figura 22). Verificou-se um grande alargamento do espaço de Disse nos animais infectados (Figuras 23 e 24).

Foi realizada a morfometria em um animal controle com 30 dias, em três animais com 30 dias PI e em dois animais com 60 dias PI. Na análise quantitativa, observou-se uma certa marcação com proteína A-ouro mesmo nos animais controles (Figura 22). Nos animais infectados observou-se maior quantidade aos 30 dias PI nas células endoteliais, no espaço de Disse e no sinusóide em relação ao controle não infectado (Figura 23). No sinusóide, observou-se uma maior quantidade no número de partículas aos 60 dias PI em relação ao controle não infectado (Tabela 6) (Figura 25).

Localização	Controle	30 dias PI	60 dias PI
Célula Endotelial	0,05 (n=4)	0,56* (n=19)	0,34 (n=8)
Espaço de Disse	0,14 (n=4)	1,00* (n=18)	0,53 (n=8)
Sinusóide	0,11 (n=7)	0,43* (n=21)	0,33* (n=9)

Tabela 6. Número de partículas (mediana de proteína A-ouro/cm²) no fígado: morfometria. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de hamster e marcação com proteína A-ouro (10 nm). *Background* = 0,26/cm². N= número total de eletromicrografias. * P< 0,05 em relação ao controle não infectado (testes de Kruskal Wallis e Dunn).

Figura 22. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no fígado de hamster controle não infectado. Nota-se pequena quantidade de partículas de proteína A-ouro. Eo = eosinófilo. S = sinusóide. E = célula endotelial. D = espaço de Disse. H = hepatócito. ME. 50.000x.

Figura 23. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 30 dias de infecção. Observa-se alargamento do espaço de Disse (D) (*) e maior quantidade de partículas de proteína A-ouro (↑) em célula endotelial (E). Er = eritrócito. S = sinusóide. H = hepatócito. ME. 50.000x.

Figura 24. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no fígado de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 60 dias de infecção. Observa-se alargamento do espaço de Disse (D) (*) e menor quantidade de partículas de proteína A-ouro (↑) nas diversas estruturas. Oc = outras células. E = célula endotelial. S = sinusóide. H = hepatócito. ME. 50.000x.

Figura 25. Análise quantitativa (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) da presença de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro (10 nm) em fígado de hamsteres controles não infectados e infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. A) Célula endotelial. B) Espaço de Disse. C) Sinusóide. N= nº de micrografias. PI= pós infecção. * $P < 0,05$ em comparação aos controles não infectados (testes de Kruskal Wallis e Dunn).

Pulmão

Foram analisadas eletromicrografias de dois animais controles, de quatro animais com 30 dias PI e de quatro animais com 60 dias PI. Analisaram-se qualitativamente as eletromicrografias e observou-se presença de partículas de proteína A-ouro tanto nos animais infectados quanto nos animais controles (Figuras 26, 27, 28 e 29), sem diferença aparente entre os grupos e em menor quantidade quando comparado ao fígado e ao rim.

Na análise quantitativa observou-se quantidade significativamente maior de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro aos 30 dias PI em célula endotelial quando comparada aos 60 dias PI (Tabela 7) (Figura 30). Nas outras estruturas estudadas não foram observadas diferenças significantes.

Localização	Controle	30 dias PI	60 diasPI
Célula endotelial	0,06 $\pm$ 0,04 (n=9)	0,08 $\pm$ 0,05* (n=17)	0,04 $\pm$ 0,02 (n=13)

Tabela 7. Número de partículas (média $\pm$ desvio padrão) de proteína A-ouro/cm² no pulmão: morfometria. Detecção de imunoglobulinas utilizando anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de hamster e marcação com proteína A-ouro (10 nm). *Background* = 0,26/cm². N= número total de eletromicrografias.
* P < 0,05 em relação aos animais com 60 dias de infecção (testes de ANOVA e de Student-Newman-Keuls).

