



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Curso de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado) em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

A PATOLOGIA INTESTINAL NO CALAZAR

Estudo Morfológico de 31 Fragmentos de Mucosa
Jejunal, obtidas por Biópsias Perorais, de 20 Crianças

LUIZ ANTÔNIO RODRIGUES DE FREITAS

SALVADOR - BAHIA - BRASIL

1 9 9 2



LUIZ ANTONIO RODRIGUES DE FREITAS
Médico

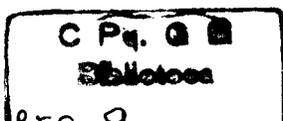
A PATOLOGIA INTESTINAL NO CALAZAR

Estudo morfológico de 31 fragmentos de
mucosa jejunal, obtidos através de biópsias
perorais, de 20 crianças

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal da Bahia
para a obtenção do Título de
Doutor em Patologia Humana

Orientador: Prof.Dr. Zilton A. Andrade

SALVADOR - BAHIA - BRASIL
1992



Freitas, Luiz Antônio Rodrigues
F866 A patologia intestinal no calazar : estudo morfológico de 31
fragmentos de mucosa jejunal, obtidos através de biópsias perorais,
de 20 crianças / Luiz Antônio Rodrigues de Freitas. -- Salvador :
Faculdade de Medicina da UFBA, 1992.
172p. ilus.

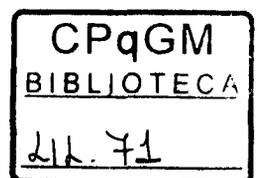
Tese (Doutoramento em Patologia Humana) - Universidade Federal da
Bahia, 1992.

1. Leishmaniose visceral 2. Biópsia intestinal 3. Intestino delgado
4. Histopatologia 5. Microscopia eletrônica 6. Mucosa intestinal.

CDU 616.993.161-091.8

MS 11975
1992

616.993.161-091.8
F866.2



A Luiz Antônio de Freitas Neto,
meu pai, que mais que símbolo,
é o modelo e o amigo.

A Ruth, minha mãe

A Nelma, companheira

A Juliana e Mariana,
nossas meninas

Ao Professor Zilton A. Andrade, pelo modelo
de Mestre e exemplo de tenacidade.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microscopia Eletrônica do CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Salvador-Bahia) e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), Projeto nº.4004002/90-41/FV.

AGRADECIMENTOS

O trabalho de Tese é uma pratica muito interessante, tanto do ponto de vista científico quanto do ponto de vista pessoal. O realizar científico tem uma característica muito peculiar: Todo ponto de chegada é ponto de partida. Nenhum trabalho se satisfaz em si. Sob o ponto de vista pessoal não é diferente. A tese cumpre um ritual de passagem. Quem começa este trabalho-ritual, modifica-se quanto pessoa durante o percurso, e quem conclui o trabalho não é o mesmo que o começou. O processo tem uma dinâmica fantástica e não se conclui na tese. Também como pessoa, todo porto de chegada é ponto de partida.

Neste percurso tivemos a colaboração de muitos, e cabe-me aqui agradecer a todos, e em particular:

Ao Prof. Zilton A. Andrade, pelo estímulo constante, o exemplo, a confiança, e pela orientação segura e competente.

A Prof. Sônia G. Andrade, coordenadora dos cursos de pós-graduação em Patologia Humana, pelo estímulo e confiança.

A Paulo Sérgio P. de Oliveira, meu companheiro e amigo, que participou ativamente deste trabalho, e me ajudou, às vezes sozinho, a conduzir, neste período, o laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Prof. Moyses Sadigursky, Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela amizade, compreensão e ajuda em várias etapas deste trabalho.

Aos amigos Profs. Drs. Luciana R. Silva, Nádia Carneiro, Hugo Ribeiro Jr, e Roberto Badaró, responsáveis pelos pacientes, que me confiaram as biópsias, e colocaram ao meu dispor todas as informações e dados solicitados.

A Maria Lúcia Vieira dos Santos, pelo processamento do material de microscopia eletrônica.

Ao Dr. Aryon Barbosa, Chefe do laboratório de Histologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-UFBA), e aos técnicos Sra. Cristina Vasconcelos, Sra. Jussara Andrade, e Sr. José Pedrosa, pela preparação das secções histológicas.

Ao Prof. Eilson Góes, da Universidade Federal do Ceará, pela inestimável ajuda e presteza na orientação sobre a avaliação estatística dos dados.

A Srta. Rose Meire Leovigildo Ccone pela ajuda na estatística.

A Rosália Meires D. da Silva, bibliotecária do Curso de pós-graduação em Patologia Humana, pela orientação nos aspectos formais da tese e pela ajuda na revisão bibliográfica.

As Senhoras Eurídice Sant'anna, Ana Maria Físcina Sampaio, Ana Cristina Campos e Celeste Barbosa, bibliotecárias do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela ajuda na revisão da literatura.

A Dônia Maria Guimarães, pela ajuda no trabalho datilográfico de algumas partes deste trabalho.

Aos colegas Eduardo Ramos, Mítermayer Reis, Helenemarie Barbosa, Iguaracyra Barreto, pelos momentos agradáveis do curso de pós-graduação.

Ao Dr. Lain Pontes de Carvalho, pelo fornecimento do anticorpo anti-leishmânia.

A Natasha Andrade, que durante seu primeiro ano de Iniciação científica participou ativamente deste trabalho.

Ao Sr. Roseimar Buerque de Silva, pela ajuda na documentação fotográfica.

Ao Sr. Antônio Silva pela realização das fotocópias.

A Maria Clara Melro, amiga que criticou e opinou sobre vários aspectos do texto e da apresentação deste trabalho.

A Nelmacy, Juliana e Mariana Freitas, pelo sacrifício e pela imensa ajuda na montagem final deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho investigou-se o envolvimento da mucosa do intestino delgado na leishmaniose visceral humana, em vinte crianças com calazar.

Foram analisados 31 fragmentos de mucosa jejunal obtidos através de biópsia peroral. As alterações morfológicas foram classificadas segundo os critérios de Shenk & Klipstein (1968), modificados por Goldgar & Vanderhoof (1986). Verificou-se a frequência e a intensidade do parasitismo de células da mucosa por leishmânias. As alterações morfológicas foram correlacionadas com a intensidade do parasitismo, e comparadas às observadas em crianças com diarreia crônica associada a desnutrição e/ou giardíase, mas sem leishmaniose. A imuno-marcação pela técnica da imunoperoxidase indireta com soro anti-leishmânico foi usada para a pesquisa de parasitas e seus antígenos. Para a caracterização das células do infiltrado inflamatório e suas relações com os parasitas, utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão.

O estudo revelou que 85% das crianças com calazar tinham leishmânias em macrófagos da mucosa intestinal, e que, em mais da metade destas, o parasitismo era intenso. Os macrófagos densamente parasitados localizavam-se no eixo das vilosidades deformando-as. Houve correlação entre a intensidade deste parasitismo e a intensidade das alterações dos parâmetros morfológicos da mucosa intestinal. A comparação com fragmentos obtidos após tratamento específico mostrou diminuição das alterações associada a redução da intensidade do parasitismo.

A comparação com alterações intestinais de 22 crianças sem calazar mostrou que, sob o ponto de vista quantitativo, não há diferenças entre os dois grupos. Porém, sob o ponto de vista qualitativo, a natureza do infiltrado na mucosa com moderado a denso parasitismo é diferente e específico. Nas crianças com pouco ou sem parasitas, a demonstração de poucas leishmânias e/ou de seus antígenos, sugerem uma participação destes na patogênese da enterite.

Pela primeira vez descrevem-se os aspectos da patologia ultra-estrutural na enterite por leishmânias. A análise ultra-estrutural sugere que a destruição de macrófagos parasitados pode ser um importante mecanismo leishmanicida na leishmaniose visceral. Nos indivíduos tratados notou-se um aumento do número de linfócitos nas lesões e à microscopia eletrônica um contacto destas células com os macrófagos lesados, sugerindo participação destas células na lise dos macrófagos.

A presença de leishmânias em macrófagos da mucosa intestinal enquanto já ocorreu um "clearance" de parasitas no baço, e a presença de um paciente resistente ao tratamento e que persistiu com parasitas no intestino, sugerem que a mucosa intestinal pode ser, como a pele em algumas regiões geográficas, um "santuário" destes parasitas.

A utilização de biópsia peroral da mucosa intestinal mostrou-se um importante instrumento na investigação do comprometimento intestinal no calazar. A sua utilização permite, não apenas o seu uso como método diagnóstico complementar, mas abre perspectivas para um estudo mais sistemático deste comprometimento intestinal e seu papel no

curso e prognóstico da doença, sobretudo em relação a sua relevância na desnutrição associada ao calazar. Além disso, poderá, dada a acessibilidade, permitir a investigação in situ e in vivo de vários aspectos patogénéticos da leishmaniose visceral.

Summary

Changes in small intestine associated with visceral leishmaniasis were investigated by means of 31 jejunal biopsies made in 20 children with classical Kala-azar. Classification of such changes followed the Shenk & Klipstein's (1968) criteria, as modified by Goldar & Vanderhoof (1986). Indirect immunoperoxidase staining and polyclonal anti-*Leishmania amazonensis* antibodies were used to search for leishmanias and their antigens. Cytological characteristics of the inflammatory cells were investigated by means of electron microscopy. Presence and degree of parasitism were correlated with morphological alterations present in intestinal mucosa and the results were compared with those found in children with chronic diarrhea, free from Kala-azar, but with giardiasis and malnutrition.

Parasites were found in 85% of the children with Kala-azar, in more than half of them parasitism being of a marked degree. Macrophages loaded with parasites were present in the axis of the intestinal villus, causing their distortion. A positive correlation was found between degree of parasitism and intensity of mucosal changes. In post-treatment biopsies, diminution of parasitism was accompanied by a decrease in the inflammatory changes. Comparative study of 22 biopsies made in control non-Kala-azar cases failed to reveal quantitative changes in intestinal mucosa, but qualitatively the nature of the cellular infiltrates in cases with moderate and marked

parasitism by leishmanias was particular and specific. Demonstration of scanty leishmanias or leishmanial antigens only in some children also suggest a participation of parasitism in the pathogenesis of the associated enteritis found in cases with low parasitism.

Ultrastructural changes in human leishmanial enteritis are described for the first time. Parasitized macrophage destruction was observed and seemed to represent a pathway for host immune clearance of leishmanias. Lymphocytes were seen attached to parasitized macrophages suggesting a cytotoxic mechanism of macrophage destruction.

The presence of parasitized macrophages in the intestinal mucosa at a time when post-therapeutical clearance of parasites occurred in the spleen is suggestive that the intestine may be a "haven" for the leishmanias.

Intestinal biopsy is an important tool not only for the diagnosis of visceral leishmaniasis, but to study host-parasite relationship, and the role of this parasitism in the evolution and prognosis, especially to clarify the relevance of associated malnutrition.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL	15
2.1.1. Considerações gerais	16
2.1.2. Manifestações clínicas	16
2.1.3. Alterações laboratoriais	21
2.1.4. Diagnóstico laboratorial	22
2.2. PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	24
2.2.1. Aspectos gerais	24
2.2.2. O baço	25
2.2.3. O fígado	26
2.2.4. Os linfonodos	29
2.2.5. Os rins	30
2.2.6. Outros órgãos	31
2.3. O ENVOLVIMENTO INTESTINAL NO CALAZAR	33
2.4. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	41
2.4.1. O papel dos macrófagos	41
2.4.2. Considerações gerais sobre as respostas imunes humoral e celular.	45
2.5. A BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL	47
2.5.1. Considerações gerais	48
2.5.2. Aspectos técnicos	51
2.5.3. Interpretação do material de biópsia intestinal	54
2.6. A MUCOSA DO JEJUNO	55
2.6.1. Descrição geral da mucosa do jejuno	55
2.6.2. O epitélio	57
2.6.3. A lâmina própria	59
2.6.4. O sistema imune associado à mucosa intestinal	60
2.7. OBJETIVOS	65
3. MATERIAL E MÉTODOS	66
3.1. PACIENTES COM CALAZAR	66
3.2. CASUÍSTICA	67
3.3. OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DE MUCOSA INTESTINAL	67
3.4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL	68

3.4.1. Estudo histológico	68
3.4.2. Estudo ultraestrutural	68
3.4.3. Estudo imunohistoquímico	69
3.4.3.1. <i>Origem e preparação dos reagentes imunológicos</i>	70
3.4.3.1.1. <i>Cultivo de leishmânias</i>	70
3.4.3.1.2. <i>Produção de anticorpos anti-leishmânia</i>	70
3.4.3.2. <i>Procedimentos da imunomarcacão</i>	71
3.4.3.3. <i>Controles da imunomarcacão</i>	71
3.5. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL	72
3.6. ESTUDO DA MUCOSA INTESTINAL DE CRIANÇAS SEM CALAZAR	74
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
4. RESULTADOS	77
4.1. DESCRIÇÃO GERAL DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS	77
4.1.1. Parasitismo	78
4.1.2. Alterações no padrão vilositário	79
4.1.3. Alterações na relação vilosidades:criptas	83
4.1.4. Epitélio superficial	83
4.1.5. Inflamação	83
4.1.6. índice geral de comprometimento da mucosa do jejuno	87
4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL DO GRUPO DE CRIANÇAS SEM CALAZAR	87
4.3. ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO E ALTERAÇÕES DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO	91
4.3.1. Intensidade do parasitismo intestinal X alteração do padrão das vilosidades intestinais	91
4.3.2. Intensidade do parasitismo intestinal X intensidade da atrofia das vilosidades	94
4.3.3. Intensidade do parasitismo intestinal X intensidade do infiltrado inflamatório	94
4.3.4. Intensidade do parasitismo intestinal X grau geral de alteração da mucosa intestinal	95
4.4. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL	98
4.5. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO	112
4.6. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA DE PACIENTES COM MAIS DE UMA BIÓPSIA NO CURSO DO CALAZAR	117
4.6.1. Pacientes com intenso parasitismo	124
4.7. CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO DA MUCOSA INTESTINAL ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E CLÍNICO-FUNCIONAIS	125

5. <i>DISCUSSAO</i>	130
6. <i>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.</i>	152

1. INTRODUÇÃO

A despeito de frequentes referências a diarréia no curso da leishmaniose visceral, tivemos dificuldades em encontrar relatos de investigações a respeito de suas causas. Os quadros diarréicos são atribuídos, em geral, a poliparasitose e infecções bacterianas.

Estudos de investigação do sistema imune na leishmaniose visceral mostram que os pacientes têm quadro de imuno-depressão que, a despeito de ser específica para antígenos parasitários, cursa com outras evidências de desregulação da resposta imune, e que pode ser responsável pela susceptibilidade aumentada às infecções bacterianas graves.

Apesar de não haver relatos de infecções oportunistas por microorganismos de vida intracelular a atenção clínica deve estar voltada para esta possibilidade. Assim, no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, esteve internada uma criança com calazar resistente ao tratamento específico e que tinha uma diarréia crônica. No curso das investigações, um exame parasitológico de fezes mostrou estruturas arredondadas que foram interpretadas como criptosporídios, agente etiológico oportunista, frequentemente isolado de pacientes com Síndrome de Imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS). Tal indicação induziu a pediatra responsável a realizar um biópsia intestinal, na expectativa de confirmar o achado e avaliar outras alterações da mucosa intestinal.

2.1.1. O estudo histológico da mucosa do jejuno não mostrou criptosporídios, mas ficamos surpresos com a presença de uma grande quantidade de macrófagos densamente parasitados por leishmânias. Associado ao intenso parasitismo da mucosa intestinal havia atrofia completa das vilosidades. Este paciente foi tratado, mas, a despeito de negativar leishmânias na punção esplênica e não encontrarmos parasitas na biópsia hepática, persistiu com denso parasitismo na mucosa jejunal.

Revendendo os dados da literatura encontramos poucos descrições a respeito do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral. A maior parte destes relata apenas o achado de parasitas, tendo, portanto uma conotação meramente diagnóstica.

Resolvemos então estudar o comprometimento intestinal na leishmaniose visceral de pacientes hospitalizados, afim de verificar a frequência e do parasitismo intestinal por leishmânias, as alterações da mucosa associada a presença destes parasitas, e avaliar a possibilidade da mucosa intestinal, assim como a pele em certas regiões geográficas representar uma espécie de "santuário" de leishmânias. Tentamos também relacionar as alterações intestinais com os quadros diarréicos e a desnutrição do calazar.

O gênero é *Lutzomyia* e a espécie é a *L. longipalpis* (Sherlock, 1969; Young & Lawyer, 1987).

No Brasil a doença é endêmica no Nordeste, principalmente no Ceará e na Bahia. Tem um curso clínico grave e fatal nos indivíduos susceptíveis não tratados.

2.1. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1.2. Manifestações clínicas

2.1.1. Considerações gerais

A leishmaniose visceral é uma doença que ocorre em várias regiões do mundo, exibindo focos de endemicidade na África, Ásia, Bacia do Mediterrâneo, e América (Rey, 1991). É causada por protozoários tripanosomatídeos da ordem Kinetoplastida, que se multiplicam no interior de células fagocitárias do hospedeiro. Nas Américas a maioria dos casos é determinada pela *L. chagasi*, uma espécie de leishmânia muito semelhante à *L. infantum*, responsável pela doença na região do Mediterrâneo (Grimaldi Jr & cols., 1989; Grimaldi Jr. & McMahon-Pratt, 1991). As características clínico-epidemiológicas da doença nas Américas e no Mediterrâneo sugerem que a doença no Novo Mundo foi introduzida por colonizadores europeus.

A doença deve ser considerada, na Europa e na América, como uma zoonose (Lainson, 1983). Acredita-se que o homem é um hospedeiro acidental. O principal reservatório doméstico da infecção é o cão, mas outros têm sido descritos (Deane & Deane, 1954; Lainson, 1983). A transmissão se faz através de um vetor, que na América é um flebotômio pertencente à sub-família Phlebotominae da família Psychodidae. O gênero é *Lutzomyia* e a espécie é a *L. longipalpis* (Sherlock, 1969; Young & Lawyer, 1987).

No Brasil a doença é endêmica no Nordeste, principalmente no Ceará e na Bahia. Tem um curso clínico grave e fatal nos indivíduos susceptíveis não tratados.

2.1.2. Manifestações clínicas

A leishmaniose visceral é uma infecção cujas manifestações clínicas têm caráter espectral, observando-se um polo constituído por formas assintomáticas, e outro por formas graves e fatais. Entre estes polos há as formas aguda, sub-aguda e crônica.

Estudos populacionais em várias partes do mundo mostram que nas áreas endêmicas a maioria dos casos é assintomática (Manson-Bahr, 1967; Pampiglione & cols, 1974; Ho & cols., 1982). Estas observações foram amplamente confirmadas por Badaró & cols. (1986b) que mostraram uma relação infecção:doença de 18,5:1 na população até 15 anos de idade. Este mesmo grupo mostrou em estudos de prevalência e incidência que de 86 crianças infectadas, 23% permaneceram assintomáticas, 17,5% desenvolveram calazar em poucas semanas e que de 51 crianças com formas subclínicas ou oligossintomáticas, 25% evoluíram em cinco meses para um quadro de calazar clássico, enquanto 75% resolveram o processo sem ajuda de terapia em um prazo de 35 meses (Badaró & cols., 1986c).

O quadro clínico classicamente descrito nos livros-texto e em trabalhos clínicos está baseado na forma mais grave da doença. Badaró (1985) verificou que na área endêmica a maior parte dos pacientes têm uma doença menos grave e com menos complicações que os internados em hospitais de referência, e que os pacientes respondem melhor à terapia quando tratados mais precocemente.

O período de incubação é variável e de difícil avaliação (Napier, 1946; Most & Lavietes, 1947; Stone &

cols., 1952; Prata, 1957a; Alencar, 1959; Yan-Jia, 1982; Badaró & cols., 1986a). Pacientes imunodeprimidos podem apresentar as manifestações clínicas de calazar muitos anos após terem se retirado dos focos endêmicos (Badaró & cols., 1986a; Montalban & cols., 1989). Estes dados sugerem que o período de incubação varia em função do estado imunológico do indivíduo infectado, e parece que a relação parasito-hospedeiro tende a um equilíbrio que pode ser rompido.

Há poucos relatos sobre as manifestações clínicas nas formas assintomáticas ou oligossintomáticas da doença (Badaró & cols., 1986b).

A lesão de inoculação tem sido pouco estudada (Teixeira, 1980). Em estudos feitos na África descreveram-se lesões iniciais caracterizadas por pequenas pápulas avermelhadas, conhecidas como "leishmaniomias", que aparecem entre uma e três semanas após a picada dos flebótomos, duram até dois meses e desaparecem sem ulcerar, deixando manchas hiperpigmentadas (Mirzorian, N.A apud Kirk, 1944). Prata (1957a) descreveu lesões cicatriciais nos membros inferiores de alguns de seus pacientes mas não investigou terem sido estas as lesões iniciais.

A forma clássica da leishmaniose visceral, a despeito de diferenças clínico-epidemiológicas regionais, apresenta um conjunto de manifestações que são constantes. Os pacientes cursam sempre com uma síndrome febril, associada a esplenomegalia e/ou hepatomegalia, e anemia. Além destas manifestações descrevem-se palidez cutâneo-mucosa devida a anemia, hiperpigmentação da pele, alterações dos fâneros como

queda de cabelos e alongamento dos cílios, adenomegalia discreta, tosse seca e persistente, perda de peso, diarreia e fenômenos hemorrágicos (Napier, 1946; Most & Lavietes, 1947; Alencar & Aragão, 1955, Manson-Bahr & Heisch, 1956; Prata, 1957a, Rodrigues da Silva, 1957; Alencar, 1959; Pampiglione & cols., 1974a; Nadim & cols., 1978; Mengesha & Abuhoy, 1978; Maru, 1979; Yan-jia, 1982; Garcia & cols., 1983). Os pacientes evoluem com perda progressiva de peso e massa corpórea, chegando à caquexia, tornam-se susceptíveis a infecções bacterianas e podem ter episódios hemorrágicos.

As manifestações clínicas da leishmaniose visceral têm início abrupto ou insidioso. Na forma de início abrupto, Alencar (1959) chamou a atenção para uma forma com sintomatologia predominantemente respiratória com tosse intermitente, e outra entérica com diarreia.

Algumas vezes o calazar se manifesta por diarreia e disenteria, que nos quadros terminais pode ser muito grave (Mengesha & Abuhoy, 1978). Apesar de sua frequência, pouca importância tem sido dada a esta alteração, que na maioria das vezes é atribuída a poliparasitoses e infecções bacterianas intercorrentes (Rodrigues da Silva, 1957; Prata, 1957a).

Manifestações de desnutrição são freqüentemente referidas nos pacientes internados . Para Prata, o estado nutricional é determinante na evolução da doença e guarda alguma relação com o tempo de infecção. Porém, as tentativas de modificar o curso da doença instalada pela melhora do estado nutricional não surte efeitos como medida isolada (Corkill, 1949). Badaró (1985) e Cerf & cols. (1987) avaliaram especificamente o papel da desnutrição na

leishmaniose visceral e mostraram que este fator é de risco no desenvolvimento da doença, quando presente antes da infecção, e sugerem que um aporte nutricional adequado e precoce poderá evitar que estas crianças desenvolvam o quadro florido da doença.

Recentemente, Barral-Netto & cols. (1991) demonstraram níveis séricos muito elevados de TNF (do inglês Tumor necrosis factor) em doentes de calazar e sugeriram que este fator pode ser o responsável pela caquexia.

A palidez cutâneo-mucosa é um reflexo da anemia que todos os pacientes com calazar apresentam. Ela tem sido atribuída a múltiplos fatores (Martins & cols., 1965). Para uns ela decorreria, em grande parte, de uma maior atividade hemocaterética do baço hipertrofiado e do fígado, da hemodiluição decorrente da hiperglobulinemia, e da maior retenção de ferro pelas células do sistema fagocítico mononuclear (Knight & cols., 1967; Pippard & cols., 1986; Lazanas & cols., 1990; Castanet & cols., 1990). Parece que fatores de natureza imune estão implicados em sua patogênese (Pontes de Carvalho & cols., 1986).

Outra manifestação da leishmaniose visceral que tem importância clínica, epidemiológica e um significado biológico ainda pouco explorado é a leishmaniose dérmica pós-calazar. É descrito com muita frequência na Índia onde ocorre em mais de 5% dos casos tratados (Napier & Das Gupta, 1930; Napier, 1946) e raramente no Brasil e em outras regiões, exceto o Sudão (Kirk, 1944; Hoogstraal & Heyneman, 1969) e algumas regiões da China (Yan-jia, 1982). Estas lesões aparecem em um período de seis meses a cinco anos após o

tratamento bem sucedido de leishmaniose visceral ou após cura espontânea da doença, mas pode ser observada durante a fase de estado do calazar (Manson-Bahr, 1955; Yan-jia, 1982; Kirk, 1944; Napier, 1946; Majumdar, 1967; Girgla & cols., 1977). Aparecem como máculas hipercrômicas, eritemas, nódulos, lesões verrucosas, papilomatosas, e outras. Na Bahia, Teixeira (1980) investigou o comprometimento cutâneo em pacientes tratados e encontrou lesões máculo-hipocrômicas em 65,3% de 26 pacientes, eritematosas em 7,6% e eritemato-papular em 3,8%. Apesar do exame histológico não revelar parasitas, a cultura foi positiva em 35% deles. Estes dados sugerem que no curso da infecção pode se estabelecer uma nova relação parasito x hospedeiro, que deve implicar em fenômenos de natureza imune muito localizados e particulares.