Figura 26. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no pulmão de hamster controle não infectado. L = luz alveolar. E = célula endotelial. Er = eritrócito. M = membrana basal. P = pneumócito. ME. 50.000x.

Figura 27. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no pulmão de hamster controle não infectado. Observa-se presença de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) no núcleo da célula endotelial caracterizando uma marcação inespecífica. L = luz alveolar. E = célula endotelial. N = núcleo de célula endotelial. ME. 50.000x.

Figura 28. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no pulmão de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 30 dias de infecção. Presença de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) no citoplasma de célula endotelial (E). N = núcleo de célula endotelial. M = membrana basal. ME. 50.000x.

Figura 29. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no pulmão de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 60 dias de infecção. Observa-se menor quantidade de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) no citoplasma de célula endotelial (E). N = núcleo de célula endotelial. M = membrana basal. P = pneumócito. ME. 50.000x.

Figura 30. Análise quantitativa (média $\pm$ desvio padrão) da presença de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro (10 nm) em célula endotelial pulmonar de hamsteres controles não infectados e infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. N= nº de micrografias. PI= pós infecção. *P< 0,05 em comparação aos infectados com 60 dias PI (testes de ANOVA e Student-Newman-Keuls).

Rim

Analisaram-se qualitativamente as eletromicrografias e foi observada presença de partículas de proteína A-ouro tanto nos animais infectados quanto nos animais controles (Figuras 31, 32, 33, 34, 35 e 36), porém em maior quantidade nos animais infectados.

Quantitativamente foram analisados dois animais controles, dois animais com 30 dias PI e dois animais com 60 dias PI. Observou-se quantidade significativamente maior de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro aos 30 dias PI em células endotelial glomerular, da região tubular e epitelial tubular quando comparada aos controles, mas não aos 60 dias PI (Tabelas 8 e 9). Não foi detectada diferença na quantidade de partículas de proteína A-ouro correspondente ao depósito de imunoglobulina na membrana basal e nos pedicelos dos podócitos nos animais infectados quando comparada aos animais controles não infectados. No interstício nenhuma diferença significativa foi observada (Figuras 37 e 38).

	Controle	30 dias PI	60 diasPI
Localização			
Célula	0,21±0,25	1,35±0,02*	0,18±0,22
endotelial	(n=6)	(n=2)	(n=5)

Tabela 8. Número de partículas (média $\pm$ desvio padrão) de proteína A-ouro/cm² no glomérulo renal: morfometria. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de hamster e marcação com proteína A-ouro (10 nm). *Background* = 0,40/cm². N= número total de eletromicrografias. * P < 0,05 em relação ao controle não infectado (testes de ANOVA e Student-Newman-Keuls).

Localização	Controle	30 dias PI	60 diasPI
Célula endotelial	0,00 (n=15)	1,00* (n=11)	0,38 (n=13)
Célula tubular	0,00 (n=13)	0,90* (n=8)	0,08 (n=6)

Tabela 9. Número de partículas (mediana) de proteína A-ouro/cm² em região de túbulo renal: morfometria. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de hamster e marcação com proteína A-ouro (10 nm). *Background* = 0,40/cm². N= número total de eletromicrografias. * P < 0,05 em relação ao controle não infectado (testes de Kruskal-Wallis e Dunn).

Figura 31. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no glomérulo renal de hamster controle não infectado. Er = eritrócito. E = célula endotelial. M = membrana basal. L = luz capilar. Pp = pedicelos dos podócitos. ME. 50.000x.

Figura 32. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no glomérulo renal de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 30 dias de infecção. Observa-se grande quantidade de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) no citoplasma de célula endotelial (E). M = membrana basal. L = luz capilar. Pp = pedicelos dos podócitos. ME. 50.000x.

Figura 33. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) no glomérulo renal de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 60 dias de infecção. Observa-se menor quantidade de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) em comparação aos 30 dias de infecção. E = célula endotelial. M = membrana basal. L = luz capilar. Er = eritrócito. ME. 50.000x.

Figura 34. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) na região de túbulo renal de hamster controle não infectado. Er = eritrócito. E = célula endotelial. M = membrana basal. L = luz capilar. T = epitélio tubular. ME. 50.000x.

Figura 35. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) na região de túbulo renal de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 30 dias de infecção. Observa-se maior quantidade de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) em comparação ao controle não infectado e aos 60 dias de infecção. E = célula endotelial. M = membrana basal. L = luz capilar. Er = eritrócito. ME. 50.000x.

Figura 36. Detecção de imunoglobulinas com anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina de hamster e proteína A-ouro (10 nm) na região de túbulo renal de hamster infectado com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com 60 dias de infecção. Observa-se menor quantidade de partículas de proteína A-ouro ($\uparrow$) em comparação aos 30 dias de infecção. E = célula endotelial. M = membrana basal. L = luz capilar. Er = eritrócito. T = epitélio tubular. ME. 50.000x.

Figura 37. Análise quantitativa (média $\pm$ desvio padrão) da presença de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro (10 nm) em célula endotelial do glomérulo renal de hamsteres controles não infectados e infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*. N= nº de micrografias. PI= pós infecção. * $P < 0,05$ em comparação aos controles não infectados (testes de ANOVA e Student-Newman-Keuls).

Figura 38. Análise quantitativa (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) da presença de imunoglobulinas marcadas por proteína A-ouro (10 nm) em região de túbulo renal de hamsters controles não infectados e infectados com *Leishmania (L.) chagasi*. A) Célula endotelial. B) Célula tubular. N= nº de micrografias. PI= pós infecção. *P< 0,05 em comparação aos controles não infectados (testes de Kruskal-Wallis e Dunn).

DISCUSSÃO

Em hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* constatamos que a carga parasitária no baço e no fígado e os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* aumentam progressivamente durante a infecção, o que reproduz a forma plenamente manifesta da leishmaniose visceral humana.

Analizamos a histopatologia dos órgãos e observamos no fígado hiperplasia e hipertrofia difusa e progressiva das células de Kupffer na infecção até 80 dias PI, com diminuição na fase final e infiltrado inflamatório progressivo com mudança na sua composição durante a evolução. O padrão encontrado corresponde ao padrão clássico encontrado em pacientes com leishmaniose visceral (Duarte e Corbett, 1987; Duarte, 2000). No pulmão a lesão é focal e caracterizada por espessamento dos septos alveolares e infiltrado inflamatório progressivo, desde os sete até os 102 dias PI, com modificação da constituição celular na evolução. Nossos resultados acerca das alterações pulmonares estão de acordo com os dados descritos por Duarte (1979), quando verificou por microscopia óptica que a LV em hamsteres determinava um quadro de pneumonite intersticial, sendo que a extensão e a intensidade do acometimento pulmonar variava de animal para animal mas ocorria em todos os animais infectados, observando ainda focos irregulares de espessamento septal alveolar desde os primeiros dias de infecção, corroborando assim nossos resultados. No rim de hamsteres observamos hiperplasia e aumento da matriz mesangial somente aos 30 e 45 dias de infecção. As alterações renais diagnosticadas por microscopia óptica, caracterizadas por um aumento da matriz e proliferação de células

mesangiais associada a graus variáveis de envolvimento intersticial, revelavam uma nefropatia proliferativa (Costa, 2001). Brito et al. (1975) evidenciaram em três casos achados histopatológicos homogêneos, com glomérulos normais ou ligeiramente alargados por hipertrofia ou hiperplasia de células mesangiais. Espessamento da matriz mesangial, proliferação de células mesangiais e membrana basal glomerular foram verificadas em um caso por Weisinger et al. (1978) e em 21 casos foram encontrados envolvimento glomerular pequeno e nefrite intersticial como alteração mais importante (Duarte et al., 1983). Todos esses relatos de casos de envolvimento renal humano assemelham-se aos aspectos clínicos observados por nós em hamsteres.