2.1.3. Alterações laboratoriais

O quadro laboratorial dos pacientes com calazar mostra alterações muito típicas. Sob o ponto de vista hematológico a anemia é precoce e tende a se agravar com a evolução (Napier, 1946; Most & Lavietes, 1947). A maioria dos pacientes se apresenta com leucopenia às custas de granulocitopenia e com linfocitose relativa, vendo-se, algumas vezes, quadros de agranulocitose (Zia, 1934). Relata-se também plaquetopenia (Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957). Outra alteração muito característica da leishmaniose visceral é a hiperglobulinemia (Prata, 1957; Alencar, 1959; Cooper & cols., 1946; Chaves & Ferri, 1966; Silver & cols., 1961). O aumento se faz, principalmente, às custas das gamaglobulinas e se

acompanha de hipalbuminemia. A elevação das imunoglobulinas resulta de uma ativação policlonal e não oferece proteção contra a infecção (Galvão-Castro & cols., 1984), podendo formar complexos imunes circulantes. Além destas alterações tem-se descrito proteinúria de graus variáveis, cilindrúria e mesmo hematúria (Most & Lavietes, 1947; Prata, 1957a; Dutra & cols., 1985).

O período final da doença é marcado pelo agravamento da anemia, perda de peso com estabelecimento de caquexia, surgimento de edemas, ascite e quadro de anasarca. Os pacientes encontram-se prostrados, com diminuição da massa muscular, e anorexia intensa. A despeito de cursarem, muitas vezes, com leucocitose e neutrofilia, são muito susceptíveis a infecções bacterianas graves, sobretudo do trato respiratório, pele, e ouvido médio, o que sugere defeitos funcionais destes leucócitos (Most & Lavietes, 1947; Guerreiro & cols., 1985; Andrade & cols., 1990). A causa mortis se relaciona com estas infecções e com as hemorragias, sendo que as crianças são muito mais vulneráveis que os adultos (Alencar & Aragão, 1955; Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957; Hashemi-Naseb & Zadeh-Shirazi, 1980).

2.1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de leishmaniose visceral fundamenta-se nos dados clínico-epidemiológicos e na demonstração de parasitas através do exame direto, cultura ou inoculação em animais de laboratório, e em testes sorológicos. O emprego de teste cutâneo de hipersensibilidade tardia a antígenos de

leishmânia além de não ser espécie-específico, é negativo na fase aguda da doença (Manson-Bahr, 1967; Cahill, 1970; Mayrink & cols., 1971; Reed & cols., 1986; Badaró & cols., 1986c). Os pacientes com calazar são anérgicos a antígenos de leishmânia (Ho & cols., 1983; Mayrink & cols., 1971; Carvalho & cols., 1981, 1988). Este tipo de teste é importante para o estabelecimento de prevalência da infecção em áreas endêmicas, pois é positivo nos indivíduos que tiveram infecções curadas e nos assintomáticos, mas oferece problemas em áreas onde há, além da forma visceral da doença, a forma tegumentar e/ou tripanosomoses, e mesmo leishmânias atípicas como as que infectam répteis (Cahill, 1970; Ho & cols., 1982).

O uso de testes sorológicos fundamenta-se na demonstração de anticorpos anti-leishmânia. Todos os testes empregados apresentam problemas de especificidade e devem ser interpretados no seu contexto clínico-epidemiológico (Cahill, 1970; Badaró & cols., 1983; Blanchot & cols., 1984). Os testes mais empregados são a reação de fixação do complemento (Chung & Chang, 1951; La Place & cols., 1975; Teixeira, 1980), a hemaglutinação indireta (Teixeira, 1980), a imunofluorescência indireta (Badaró & cols., 1983; Camargo & Rebonato, 1969) e o teste imuno-enzimático-ELISA e suas variações (Hommel & cols., 1978; Teixeira, 1980; Badaró, 1985; Badaró & cols., 1986c). Nos inquéritos epidemiológicos o ELISA tem sido o mais utilizado.

A demonstração dos parasitas é a prova irrefutável da infecção. A pesquisa é feita através de exame direto de esfregaços corados pelo método do Giemsa, obtidos de punção de medula óssea ou de outras vísceras, pela cultura em meios

axênicos ou pela inoculação em animais susceptíveis como o hamster. Apesar de certa resistência, a punção esplênica tem sido a mais utilizada para esta demonstração, mostrando-se um método seguro, rápido e que oferece subsídios não apenas para o estabelecimento do diagnóstico, mas, também para a avaliação da eficácia terapêutica (Prata, 1957b; Ho & cols., 1948; Chulay & Bryceson, 1983; Badaró, 1985).

2.2. PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

2.2.1. Aspectos gerais

Os aspectos morfológicos da leishmaniose visceral são, na sua maioria, resultantes da proliferação dos parasitas no interior de células macrofágicas do sistema fagocítico-mononuclear e da reação inflamatória que ele ou seus produtos provocam. As promastigotas de leishmânias após serem fagocitadas pelos macrófagos se transformam em amastigotas, conseguem escapar dos mecanismos parasiticidas destas células, e proliferam causando morte e destruição celular.

Os órgãos mais envolvidos são os mais ricos em elementos do sistema fagocítico-mononuclear, ou sejam, baço, medula óssea e fígado.

O quadro histológico caracteriza-se por intensa hipertrofia, hiperplasia e parasitismo de macrófagos, e infiltração linfo-plasmocitária dos tecidos. Estes aspectos fundamentais da resposta tissular às leishmânias estão bem estabelecidos desde o trabalho original de Christophers (apud, Meleney, 1925). Alguns autores descrevem além da presença de

infiltração linfo-plasmocitária e proliferação de macrófagos, o encontro de arranjos nodulares de células inflamatórias constituindo granulomas (Andrade, 1958a, 1958b; Andrade & Andrade, 1966, Meleney, 1925). Há também referências a tumefação do endotélio e espessamento de fibras reticulares com ocasional fibrose (Andrade, 1958a). Outras alterações resultam da deposição de complexos imunes como ocorre nos glomérulos renais e nos septos alveolares dos pulmões.

Os estudos de grande número de necropsias mostram que praticamente todos os órgãos podem estar comprometidos em maior ou menor grau na leishmaniose visceral. Nesta revisão nos ateremos aos órgão mais intensamente comprometidos.

2.2.2. O baço

O baço, na maioria dos casos, está aumentado de tamanho, pesando entre 500 e 2000 gramas. Pode apresentar espessamento da cápsula devido a peri-esplenite (Coutinho, 1982). Ocasionalmente há infartos esplênicos e podem ser vistos nódulos de Gandy-Gamna (Veress & cols., 1977; Pampiglione & cols., 1974a).

O exame histológico mostra atrofia da polpa branca e desaparecimento dos centros germinativos (Meleney, 1925; Andrade, 1958a; Andrade & Andrade, 1966; Coutinho, 1982). As áreas timo-dependentes estão atrofiadas, podendo ocorrer necrose e fibrose, além de acúmulo de macrófagos parasitados. Por vezes, nestes folículos há deposição de material hialino, PAS positivo, semelhante a substância amilóide, e que tem sido interpretado como deposição de complexos imunes ou proteínas

plasmáticas (Meleney, 1925; Andrade, 1958; Veress & cols., 1977). Em alguns casos, no entanto, os folículos linfóides estão hipertrofiadas e têm centros germinativos proeminentes (Carvalho & cols., 1985).

A polpa vermelha mostra cordões de Bilioth infiltrados por plasmócitos e macrófagos, contendo número variável de parasitas (Andrade, 1958a; Veress & cols., 1974, 1977; Daneshbod, 1972). Raramente são descritos granulomas (Meleney, 1925).

Pampiglione & cols., (1974a) mostraram que não há uma relação direta entre o número de parasitas e a intensidade das alterações morfológicas, e Daneshbod (1972) sugeriu que o parasitismo é mais intenso nas fases iniciais da infecção, diminuindo com o passar do tempo.

2.2.3. O fígado

O fígado, devido ao fácil acesso através de biópsias por agulha, é o órgão mais freqüentemente estudado, sob o ponto de vista anatomopatológico, na leishmaniose visceral. Como nos demais órgãos há comprometimento das células do sistema fagocítico-mononuclear, caracterizado por hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, que, em proporções variadas, podem estar parasitadas. Há infiltração linfocitária dos sinusóides, e infiltrado linfo-plasmo-macrofágico dos espaços-porta (Meleney, 1925; Sen Gupta & cols., 1956; Andrade, 1958a; Rodrigues da Silva, 1957; Veress, 1974; Coutinho, 1982; Duarte, 1987; Duarte & Corbett, 1987). Tem-se descrito granulomas no interior do parênquima hepático ou nos

espaços-porta. Estes granulomas são formados por macrófagos misturados com linfócitos e plasmócitos, podem exibir necrose central, e em geral têm poucos parasitas (Meleney, 1925; Andrade & Andrade, 1966; Pampiglione & cols., 1974a). O encontro de granulomas hepáticos isolados foi a única alteração observada em indivíduos assintomáticos estudados no Norte da Itália (Pampiglione & cols., 1974a), e sua presença tem sido interpretada como evidência de resistência à infecção.

A esteatose hepatocelular é muito frequente e variável, e pode ser atribuída à desnutrição que a maioria dos doentes apresenta (Meleney, 1925; Sen Gupta & cols., 1956; Neafie & Connors, 1976; Coutinho, 1982). A necrose e a atrofia de hepatócitos isolados são frequentes (Veress & cols., 1974; Coutinho, 1982). Na Itália, durante um surto de casos graves e atípicos, observaram-se alguns fígados com necrose hepatocelular extensa e atrofia vermelha (Pampiglione & cols., 1974a). Em alguns trabalhos descrevem-se parasitas no interior de hepatócitos (Daneshbod, 1972; Bambirra & cols., 1980; Duarte & Corbett, 1987).

Um aspecto interessante do envolvimento hepático na leishmaniose visceral é a tendência ao aumento da matriz conjuntiva ao longo dos sinusóides. Este aumento da matriz é caracterizado, inicialmente, por um espessamento da trama reticular que pode progredir para a franca deposição de colágeno, culminando, nos casos mais crônicos e avançados, com uma fibrose difusa, que circunda e isola hepatócitos, referida com cirrose de Rogers. Este tipo de cirrose, apesar de bem caracterizada em pacientes hindus, tem sido pouco encontrada

no Brasil (Bogliolo, 1956; Andrade, 1958a; Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957; Raso & Siqueira, 1964; Coutinho, 1982; Duarte, 1987).

Estudos sistemáticos de biópsias hepáticas e de material de necropsia mostram que alguns pacientes têm depósito de um material hialino semelhante ao amilóide ao longo dos sinusóide, enquanto outros têm espessamento da trama reticular, sugerindo-se algum papel indutor da fibrogênese a este material (Andrade, 1958a; Andrade & Andrade, 1966; Daneshbod, 1972; Bambirra & cols., 1980; Coutinho, 1982). Esta fibrose pode ser intralobular ou portal e tem-se evidenciado a participação das células perisinusoidais de Ito neste processo (Duarte, 1987 e Duarte & Corbett, 1987). Prata (1957a) relatou o estudo de biópsias hepáticas em dezoito pacientes com calazar e mostrou aumento da matriz conjuntiva em vários deles, sendo que dois casos com evidências de hipertensão portal e varizes de esôfago tinham um quadro compatível com a cirrose de Rogers. Este autor chamou a atenção para o fato, à época inusitado, da regressão da fibrose hepática, observada em pacientes submetidos a biópsias antes e após o tratamento específico. Um dado muito curioso, relatado por este mesmo pesquisador, é que, em sua experiência, o número de parasitas em fígado diminui após o tratamento, mas não desaparece completamente. Até onze meses após a cura clínica foi possível, em alguns casos, a demonstração de parasitas em fígado.

Duarte e Corbett (1987), em um esforço para sistematizar os padrões de comprometimento hepático no calazar, propuseram a existência de três padrões morfológicos:

A) O padrão típico, caracterizado por intensa e difusa mobilização e parasitismo das células de Kupffer, com infiltração portal de linfócitos, plasmócitos e macrófagos ocasionalmente parasitados, esteatose e necrose hepatocelular.

B) O padrão nodular com arranjos nodulares de macrófagos, linfócitos e plasmócitos nos lóbulos e espaços-porta, sem células epitelióides, e com pouca mobilização das células de Kupffer. Nestes casos o parasitismo é escasso, sendo vistas formas amastigotas no interior de alguns nódulos.

C) O padrão fibrogênico, no qual os parasitas são raros, há proliferação intralobular de fibras reticulínicas e deposição de colágeno ao longo dos sinusóides. Algumas vezes a fibrose é intensa e constitui a cirrose de Rogers. Nestes casos a inflamação sinusoidal e portal são discretas. Para estes autores os distintos padrões morfológicos representam estágios evolutivos distintos da doença.

2.2.4. Os linfonodos

Os linfonodos estão aumentados de tamanho em uma grande percentagem de casos (Nandy & Chowdhery, 1984; Prata, 1957; Rodrigues da Silva, 1957; Neafie & Connors, 1976). No entanto, alguns autores relatam que eles estão de tamanho normal (Pampiglione & cols., 1974a). Em estudos de material de necropsias há referências que eles estão aumentados e que pode haver fibrose da cápsula (Andrade, 1958a; Coutinho, 1982). As observações microscópicas mostram atrofia de folículos, hiperplasia das células dos seios medulares, e histiocitose e plasmocitose dos cordões medulares (Andrade, 1958a; Veress &

cols., 1974, 1977). Por vezes há deposição de material hialino interfolicular semelhante ao descrito em baço (Veress, 1974; Coutinho, 1982).

Veress & cols., (1977) atentaram para atrofia das zonas timo-dependentes com depleção de pequenos linfócitos nas áreas paracorticais e sugeriram que mecanismos de natureza imune, desencadeados por antígenos parasitários, teriam alguma papel na destruição dos linfócitos.

A presença de parasitas é referida de modo muito variável e parece depender dos linfodos estudados e do tempo de evolução da doença (Meleney, 1925; Rodrigues da Silva, 1957; Andrade, 1958a; Daneshbod, 1972; Veress & cols, 1974, 1977; Coutinho, 1982). As células macrofágicas, além de parasitas, apresentam eritrofagocitose (Veress & cols., 1977).

2.2.5. Os rins

Apesar dos frequentes relatos de proteinúria em pacientes com calazar, poucos estudos sobre as alterações morfológicas renais são encontrados. Andrade & Iabuki (1972) estudaram as alterações renais em 18 casos autopsiados e verificaram, em todos eles, graus variáveis de comprometimento glomerular, caracterizado por espessamento membranoso hialino e fibrilar da matriz mesangial, que era mais intenso no polo vascular do tufo glomerular e se atenuava na periferia. Chamaram a atenção para a semelhança com a glomerulo-esclerose observada nos esquistossomóticos e nos cirróticos, e atribuíram a lesão à infiltração de proteínas plasmáticas

decorrente da hiperglobulinemia. Não observaram proliferação das células nem espessamento das membranas basais. Descreveram, ainda, alterações degenerativas do tipo hialinogoticular nas células dos túbulos proximais.

Alguns anos depois, Brito & cols. (1975) analisaram as biópsias renais de três pacientes com calazar, mas sem evidências clínicas de comprometimento renal, utilizando técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunofluorescência. Confirmaram os achados de Andrade & Labuki (1972) e descreveram proliferação de células mesangiais, e depósito de imunoglobulinas, complemento e fibrinogênio, sugerindo um papel do sistema imune nas alterações. A microscopia eletrônica confirmaram a presença de depósitos nos glomérulos e também na membrana basal de alguns túbulos. Não encontraram antígenos parasitários nas lesões. Achados ultra-estruturais semelhantes a estes e acrescido da descrição de fusionalamento dos podócitos foram relatados por Weisinger & cols. (1978) que estudaram uma paciente na Venezuela.

O envolvimento do interstício renal parece ser mais proeminente que o glomerular, conforme as descrições de Duarte & cols. (1983), que reviram estas alterações em 21 casos de necropsia e biópsia. Descreveram uma nefrite intersticial linfo-plasmocitária que julgam responsável, nos casos graves, pelo quadro de insuficiência renal. Para estes autores as alterações glomerulares são discretas e semelhantes às descritas pelos outros patologistas.

2.2.6. Outros órgãos

A medula óssea tem sido muito pouco estudada sob o ponto de vista anatomopatológico no calazar. O parasitismo de células macrofágicas é o fundamento para o método tão difundido da punção medular para o diagnóstico da doença. Andrade (1958a) observou hipoplasia da série mieloide, hiperplasia das células reticulares com acentuado parasitismo das células fagocitárias e intensa plasmocitose. Achados semelhantes foram descritos por Coutinho (1982) que acrescentou a presença de fibrose vista nos casos com evolução prolongada. Veress & cols. (1974) limitaram-se a descrever uma hiper celularidade da medula óssea, enquanto Neafie & Connor (1975) dizem que há conversão da medula óssea amarela em medula vermelha, e que o parasitismo é intenso na fase aguda e diminui com a cronificação.

O comprometimento pulmonar no calazar foi descrito por Andrade (1958a) e Andrade & Andrade (1966). Caracteriza-se por uma pneumonite intersticial focal ou difusa constituída por espessamento dos septos alveolares devido a infiltração de células inflamatórias mononucleares. Há um processo inflamatório em torno de brônquios e bronquíolos. Raramente foram encontrados parasitas. Achados semelhantes foram registrados por Veress & cols. (1974); Raso & Siqueira (1964) e Coutinho (1982).

Mais recentemente, Duarte & cols. (1989) descreveram os mesmos achados em 13 casos de necropsia e demonstraram fibrose dos septos alveolares e a presença de antígenos parasitários no tecido pulmonar que talvez sejam responsáveis pela patogênese das lesões.

2.3. O ENVOLVIMENTO INTESTINAL NO CALAZAR

A diarreia é uma manifestação clínica frequente no curso da leishmaniose visceral.

Os dados disponíveis em estudos de grandes séries mostram que sua frequência varia de 2,6% a 66,3% (Napier, 1946; Manson-Bahar & Heisch, 1956; Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957; Alencar, 1959; Nadim & cols., 1978; Mengesha & Abuhoy, 1978.; Maru, 1979.; Hashemi-Nasab & Zedeh-Shirazi, 1980; Yan-jia, 1982).

Na maioria dos trabalhos esta diarreia está mal caracterizado, mas há relatos de que algumas vezes ela é grave e mesmo fatal, como no Sudão.

Nos primeiros estudos clínicos sobre o calazar, realizados no início do século, há referências a diarreia, sendo que alguns autores relatam sua gravidade nas fases finais da doença (Donovan, 1904, apud, Rodrigues da Silva, 1957; Laveran, 1911, apud, Rodrigues da Silva, 1957).

As pesquisas feitas no Brasil mostraram que a frequência de diarreia é muito alta no calazar, variando de 42% a 66% (Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957; Alencar, 1959).

Prata (1957) estudou pacientes provenientes da área endêmica de Jacobina e constatou distensão abdominal, além de quadros diarreicos em 42,1%, uma frequência bem maior que a descrita por autores de outras partes.

Dados mais recentes confirmam que a diarreia é um achado frequente nesta doença e tende a ser mais intensa nos

pacientes mais graves (Maru, 1979; Garcia & cols., 1983; Badaró & cols., 1986b).

A despeito destas observações, não encontramos investigações sistemáticas sobre as causas de diarreia no curso do calazar. Geralmente, ela é atribuída a poliparasitoses ou outras infecção secundárias (Prata, 1957a; Badaró & cols., 1986b).

Apesar das frequentes referências a parasitose intestinal tivemos dificuldades em encontrar estudos bem conduzidos sobre este assunto. Na maioria das vezes há referências passageiras há exames parasitológicos de fezes. Badaró (1985), em seu trabalho de tese na área de Jacobina, fez estudos sistemáticos. Encontrou grande frequência de parasitismo intestinal tanto nos casos sem quanto nos casos com leishmaniose. A maioria dos pacientes tinha áscaris e ancilostomos. Também foi grande o número de indivíduos com ovos de *S.mansonii* nas fezes, e cistos de *Giardia lamblia* e *E. histolytica*. No grupo que desenvolveu calazar ocorreu um claro aumento da frequência de infecção por giárdia. O autor teve dificuldade em correlacionar parasitose intestinal com risco de desenvolvimento de formas sintomáticas de leishmaniose intestinal, mas sugeriu que, talvez, a parasitose intestinal seja importante no desencadeamento dos quadros de desnutrição.

Revendo-se a literatura, constata-se que, na primeira metade do século, pensou-se na possibilidade da leishmaniose visceral ser uma infecção transmitida por via fecal-oral devido a frequência com que se observava diarreia nos doentes.

Knowles (1920)) estudou quatro indianos com calazar e diarreia, e descreveu o encontro, nas fezes, de parasitas com aspectos sugestivos de leishmânias. Porém, a cultura de fezes foi negativa e a inoculação em macacos Rhesus não causou doença.

Nesta mesma década, Shortt e cols. (1929) que trabalharam na Índia, onde a doença apresenta surtos epidêmicos e se acompanha de quadros diarréicos, descreveram o encontro de leishmânias no exame parasitológico de fezes de pacientes com calazar. Sugeriram que esta via poderia ser importante na disseminação da doença, e que o parasitismo intestinal seria responsável pelos quadros diarréicos, mas não descartaram a possibilidade de infecções superimpostas causarem a diarreia, haja vista a frequência de enterites por outras causas.

Andrade (1958a), analisando estes dados da literatura chama a atenção para o fato de que na Índia e na China, há grande prevalência de amebíase intestinal e Napier (1947), relaciona os quadros diarréicos com febre tifóide.

Datam do início do século os primeiros relatos sobre os aspectos morfológicos do comprometimento intestinal no curso da leishmaniose. Todos são relatos esporádicos de casos de necropsia, e não mereceram de seus autores análises mais detalhadas.

O primeiro relato do encontro de leishmânias em intestino delgado de seres humanos foi feito por Perry, em 1922 (Apud, Meleney, 1925), que descreveu o comprometimento intestinal em dois casos de necropsia. Este autor encontrou parasitas em linfáticos da mucosa jejunal, associado a erosão

do epitélio das vilosidades, e sugeriu a possibilidade de liberação de parasitas viáveis na luz intestinal. Pouco tempo depois, Meleney (1925) descreveu o encontro de leishmãrias na mucosa de todo o trato digestivo, desde o estômago até o cólon, incluindo o apêndice cecal. Na descrição dos modelos experimentais do hamster e de macacos, este pesquisador relatou que o comprometimento intestinal diminuía no sentido caudal, e que as células parasitadas apareciam no topo das vilosidades e desapareciam na base.

No Brasil, Andrade (1958a) mostrou parasitas nas vilosidades da mucosa do jejuno em quatro pacientes necropsiados. O parasitismo era intenso, e os macrófagos parasitados localizavam-se no topo das vilosidades, deformando-as. Ele sugeriu que a distensão abdominal e a diarréia observadas por Prata (1957a) poderiam decorrer destas alterações morfológicas.

No caso necropsiado e relatado por Raso & Siqueira (1964) havia pequeno número de parasitas em macrófagos da mucosa e submucosa do intestino delgado.

O envolvimento intestinal, segundo Daneshbod (1972) tem uma distribuição segmentar, alternando áreas de denso parasitismo com outras sem parasitas mais infiltradas por células inflamatórias mononucleares. As vilosidades intestinais nas áreas parasitadas mostram-se alargadas e encurtadas devido a infiltrado linfo-plasmocitário e de macrófagos parasitados. Também Veress & cols. (1974) acharam parasitas na mucosa do intestino delgado, mas associado com áreas de ulceração e congestão. Estas ulcerações também foram

referidas por Coutinho (1982) que encontrou parasitismo de mucosa e submucosa em quatro casos de sua série de necropsias.

Com o desenvolvimento de técnicas que permitem a realização de biópsias do trato gastro-intestinal por via peroral, e por ser a leishmaniose visceral uma doença que cursa com diarreia, perde de peso e retardo do desenvolvimento físico, sugerindo síndromes de malabsorção, começaram a aparecer relatos esporádicos do envolvimento intestinal no curso da doença. A maioria destes trabalhos relata casos isolados e que são tratados como curiosidades, chamando-se a atenção para a possibilidade do diagnóstico de leishmaniose a partir do exame de biópsia intestinal.

O primeiro relato de diagnóstico in vivo de envolvimento intestinal no curso de calazar, através de biópsia de mucosa de jejuno com cápsula de Crosby, foi feito no Brasil por Sobral e cols. (1967). Tratava-se de paciente de 22 anos com calazar e síndrome de malabsorção. A biópsia mostrou intenso parasitismo de macrófagos da mucosa jejunal associada a atrofia parcial das vilosidades. A instituição da terapêutica anti-leishmânia resultou em reversão do quadro clínico e morfológico com volta a arquitetura normal da mucosa jejunal.