Como na leishmaniose visceral o mecanismo imunopatogênico de lesão considerado é o de deposição de imunocomplexos, neste trabalho avaliamos inicialmente a participação de imunoglobulinas e C3 no fígado e no pulmão de hamsteres com leishmaniose visceral, órgãos ainda não abordados na literatura.

Inicialmente, pela técnica de imunofluorescência direta, observamos deposição de imunoglobulinas no fígado e no pulmão de hamsteres. Com o intuito de determinarmos melhor a localização dos depósitos de imunoglobulinas nesses órgãos, partimos para a técnica de imunoistoquímica, onde observamos depósitos de IgG acompanhando o sinusóide hepático, sendo que o aumento da intensidade progride até os 45 dias PI. No pulmão observam-se depósitos de IgG de intensidade moderada na parede dos capilares alveolares aos sete dias PI, aumentando consideravelmente aos 30

dias PI. Nenhum depósito expressivo de C3 foi observado no fígado ou no pulmão.

Visto que a ausência de depósito de C3 não é compatível com a patogênese por deposição de imunocomplexo e como é aceito que o mecanismo de lesão renal na leishmaniose visceral é mediado por imunocomplexo (Brito et al., 1975; Weisinger et al., 1978; Sartori et al., 1987), examinamos também o tecido renal. Detectamos depósitos de IgG acompanhando a parede do capilar glomerular e dos túbulos aos 30 e 102 dias PI. Observa-se também depósito de C3 em intensidade moderada no rim. Desse modo concluímos que existiam condições favoráveis para a formação de imunocomplexo nos animais do nosso experimento. Além disso, um dos fatores que predis põem a deposição de imunocomplexo é a incapacidade do organismo em eliminá-los devido à disfunção do sistema fagocítico mononuclear (Lawley e Frank, 1980), o que provavelmente acontece na leishmaniose visceral em decorrência da proliferação de *Leishmania* em fagócitos mononucleares.

A ausência de depósitos de C3 no fígado e no pulmão não condiz com o mecanismo de deposição de imunocomplexo. Porém, a presença de depósitos de IgG no fígado e no pulmão parecem indicar o envolvimento de imunoglobulinas na patogênese da lesão nesses órgãos. No pulmão, depósitos de IgG são relatados em algumas situações: na síndrome de Goodpasture, onde ocorre a deposição de anticorpo anti-membrana basal pulmonar (Sturgill e Westervelt, 1965) e em modelos de doença do soro aguda e crônica mediada por imunocomplexo (Cochrane e Dixon, 1978). Neste trabalho, observamos a presença de depósitos de IgG no pulmão, principalmente na parede vascular, o

que é semelhante aos achados na doença do soro crônica em coelho, onde ocorre pneumonite intersticial (Brentjens et al., 1974). Além disso, em leishmaniose visceral a presença de antígeno de *Leishmania* foi observada em focos inflamatórios no pulmão (Duarte et al., 1989). Em doenças mediadas por imunocomplexo, como na doença do soro aguda e crônica em modelos animais (Cochrane e Dixon, 1978), não são descritas lesões hepáticas. Por outro lado, em doenças nas quais o mecanismo imune está envolvido, os anticorpos são direcionados para os hepatócitos ou para os ductos biliares em hepatite viral e cirrose biliar primária, respectivamente (Eddleston et al., 1980; Krams et al., 1990). Desse modo, à luz da literatura pertinente, este é o primeiro registro da presença de IgG depositada ao longo dos sinusóides hepáticos em leishmaniose visceral experimental.

Na análise semiquantitativa de depósitos de IgG em diferentes tecidos, um achado constante é a presença mais marcante destes aos 30 e 45 dias de infecção, e quando analisamos a histopatologia dos órgãos visando correlacionar a lesão tecidual com o grau de deposição de imunoglobulinas, observamos que as lesões nos órgãos foram geralmente progressivas, porém ocorreram alterações das características durante a evolução da infecção. As variações na característica da lesão e a ocorrência de depósitos mais intensos de IgG nas fases iniciais da infecção sugerem que a participação de IgG na patogênese da leishmaniose visceral ocorra em determinados períodos durante a evolução da infecção.

Foi demonstrada a presença de depósitos de IgG no fígado e no pulmão, mas a ausência de depósitos de C3 nesses órgãos neste trabalho nos induz a considerar mecanismos patogênicos alternativos de lesão na leishmaniose

visceral. Há evidências que outros mecanismos patogênicos, diferentes daquele mediado por imunocomplexo, participem das lesões em leishmaniose visceral. Recentemente demonstramos a presença de células T no rim na leishmaniose visceral canina (Costa et al., 2000). Além disso, mostrou-se que no lupus eritematoso sistêmico imunoglobulinas podem participar da patogênese da lesão glomerular por mecanismo distinto da deposição de imunocomplexo (Itoh et al., 1993; Ono et al., 1995). A hipótese que perseguimos neste trabalho foi a de internalização de imunoglobulinas pelas células endoteliais que poderiam ter papel na patogênese da leishmaniose visceral.

Considerando essa hipótese de internalização de imunoglobulinas pelas células endoteliais, analisamos tanto qualitativamente como quantitativamente o depósito de imunoglobulinas no fígado, no pulmão e no rim de hamsteres infectados e não infectados nos diferentes tempos, por microscopia eletrônica de transmissão. Observamos quantidade significativamente maior de imunoglobulinas tanto na célula endotelial do fígado quanto em célula endotelial glomerular e endotelial da região tubular renal, aos 30 dias PI em relação ao controle, não observando aumento aos 60 dias PI. Já no pulmão, observamos diferença significativa entre os animais infectados aos 30 dias PI em relação aos infectados aos 60 dias PI e não houve diferença nos animais controles em relação aos infectados tanto aos 30 dias PI quanto aos 60 dias PI. Esses resultados de microscopia eletrônica corroboram os resultados obtidos na microscopia óptica quanto à presença e quanto à cronologia.

Qualitativamente observamos um alargamento do espaço de Disse hepático e quantitativamente observamos, curiosamente, uma maior

quantidade de imunoglobulinas aos 30 e 60 dias PI no espaço de Disse que no sinusóide. Conhecendo-se a organização estrutural do fígado e como ocorre o transporte de substâncias e a circulação, sugerimos que as células endoteliais possam ter um papel ativo no transporte de imunoglobulinas para o espaço de Disse.

Nossos dados mostram depósitos de IgG e a presença de imunoglobulinas nas células endoteliais internalizadas na leishmaniose visceral em hamsteres. Tanto o depósito quanto a internalização ocorrem na fase inicial da infecção, quando é mais evidente. O questionamento que surge, e em relação ao qual deveremos prosseguir com a investigação, refere-se ao papel das imunoglobulinas e a que processo desencadeiam com sua internalização. Nossa suposição no momento é que esse mecanismo pode desencadear a ativação de células endoteliais, induzindo, entre outros processos, a expressão de moléculas de adesão, culminando na migração de células mononucleares, inclusive células T, na lesão, observada na nefropatia da leishmaniose visceral canina (Costa et al., 2000).

Na leishmaniose visceral em hamsteres, imunoglobulinas parecem ter papel na patogênese de lesões em órgãos como fígado, pulmão e rim, mas por um mecanismo que não é o de deposição de imunocomplexos. Sugerimos, a partir de nossos dados, que o mecanismo patogênico envolva a internalização de imunoglobulinas pelas células endoteliais.