Em 1983, Challacombe e cols. descreveram o encontro de leishmânias em macrófagos da mucosa jejunal de uma criança de 13 meses de idade, procedente da Ilha de Malta. Esta criança apresentava uma síndrome febril com hepatoesplenomegalia e o mielograma havia sido negativo para protozoários. Como ela tinha uma síndrome de malabsorção foi feita uma biópsia de mucosa do jejuno e surpreenderam-se

macrófagos contendo leishmânias. A criança foi tratada com antimonial e recuperou-se. Estes autores sugeriram o uso de biópsia intestinal em casos de suspeita de calazar cujo mielograma seja negativo para protozoários. Não fizeram uma avaliação do parasitismo após o tratamento, nem correlacionaram a presença de parasitas com alterações da mucosa que pudessem estar relacionadas com a síndrome de malabsorção.

A pesquisa de leishmânias em biópsias intestinais de indivíduos com calazar, antes e após o tratamento, e testes de função intestinal foram feitas por Muigai & cols. (1983) trabalhando com indivíduos infectados de Nairobi (Quênia). Eles fizeram biópsias em três adultos e sete crianças. Destes apenas um tinha quadro de diarréia, e apresentava recidiva da doença. Em cinco deles foram encontrados parasitas em macrófagos na mucosa intestinal, associados a moderado infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário. Poucos casos tinham atrofia discreta a moderada das vilosidades intestinais. Os testes de absorção de vitamina A estavam alterados em sete e o de d-xilose em um, mas não foi feita correlação entre a intensidade do parasitismo e o grau de atrofia da mucosa com as alterações das provas funcionais. Os pacientes foram tratados e reavaliados 5-6 semanas após o término do tratamento com antimonial. Todos obtiveram cura parasitológica e mostraram melhora nos testes de função jejunal. Interessante é que o padrão de células inflamatórias modificou-se ao término do tratamento, aumentando o número de plasmócitos e reduzindo o número de linfócitos.

Outro caso esporádico do comprometimento intestinal no curso do calazar foi relatado por Veryres & Raimpai (1985). Estes autores descrevem uma síndrome diarréica febril leuconeutrópica em um paciente de 68 anos de idade, que tinha hipergamglobulinemia, títulos de anticorpos anti-leishmânia de 1/20480 e que se recuperou após tratamento com glucantime. Não fizeram demonstração do agente em intestino, mas sugeriram que estas formas atípicas de leishmaniose ocorrem na região do Mediterrâneo e devem ser investigadas.

Nesta mesma época Arnaud-Battandier & cols. (1985) estudaram uma criança de três anos proveniente da Argélia que era portadora de uma cardiopatia congênita e que tinha esplenomegalia, marasmo intenso e diarréia. A pesquisa de anticorpos anti-leishmânia foi negativa e dois esfregaços de medula óssea não mostraram parasitas. Foi feita uma biópsia intestinal que revelou, ao lado de atrofia completa das vilosidades intestinais, a presença, próxima ao epitélio superficial, de macrófagos parasitados por leishmânias. A criança foi tratada durante seis semanas com N-metilglucamina, e a biópsia de controle mostrou desaparecimento dos parasitas e recuperação parcial das vilosidades.

A maior série de casos, faz parte do estudo de Benhassine & cols. (1984) na Argélia, que analisaram biópsias do duodeno de 46 pacientes com leishmaniose visceral e demonstraram parasitas em 18 (39%) deles. Segundo estes autores a diarréia pode ser o sintoma predominante da doença, condicionando o prognóstico. Sugeriram que a diarréia é o principal fator responsável pela perda de peso e hipoalbuminemia. Eles interpretaram a diarréia como

consequência da presença de parasitas na mucosa intestinal. Neste trabalho eles avaliaram exames citológicos e biópsias e correlacionam o parasitismo com alterações morfológicas. Não fizeram referências à intensidade do parasitismo, não analisaram o infiltrado inflamatório, nem caracterizaram clinicamente os pacientes. Foram identificados parasitas em exame citológico de 11 casos em um total de 28, e em estudos histológicos em 10 de 32 casos. Em 17 casos foram feitos os dois exames e houve concordância em 13. Foi vista atrofia vilositária em 21 dos 36 casos, parcial em 17 e total em 4. As leishmânias foram vistas com maior frequência nos casos com atrofia. Não foi observada correlação entre diarreia e o grau de atrofia.

Mais recentemente Banerjee & Cols. (1990) descreveram um caso de leishmaniose visceral com envolvimento intestinal em um paciente portador de lepra tuberculóide, que desenvolveu uma síndrome de malabsorção. Na biópsia intestinal havia atrofia parcial das vilosidades e na lâmina própria numerosos macrófagos abarrotados de leishmânias. O tratamento com antimoniais reverteu o quadro. Os autores chamam a atenção para o diagnóstico diferencial com a Doença de Whipple, haja vista a localização dos macrófagos no topo das vilosidades.

A partir de 1989 surgiram alguns trabalhos mostrando infecção "oportunista" por leishmaníase em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS/SIDA) (Fernandez-Guerrero & cols., 1987; Montalban & cols., 1989; Berenguer & cols., 1989; Peters & cols., 1990). Sendino & Cols. (1990) descreveram um caso de paciente com HIV que apresentou quadro de diarreia e malabsorção associado com

intenso parasitismo de macrófagos da mucosa intestinal por leishmânias tanto em jejuno quanto em cólon. Este paciente tinha tido calazar algum tempo antes do diagnóstico de AIDS e tinha apresentado três recidivas. Após o tratamento com pentamidina recuperou-se bem. Os autores sugerem que a infecção por leishmânias deve ser incluída entre as infecções que causam diarreia crônica em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida, provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose visceral.

2.4. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Antes de relatarmos evidências de alterações das respostas imunes humoral e celular na leishmaniose visceral, teceremos algumas considerações acerca do papel dos macrófagos nesta parasitose, haja vista a importância das células do sistema fagocítico-mononuclear na patogênese da doença.

2.4.1. O papel dos macrófagos

Os fenômenos fundamentais nas infecções por leishmânias são a penetração, a multiplicação e a sobrevivência dos parasitas em macrófagos, células que, em outras circunstâncias, exercem grande atividade destruidora de vários patógenos.

Parece que a sobrevivência dos parasitas depende de sua penetração nestas células. Há múltiplas evidências de que

soro de indivíduos normais e imunes é capaz de destruir as leishmânias (Pearson & Steigbigel, 1980; Cunha & cols., 1981; Mosser & Edelson, 1987; Barral-Netto & cols., 1987b). Esta destruição que depende do complemento, não é capaz de evitar a infecção. As formas metacíclicas de leishmânias são menos susceptíveis à lise mediada por estes fatores. Nestas formas os parasitas expressam moléculas na superfície que se ligam ao fragmento C3b do complemento, facilitando o contacto dos parasitas com os macrófagos e sua fagocitose (Blackwell & cols., 1985; Puentes & cols., 1988). Assim, o sistema complemento, facilitando a fagocitose, favorece à infecção. Handman & Goding (1985) descreveram um lipopolissacarídeo (LPS) da membrana plasmática das leishmânias que é reconhecido por um receptor na superfície dos macrófagos e que facilita sua fagocitose. Sugerem, também, que este LPS tem alguma ação na neutralização de produtos do metabolismo do oxigênio ou das enzimas lisossomiais, favorecendo a sobrevivência dos parasitas no interior dos macrófagos.

Após a fagocitose, os vacúolos contendo os parasitas fusionam com os lisossomos dos macrófagos. Porém, as enzimas lisossômicas não são capazes de, sozinhas, destruir as leishmânias, que sobrevivem e se multiplicam neste local (Chang & Dwyer, 1976).

A ingestão dos parasitas desencadeia nos fagócitos uma verdadeira "explosão" com produção de metabólicos tóxicos do oxigênio, que podem destruir parasitas (Murray, 1981). Apesar deste mecanismo geral ser desencadeado na leishmaniose, tem-se verificado que os parasitas, em sua forma amastigota, produzem catalases e glutatión-peroxidase que neutralizam os

Assim, macrófagos inflamatórios e monócitos, têm uma menor capacidade de destruir leishmânias que os macrófagos residentes do peritônio, mesmo quando isolados de um mesmo indivíduo. Nesta mesma linha, Solbach & cols. (1987) mostraram que macrófagos imaturos, induzidos por injeção de GM-CSF são incapazes de sofrer ativação pelo gama-interferon, e portanto, não conseguem destruir leishmânias.

Em 1984 Panosian & cols. sugeriram que a ativação dos macrófagos dependeria não apenas da produção de citocinas, mas também de um contacto íntimo entre linfócitos e macrófagos. Achados semelhantes foram descritos por Sypek & Wyler (1985). Outro dado interessante na literatura é a demonstração, em alguns modelos experimentais, que a produção de citocinas por linfócitos especificamente estimulados induz, não apenas ativação de macrófagos com destruição de leishmânias, mas que células linfocitárias com perfil de células auxiliares podem promover a lise tanto de parasitas como dos macrófagos (Pham & Mauel, 1987).

Além da ativação dos macrófagos para a destruição de leishmânias através de produtos linfocitários, uma questão que deve também ser levada em consideração na patogênese das leishmanioses são características intrínsecas aos próprios macrófagos. Além das diferenças entre diferentes macrófagos de um mesmo hospedeiro, já anteriormente referida, que deve refletir diferenças na capacidade de apresentar antígenos, deve-se levar em consideração a produção de substâncias capazes de induzir a supressão da resposta imune, como já demonstrado na leishmaniose tegumentar, e que se faz através da produção de prostaglandinas pelos macrófagos (Petersen &

col., 1984). Recentemente, também em modelo de leishmaniose experimental cutânea, que macrófagos parasitados produzem TGF- β , uma citocina capaz de modular no sentido negativo os próprios macrófagos tornando-os mais susceptíveis (Barral-Netto & cols., 1992).

1.4.2. Considerações gerais sobre as respostas imunes humoral e celular.

Uma característica importante nos doentes de calazar é a hiperglobulinemia. Há uma ativação policlonal de linfócitos com produção de anticorpos específico e inespecíficos, além da formação de auto-anticorpos. Há ainda a demonstração da formação de complexos imunes circulantes, que, provavelmente participam na patogênese de algumas lesões observadas no calazar (Wolga & cols., 1983; Carvalho & cols., 1983; Galvão-Castro & cols., 1984; Pontes de Carvalho & cols., 1985).

A despeito desta formação de anticorpos, os dados disponíveis demonstram que estes anticorpos não conferem proteção. Os doentes têm altos títulos de anticorpos e estes parecem não interferir no curso da doença. As tentativas de transferência de imunidade passiva através de soro imune de camundongos imunizados por via subcutânea contra *L.donovani*, foram negativas (Jarecki-Black & cols., 1985). Em alguns estudos há evidências de que o soro imune inibe a fagocitose e interiorização de parasitas (Brandonisio & cols., 1986; Chang, 1981), porém em outro demonstrou-se que o soro de camundongos infectados com *L.amazonensis* aumentam a

respostas (Garcia & cols., 1987) . É importante levar em consideração que os linfócitos e fagócitos de parasitas por células do sistema fagocítico mononuclear por representar importante mecanismo para a sobrevivência e proliferação do patógeno, e portanto, do estabelecimento da doença.

O outro braço da resposta imune que está alterado no calazar é a resposta imune mediada por células. É clássica a observação da falta de resposta aos testes de hipersensibilidade cutânea tardia nos indivíduos doentes, quando desafiados com antígenos específicos e mesmo com outros antígenos cuja resposta é positiva na maioria dos indivíduos normais (Manson-Bahr, 1961; Teixeira, 1980; Andrade & cols., 1982; Badaño & cols., 1986c). Após o tratamento específico anti-leishmânia muitos pacientes passam a apresentar o teste cutâneo positivo e podem ser sensibilizados contra novos antígenos, sugerindo que realmente a doença leva a uma imunodepressão tanto específica quanto inespecífica (Manson-Bahr, 1961; Andrade & cols., 1982).

Em algumas series estudadas evidenciou-se redução do número de linfócitos T circulantes (Rezai & cols., 1978; Carvalho & cols., 1981, 1985). Corroborando estes achados, há dados provenientes de estudos de baços obtidos de autópsias que mostram redução do número de linfócitos nas áreas timo-dependentes (Veress & cols., 1977; Carvalho & cols., 1985).

A exploração funcional dos linfócitos frente a antígenos de leishmânia e outros mitógenos mostra que no curso do calazar há alterações na resposta destas células, resultando em produção deficiente de interleucina-2 e gama-interferon (Ho & cols., 1983; Carvalho & Bacellar, 1983;

Carvalho, 1985; Carvalho & cols., 1985; Carvalho & cols., 1987; Carvalho & cols., 1988; Bacellar & cols., 1991). Estudos mostram que estas alterações são bem menos intensas nos indivíduos infectados que fazem formas assintomáticas ou subclínicas da doença, e que após tratamento específico bem sucedido há reversão das alterações (Carvalho & cols., 1992). As tentativas de encontrar as causas para estas alterações levam a indicação da existência de células que induzem um efeito supressor, mas cujo perfil fenotípico não está delineado, e que fatores séricos podem também induzir este efeito, sendo que uma produção exagerada de receptores solúveis de interleucina-2 foi recentemente documentada (Barral-Netto, 1988; Carvalho & cols., 1989; Barral-Netto & cols., 1991). Há, ainda, alguns dados sugerindo que problemas dos macrófagos, como baixa produção de interleucina-1 esteja implicado (Ho & cols., 1992).

Os dados da literatura sugerem, em seu conjunto, que, no curso da leishmaniose visceral ocorre uma imunodesregulação complexa, envolvendo vários níveis do sistema. Continua sem resposta no entanto a questão fundamental de por que alguns indivíduos desenvolvem estas alterações e ficam doentes, enquanto outros conseguem estabelecer um equilíbrio na relação parasita-hospedeiro. A ocorrência de leishmaniose visceral como doença oportunista em pacientes com quadros variados de imunodeficiência, reforçam a importância da resposta imune na sua patogênese (Badaró & cols., 1986a; Fernandez-Guerrero & cols., 1987; Montalban & cols., 1989).

2.5. A BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL

2.5.1. Considerações gerais

As bases para a interpretação de biópsias intestinais foram desenvolvidas no diagnóstico de uma condição muito específica: a Doença Celíaca. Partiu-se do pressuposto de que esta doença atingia todo o jejuno proximal, de modo difuso e intenso. Assim, vários autores consideram como uma biópsia normal aquela que apresenta quatro vilosidades normais consecutivas (Schenk & cols., 1972; Perera & cols., 1975; Petras, 1989). Por outro lado, se uma vilosidade está normal, pensa-se, a priori, em descartar a possibilidade de doença celíaca.

As técnicas que permitem a realização de biópsias perorais da mucosa do trato digestivo foram rapidamente incorporadas na exploração clínica e laboratorial de outras doenças do intestino delgado. Atualmente indica-se biópsia jejunal peroral a pacientes com diarreia crônica e síndromes de malabsorção global ou seletiva, na hipoalbuminemia e edema de etiologia desconhecida, e nos retardos de crescimento de causas não-endócrinas (Penna & cols., 1983). O procedimento é relativamente inócuo e a contra-indicação formal restringe-se ao risco de sangramento em pacientes com distúrbios da coagulação e discrasias sanguíneas. As perfurações intestinais são muito raras. A síndrome pós-biópsia, caracterizada por dor abdominal, náuseas, vômitos e febre, são rapidamente revertidas com medidas de rotina (Perera & cols., 1975)

Na interpretação das alterações da mucosa objetiva-se encontrar aspectos que possam ser especificamente relacionados com certas doenças, identificar fatores etiológicos e suas

conseqüências imunológicas, além de avaliar a eficácia de vários tipos de tratamento (Schenk & cols., 1972). Estes mesmos autores sugeriram que biópsias intestinais fossem realizadas com o objetivo de avaliar a extensão e a incidência de anormalidades em populações ou áreas geográficas definidas, sobretudo onde ocorre jejunitis tropical, sprue tropical e desnutrição.

Inicialmente houve um esforço no sentido de se estabelecer parâmetros morfológicos específicos relacionados com entidades mórbidas específicas, sobretudo em se estabelecer o diagnóstico diferencial entre sprue celíaco e sprue tropical (Schenk & cols., 1965; Schenk & Samloff, 1968; Schenk & cols., 1968). Estes autores estudaram pacientes com quadro clínico bem desenvolvido de Doença Celíaca e interpretaram as alterações difusas de atrofia vilositária e inflamação como específicas, enquanto as alterações multifocais, com atrofia parcial da mucosa como típicas do sprue tropical. Desenvolveram métodos histoquímicos aplicados à interpretação de biópsias jejunais e correlacionaram achados morfológicos com alterações funcionais. Porém, desde cedo a especificidade das alterações morfológicas encontrou contestadores, que mostraram que em várias condições há uma sobreposição de quadros morfológicos (Hindle & Creamer, 1965; Stanfield & cols., 1965; Brunser & cols., 1966).

A biópsia intestinal foi sendo progressivamente difundida, e foi possível acumular o conhecimento sobre as formas menos graves de sprue celíaco, e sobre o frequente comprometimento intestinal apresentado por indivíduos que viajavam pelas tropicais (Lindenbaum, 1971; Gerson & cols.,

1971). Vários pesquisadores se interessaram em estudar a mucosa intestinal na desnutrição e em parasitoses intestinais, sobretudo na giardíase (Baker & cols., 1972; Lindenbaum & cols., 1972; Magalhães & cols., 1975; Brunser & cols., 1977; Levinson & cols., 1978; Hartong & cols., 1979; Campos & cols., 1979).

Desenvolveu-se então a compreensão de que a mucosa intestinal reage de forma relativamente limitada a uma série de agressões e que os quadros patognomônicos são menos frequentes do que inicialmente imaginado. O reconhecimento da "inespecificidade" das alterações qualitativas desencadeou uma vendeeira avalanche de uso de técnicas morfométricas na busca de alguma especificidade e sobretudo de índices que permitissem a diferenciação entre lesões discretas e variações do padrão normal (Dunhill & Whitehead, 1972; Corazza & cols., 1982; Penna & cols., 1981; Corazza & cols., 1985). Estas técnicas tem-se mostrado válidas no que diz respeito a diminuição de variação inter e intra-observador, mas parecem não resolver o problema da inespecificidade das lesões.

Em algumas circunstâncias, a biópsia intestinal tem oferecido resultados duvidosos quanto à correlação entre os achados morfológicos e as alterações clínico-laboratoriais, bem como à resposta a terapias específicas, sendo mesmo desaconselhada por alguns gastroenterologistas pediátricos (Manuel & cols., 1979; Goldgar & Vanderhoof, 1986). A realização de biópsias múltiplas tem mostrado que muitas doenças cursam com comprometimento multifocal da mucosa, havendo áreas preservadas ao lado de outras lesadas (Scott & Losowsky, 1976; Shiner & cols., 1990). Assim a

representatividade das lesões deve ser levada em consideração. Outro problema é que indivíduos assintomáticos, tomados como controles normais em certas áreas geográficas podem mostrar alterações morfológicas que só são vistas em indivíduos sintomáticos de outras regiões (Brunser & cols., 1970; Baker, 1973; Magalhães & cols., 1975).

Outra área de muito interesse na atualidade e que se desenvolveu com o advento das biópsias perorais foram os estudos acerca do sistema imune relacionado com o trato gastrointestinal e doenças envolvendo este sistema. Técnicas de imuno-marcação *in situ* e isolamento de células permitiram uma ampla dissecação das células deste sistema em condições normais e em doenças específicas. Estas técnicas estão sendo progressivamente incorporadas na rotina dos exames histopatológicos e poderão ser aplicadas na compreensão da patogênese de doenças.

A microscopia eletrônica foi usada para descrever os aspectos morfológicos normais. Sua aplicação tem sido limitada na área diagnóstica, mas é usada de forma específica para a compreensão de certas doenças como a Doença de Whipple e enteropatias bacterianas que cursam com diarreia crônica (Dobbin & Kawanishi, 1981; Shiner & cols., 1990).

2.5.2. Aspectos técnicos

A técnica da biópsia intestinal peroral desenvolveu-se a partir das técnicas empregadas em biópsias da mucosa gástrica com a utilização de tubo flexível (Wood & cols., 1949; Shiner, 1956). Pouco tempo depois Crosby & Kugler

(1957) desenvolveram um instrumento que consiste em uma cápsula acoplada a um tubo, e que dispõe de um mecanismo que, após sucção da mucosa intestinal por pressão negativa, permite o disparo de uma lâmina cortante que secciona a mucosa. As demais cápsulas de biópsias são variações desta cápsula original. Algumas permitem a retirada de múltiplos fragmentos e são acionadas por mecanismo hidráulico. Amplas revisões sobre os aspectos técnicos e conceituais na realização e interpretação das biópsias de mucosa intestinal estão disponíveis (Schenk & cols., 1968; Schenk & Klipstein, 1972.; Perera & cols., 1975; Penna & cols., 1983; Patri, 1983).

A cápsula é introduzida pelo nariz ou pela boca acoplada a um tubo radiopaco. O paciente deve ser mantido em jejum cerca de 12 horas antes da realização do exame. Através de fluoroscopia determina-se o local exato da biópsia. Estas são geralmente feitas a nível do ângulo de Treitz. Nesta área não há as glândulas de Brunner que deformam as vilosidades. A outra razão para a realização do exame nesta área é que na Doença Celíaca, as alterações são mais intensas no intestino proximal e diminuem de intensidade no sentido caudal (Perera & cols., 1975). No local faz-se pressão negativa e dispara-se o mecanismo de corte. A sonda é retirada trazendo a cápsula.

Após a abertura da cápsula retira-se o(s) fragmento(s) de mucosa. Esta retirada do material deve ser feita com muito cuidado com auxílio de pinças oftalmológicas ou com uma agulha fina. O fragmento é então estendido em uma superfície lisa, com a superfície externa voltada para cima e colocado sobre papel de filtro ou película sintética de

monofio, para facilitar as manipulações durante o processamento.

Alguns autores defendem a realização de exame estereoscópico sob lupa para a caracterização macroscópica do padrão vilositário. Este procedimento foi muito utilizado e pretendeu-se dar especificidade aos achados. Atualmente este exame é recomendado apenas para auxiliar a forma correta da inclusão do material em parafina e para se detectar alterações focais (Perera & cols., 1975).

O material deve ser fixado em formol neutro tamponado à 10% ou em líquido de Bouin. A fixação em Bouin, apesar de oferecer excelente preservação dos tecidos epiteliais, faz desaparecer as granulações típicas das células de Paneth. Uma parte do material pode ser congelado para cortes em criostato, ou pode ser fixada para a microscopia eletrônica. A maioria dos autores concorda que os estudos histológicos com técnicas convencionais responde à maioria das questões diagnósticas.

O material congelado pode, quando indicado, ser utilizado para estudos histoquímicos visando a quantificação de enzimas específicas.

A inclusão é feita em parafina ou em misturas de parafina com resinas sintéticas que permitem cortes uniformes. Nesta etapa do processo reside o grande problema da manipulação das biópsias intestinais. O material deve ser orientado de modo que as secções possam ser feitas perpendiculares à superfície da mucosa, e que as vilosidades sejam cortadas no sentido mais longitudinal possível. Este ponto é tão crítico que Perera & cols.(1975) sugerem que não

apenas o patologista que examina o material seja sempre o mesmo, mas que o técnico responsável pelo processamento não mude.

As secções devem ser múltiplas. A melhor área para estudo é a parte central da amostra, pois sofre menos artefatos. Preconiza-se a realização de mais de três lâminas por amostra contendo cerca de 10 a 15 secções cada. Os cortes são corados pela hematoxilina e eosina. Outras técnicas de coloração devem ser utilizadas de modo racional.

2.5.3. Interpretação do material da biópsia intestinal

Os critérios genericamente adotados para a interpretação de biópsias intestinais foram propostos por Schenk & cols. (1972). Basicamente avalia-se o padrão vilositário, levando-se em consideração graus semi-quantitativos de encurtamento e alargamento das vilosidades. A relação entre altura das vilosidades e profundidade das criptas, que é considerada normal de 4:1 a 5:1, também é graduada. Analisa-se o epitélio de revestimento que normalmente é cilíndrico alto, e que em condições mórbidas pode mostrar desde diminuição da altura até pseudo-estratificação. A intensidade do infiltrado inflamatório, referida como intensa, discreta ou moderada e os tipos celulares envolvidos são também referidos.

Os vários autores oferecem variações pequenas em torno destes mesmos critérios de interpretação. A alteração mais valorizada por todos é o grau de atrofia da vilosidades (Perera & cols., 1975; Patri, 1983; Petras, 1989).