CONCLUSÕES

Na leishmaniose visceral em hamsteres:

- A carga parasitária no baço e no fígado aumenta progressivamente com a evolução da infecção;
- Os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de hamsteres aumentam progressivamente com a evolução da infecção;
- As lesões do fígado, do pulmão e do rim são progressivas, com alterações das características das lesões durante a evolução da infecção;
- Observam-se depósitos de IgG acompanhando o sinusóide hepático;
- Depósitos de IgG são encontrados nos septos alveolares;
- Depósitos de IgG são encontrados no glomérulo renal e ao redor dos túbulos renais;
- No fígado e no pulmão há um aumento progressivo da intensidade dos depósitos de IgG nas fases iniciais da infecção, até os 30 dias pós-infecção, declinando nas fases posteriores. Nenhum depósito de C3 significativo foi encontrado no fígado e no pulmão;
- No rim os depósitos de IgG foram detectados aos 30 e 102 dias pós-infecção. Depósito de C3 de fraca intensidade foi encontrado aos 15 e 30 dias pós-infecção;
- Material antigênico de *Leishmania* foi detectado no fígado, no pulmão e no rim;
- À microscopia eletrônica, quantidades significativamente maiores de imunoglobulinas são detectadas nas células endoteliais, no espaço de Disse e no sinusóide hepático aos 30 dias pós-infecção, em comparação aos controles não infectados;

- À microscopia eletrônica, no pulmão maiores quantidades de imunoglobulinas são detectadas em células endoteliais aos 30 dias pós-infecção, em comparação aos 60 dias pós-infecção;
- À microscopia eletrônica, no rim imunoglobulinas estão presentes nas células endoteliais glomerulares e nas da região tubular e nas células epiteliais tubulares aos 30 dias pós-infecção, em comparação aos controles não infectados.

Os dados mostram que na leishmaniose visceral em hamsteres há deposição de imunoglobulinas nas células endoteliais em uma fase inicial da infecção e ocorre a internalização de imunoglobulinas por essas células. Esse processo pode ser um mecanismo patogênico alternativo na leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 2 ed. Rio de Janeiro, Revinter, 1998. 284 p.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D.; RUIZ-ARGUELLES, A; LLORENTE, L. Antibody penetration into living cells. II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into T lymphocytes causing their deletion and the abrogation of supressor function. *J. Immunol.*, v.122, p.1855-62, 1979.
- ALENCAR, J. E. *Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. Fortaleza, 1959. 342 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect Dis.*, v. 154, p. 639-49, 1986.
- BALLERMANN, B. J. Endothelial responses to immune injury. In: NEILSON E. G.; COUSER W. G., ed. *Immunologic renal diseases*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997.
- BARBOSA JUNIOR, A.A.; ANDRADE, Z.A. ; REED, S.G. The pathology of experimntal visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* , v. 20, p. 63-72, 1987.
- BATUMAN, V.; GUAN, S. Receptor-mediated endocytosis of immunoglobulin light chains by renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.*, v.272, p. 521-30, 1997.

- BRADLEY, D.J. Genetics of susceptibility and resistance in the vertebrate host. In PETERS, W. ; KILLIGH-KENDRICH, R., ed. *The leishmaniasis in biology and medicine: clinical aspects and control*. London, American Press, 1987. v.2, p.551-80.
- BRANDÃO-FILHO, S.; SHAW, J. Leishmaniasis in Brasil. *Parasitol. Today*, v. 10, p. 329-30, 1994.
- BRENTJENS, J.R.; O'CONNELL, D.W.; PAWLOWSKI, I.B.; HSU, K.C.; ANDRES, G.A. Experimental immune complex disease of the lung. *J. Exp. Med.*, v.140, p.105-25, 1974.
- BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M.I.S.; PENNA, D.O. Glomerular involvement in human kala-azar: a light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.24, p.9-18, 1975.
- BRYCESON, A. D. M.; BRAY, R. S.; WOLSTENCROFT, R. A.; DUMOND, D. C. Cell mediated immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.64, p.472, 1970.
- BUNN-MORENO, M.M.; MADEIRA, E.D.; MILLER, K.; MENEZES, J.A.; CAMPOS-NETO, A. Hypergammaglobulinemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activation of B cells and with suppression of T cell function. *Clin. Exp. Immunol.*, v.59, p.427-34, 1985.
- CAMPOS-NETO, A.; BUNN-MORENO, M.M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of genus *Leishmania*. *Infect. Immun.*, v.38, p.871-6, 1982.