Goldgar & Vanderhoof (1986), mesmo mostrando a falta de correlação entre os aspectos morfológicos e o curso clínico em crianças com diarreia intratável, oferecem um sistema de análise simultânea de múltiplas variáveis analisadas rotineiramente pelo patologista. Este método é simples e dispensa o uso de equipamento sofisticado. O grande problema na interpretação de biópsias intestinais, com ou sem ajuda de sistemas complexos, continua sendo a interpretação de achados limitrofes entre alterações mínimas e variações do normal. Perera & cols. (1975) sugerem que o patologista seja no mais das vezes descritivo e menos dogmático em seus diagnósticos, pois nem sempre é possível interpretar dinamicamente uma imagem limitada e fixa. Daí chama a atenção para a necessidade de uma boa correlação clínico-patológica.

O conhecimento da morfologia normal e de aspectos funcionais da mucosa jejunal é fundamental para a interpretação das biópsias e para se compreender possíveis mecanismos patogénéticos. Assim, em seguida, apresentaremos, de modo conciso, uma revisão sobre a mucosa do jejuno.

2.6. A MUCOSA DO JEJUNO

2.6.1. Descrição geral da mucosa do jejuno

A mucosa do intestino delgado, e em particular a do jejuno, desempenha importantes funções no processo digestivo, na absorção e na secreção, além de reconhecidas funções imunológicas.

A sua estrutura morfológica está, de certa forma, intimamente relacionada com suas funções.

A morfologia geral da mucosa do jejuno mostra um aspecto pregueado em decorrência do grande número de projeções digitiformes da mucosa, denominadas de vilosidades. Estas vilosidades são intercaladas por estruturas glandulares, conhecidas como criptas de Lieberkuhn. Nas áreas proximais do intestino delgado são encontradas 10-40 vilosidades/mm². O número de vilosidades é maior no duodeno e no jejuno proximal, tendendo a diminuir distalmente. A altura das vilosidades varia de 320 a 570um, e sua espessura de 85 a 140um. Técnicas especiais de microdissecção mostram vilosidades bem mais altas e espessas que com as técnicas usuais (Ferguson & cols., 1977). A relação vilosidades:criptas é de 4:1 a 5:1 (Schenk & cols., 1968; Slavin & cols., 1980; Corazza & cols., 1985 ; Bennett & cols., 1985).

A forma das vilosidades é variável. Em estudos estereoscópicos de material obtido de indivíduos caucasianos, mais de 90% das vilosidades têm aspecto digitiforme, enquanto em asiáticos, negros e latino-americanos que vivem nos Estados Unidos as vilosidades apresentam um aspecto mais heterogêneo, vendo-se vilosidades digitiformes, foliáceas, em forma de espadas e outras. Tem-se atribuído esta variação de forma a fatores ambientais como infecções bacterianas e virais, ou substâncias tóxicas na alimentação (Cook & cols., 1969; Baker, 1973). Contudo, estudos com técnicas de reconstrução tridimensional a partir de secções histológicas mostram que, mesmo em indivíduos normais, há variação na forma das vilosidades (Cocco & cols., 1966). Alguns fatores de ordem

técnica também podem interferir na altura e forma das vilosidades. Assim, o grau de contração da musculatura do eixo das vilosidades, a presença da muscular da mucosa, o grau de distensão intestinal no momento da retirada do fragmento, e o plano de secção interferem na morfologia final destas estruturas (Shenk & cols., 1968). Outro fator aventado é a taxa de renovação das células epiteliais. Quanto maior a taxa, maior a altura da vilosidade, e maior a tendência ao aspecto digitiforme (Morson & Dawson, 1990)..

As vilosidades são constituídas por um eixo conjuntivo revestido por uma camada de epitélio cilíndrico alto. Este epitélio invagina-se e constitui as criptas intestinais de Lieberkuhn. Há, em média, três a sete criptas para cada vilosidade (Ferguson & cols., 1977). Entre as criptas há um estroma frouxo, que forma a lâmina própria ou córion da mucosa intestinal. Descreveremos os diversos componentes da mucosa.

2.6.2. O epitélio

As criptas e as vilosidades intestinais estão revestidas por uma camada única de epitélio cilíndrico simples. Estas células são polarizadas, exibindo um núcleo ovóide de localização basal, com maior o eixo orientado no sentido do maior eixo da célula. O polo basal das células repousa sobre uma membrana basal e o polo em relação com a luz intestinal apresenta um aspecto em "borda em escova", devido a grande número de microvilosidades que aumenta a superfície de contacto. Esta borda em escova cora intensamente quando

aplicada a técnica do PAS (ácido periódico de Schiff) devido a presença de uma camada genericamente conhecida como "glicocalice", formada por substâncias muco-ácidas.

Nas secções coradas pela hematoxilina e eosina, à medida que progride das criptas para o topo das vilosidades, as células cilíndricas mostram citoplasma progressivamente mais eosinofílico e vacuolado, e núcleo picnótico (Shenk & cols., 1968).

As células epiteliais das vilosidades e das criptas se diferenciam a partir de "células-mãe" (stem cells), que se localizam na base das e criptas (Potten, 1975). Nas vilosidades as células são de três tipos: as células absortivas ou enterócitos, com borda em escova bem desenvolvida; as células produtoras de muco; e as células caliciformes. Nas criptas as células são: células muco-produtoras, células caliciformes, células endócrinas do sistema APUD, e células de Paneth. As células de Paneth tem função pouco conhecida, elas contem IgA e IgG, e seus grânulos característicos são ricos em lisozima (Morson & cols., 1990). As células endócrinas ou argentafins produzem grande quantidade de hormônios de atuação no aparelho digestivo.

As células caliciformes aparecem entre as células cilíndricas das vilosidades e das criptas. Seu número varia muito em diferentes vilosidades de um mesmo fragmento, e entre diferentes fragmentos. No topo das vilosidades a relação entre enterócitos e células caliciformes é de 8:1. Há evidências de que as células produtoras de muco progressivamente se diferenciam e maduram no sentido de células caliciformes (Lipkin, 1973).

Na região das criptas são encontradas figuras de mitoses, indicativas de renovação do epitélio, e que em condições normais estão presentes em 1% das células. A diferenciação dos enterócitos se inicia na transição entre criptas e vilosidades. Nesta área aparecem as microvilosidades que aumentam em número e altura na sentido do topo das vilosidades (Trier & Rubin, 1965). Há, porém, evidências em estudos feitos em crianças, que sob o ponto de vista morfológico, os enterócitos mais bem diferenciados, e provavelmente, funcionalmente mais ativos, estão localizados na região intermediária das vilosidades, enquanto os enterócitos localizados no topo, mostram aspectos degenerativos, com perda do número e tamanho das microvilosidades (Phillips & cols., 1979).

2.6.3. A lâmina própria

As células epiteliais repousam em uma membrana basal da qual partem, perpendicularmente, finas fibras reticulares que se inserem na tênue e frouxa matriz conjuntiva das vilosidades e do córion entre as criptas. Estas fibras reticulares também se inserem na parede de vasos sanguíneos e linfáticos. A matriz conjuntiva é frouxa e pouco colagenizada. Estão presentes delgadas fibras colágenas em torno das criptas. Neste tecido estão arteríolas, vênulas e capilares, um vaso linfático central, músculo liso e fibroblastos, além de filetes nervosos do sistema nervoso autônomo. Os fibroblastos se dispõem na interface células epiteliais -

mesênquima e parecem ter algum papel na regulação e manutenção das funções absorptivas e secretoras da mucosa (Parker & cols., 1974).

Além dos constituintes comuns a todo tecido conjuntivo, a mucosa intestinal tem a particularidade de conter, em condições normais, pequenas quantidades de células inflamatórias. Estas células são principalmente linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos.

2.6.4. O sistema imune associado à mucosa intestinal

A maior concentração de tecido linfóide nos seres humanos não está nos órgãos linfóides clássicos, mas espalhado nas mucosas sob a forma de folículos linfóides ou com um tecido mais difuso, formado por linfócitos T e B, linfócitos intra-epiteliais, macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos. Este tecido recebe a designação genérica de sistema MALT, do inglês "mucosa-associated lymphoid tissue", e no trato gastrointestinal tem a denominação de GALT, do inglês "gastrointestinal-associated lymphoid tissue. A localização estratégica deste tecido está relacionada com a porta de entrada de antígenos e patógenos (Roitt, 1988; Klein, 1990). Atualmente há muitas evidências de que as células deste sistema recirculam ativamente, e que devido a presença de moléculas de cito-adesão específicas, fazem um "homing" específico nas mucosas.

Os linfócitos B e os plasmócitos da mucosa intestinal secretam principalmente IgA, mas há também secreção de outras

imunoglobulinas, porém em menor quantidades. Uma vez sensibilizados na mucosa intestinal após contacto com o antígeno e cooperação com linfócitos T-auxiliadores, eles migram através do linfático eferente (na mucosa não há linfáticos aferentes) para os linfonodos mesentéricos, onde se diferenciam em células produtoras de imunoglobulinas, entram na circulação através dos linfáticos eferentes, chegam ao ducto torácico e a circulação sanguínea, voltando ao sistema MALT. Esta volta ao sistema MALT não é órgão-específica, i.e., células originalmente sensibilizadas na mucosa intestinal podem migrar para mucosa brônquica ou outra mucosa, e vice-versa, e parece depender de moléculas de cito-adesão presentes no endotélio e nas células circulantes (Mestecky & cols., 1988). A presença de antígenos na mucosa pode determinar respostas localizada ou sistêmica.

Os plasmócitos da mucosa intestinal foram estudados através de técnicas de imuno-marcação "in situ" para caracterização do perfil de síntese de imunoglobulinas. A maioria destas células sintetiza IgA, que sob a forma dimérica ou tetramérica, associada à proteína J é secretada na luz intestinal, através de um processo de transcitose após ligação específica com um receptor de membrana, recobrando e ligando-se à superfície dos enterócitos através de glicoproteínas do glicocálice (Mestecky & cols., 1988). Esta imunoglobulina é importante na aglutinação de microorganismos e antígenos alimentares, prevenindo sua ligação à superfície das células. A IgA é importante no estabelecimento da flora intestinal normal, e na proteção contra patógenos. A relação de

plasmócitos sintetizando IgA, IgM e IgG, em condições normais, é de 20:10:1 (Kingston & cols., 1981).

Os linfócitos da mucosa intestinal se organizam em folículos com centro germinativo contendo células B, e periferia constituída por linfócitos T, ou aparecem com uma distribuição difusa na mucosa e entre as células epiteliais do revestimento das vilosidades e criptas, sendo denominados de linfócitos intra-epiteliais (James & cols., 1988; James & cols., 1987). A caracterização fenotípica destas células através de marcação de antígenos de superfície mostra que a maioria dos linfócitos T tem características de células auxiliaadoras com perfil $CD4^+$, e que o número de células $CD4^+$ com perfil indutor de supressão ($CD4^+ CD45R^+$) é muito pequeno. Os linfócitos T $CD8^+$ têm, na sua maioria, características de células citotóxicas, havendo quantidade diminuída em relação ao sangue periférico de células com o perfil de células supressoras ($CD11^+$) (James & cols., 1988; James & cols., 1987). Um dado muito interessante em relação aos linfócitos da mucosa intestinal é que eles mostram maior quantidade de receptores de IL-2 que os linfócitos em outros órgão, sugerindo que estão em estado de ativação permanente, talvez resultante da continuada estimulação antigênica a que estão submetidos (Zeitz & cols., 1988).

Os linfócitos intra-epiteliais são vistos entre as células epiteliais de revestimento das vilosidades e das criptas, acima da membrana basal. Seu número varia de 7 a 30/100 células epiteliais. São linfócitos grandes, com citoplasma granuloso (Ferguson, 1977; Selby & cols., 1981; Cerf-Bensussan & cols., 1985). A maioria tem perfil fenotípico

de linfócitos T supressores, exibindo CD8. Poucos são linfócitos T auxiliares, e raros são linfócitos B. Uma percentagem destas células têm características morfológicas de células NK (natural killer), mas não se tem demonstrado atividade citotóxica nestas células (Dobbins, 1986). A função destas células não é bem conhecida, mas supõe-se que elas modulem a resposta imune em condições normais e patológicas, contrapondo-se ao perfil auxiliador das células T da lamina própria.

Os macrófagos da mucosa intestinal podem ser isolados para estudos in vitro e também têm sido caracterizados in vivo (Golder & Doe, 1983; Selby & cols., 1983). Estas células localizam-se, preferencialmente, no eixo das vilosidades intestinais, onde normalmente há poucos linfócitos e plasmócitos. Foram identificados dois tipos morfológicos distintos, que também exibem perfis fenotípicos diversos, tendo sido interpretados como morfo e funcionalmente heterogêneos. A maioria dos macrófagos tem aspecto interdigitante com prolongamentos longos, e sob o ponto de vista funcional apresentam-se com o perfil de células apresentadoras de antígenos, expressando HLA-DR e ATPase na superfície. Uma minoria dos macrófagos (10 a 20%) tem características de macrófagos inflamatórios, exibindo grande volume, superfície lisa e lisossomos. O perfil de células com pouca capacidade de apresentação de antígenos foi evidenciado pela ausência ou pequena expressão de ATPase, e grande expressão de fosfatase ácida.

Os mastócitos estão presentes em toda a extensão da mucosa do trato digestivo, mas não são vistos no epitélio. Sua

concentração é máxima a nível do jejuno, onde são encontrados cerca de 11.000/mm³. Os produtos destas células além de alterarem o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, estimulam a secreção de muco, aumentam a quimiotaxia e a capacidade de destruir parasitas dos eosinófilos, e promovem a inibição da síntese de linfocinas e anticorpos através dos linfócitos T supressores. Os eosinófilos estão presentes em pequena quantidade, mas o seu número aumenta nos processos alérgicos e nas helmintíases e outras parasitoses (Lee & cols., 1988; Klein, 1990).

2.7 OBJETIVOS

- 1) Descrever a nível histológico, as alterações morfológicas encontradas em mucosa de intestino delgado de crianças com calazar, obtidas através de biópsia per-oral.
- 2) Graduar segundo os critérios de Shenk & Klipstein e Goldegar & Vanderhoof, as alterações da mucosa intestinal de crianças com calazar.
- 3) Comparar estas alterações da mucosa intestinal com as encontradas na desnutrição e em outras parasitoses.
- 4) Verificar a frequência e a intensidade do parasitismo de células da mucosa intestinal por leishmânias em crianças com calazar.
- 5) Correlacionar as alterações morfológicas da mucosa de intestino delgado de crianças com calazar, com a intensidade do parasitismo de células da mucosa por leishmânias.
- 6) Analisar a nível ultra-estrutural, as relações parasitas x hospedeiro, caracterizando as células do infiltrado inflamatório e suas relações com as leishmânias.
- 7) Investigar a nível ultra-estrutural, evidências e possíveis mecanismos parasiticidas in vivo, na leishmaniose visceral humana.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. PACIENTES COM CALAZAR

Foram estudadas fragmentos de mucosa do jejuno obtidos, através de biópsia peroral, de 20 pacientes internados no Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia ou no Centro de Reidratação do INAMPS (CHR) com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral. Todos eram crianças e procediam de diversas regiões da Bahia e de Sergipe (um caso), e apresentavam os sinais e sintomas clássicos de calazar, quais sejam, hepato e/ou esplenomegalia, febre prolongada, anemia, e hiperglobulinemia. Em todos confirmou-se a suspeita diagnóstica através da demonstração de formas amastigotas de leishmânia, em esfregaços de punção esplênica ou de medula óssea corados pelo método do Giemsa, ou por cultura em meios artificiais.

Os dados relativos aos pacientes estão expressos nas tabelas 1 e 2. Todos eram crianças na faixa etária de um a onze anos; a maioria do sexo masculino. O intervalo entre o aparecimento dos sintomas e o internamento variou bastante. A partir dos prontuários clínicos foram levantados dados a respeito da intensidade do parasitismo nos esfregaços de punções esplênicas ou medulares. Na maioria dos pacientes tinha sido feita a avaliação do estado nutricional segundo os critérios de Gomez (1946) e procederam-se exames parasitológicos de fezes. Dados relativos a presença de diarréia foram levantados. Quase todos pacientes foram submetidos a testes de avaliação da função absorptiva

intestinal através de testes de absorção de triglicerídeos, de sacarose e lactose.

Três pacientes eram virgens de tratamento específico quando foram submetidos a primeira biópsia de mucosa de jejuno. Os demais estavam em diversos momentos do uso de terapia específica. Quatro deles tinham recidiva da doença e em seis havia evidências de resistência ao tratamento convencional com drogas antimoniais.

3.2. CASUÍSTICA

Foram realizadas biópsias em vinte pacientes. Alguns pacientes foram submetidos a mais de uma biópsia em momentos diferentes da evolução da doença. Trinta e um fragmentos foram analisados através da microscopia óptica. Vinte e dois fragmentos foram submetidos a análise ultra-estrutural com microscopia eletrônica de transmissão.

3.3. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MUCOSA INTESTINAL.

As crianças foram submetidas a biópsia de mucosa do intestino delgado por via per-oral. Os procedimentos foram realizados na Enfermaria de Pediatria do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia pelos membros do grupo de Gastroenterologia Pediátrica.

Foram utilizadas cápsulas de Watson, Crosby ou Carey. Os pacientes foram mantidos em jejum por, no mínimo, quatro horas. Após intubação nasal com sonda de nelaton no. 09, a sonda era "pescada" pela boca com gancho próprio e em sua extremidade distal era acoplada a cápsula de biópsia que

dispõe de um mecanismo cortante disparável por pressão negativa. Esta cápsula era conduzida até a oro-faringe e então deglutida pelo paciente. Aguardava-se a progressão da cápsula até a região duodeno-jejunal e procedia-se o disparo da cápsula. Em seguida a sonda era retirada e na oro-faringe recolhia-se a cápsula. Esta era aberta e o(s) fragmento(s) eram retirados e divididos para os diversos procedimentos.

3.4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL

3.4.1. Estudo histológico

Os fragmentos de mucosa foram estendidos em papel de filtro de modo que a superfície externa da mucosa ficasse para cima. Foram fixados em formol a 10% tamponado durante oito a 12 horas. Em seguida foram desidratados progressivamente em etanol, clarificados em xilol e embebidos em parafina. A inclusão em parafina foi orientada de modo que as secções incluíssem as vilosidades e criptas cortadas longitudinalmente. Os cortes foram feitos com 3 a 5 micra de espessura e foram corados pela hematoxilina e eosina.

3.4.2. Estudo ultra-estrutural

Fragmentos com um milímetro de espessura foram imediatamente fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 40C, durante uma hora. Após 12 horas de lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,2M, os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido

de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,15M, pH 7,4 a 400, durante uma hora. Foi feita desidratação em álcool etílico em concentrações progressivamente aumentadas a partir de 30% até álcool absoluto. Após passagens em óxido de propileno, foi feita inclusão em resina Polybed 812 (Polysciences Co., EEUU). Foram feitos cortes semifinos com 0,5 a 1,0 micrômetro de espessura com navalha de vidro, que foram montados em lâminas de vidro e coradas pelo azul de metileno-azur II (Richardson & cols., 1960), e estudadas em microscopia óptica. Dos blocos selecionados, foram feitos cortes ultra-finos com 600 angstroms de espessura, usando-se navalha de diamante em ultra-micrótomo Reichert-Jung Ultra-Cut II. As secções foram colhidas em grades de cobre de 200 malhas e contrastadas pelo acetato de uranila a 7% em álcool metílico absoluto e em citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Os exames foram feitos em um microscópio eletrônico Zeiss, modelo EM-109. As micrografias foram feitas em filme Kodalith Ortho de 70mm.

Na análise ultra-estrutural avaliou-se a natureza do infiltrado inflamatório e as relações parasito hospedeiro.

3.4.3. Estudo imunohistoquímico.

Afim de confirmar que os protozoários presentes na mucosa intestinal eram leishmânias foram realizados estudos imunohistoquímicos com anticorpos anti-leishmânia, segundo a técnica da imunoperoxidase indireta, em secções histológicas de fragmentos de mucosa intestinal fixada em formol e incluída em parafina.

3.4.3.1. Origem e preparação dos reagentes imunológicos

Os anticorpos anti-leishmânia foram preparados segundo os métodos a serem descritos.

3.4.3.1.1. *Cultivo de leishmânia*

Para a produção de anticorpos anti-leishmânicos foram utilizados protozoários de um isolado de *Leishmânia amazonensis*, caracterizado através de um painel de anticorpos monoclonais (Dr. Gabriel Grimaldi, FIOCRUZ, Rio de Janeiro), mantido em cultura in vitro em meio LIT (Liver infusion Tryptose) suplementado com 5% soro bovino fetal, 1% de meio RPMI dez vezes concentrado, e 1% de meio 199 dez vezes concentrado.

3.4.3.1.2. *Produção de anticorpos anti-leishmânia*

Para a produção de anticorpos anti-leishmânia foram utilizados coelhos que durante sete semanas consecutivas foram inoculados por via intravenosa com 10^7 formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária de crescimento em cultura in vitro. Uma semana após a última inoculação determinou-se a presença de anticorpos no soro através de um teste de ELISA, utilizando-se como antígeno um extrato de leishmânia. O soro utilizado mostra uma reação positiva até a diluição de 1:1000.

3.4.3.2. Procedimentos da imunomarcação

Secções histológicas de fragmentos de mucosa intestinal de crianças com calazar, com espessura de 5 micra, foram desparafinizados em três banhos de xilol, durante 30 minutos. Em seguida o xilol foi removido com um banho de dois minutos em álcool absoluto. A peroxidase endógena foi bloqueada em um banho de uma hora em uma mistura de metanol contendo peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 1%, azida de sódio a 0,1%. A inibição de reações inespecíficas foi feita utilizando-se um banho de uma hora na mistura de PBS contendo leite desnatado (MOLICO) a 0,2% e 10% de soro normal humano do tipo AB. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados, durante uma noite a 4°C, com o soro do coelho imunizado com leishmânia diluído a 1:360, em PBS (Phosphate buffer saline - solução salina tamponada) contendo 10% de soro normal humano do tipo AB. Em seguida, após lavagens apropriadas, cobriram-se os cortes com soro de cabra anti-coelho (Sigma Co., EEUU) conjugado à peroxidase, diluído a 1:50, durante 30 minutos, em câmara úmida, à 37°C.

Seguiram-se novas lavagens e a enzima foi revelada oferecendo-se para uma reação corada a diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co., EEUU) diluída à 30% em PBS contendo peróxido de hidrogênio. Os cortes foram lavados, rapidamente corados em hematoxilina de Harris, desidratados em álcool, clarificados em xilol, e montados com laminulas de vidro sobre bálsamo.

3.4.3.3. Controles da imunomarcação

Para a avaliação do teste de imunomarcagem em tecido fixado em formol e parafinizados foram utilizados os seguintes controles da reação.

- a) Soro de coelho normal substituindo o anticorpo primário na técnica de imunoperoxidase indireta.
- b) Soro de coelho anti-leishmânia, previamente absorvido com formas amastigotas de Leishmânia, substituindo a anticorpo primário na técnica de imunoperoxidase indireta. Para tal, 1 ml de soro de coelho anti-leishmânia foi absorvido com um "pellet" de 1×10^5 promastigotas de *L.amazonensis*. O sobrenadante foi absorvido mais uma vez com um "pellet" contendo 5×10^4 *L.amazonensis*. O teste de imunomarcagem em tecido foi negativo usando-se um controle positivo.
- c) Secções de mucosa intestinal de crianças com Doença Celíaca, poliparasitose intestinal e desnutrição.
- d) Secções de lesões cutâneas de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com *L.amazonensis*.

3.5. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL

Além da descrição dos aspectos morfológicos gerais da mucosa intestinal e da semi-quantificação de parasitas, foram adotados os critérios descritos por Goldgar & Vanderhoof (1986) para avaliar o grau de comprometimento da mucosa, utilizando um método semi-quantitativo que permite o estabelecimento de escores. Incluiu-se, ainda, a semi-

A soma dos índices obtidos nos itens A, B, C, D e E gera o índice geral de alteração da mucosa, que divide os pacientes em três grupos:

De 0 a 4 pontos → Normal ou discretamente alterado

De 5 a 9 pontos → Moderadamente alterada

De 10 a 14 pontos → Intensamente alterada

3.6. ESTUDO DA MUCOSA INTESTINAL DE CRIANÇAS SEM CALAZAR

Afim de comparar os aspectos morfológicos da mucosa intestinal de crianças com calazar com as alterações morfológicas vistas em crianças com desnutrição e/ou giardíase, e diarreia crônica foram revistas as secções histológicas de mucosa intestinal de 22 crianças, 13 com graus variados de desnutrição e nove com giardíase. A faixa etária era a mesma das crianças com calazar, e tinham sido biopsiados no mesmo período de estudo dos casos de calazar.

3.7. ANALISE ESTATÍSTICA

Afim de analisar a associação entre alterações da mucosa intestinal e parasitismo dos macrófagos por leishmânias foi usado o coeficiente Gama de Goodman & Kruskal com a respectiva medida de significância (Levin, 1978). Para efeito dos cálculos as tabelas foram reduzidas a forma 3X3, juntando-se as colunas e linhas referentes a parasitismo discreto e ausente.

TABELA 1

DADOS RELATIVOS À IDADE, SEXO, TEMPO DE DOENÇA E PROCEDÊNCIA DE 26 PACIENTES COM COLAZAR, SUBMETIDOS À BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL

Paciente	Idade	Sexo	T.doença	Procedência	Hospital
F.F.S	6 anos	Mas	12 meses	Aracaju	HUPES
R.J	4 anos	Mas	08 meses	Camagari	HUPES
G.O.S	18 meses	Mas	05 meses	Lençóis	HUPES
D.R.S	11 anos	Mas	24 meses	Brejinhos	HUPES
E.C.F	16 meses	Mas	03 meses	Itaberaba	HUPES
D.C.S	20 meses	Fem	03 meses	Camagari	HUPES
M.S	3 anos	Mas	01 mês	Lençóis	CHR
C.R	5 anos	Mas	18 meses	C.Formoso	CHR
R.O.S	2 anos	Mas	06 meses	Jacobina	HUPES
P.A	4 anos	Fem	06 meses	Jacobina	HUPES
T.C.S	3 anos	Fem	03 meses	Entre Rios	HUPES
M.S.Q	14 meses	Mas	01 mês	Monte Alegre	HUPES
H.J.N	3 anos	Mas	06 meses	Jacobina	HUPES
E.S.S	1 ano	Fem	07 meses	Lençóis	HUPES
S.S.S	1 ano	Fem	01 mes	Itaberaba	HUPES
R.S.C	9 anos	Mas	10 dias	Cipó	HUPES
R.S.P	4 anos	Fem	01 mes	Jacobina	HUPES
M.S.A	5 anos	Mas	03 meses	Serra Preta	HUPES
L.A.G	6 anos	Fem	25 dias	Ituaçu	HUPES
P.A.S	5 anos	Mas	01 mês	Lençóis	HUPES

TABELA 2

DADOS CLÍNICOS DE 20 PACIENTES DE CALAZAR
 SUBMETIDOS A BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL

Paciente	Febre	Espienomegalia	Hepatomegalia	Diarréia	E.Nutricional
F.R.S	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC II
R.J	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC II
G.O.S	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC III
D.R.S	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC II
E.C.F	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC III
D.C.S	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC II
M.S	SIM	NÃO	SIM	NÃO	DPC II
C.R	SIM	SIM	SIM	NÃO	EUTRÓFICO
R.O.S	SIM	SIM	SIM	SIM	N.A
P.A	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC II
T.C.S	SIM	SIM	SIM	SIM	N.A
M.S.Q	SIM	SIM	SIM	NÃO	DPC I
H.J.N	SIM	SIM	SIM	SIM	DPC I
E.S.S	SIM	SIM	SIM	SIM	N.A
S.S.S	SIM	SIM	SIM	NÃO	EUTRÓFICO
R.S.C	SIM	SIM	SIM	SIM	EUTRÓFICO
R.S.P	SIM	SIM	SIM	NÃO	DPC III
M.S.A	SIM	SIM	SIM	SIM	N.A
L.A.G	SIM	SIM	NÃO	NÃO	DPC II
P.A.S	SIM	SIM	SIM	NÃO	DPC II

DPC= Desnutrição protéico-calórica

N.A= Não avaliado

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIÇÃO GERAL DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS

Foram analisadas secções histológicas de 31 fragmentos de mucosa de jejuno, obtidas através de biópsias per-orais de 20 crianças com diagnóstico clínico-laboratorial e parasitológico de calazar.

A microscopia óptica havia, em quase todos os casos, alterações inflamatórias no córion da mucosa, caracterizadas por infiltrado inflamatório de células mononucleares, notadamente plasmócitos, linfócitos e macrófagos, além de pequena quantidade de eosinófilos e raramente neutrófilos. A quantidade e distribuição destas células mostraram variações individuais. Este infiltrado era difuso e tendia a adensar-se no eixo das vilosidades intestinais. Em dezessete pacientes foram encontradas formas amastigotas de leishmânia no citoplasma de macrófagos. Em alguns pacientes o parasitismo intestinal era intenso, enquanto em outros havia poucos parasitas. Além destas, notaram-se alterações na arquitetura das vilosidades intestinais. Frequentemente observaram-se alargamento e encurtamento das vilosidades devido a presença do infiltrado inflamatório e edema. Muitos casos mostraram redução na relação vilosidades:criptas, que se traduzia por graus variados de atrofia vilositária.

Descreveremos, com detalhes, cada grupo de alterações observadas.

4.1.1. Parasitismo

Quantidades variáveis de formas amastigotas de leishmanias foram observadas na mucosa de espessura dos vinte pacientes estudados (85% dos casos). A tabela 3 mostra a distribuição do parasitismo intestinal, segundo sua intensidade. Nota-se que quase a metade dos pacientes tinha moderado a intenso parasitismo intestinal.

No total de 31 fragmentos estudados, foi possível a identificação de leishmânias em 21, ou seja, em cerca de 67% dos casos.

O parasitismo foi intenso em oito casos, moderado em quatro, discreto em nove, e esteve ausente em dez.

Os parasitas eram vistos no citoplasma de macrófagos. Nos casos com intenso parasitismo estas células predominavam no infiltrado e ocupavam todo o córion, exibindo citoplasma amplo e abarrotado de parasitas (Prancha 1, Figs.1 e 2). Os macrófagos parasitados distribuíam-se no córion superficial dissociando as criptas glandulares e se adensavam no eixo das vilosidades, causando alargamento, por vezes acentuado, e que conferiam a estas estruturas o aspecto em " baqueta de tambor " ou em " cogumelo " (Prancha 1, Figs.3 e 4). Quando o parasitismo era discreto, além de redução do número de macrófagos parasitados, o número de parasitas por macrófagos também era menor que nos casos com denso parasitismo, e estas células, em geral, eram encontradas no eixo das vilosidades, de permeio a outras células inflamatórias mononucleares (Prancha 1, Fig.5). Nos casos

cujo parasitismo foi considerado moderado a distribuição dos macrófagos parasitados era irregular. Algumas vilosidades mostravam-se intensamente parasitadas, enquanto outras estavam livres de parasitas.

4.1.2. Alterações no padrão vilositário

A análise do padrão vilositário da mucosa mostrou alterações em vinte e cinco das trinta e uma amostras (Tabela 4). Nos casos com alterações intensas notavam-se acentuados encurtamento e alargamento das vilosidades devido a inflamação e discreto edema. Nestas circunstâncias, as vilosidades exibiam aspecto digitiforme com topo arredondado (Prancha 2, Fig.1). Em um caso deste grupo havia completo desaparecimento das vilosidades e a mucosa tinha aspecto plano (Prancha 2, Fig.2). Nas amostras com alterações moderadas o encurtamento e o alargamento eram moderados, mesmo nas áreas sem parasitas (Prancha 2, Fig.3). Poucos fragmentos mostravam padrão vilositário normal, caracterizado por aspecto digitiforme, com escasso córion no eixo, contendo poucas células inflamatórias (Prancha 2, Fig.4). Nas áreas parasitadas as leishmânias eram vistas nos macrófagos do topo das vilosidades (Prancha 2, Fig.5). Em dois casos, devido ao pequeno tamanho dos fragmentos e dificuldades na orientação das secções, não foi possível avaliar o padrão vilositário.

TABELA 3

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

PRESENÇA DE PARASITAS NA MUCOSA DE INTESTINO
DELGADO EM 20 CRIANÇAS BIOPSIADAS

PARASITISMO	Nº Pacientes / Total
PRESENTE:	17/20 (85%)
Intenso	5/17
Moderado.....	4/17
Discreto.....	8/17
AUSENTE:	3/20 (15%)

PRANCHA 1

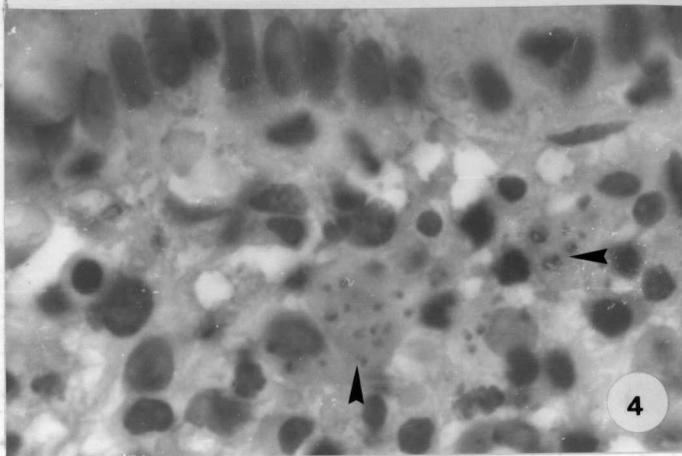
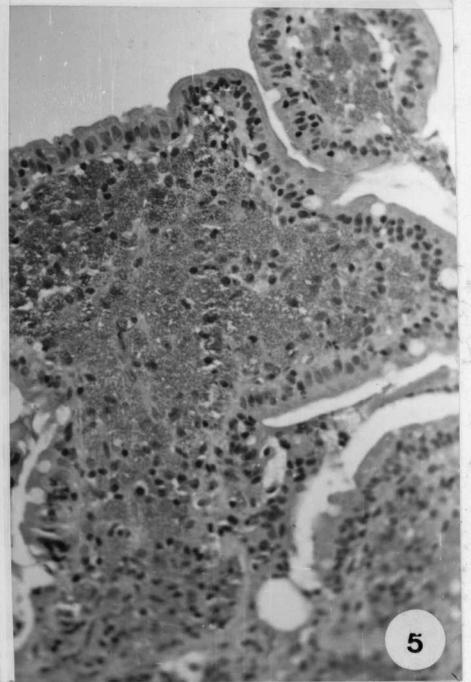
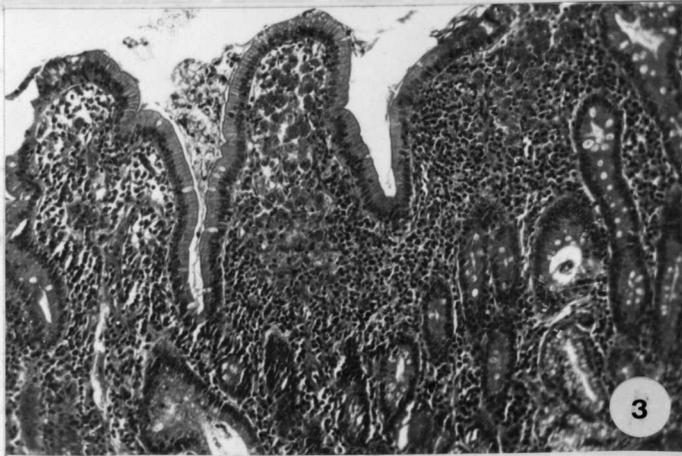
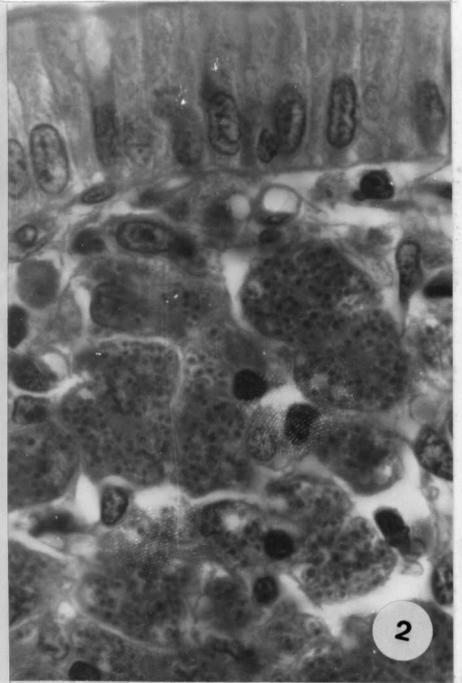
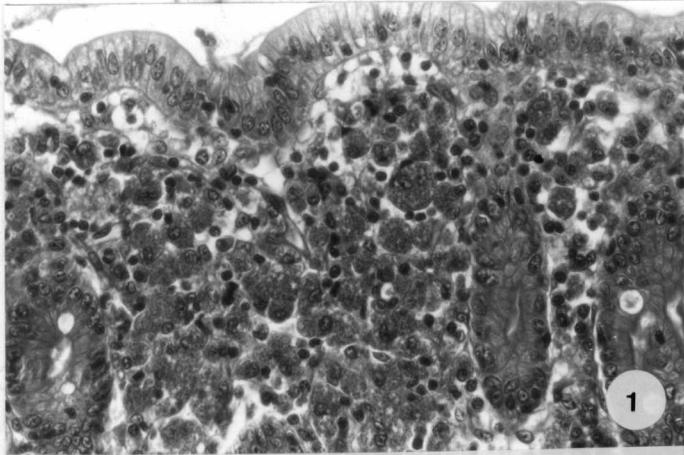
Fig. 1 - Parasitismo intestinal por leishmânia. Nota-se mucosa plana tendo no cólon macrófagos abarrotados de leishmânias. De permeio há poucos linfócitos. (H-E, X400).

Fig. 2 - Detalhe da foto anterior. Notam-se macrófagos amplos abarrotados de leishmânia e alguns linfócitos de permeio. No alto o epitélio cilíndrico alto do revestimento intestinal. (H-E, X1000).

Fig. 3 - Atrofia parcial e intensa de mucosa intestinal. Há inversão de relação vilosidades : criptas. Nota-se topo de vilosidade arredondado, contendo macrófagos parasitados. À medida que se distância da superfície diminui o número de macrófagos e aumenta o de linfócitos. (H-E, X100).

Fig. 4 - Vilosidade com acentuado alargamento devido a presença de macrófagos parasitados por leishmânias. O infiltrado é monomórfico, mas à medida que se desloca para dentro aumenta o número de linfócitos. (H-E, X200).

Fig. 5 - Presença de alguns macrófagos parasitados () em caso com discreto parasitismo. Note que o infiltrado é misto, vendo-se outras células mononucleares de permeio. (H-E, X1000).



4.1.3. Alterações na relação vilosidades : criptas.

A Tabela 4 mostra que a relação vilosidades : criptas estava intensamente alterada em vários casos, traduzindo a acentuada atrofia vilositária. Nestes, a relação estava invertida ou era de 1:1. Em outros fragmentos a atrofia vilositária era moderada, notando-se uma relação vilosidades : criptas de 2:1. Nos espécimens com discreta atrofia das vilosidades a relação vilosidades : criptas era de 3:1. Três casos mostravam vilosidades de aspecto normal. Estas vilosidades eram alongadas, digitiformes e a relação vilosidades : criptas era de 4:1 a 5:1. Nas três amostras que eram pequenas não foi possível a avaliação da relação vilosidades : criptas.

4.1.4. Epitélio Superficial

O epitélio de revestimento das vilosidades tinha aspecto colunar alto com borda em escova nítida em 17 dos fragmentos estudados. Em sete casos o epitélio era cúbico e nos outro sete mostrava evidências de pseudo-estratificação dos núcleos. Ocasionalmente eram vistos linfócitos intra-epiteliais, mas seu número sempre foi discreto a moderado.

4.1.5. Inflamação

Em apenas um caso, a quantidade de células inflamatórias mononucleares no córion foi considerada normal. Os demais tinham quantidades variadas de células inflamatórias (Tabela 4).

PRANCHA 2

Fig. 1 - Vilosidade com topo alargado e arredondado devido a acúmulo de macrófagos parasitados por leishmânias. Note que o infiltrado é intenso no topo e diminui no sentido da lâmina própria (imunoperoxidase anti-LSH, X400).

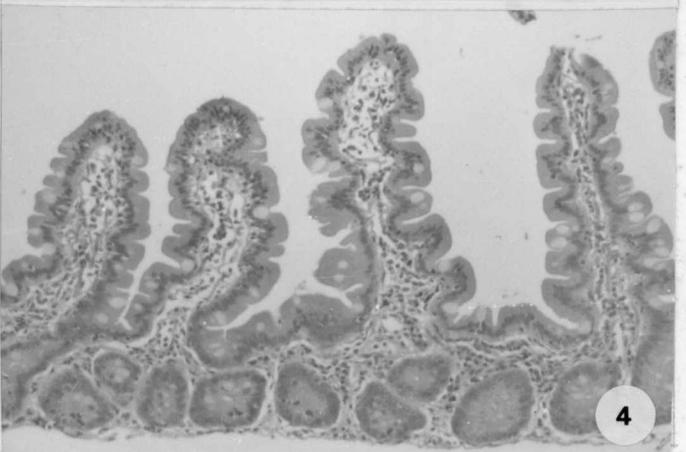
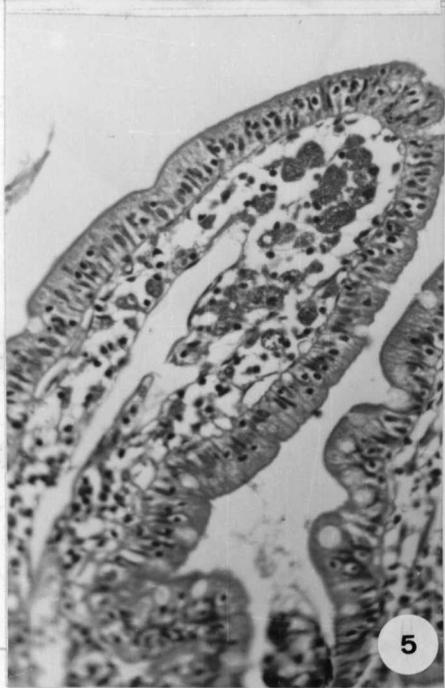
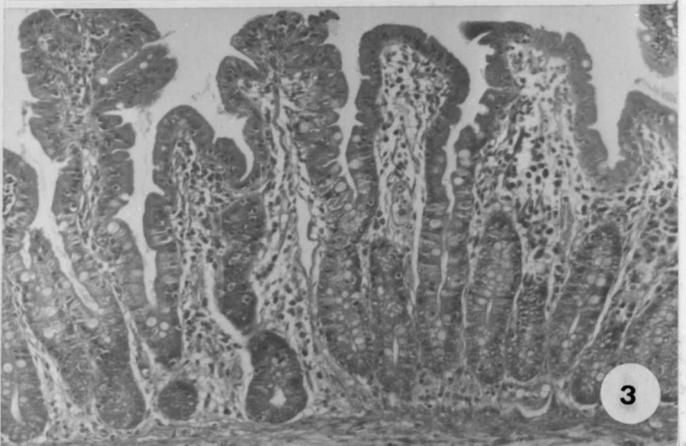
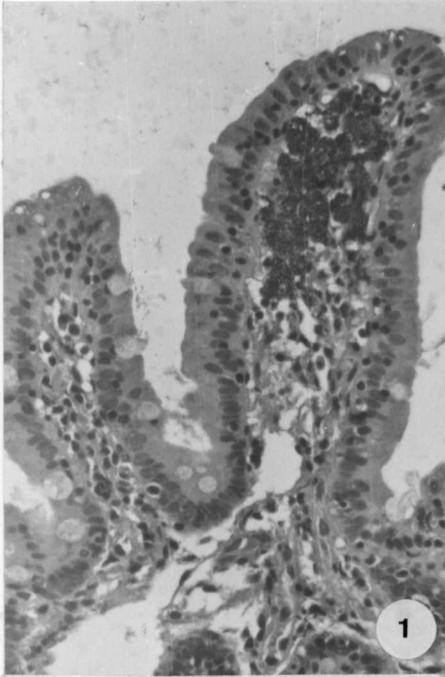
Fig. 2 - Atrofia completa das vilosidades intestinais em caso com intenso parasitismo. As criptas estão alongadas (H-E, X100).

Fig. 3 - Atrofia moderada das vilosidades. Notam-se vilosidades encurtadas e alargadas, com infiltrado mononuclear do córion. A relação vilosidades:criptas é de 2:1 a 1:1 (H-E, X100).

Fig. 4 - Mucosa com alterações histológicas mínimas. Há discreto infiltrado de células mononucleares no córion (H-E, X100).

Fig. 5 - Detalhe de vilosidade contendo poucos macrófagos parasitados na lâmina própria. Nota-se dilatação do linfático central. (H-E, X400).

FRANCHA 2



Na maioria dos casos o infiltrado era misto, e constituído por células inflamatórias mononucleares plasmocitárias, linfocitárias e macrofágicas. Em vários casos, além destas células, foram identificadas quantidades variáveis de eosinófilos, e, mais raramente, de neutrófilos.

Os macrófagos predominaram em nove casos e foram as células predominantes em todos os casos com intenso parasitismo. Eram vistos nas porções mais altas do córion e no eixo das vilosidades, e tendiam a desaparecer na direção da muscular da mucosa. Quando o parasitismo era moderado, freqüentemente eram vistos linfócitos de permeio aos macrófagos, às vezes em íntimo contacto com estas células (Prancha 3, Figs.1 e 2). Em casos com poucos parasitas ou mesmo sem parasitas demonstráveis, eram vistos alguns macrófagos contendo pigmento pardo-acastanhado e granuloso no citoplasma. Em alguns casos havia focos de destruição de macrófagos com liberação de parasitas para o interstício.

Em cinco fragmentos a célula inflamatória predominante foi o plasmócito. Destes quatro tinham moderado infiltrado e o outro tinha intenso infiltrado plasmocitário, constituindo uma enterite plasmocitária (Prancha 3, Fig.3).

Nos quinze casos restantes o infiltrado inflamatório foi do tipo misto, contendo quantidades semelhantes de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Prancha 3, Fig.4). Nestes casos a inflamação variou de discreta a moderada.

A presença de eosinófilos foi notada em vinte e um fragmentos. Seu número sempre foi menor que o das células inflamatórias mononucleares. Nos casos com parasitismo

discreto ou ausente e infiltrado misto, estas células foram mais numerosas que nos casos com parasitismo intenso e predomínio de infiltrado macrofágico.

4.1.6. índice geral de comprometimento da mucosa do jejuno

A avaliação do índice geral do comprometimento da mucosa através da quantificação das alterações anteriormente descritas mostra que a maioria dos fragmentos analisados tem índices que apontam para alterações moderadas a intensas. Em quatro casos não foi possível a avaliação devido a escassez do material e/ou problemas na orientação do fragmento. A Tabela 4 mostra a distribuição geral dos índices.

4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL DO GRUPO DE CRIANÇAS SEM CALAZAR.

A tabela 5 mostra os resultados da análise histológica de 22 biópsias intestinais de crianças desnutridas (13) e de crianças com giardíase. Não foram observadas diferenças quantitativas entre as alterações observadas neste grupo e nas crianças com calazar. Sob o ponto de vista qualitativo a natureza do infiltrado inflamatório foi semelhante a descrita nas crianças com poucas ou sem leishmânias na mucosa intestinal.

TABELA 4

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Alterações gerais observadas em 31 fragmentos
de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças
com Calazar

PARAMETROS	Intensidade das alterações				
	Intenso	Moderado	Discreto	Normal	N.A
Padrão vilositário	10	7	8	4	2
Relação vilos.:criptas	6	10	8	3	4
Inflamação	7	16	7	1	0
Índice geral	6	15	6	0	4

N.A - Não avaliado

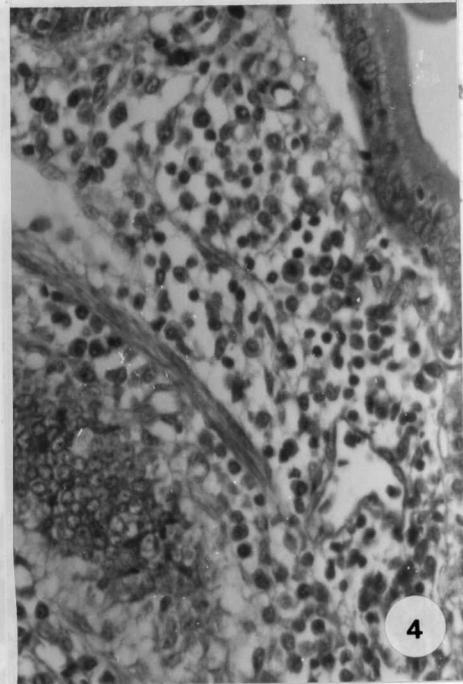
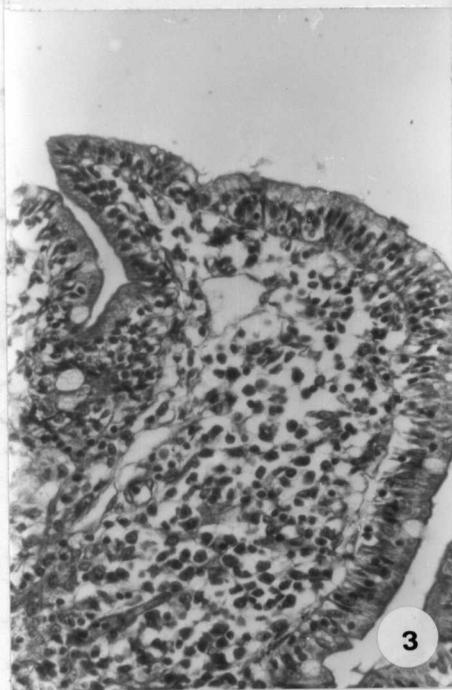
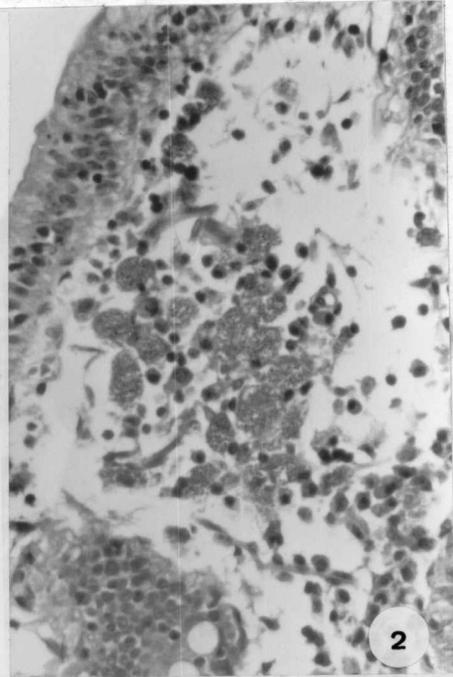
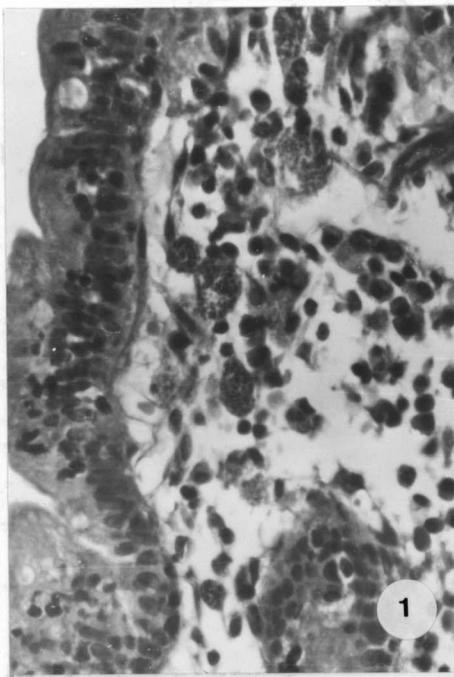
PRANCHA 3

Fig. 1 - Macrófagos parasitados por leishmãrias, tendo de permeio linfócitos e plasmócitos. (H-E, X400).