- COCHRANE, CG; DIXON, F.J. Immune complex injury. In SAMTER, M., ed. *Immunological diseases*. Little, Brown and Company, USA.(1978).
- CORBETT, C.E.P.; PINTO PAES, R.A.; LAURENTI, M.D.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; DUARTE, M.I.S. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.73, p.417-34, 1992.
- COSTA, F.A.L. Patologia e Imunopatogenia da nefropatia da leishmaniose visceral canina. São Paulo. 2001, 129 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy in canine visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p.1455-58, 2000.
- DUARTE, M. I. S. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (calazar). In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo patologia*. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p.1215-75.
- DUARTE, M.I.S.; MATTA, V.L.R.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M. D.; CHEBABO, R.; GOTO, H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.83, p.73-6, 1989.
- DUARTE, M.I.S.; CORBETT, C.E.P. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29, p.131-6, 1987.
- DUARTE, M.I.S.; SILVA, M.R.R.; GOTO, H.; NICODEMO, E.L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human kala-azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.77, p.531-7, 1983.
- DUARTE, M. I. S. *Pneumonite intersticial no Calazar*. São Paulo. 1979. 138 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- DWYER, D.M. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J. Immunol.*, v.117, p.2081-91, 1976.
- EDDLESTON, A.L.W.F. Immunology and the liver. In: PARKER, C.W., ed. *Clinical immunology*. Philadelphia, Saunders Company, 1980.
- EVANS, D. A.; REBÊLO, M. E. *Leishmaniose viscerocutânea no cão doméstico: estudo laboratorial e clínico*. Lisboa, Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar/Centro Nacional de Protecção e Controle Zoo-Sanitário, 1996. 67 p.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. 1999. Boletim Epidemiológico: Leishmaniose visceral. Ano III, p.16-7.
- GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ-FERREIRA, J.A.; MARZOCHI, K.F.; MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; LAMBERT, P.H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.*, v.56, p. 58 - 66, 1984.
- GOTO, H; NOSE, M. Ingestion of hamster and visceral leishmaniasis serum IgG by endothelial cells as pathogenetic mechanism of interstitial inflammation. XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, Mangaratiba, RJ, 11.17: 115, 1997.
- KRAMS, S.M.; De WATER, J.V.; COPPEL, R.L.; ESQUIVEL, C.; ROBERTS, J.; ANSARI, A.; GERSHWIN, ME. Analysis of hepatic T lymphocyte and immunoglobulin deposits in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, v.12, p.306-13, 1990.

- ITOH, J.; NOSE, M.; TAKAHASHI, S.; ONO, M.; TERASAKI, S.; KONDOH, E.; KYOGOKU, M. Induction of different types of glomerulonephritis by monoclonal antibodies derived from an MRL/lpr lupus mouse. *Am. J. Pathol.*, v.143, p.1436-43, 1993.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal leishmaniasis of brazil with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.435-43, 1994.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência Cultura*, v. 44, 1992.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R., ed. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press. p.1-121. 1987.
- LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; SOTTO, M.N.; SINHORINI, I.L.; GOTO, H. The role of complement on the acute inflammatory process in the skin and on host parasite interaction in hamsters inoculated by *Leishmania (L.) chagasi*. *Int. J. Exp. Pathol*, v.77, p.15-24, 1996.
- LAWLEY, T.J.; Frank, M. Imune complexes and immune complex diseases. In: PARKER, C.W., ed. *Clinical immunology*. Philadelphia, WB Saunders Company, 1980. p.143-72.
- MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; INTRONA, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today*, v.18, p.231-40, 1997.