Fig. 2 - Area de infiltrado misto no eixo de uma vilosidade. Há vários macrófagos densamente parasitados com linfócitos de permeio e vários plasmócitos em torno. (H-E, X400).

Fig. 3 - Enterite plasmocitária. O infiltrado inflamatório no eixo da vilosidade consta, quase exclusivamente, de plasmócitos. (H-E, X400).

Fig. 4 - Vilosidade muito alargada por infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. Note a pseudo-estratificação dos núcleos do epitélio cilíndrico de revestimento da vilosidade. (H-E, X200).



4.3. ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO E ALTERAÇÕES DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.

4.3.1. Intensidade do parasitismo intestinal X alteração do padrão das vilosidades intestinais.

A Tabela 6 mostra a relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa do intestino delgado e o grau de alteração do padrão vilositário.

Os dados mostram uma correlação entre a intensidade do parasitismo e o grau de alteração do padrão vilositário.

No grupo com intenso parasitismo o padrão vilositário estava moderada ou acentuadamente alterado. Neste grupo foram observados três fragmentos com mucosa completamente plana.

No grupo com moderado parasitismo, as alterações do padrão vilositário foram semelhantes às vistas no grupo com intenso parasitismo.

Quando o parasitismo era discreto, as modificações do padrão vilositário tendiam a ser mais discretas.

Nas amostras sem parasitas demonstráveis, as alterações do padrão vilositário foram variadas. Dos três fragmentos com alteração moderada, dois representavam a segunda biópsia de pacientes que tinham mostrado parasitas na primeira. Um deles tinha intenso parasitismo e alteração acentuada do padrão vilositário. O outro tinha parasitismo moderado e alteração moderada.

TABELA 5

MORFOLOGIA DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO

Alterações gerais observadas em 22 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 22 crianças com desnutrição e/ou giardíase, sem Calazar

PARAMETROS	Intensidade das alterações			
	Intenso	Moderado	Discreto	Normal
Padrão vilositário	5	8	7	2
Relação vilos:criptas	5	8	5	4
Inflamação	5	11	6	0
Índice geral	6	10	6	0

TABELA 6

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa e o grau de alteração das vilosidades, em 31 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças com Calazar

PARASITISMO	Alterações do padrão vilositário					total
	Acentuado	Moderado	Discreto	Normal	N.A	
Intenso	7	1	-	-	-	8
Moderado	3	1	-	-	-	4
Discreto	-	2	4	2	1	9
Ausente	-	3	4	2	1	10
total	10	7	8	4	2	31

N.A - Não avaliado, Coeficiente Gama = +0,97, $P < 0,01$

4.3.2. Intensidade do parasitismo intestinal X intensidade do infiltrado das vilosidades.

A Tabela 7 mostra que há correlação entre a intensidade do parasitismo da mucosa intestinal e o grau de atrofia das vilosidades da mucosa.

Os fragmentos com acentuado parasitismo, mostravam moderada ou intensa atrofia das vilosidades, sendo que dois tinham inversão da relação vilosidades : criptas. Esta alteração se traduz por redução da relação vilosidades-criptas que passa a ser de 2:1 a 1:1.

Quando havia moderado parasitismo da mucosa, notava-se moderada atrofia das vilosidades.

Quando havia discreto parasitismo a atrofia era, na maioria dos casos, discreta.

Em dez amostras sem parasitas, apenas duas tinham atrofia moderada. As duas representavam a segunda amostra de pacientes que tiveram biópsia anterior mostrando parasitas. Os três casos que tinham atrofia discreta provinham de pacientes que tinham mostrado parasitas e graus de atrofia maiores ou semelhante em biópsia anterior. Duas amostras eram normais e em três não houve condições de avaliação do grau de atrofia.

4.3.3. Intensidade do parasitismo intestinal X intensidade do infiltrado inflamatório.

A tabela 8 mostra a relação entre a intensidade do parasitismo e a intensidade do infiltrado inflamatório.

Nos fragmentos que mostraram intenso parasitismo, havia intenso infiltrado inflamatório. Nestes casos a célula inflamatória predominante eram os macrófagos.

Nos casos com moderado parasitismo, a inflamação foi de moderada intensidade em todos. Nestes casos além de macrófagos eram vistos muitos plasmócitos e linfócitos.

Nas amostras com parasitismo discreto, a inflamação foi moderada ou discreta. O infiltrado tinha um caráter misto, vendo-se linfócitos, plasmócitos, macrófagos e alguns eosinófilos misturados.

Dos dez fragmentos sem parasitas, a inflamação foi moderada em cinco, sendo que a dois destes fragmentos provinham de pacientes que tinham mostrado parasitas em biópsias anteriores. Quatro tinham inflamação discreta, e três deles representavam a segunda biópsia de pacientes que tinham parasitas demonstráveis na biópsia anterior, enquanto o outro era o segundo fragmento proveniente de um indivíduo no qual não tinham sido encontrados parasitas anteriormente.

Apenas um caso não tinha número aumentado de células inflamatórias nem foram demonstrados parasitas. Provinha de um paciente cuja biópsia anterior mostrou raros parasitas.

4.3.4. Intensidade do parasitismo intestinal X grau geral de alteração da mucosa intestinal

Considerando-se os critérios anteriormente analisados, foi possível o estabelecimento de uma correlação entre a intensidade do parasitismo da mucosa e o índice geral de seu comprometimento. As Tabela 9 e 10 mostram a correlação

TABELA 7

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa e o grau de atrofia das vilosidades, em 31 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças com Calazar

PARASITISMO	Intensidade de atrofia das vilosidades					total
	Acentuada	Moderada	Discreta	Normal	N.A	
Intenso	6	2	-	-	-	8
Moderado	-	4	-	-	-	4
Discreto	-	2	5	1	1	9
Ausente	-	2	3	2	3	10
total	6	10	8	3	4	31

N.A = Não avaliado, Coeficiente Gama= +1, $P < 0,01$

TABELA E

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa intestinal e a intensidade do infiltrado inflamatório, em 31 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças com Calazar.

PARASITISMO	INTENSIDADE DA INFLAMAÇÃO				total
	Intensa	Moderada	Discreta	Ausente	
Intenso	8	0	0	0	8
Moderado	0	4	0	0	4
Discreto	0	6	3	0	9
Ausente	0	5	4	1	10
total	8	15	7	1	31

Coefficiente Gama= +1, $P < 0,01$

parasitismo X índice e parasitismo X grau geral de alteração, respectivamente.

No grupo com intenso parasitismo, sete tinham índice geral que mostravam alterações acentuadas da mucosa. O outro tinha índice geral nove, que apontava para o limite superior das alterações consideradas moderadas.

No grupo com moderado parasitismo os índices gerais apontam para alterações de moderada intensidade.

No grupo com poucos parasitas na mucosa intestinal, a maioria mostra índice geral que aponta para alterações discretas. Dois tinham índices que mostravam alterações moderadas. Um tinha índice oito e o outro índice cinco. Os outros três tinham índices dois, três e quatro.

No grupo sem parasitas demonstráveis, os índices gerais apontavam para alterações moderadas e discretas. Dos quatro fragmentos com índices que indicam alterações moderadas da mucosa, três provinham de pacientes que tinham biópsias anteriores mostrando parasitas, e cujos índices eram iguais ou superior ao da biópsia sem parasitas.

4.4 ESTUDO ULTRAESTRUTURAL

Dos vinte pacientes, dezesseis tiveram material processado e analisado a nível de microscopia eletrônica de transmissão. A análise ultra-estrutural prendeu-se ao estudo do infiltrado inflamatório e às relações entre os parasitas e as células do hospedeiro. Foram estudadas secções provenientes dos quatro grupos de pacientes identificados no estudo histológico.

TABELA 9

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa e o grau geral de alteração da mucosa em 31 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças com Calazar

PARASITISMO	Grau de alteração da mucosa				total
	Intenso	Moderado	Discreto	N.A	
Intenso	7	1	0	0	8
Moderado	0	4	0	0	4
Discreto	0	4	4	1	9
Ausente	0	4	3	3	10
total	7	13	7	4	31

N.A - Não avaliado, Coeficiente Gama= +1, P< 0,01

TABELA 10

ENVOLVIMENTO DO INTESTINO DELGADO NO CALAZAR

Relação entre a intensidade do parasitismo da mucosa intestinal e o índice geral de comprometimento da mucosa, em 31 fragmentos de mucosa intestinal, obtidos de 20 crianças com Calazar.

PARASITISMO	ÍNDICE GERAL														
	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01	NA
Intenso	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderado	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Discreto	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	2	1	0	1
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	2	0	3

N.A - Não avaliável.

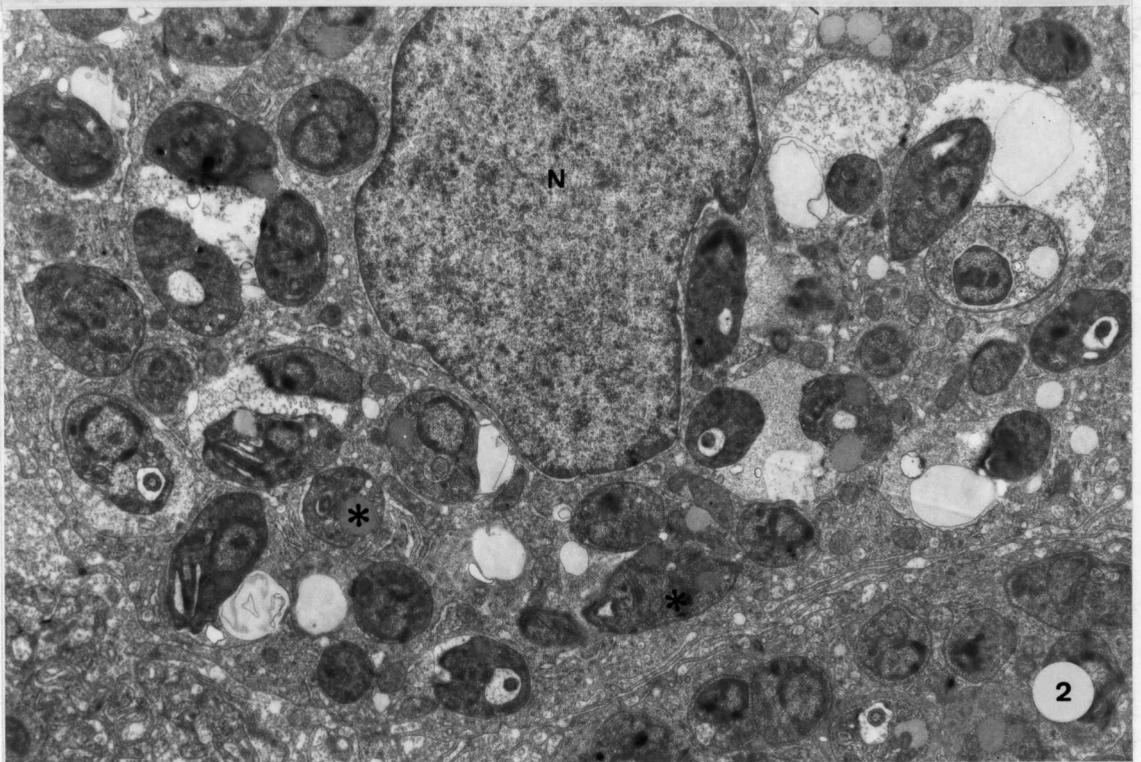
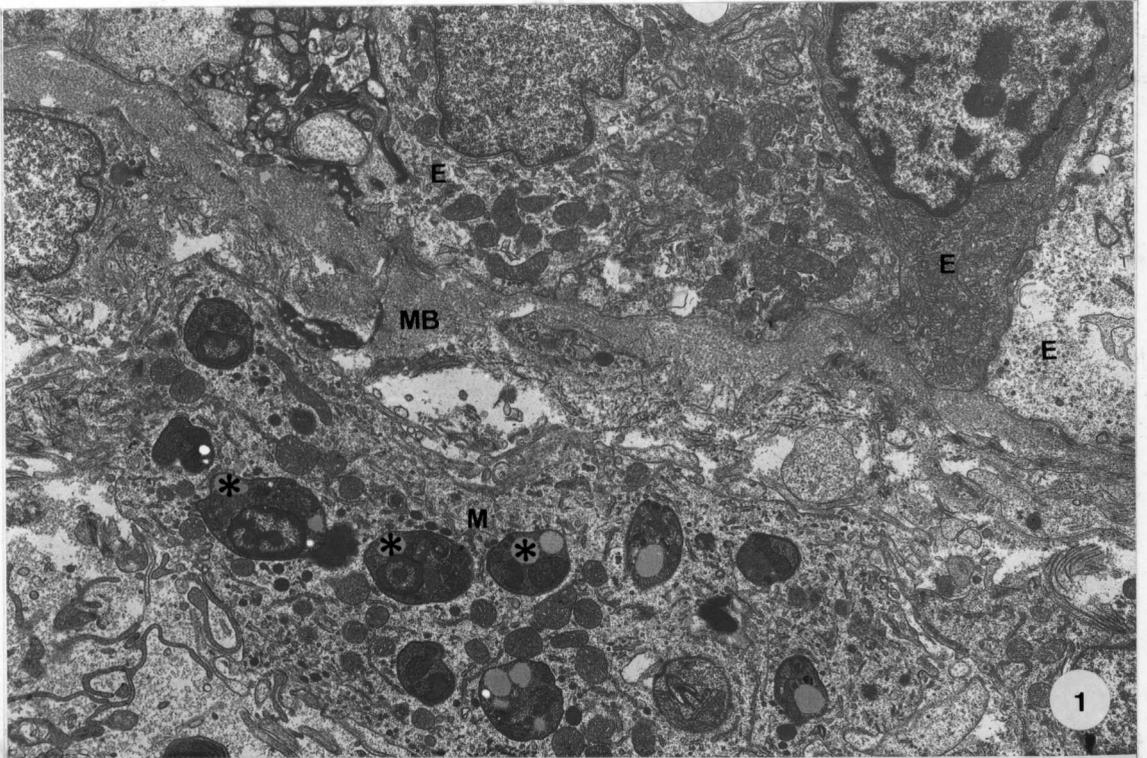
No grupo de pacientes com intenso parasitismo da mucosa, havia grande número de macrófagos densamente parasitados. Estas células localizavam-se no eixo das vilosidades ou no córion superficial, muito próximos uns dos outros (Prancha 4, Fig.1 e 2). Nestas circunstâncias o infiltrado era formado quase exclusivamente por macrófagos. Estes macrófagos continham, no citoplasma, grande número de formas amastigotas de leishmânias, que se localizavam no interior de vacúolos parasitóforos individualizados. Os vacúolos eram pequenos e sua membrana aparecia, na maioria das vezes, acolada à superfície dos parasitas. Raramente os vacúolos eram maiores ou apresentavam, além dos parasitas, conteúdo eletrôn-denso (Prancha 5, Fig.1). O citoplasma destes macrófagos era amplo, contendo muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi, porém poucos lisossomos (Prancha 5, Figs.2). A superfície externa era lisa, e raramente a membrana citoplasmática apresentava pequeno número de prolongamentos. Na maioria dos vacúolos parasitóforos, os parasitas estavam íntegros.

Em outras áreas, onde havia poucos parasitas, eram vistos focos de infiltrado inflamatório misto, contendo plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e poucos macrófagos. Os plasmócitos mostravam retículo endoplasmático rugoso muito desenvolvido, e algumas vezes, dilatados (Prancha 6, Fig.1). Alguns eosinófilos tinham aspecto imaturo mostrando citoplasma amplo, contendo poucos grânulos, enquanto outros tinham aspecto maduro e continham muitos grânulos (Prancha 6, Fig.2). As vezes estes infiltrados se faziam em torno de filetes

PRANCHA 4

Fig. 1 - Transição epitélio-lâmina própria. Vê-se parte do citoplasma de um macrófago abarrotado de leishmânias (*). O macrófago contém poucos lisossomos (▲) e muitas mitocôndrias (★). Célula epitelial (E), macrófago (M), membrana basal (MB). (X3300).

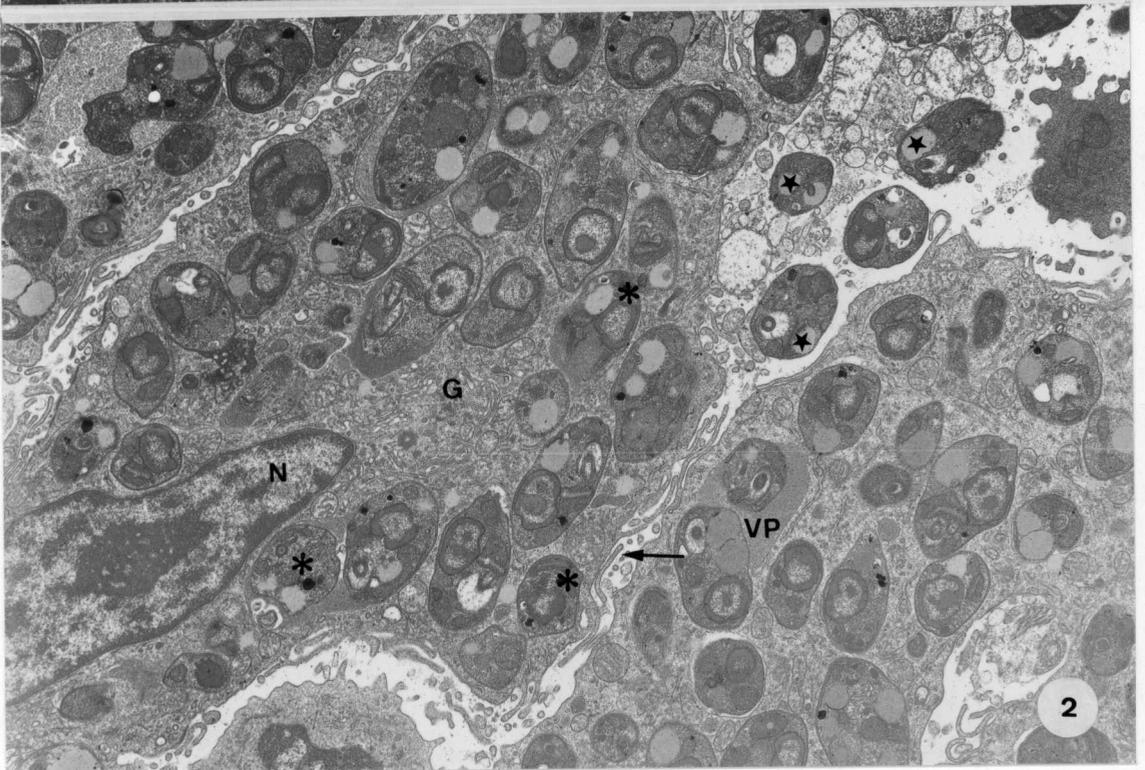
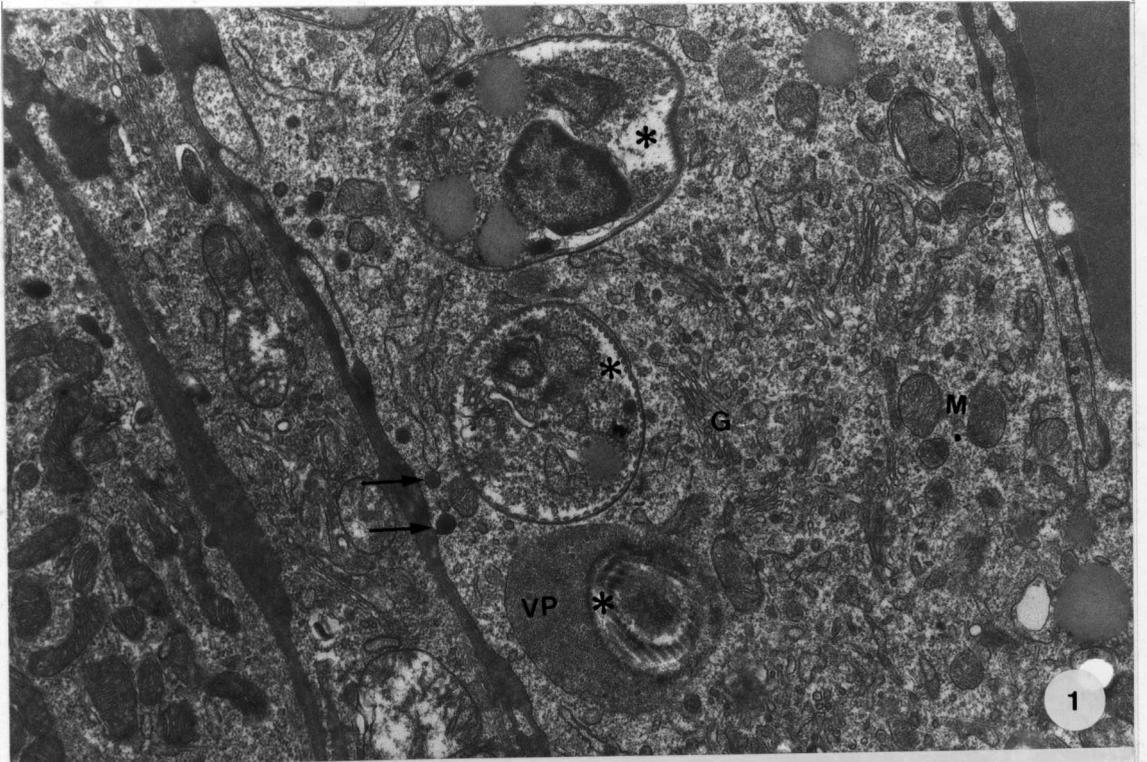
Fig. 2 - Macrófago com citoplasma cheio de formas amastigotas de leishmânia (*). Os vacúolos parasitófaros são estreitos, mas em algumas áreas estão dilatados (VP). Não há lisossomos no citoplasma. Núcleo (N). (X4400).



FRANCHA 5

Fig. 1 - Parte do citoplasma de um macrófago contendo leishmanias (*). Um dos vacúolos parasitófagos está dilatado e tem conteúdo eletro-denso (VP). O macrófago tem abundante aparelho de Golgi (G) e poucos e pequenos lisossomos (→), mitocôndrias (M). (X12000)

Fig. 2 - Macrófagos abarrotados de leishmanias. Note que a maioria dos vacúolos parasitófagos (VP) é estrito. As células têm poucos prolongamentos citoplasmáticos (seta) e aparelho de Golgi (G) muito desenvolvido. N (núcleo). Alguns parasitos estão livres no intestício (*). (X3300)



nervosos que mostravam células com citoplasma intumescido e de aspecto rarefeito (Prancha 6, Fig.2).

Além destes aspectos foram observados vários focos de lise de macrófagos com liberação de parasitas para o interstício (Prancha 7, Fig.1 e 2). Nestes focos de lise era frequente a associação dos macrófagos com outras células inflamatórias, sobretudo linfócitos. Estas células eram vistas na periferia destes focos de necrose ou de permeio a eles. Na periferia dos focos era possível a verificação de íntimo contacto entre os elementos linfocitários e os macrófagos parasitados (Prancha 7, Fig.2). Outras células frequentemente observadas nestas áreas eram os eosinófilos. Em algumas oportunidades foram vistos grânulos de eosinófilos de permeio a "debris" de células lisadas e parasitas íntegros e degenerados, livres no interstício.

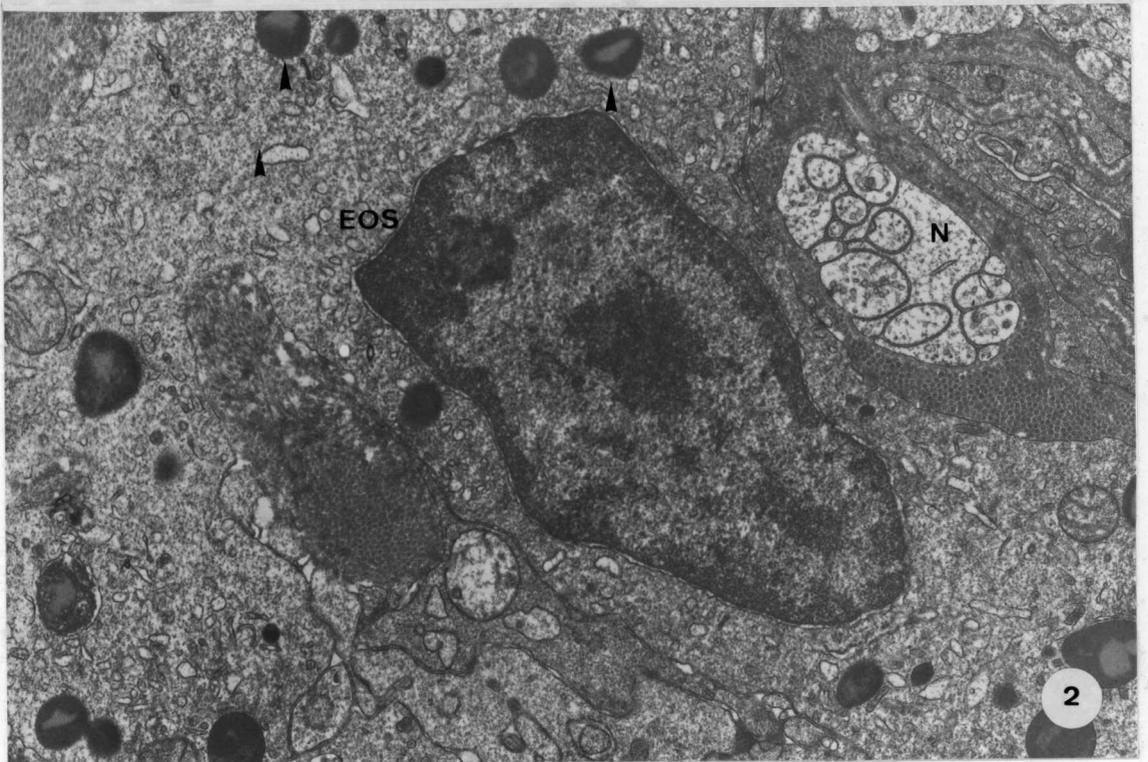
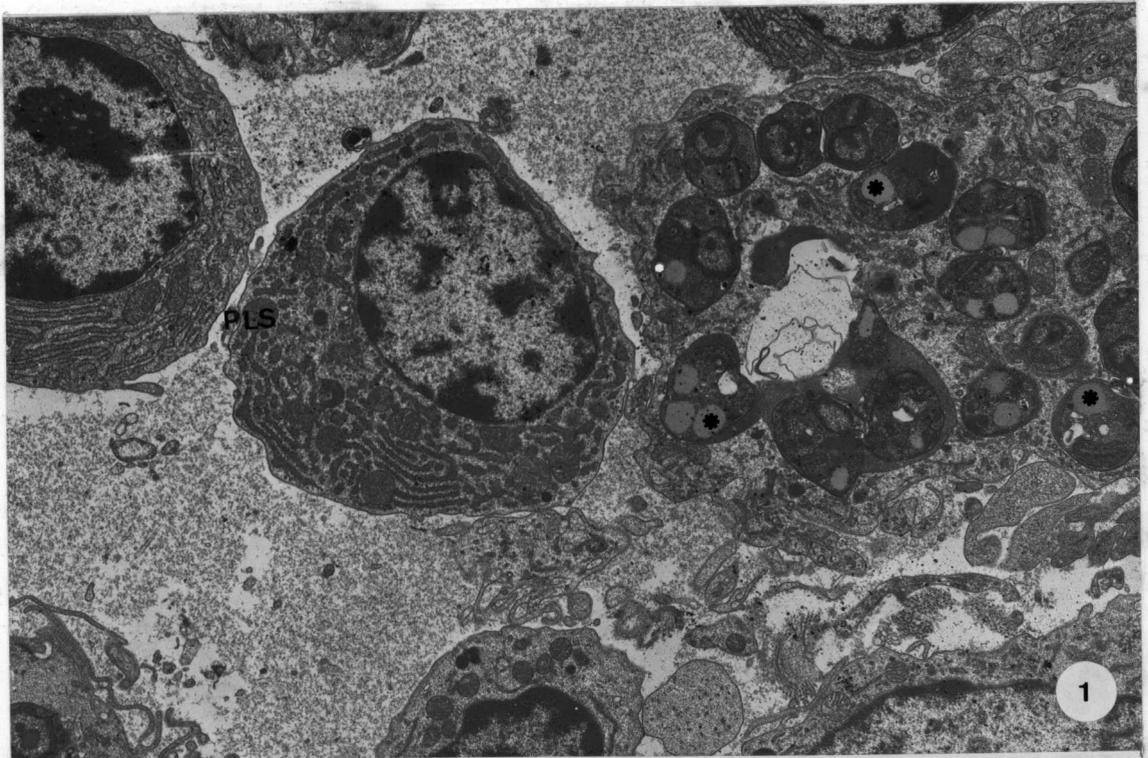
Ocasionalmente eram observados acúmulos de macrófagos de citoplasma amplo, próximos uns dos outros, contendo grande número de lisossomos, e vacúolos com restos de parasitas no interior.

Um paciente deste grupo teve material analisado em microscopia eletrônica quando foi diagnosticado o envolvimento intestinal no calazar e depois de mais de um mês de terapia medicamentosa específica anti-leishmânia. Na primeira amostra predominaram os aspectos do infiltrado monótono, constituído de macrófagos abarrotados de parasitas íntegros. Na segunda, havia um nítido aumento do número de outro tipos de células inflamatórias. Muitos linfócitos apareciam associados a macrófagos parasitados e em focos de lise celular, nos quais

PRANCHA 6

Fig. 1 - A direita há macrófago densamente parasitado por leishmônias (*). A esquerda são vistos plasmócitos (PLS) com abundante retículo endoplasmático rugoso dilatado. (X3300)

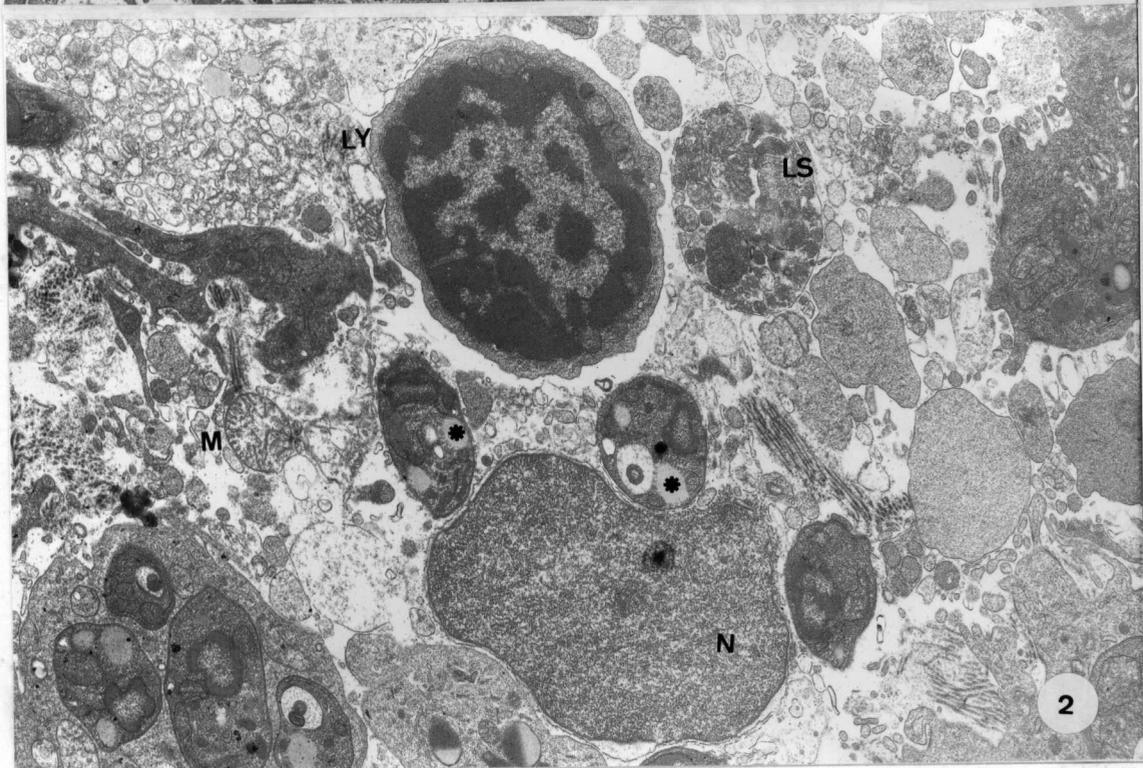
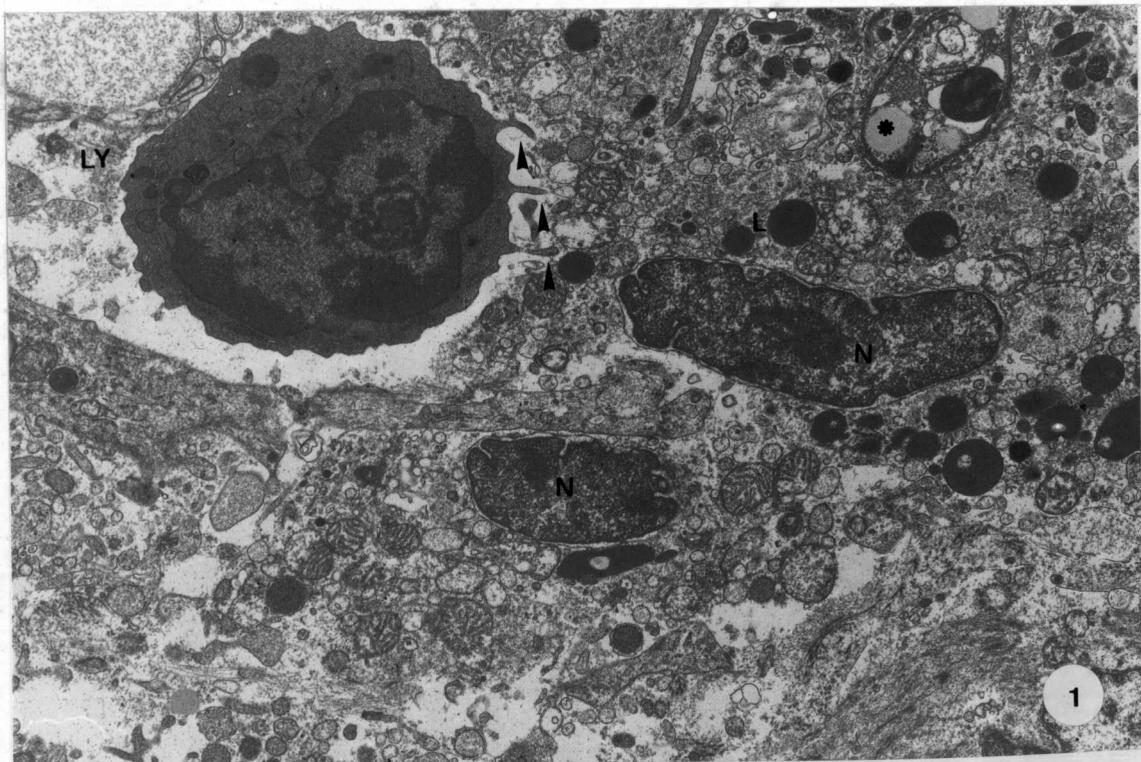
Fig. 2 - Eosinófilos imaturos (EOS), contendo poucos grânulos com inclusão característica (▲). Note filete nervoso (N) mostrando prolongamento axônico intumescidos e de aspecto rarefeito. (X20000)



PRANCHA 7

Fig. 1 - Area de lise celular. Notam-se restos celulares de macrófagos, constando de lisossomos (L), núcleo (N) e leishmânia degenerada (*). A esquerda vê-se linfócito (Ly) com prolongamentos citoplasmáticos curtos no polo em relação com o foco e lesão (▲). (X7200)

Fig. 2 - Foco de lise celular com liberação de amastigotas para o meio extra-celular (*). Há restos celulares como núcleo (N), mitocôndrias (M) e lisossomo secundário (LS). Nota-se linfócito (Ly) integro no foco. (X7200).



havia ruptura de macrófagos e liberação de parasitas para o interstício.

Outro aspecto visto com frequência, foi a presença de moderada quantidade de linfócitos entre as células epiteliais cilíndricas do revestimento das vilosidades. Em dois casos foram encontradas giárdias entre as vilosidades ou acoladas ao epitélio superficial. As células epiteliais tinham aspecto normal.

No grupo de pacientes com moderado parasitismo foram observadas, nas áreas onde o parasitismo era intenso, aspectos semelhantes aos descritos no grupo anterior, notando-se macrófagos densamente parasitados, contendo grande número de formas amastigotas íntegras. Em outras secções o parasitismo era menos intenso e o infiltrado inflamatório era misto, formado de vários tipos celulares, sobretudo plasmócitos, linfócitos e eosinófilos. Os plasmócitos exibiam retículo endoplasmático rugoso muito desenvolvido, por vezes acentuadamente dilatado. O epitélio mostrava-se íntegro, e de permeio eram vistos ocasionais linfócitos.

Os grupos de pacientes com poucos parasitas e sem parasitas mostravam infiltrado de células inflamatórias muito semelhantes entre si. Eram vistos muitos plasmócitos, linfócitos e eosinófilos (Prancha 8, Fig.1). Os plasmócitos mostravam RER muito hiperplasiado e hipertrofiado. Frequentemente, mesmo no grupo no qual não foram demonstrados parasitas, eram observados macrófagos fagocitando material arredondado que se assemelhava a parasitas degenerados, parcialmente digeridos (Prancha 8, Fig.2). Nos macrófagos parasitados os parasitas eram escassos e apareciam íntegros ou

degenerados (Prancha 9, Fig.1). O epitélio de revestimento das vilosidades tinha aspecto normal na maioria das secções examinadas, mas, por vezes, em associação com infiltrado linfocitário intra-epitelial, mostravam aspectos degenerativos. Deve-se assinalar que, freqüentemente, eram vistos linfócitos intra-epiteliais sem associação com alterações degenerativas do epitélio.

4.5. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

A imunomarcacão com soro anti-leishmãias, em secções de mucosa intestinal, foi realizada em 16 secções provenientes de 14 pacientes com calazar. A técnica utilizada foi da imunoperoxidase indireta, utilizando-se um soro policlonal de coelho imunizado com *L.amazonensis*.

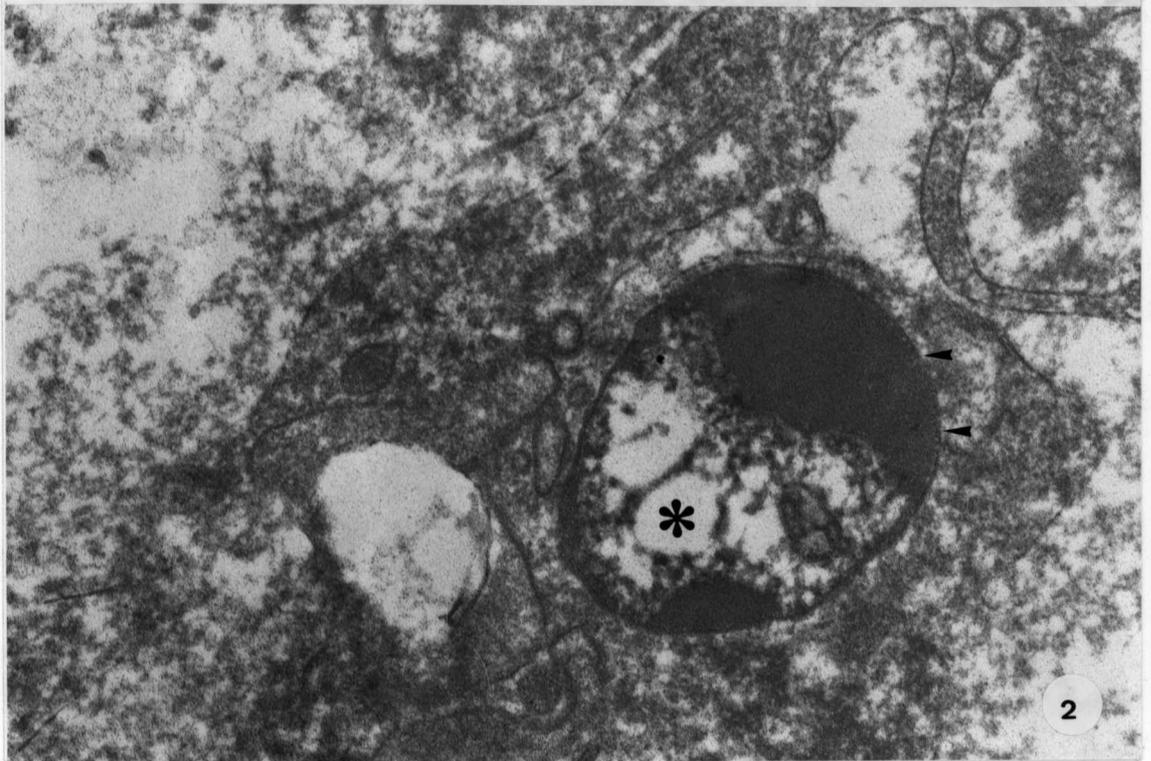
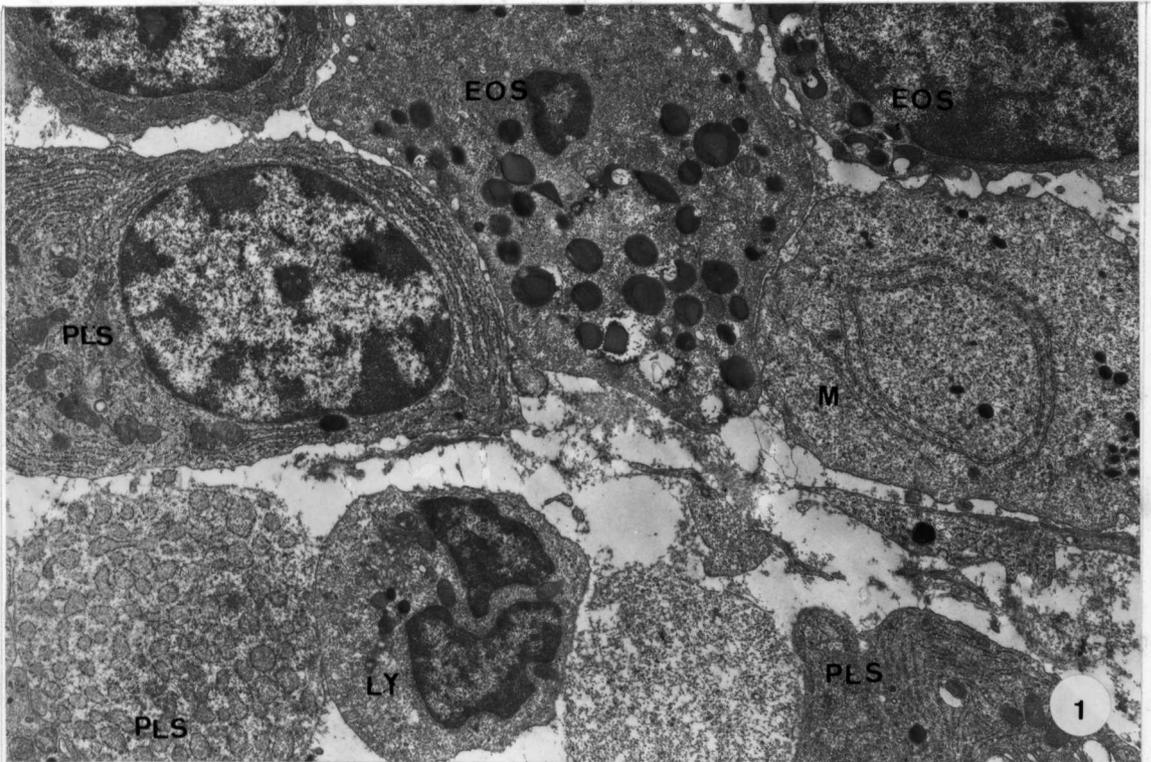
Em todos os casos nos quais os parasitas tinham sido previamente identificados em secções histológicas coradas pela hematoxilina e eosina, a imunomarcacão foi positiva. Em dois casos o encontro de corpúsculo arredondados positivos no interior de macrófagos nos remeteu às respectivas secções histológicas coradas pelo H-E e confirmaram-se o encontro de formas amastigotas de leishmãnia.

A imuno-marcacão positiva mostrava formas arredondadas de parasitas, intensamente marcadas em coloracão marrom, no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos localizados na lamina propria da mucosa intestinal, mais amiudemente no topo das vilosidades. Nos casos com intenso

PRANCHA 8

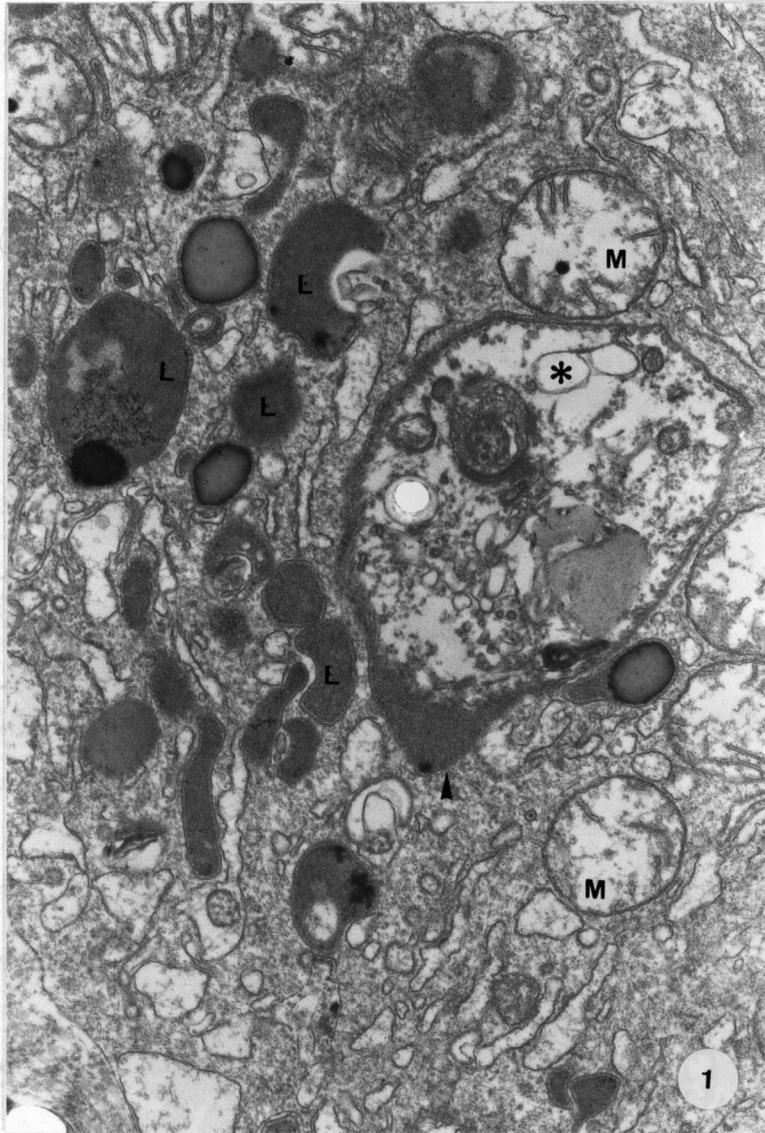
Fig. 1 - Foco de células inflamatórias. Vêem-se linfócitos (Ly), eosinófilos (EOS), plasmócitos (PLS) e parte do citoplasma de um macrófago (M). No canto inferior esquerdo há parte de plasmócitos com retículo endoplasmático rugoso exuberante. (X3300)

Fig. 2 - Detalhe do citoplasma de macrófago contendo amastigota de leishmânia, parcialmente digerida (*). Notam-se, na periferia do parasito restos do sistema microtubular do periplasto (). (22.900).



PRANCHA 9

Fig. 1 - Porção do citoplasma de um macrófago contendo amastigotas de leishmânia (*) parcialmente digerida. Nota-se área de conteúdo eletrôn-denso no vacúolo parasitóforo (seta) e grande número de lisossomos (L). Mitocôndrias (M). (X13.200)



parasitismo os macrófagos adquiriam coloração difusamente marrom. Nos locais de ruptura das células parasitadas, as formas amastigotas apareciam coradas, livres no interstício.