- MELLENEY, H.E. The histopathology of kala-azar in the hamster, monkey and man. *Am. J. Path.*, v.1, p. 147-68, 1925.
- MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.27, p.67-72, 1994. Suplemento. 3.
- MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M.; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma , tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J. Immunol.*, v.138, p.2290-7, 1987.
- ONO, M.; YAMAMOTO, T.; KYOGOKU, M.; NOSE, M. Sequence analysis of the germ-line VH gene corresponding to a nephritogenic antibody in MRL/lpr lupus mice. *Clin. Exp. Immunol.*, v.100, p.284-90, 1995.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infec. Dis.*, v.22, p.1-13, 1996.
- PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In: Brasileiro Filho, G., ed. *Bogliolo patologia*. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
- POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A. Renal involvement in canine leishmaniasis. *Nephron*, v.57, p.444-52, 1991.
- POZIO, E.; GRANDONI, L.; BETTINI.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, v.38, p.383-93, 1981.
- REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.*, v.13, p.151-77, 1995.

- REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.76, p.269-81, 2000.
- RONDA, N.; GATTI, R; ORLANDINI, G.; BORGHETTI, A. Binding and internalization of human IgG by living cultured endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v.109, p.211-16, 1997.
- ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E., ed. *Fundamental immunology*. 4 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999.
- SACKS, D.L.; LOUIS, J.A.; WIRTH, D.F. Leishmaniasis. In: WARREN, K.S., ed. *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Massachusetts, Blackwell Scientific Publications, 1993.
- SARTORI, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunol.*, v.9, p. 93-103, 1987.
- SCHAEFER, K.U.; KURTZHALS, J.A.L.; SHERWOOD, J.A.; GITHURE, J.I.; KAGER, P.A.; MULLER, A.S. Epidemiology and clinical manifestations of visceral and cutaneous leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley, Kenya. A literature review. *Trop. Geog. Med.*, v.46, p.129-33, 1994.
- SHI, S-R.; COTE, R.J.; CHAIWUN, B.; YOUNG, L.L.; SHI, Y.; HAWES, D.; CHEN, T.; TAYLOR, C.R. Standardization of immunohistochemistry based on antigen retrieval technique for routine formalin-fixed tissue sections. *Appl. Immunohistochem.*, v.6 , p.89-96, 1998.
- SHLOMCHIK, M.J.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WOLFOWICZ, C.B.; ROTHSTEIN, T.L.; WEIGERT, M.G. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature*, v.328, p.805-11, 1987.

- SHLOMCHIK, M.J.; MASCELI, M.; SHAN, H.; DADIC, M.Z.; PISETSKY, D.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WEIGERT, M.G. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J. Exp. Med.*, v.171, p.265-92, 1990.
- STAUBER, L.A. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. *Rice Inst. Pamph.*, v.45, p.80-96, 1958.
- STURGILL, B.C.; WESTERVELT, F.B. Immunofluorescence studies in a case of Goodpasture's syndrome. *J.A.M.A.*, v.194, p.172-4, 1965.
- THEOFILOPOULOS, A.N.; DIXON, F.J. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.*, v.37, p.269-390, 1985.
- THOMAS-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINI-DUMAS, A.; SERRES, E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.68, p.107-8, 1993.
- WEISINGER, J.R.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, G.A.; BRONSTEIN, I.; DESSENE, J.J.; DUQUE, J.F.; MONTENEGRO, J.; TAPANES, F.; ROUSSE, A.R. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.27, p.357-9, 1978.
- WILCOCKS, C.; MANSON-BAHR, P.E. Kala-azar. In: WILCOCKS, C.; MANSON-BAHR, ed. *Tropical Diseases*. Baltimore, Baillière Tindall., 1972. p.120-33.
- YANASE, K.; SMITH, R.M.; PUCETTI, A.; JARETT, L.; MADAIO, M.P. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J. Clin. Invest.*, v.100, p. 25-31, 1997.
- YOUNG, C. W.; SMILY, H. J.; BROWN, C. Experimental Kala-azar in a hamster (*Cricetus griseus*, M. Edv.). *Nat. Med. J. China*, v.20, p. 357-9, 1919.