Nos casos com intenso ou moderado parasitismo, as leishmânias eram identificadas facilmente no interior de macrófagos localizados no eixo das vilosidades, e mais densamente em seu topo (Prancha 10, Figs.1 e 2). Nas áreas de ruptura de macrófagos os parasitas apareciam livres no interstício. Nos casos com discreto parasitismo o encontro de parasitas era, às vezes, difícil. Além de formas amastigotas clássicas, era possível a observação de macrófagos contendo vacúolos irregulares, por vezes ocos, marcados pela peroxidase (Prancha 11, Figs.1 e 2).

O uso de soro imune absorvido com leishmânia ou de soro de coelho não imunizado não resultava a marcação (Prancha 10, Fig.3).

O soro de coelho anti-leishmânia policlonal marcava, além das leishmânias, estruturas alongadas, identificadas como filete nervosos (Prancha 11, Fig.3). Este padrão de marcação também desaparecia quando o anti-soro era absorvido com um "pellet" de leishmânias.

As secções de mucosa intestinal com doença inflamatória, mas sem leishmaniose foram negativas.

4.6. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA DE PACIENTES COM MAIS DE UM BIÓPSIA NO CURSO DO CALAZAR.

A tabela II contém dados relativos a nove pacientes que foram submetidos a mais de uma biópsia intestinal no curso da doença.

A maioria dos pacientes foi biopsiada, pela primeira vez, após a instituição de terapia medicamentosa específica anti-leishmânia. Quase sempre a segunda biópsia foi realizada após um mês de terapia específica. Todos tinham parasitas demonstráveis no cito-aspirado esplênico ou em cultura de aspirado de medula óssea à época da primeira biópsia.

Em quase todos pacientes que mostraram parasitismo intestinal no material da primeira biópsia intestinal, não foram encontrados parasitas na segunda biópsia. Apenas um paciente (caso 9), no qual não foram vistos parasitas no material da primeira biópsia, foram encontrados poucos parasitas na segunda.

Dois pacientes mostraram parasitismo intestinal persistente, mesmo após a instituição da terapia específica. Estes pacientes foram classificados clinicamente como resistentes ao tratamento convencional com drogas antimoniais, e foram submetidos a terapia alternativa com associação de gama-interferon ao antimonial. Ambos tinham intenso parasitismo intestinal no primeiro fragmento. O paciente 1 persistiu com intenso parasitismo nos dois fragmentos obtidos em biópsias subseqüentes. O caso 2 persistiu com intenso parasitismo na segunda amostra feita três meses depois da primeira, mas na terceira os parasitas eram escassos na mucosa intestinal. Nestes dois casos os cito-aspirados esplênicos foram negativos enquanto persistia o parasitismo intestinal.

TABELA 11

DADOS RELATIVOS A NOVE PACIENTES SUBMETIDOS
A MAIS DE UMA BIÓPSIA INTESTINAL NO CURSO DE CALAZAR

CASO	BIÓPSIA	TEMPO TRAT.	PARASITISMO		TRATAMENTO	RESPOSTA
			INTESTINAL	BAÇO		
01	27.12	1 mês	Intenso	6+	SG ^b + IFN	Resistente + recidiva
	30.03	4 meses	Intenso	0	" "	
	10.05	6 meses	Intenso	0	" "	
02	26.04	13 dias	Intenso	2+	SG ^b	Resistente
	24.07	3 meses	Intenso	0	SG ^b + IFN	
	01.08	4 meses	Discreto		" "	
03	13.04	6 dias	Intenso	6+	SG ^b	Curado
	08.06	2 meses	Ausente	0		
04	13.04	22 dias	Discreto	5+	SG ^b	Resistente
	10.05	49 dias	Ausente	0	SG ^b + IFN	
05	22.04	08 dias	Discreto	3+	SG ^b	Curado
	26.05	42 dias	Ausente	0		
06	04.05	Virgem	Discreto	N*	SG ^b	Curado
	?		Ausente	NA		
07	31.07	14 dias	Ausente	0	SG ^b	Resistente
	31.08	45 dias	Ausente	0	Anfotericina	
08	02.08	Virgem	Discreto	6+	SG ^b	Resistente
	04.09	24 dias	Ausente	NA		
09	01.09	11 dias	Ausente	2+	SG ^b + IFN	Curado
	21.09	32 dias	Discreto	NA		

* Cultura de punção medular positiva

SG^b - Antimonial pentavalente

IFN - Gama interferon

NA - Não avaliado

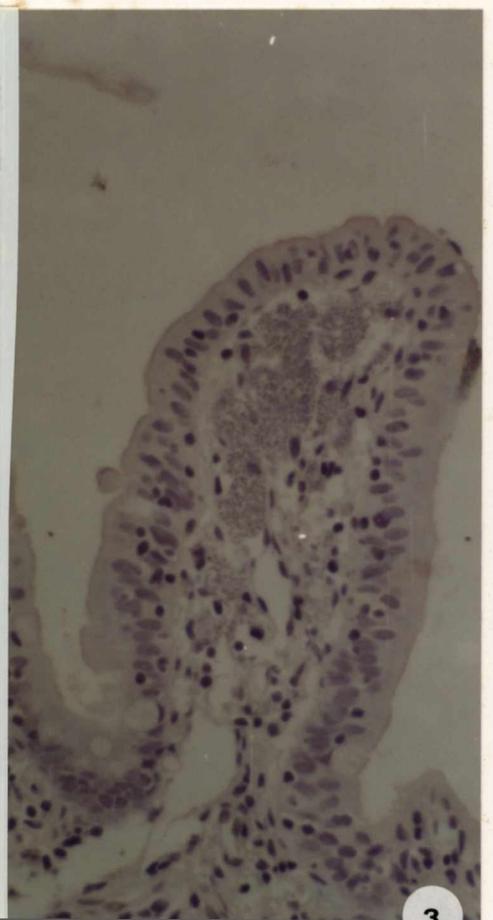
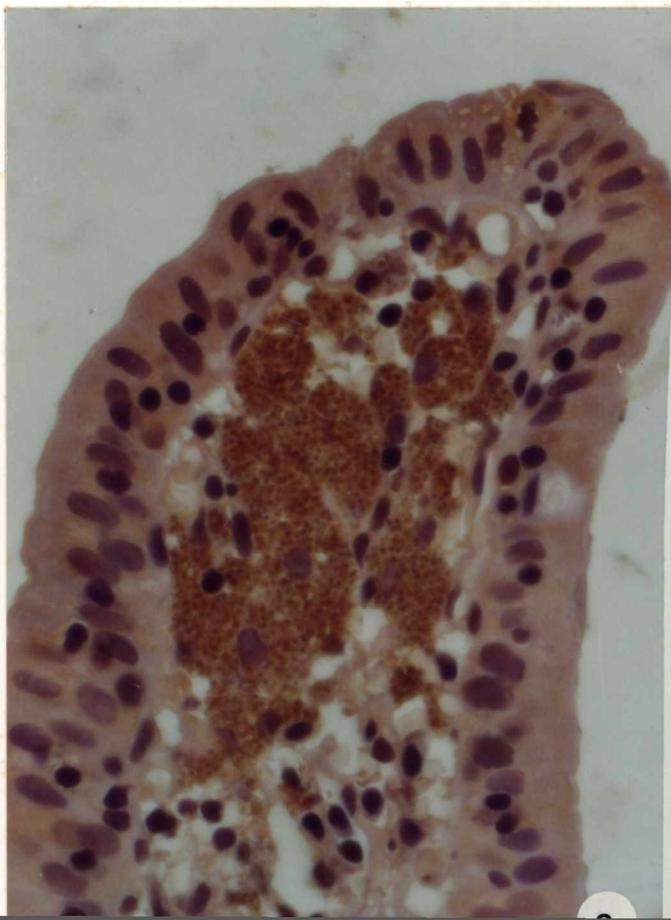
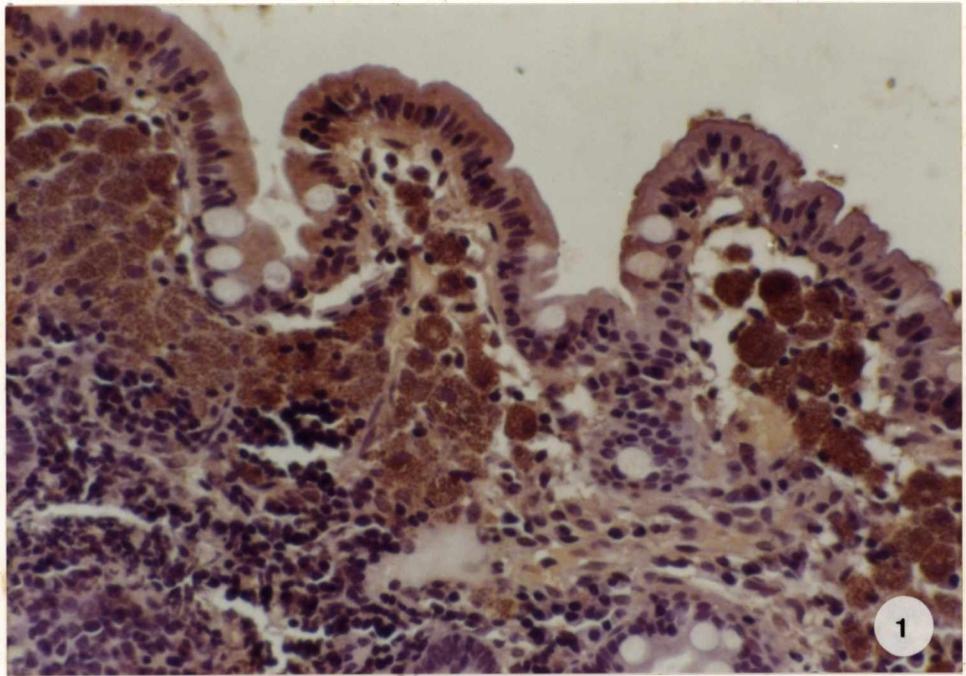
PRANCHA 10

Fig. 1 - Denso parasitismo de macrófagos no eixo das vilosidades intestinais. As leishmânias estão coradas em marrom pela técnicas da imunoperoxidase indireta. Observa-se que à medida que se afasta da luz o parasitismo tende a desaparecer e aparecem muitas células inflamatórias mononucleares. As vilosidades estão encurtadas e alargadas. (X200, Imunohistoquímica, Peroxidase indireta com anticorpo policlonal anti-leishmânia).

Fig. 2 - Detalhe de uma vilosidade intestinal alargada pela presença de macrófagos densamente parasitados por formas amastigotas de leishmânia. Note que o parasitismo diminui à medida que se afasta da luz e aparecem células inflamatórias mononucleares. O epitélio tem discreto a moderado infiltrado linfocitário (X400 - Técnica da imunoperoxidase indireta com anticorpo policlonal anti-leishmânia).

Fig. 3 - Controle da reação de imunoperoxidase. Utilizou-se soro de coelho anti-leishmânia absorvido com um "pellet" de *L.amazonensis*. Nota reação negativa nos macrófagos parasitados do topo das vilosidades (X100).

PRANCHA 10



Outros três pacientes apresentavam resistência ao tratamento. Dois tinham parasitismo intestinal discreto que desapareceu na segunda amostra. No outro não foram encontrados parasitas na mucosa intestinal em qualquer amostra.

4.6.1. Pacientes com intenso parasitismo

Três pacientes com intenso parasitismo da mucosa intestinal foram submetidos a mais de uma biópsia intestinal em diferentes momentos do tratamento e foram observadas modificações nos padrões inflamatórios e na intensidade do parasitismo.

Os pacientes com discreto parasitismo ou sem parasitas não mostraram modificações significativas da resposta inflamatória.

O paciente que apresentou intenso parasitismo persistente mostrava na primeira amostra grande número de macrófagos parasitados localizados no eixo das vilosidades. Mais abaixo o infiltrado mostrava plasmócitos e linfócitos e o número de macrófagos parasitados era pequeno. Na segunda amostra, a despeito da persistência de grande número de macrófagos parasitados, notava-se, mesmo no eixo das vilosidades, aumento do número de linfócitos e plasmócitos, às vezes associados a focos de ruptura de macrófagos com liberação de parasitas para o interstício. Na terceira amostra os aspectos eram parecidos com a anterior mas apareceram vários eosinófilos. As figuras 1 e 2 da Prancha 12 mostram que não houve mudanças importantes nos aspectos entre a primeira e a última biópsias.

O paciente que tinha intenso parasitismo e que mostrou persistência do parasitismo, mas com grande redução de sua intensidade, apresentou na primeira amostra aspectos semelhantes aos vistos na primeira amostra do caso anterior (Prancha 12, Fig.3). A segunda amostra também foi semelhante à segunda amostra do caso anterior, exceto pela presença de mais linfócitos e alguns eosinófilos (Prancha 12, Fig.4). Na terceira amostra o infiltrado era misto, predominantemente linfoplasmocitário, com poucos macrófagos de permeio, sendo raros parasitados. Este padrão era semelhante ao visto nos casos com discreto parasitismo.

O caso com intenso parasitismo intestinal e que mostrou desaparecimento de parasitas no curso do tratamento, apresentava, na primeira amostra, aspectos semelhantes aos vistos nas primeiras amostras dos casos anteriores, acrescido da presença de alguns eosinófilos. Na segunda amostra, na qual não foram encontrados parasitas, os aspectos eram idênticos aos descritos nos casos com discreto ou sem parasitismo intestinal, e à terceira amostra do caso anterior.

Os demais parâmetros de avaliação da morfologia da mucosa intestinal nestes pacientes revelam que no paciente no qual o parasitismo intenso persistiu, as alterações da mucosa se mantiveram inalteradas. Nos caso em que houve redução ou desaparecimento do parasitismo houve diminuição da intensidade das alterações.

4.7. CORRELAÇÃO ENTRE PARASITISMO DA MUCOSA INTESTINAL, ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E CLÍNICO-FUNCIONAIS.

A Tabela II mostra os resultados e interpretações do exame microscópico intestinal por leishmânias, os graus gerais de alterações morfológicas, a presença de diarreia, o estado nutricional, testes de absorção intestinal e resultado de exames parasitológicos de fezes, em 20 pacientes com calazar. Os dados clínico-laboratoriais foram obtidos dos prontuários dos pacientes. Os critérios de avaliação do estado nutricional obedeceram aos critérios estabelecidos por Gomez (1942).

Os dados revelam que a maioria dos pacientes com parasitismo intestinal por leishmânias tinham diarreia e também apresentavam evidências de desnutrição protéico-calórica. A maioria destes pacientes tiveram provas de função absorptiva intestinal, e revelaram que pelo menos um dos testes estava alterado, sendo que quase todos tinham mais de um teste anormal. Nota-se que todos eles mostravam graus variados de alteração da mucosa intestinal.

A presença de diarreia foi também constatada na maioria dos pacientes com discreto número de leishmânias ou sem parasitas na mucosa intestinal, porém com menor frequência que no grupo com parasitismo mais intenso. As provas de função absorptiva intestinal também mostraram-se alteradas, porém menos freqüentemente que no grupo anterior. Neste grupo, os graus de comprometimento da mucosa foram menos intensos que no anterior. Quase todos os pacientes tinham desnutrição protéico-calórica, que variou de discreta a intensa. Dois pacientes deste grupo eram eutróficos.

Em relação ao parasitismo intestinal por outros parasitas além das leishmânias, parece não haver diferenças

TABELA 12

Fig. CORRELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DE PARASITISMO INTESTINAL, GRAU DE ALTERAÇÕES DA MUCOSA, DIARRÉIA, ESTADO NUTRICIONAL, PROVAS DE FUNÇÃO INTESTINAL E PARASITAS INTESTINAIS, EM 20 PACIENTES COM DOENÇA DE CALAZAR, SUBMETIDOS A BIÓPSIA DE MUCOSA INTESTINAL

Paciente	Parasitismo intestinal	Grau de alteração da mucosa	Diarréia	E.Nutricional	TTT	TTS	TTL	P.Fezes
F.R.S	INTENSO	13	PRESENTE	DPC II	MA	MA	MA	1
R.J	INTENSO	11	PRESENTE	DPC II	--	A	MA	2,3,4
G.O.S	INTENSO	09	PRESENTE	DPC III	--	--	MA	NEGATIVO
D.R.S	INTENSO	12	PRESENTE	DPC II	MA	MA	MA	NEGATIVO
E.C.F	INTENSO	10	PRESENTE	DPC III	MA	MA	MA	1
D.C.S	MODERADO	08	PRESENTE	DPC II	MA	MA	--	NEGATIVO
M.S	MODERADO	08	AUSENTE	DPC II	MA	MA	MA	1
C.R	MODERADO	09	AUSENTE	EUTR&FICO	A	A	MA	1,5
R.O.S	MODERADO	09	PRESENTE	--	--	--	--	--
P.A	DISCRETO	05	PRESENTE	DPC II	A	MA	--	1,4
T.C.S	DISCRETO	08	PRESENTE	--	MA	A	A	2,4,3
M.S.Q	DISCRETO	04	AUSENTE	DPC I	MA	A	A	1
E.S.S	DISCRETO	05	PRESENTE	NA	A	A	A	2,4,6
R.S.C	DISCRETO	03	PRESENTE	EUTR&FICO	A	A	A	2,3,4,5,7
M.S.A	DISCRETO	02	PRESENTE	--	--	--	--	--
L.A.B	DISCRETO	NA	AUSENTE	DPC II	MA	MA	MA	NEGATIVO
R.S.P	DISCRETO	02	AUSENTE	DPC III	--	MA	MA	1,2,4,5
H.J.N	AUSENTE	06	PRESENTE	DPC I	--	A	MA	NEGATIVO
S.S.S	AUSENTE	02	AUSENTE	EUTR&FICO	--	A	MA	5,7
P.A.S	AUSENTE	NA	AUSENTE	DPC II	MA	MA	MA	2,4

TTT-Teste de tolerância a triglicerídios. TTS-Teste de tolerância a sacarose.

Fig. TTL-Teste de tolerância a lactose. MA (Má absorção)- No TTS e TTL < 25mg%. No TTT < 55mg%.

A= Absorção normal

obt DPC= Desnutrição protéico-calórica

Fig. 1-Giardia, 2-T.trichiurus, 3-A.duodenalis, 4-A.lumbricoides, 5-E.hystolitica, 6-S.stercoralis,

Fig. 7-E.vermiculares

Fig. parasitados, entremeados por raros linfócitos. (X400, H-E).

PRANCHA 12

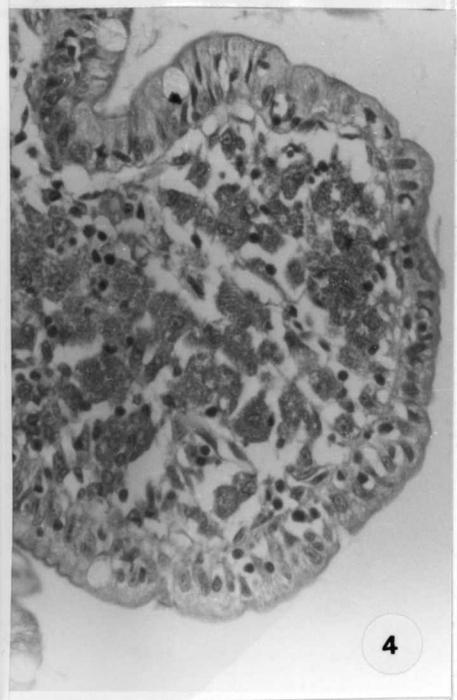
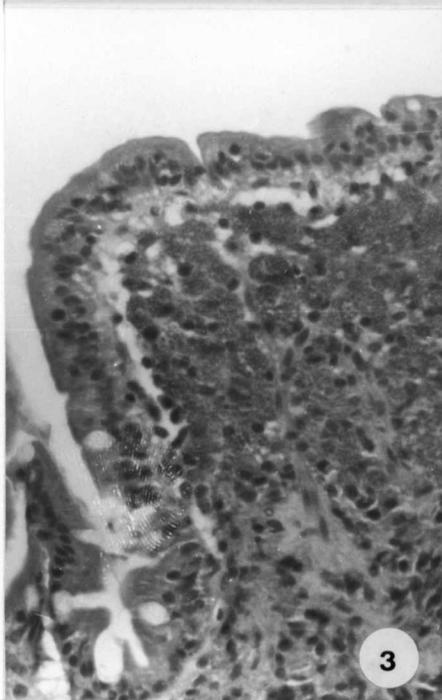
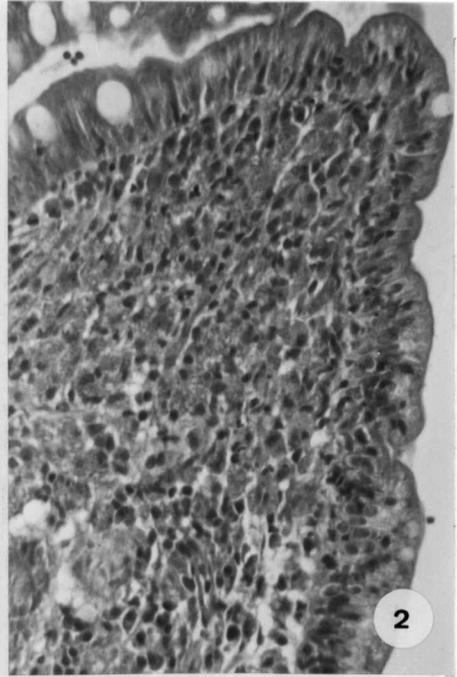
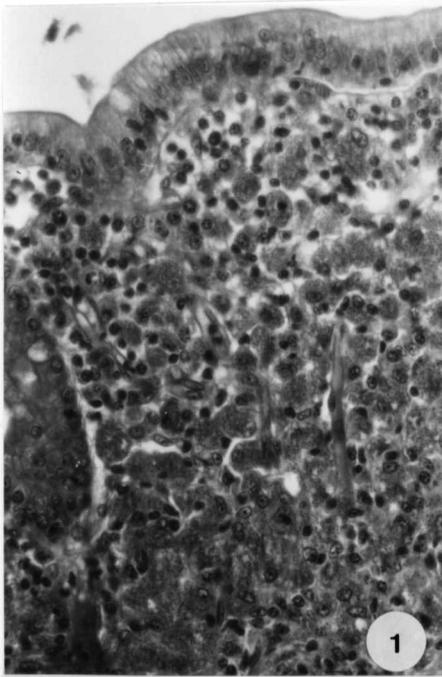
Fig. 1 - Denso infiltrado macrofágico de mucosa intestinal. Os macrófagos têm citoplasma amplo e estão abarrotados de leishmânias. De permeio há poucas células mononucleares. Primeira biópsia de um paciente resistente ao tratamento e com recidiva da doença. (X 400, H-E).

Fig. 2 - Fragmento de mucosa do mesmo paciente da Figura 1, obtida seis meses após a primeira. O infiltrado é predominantemente macrofágico, semelhante ao anterior. (X 400, H-E).

Fig. 3 - Primeira biópsia de outro paciente resistente ao tratamento. Há acentuado alargamento das vilosidades às custas de denso infiltrado de macrófagos abarrotados de leishmânia. (X 400, H-E).

Fig. 4 - Fragmento de biópsia do mesmo paciente da Fig. 3, obtida 3 meses após o tratamento. A vilosidade está muito alargada e arredondada, contendo muitos macrófagos parasitados, entremeados por raros linfócitos. (X400, H-E).

PRANCHA 12



significativas entre os dois grupos. Em ambos, vários pacientes apareceram poliparasitados, e chamou a atenção a frequência de giardíase, encontrada não apenas em exames parasitológicos, mas também em secções histológicas. Três pacientes do grupo com intenso parasitismo não tinham outras parasitoses intestinais associadas, enquanto dois do grupo com pequena quantidade ou sem leishmânias no intestino, estavam aparentemente livres de outros parasitas intestinais.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram analisadas as alterações morfológicas de fragmentos de mucosa jejunal de crianças com calazar, obtidos através de biópsia peroral, e submetidos a estudos histológicos, imunohistoquímicos e ultraestrutural. Nossos resultados tornam claro que a mucosa do intestino delgado está frequentemente comprometida nos pacientes com calazar, que este comprometimento pode, em alguns pacientes, ser específico, e que seu estudo se presta não apenas ao diagnóstico, mas também a avaliação da eficácia terapêutica e que pode oferecer alguns subsídios importantes na compreensão da patogênese da doença e ao estudo das relações parasita X hospedeiro in vivo.

A maior parte dos conhecimentos acerca da patologia intestinal na leishmaniose visceral provém de estudos de necropsias. Os pacientes que chegam ao estado final da doença representam uma parcela do conjunto dos indivíduos afetadas que tem doença grave em função da demora na atenção médica ou devido a certas particularidades na relação parasito X hospedeiro, resultantes, provavelmente, da desnutrição. Os estudos de material obtido de indivíduos vivos, limitam-se quase exclusivamente ao comprometimento hepático, renal e cutâneo em função da acessibilidade destes órgãos a biópsia (Prata, 1957a; Rodrigues da Silva, 1957; Daneshbod, 1972; Bambirra & cols., 1980; Duarte & Corbett, 1987; Brito & cols., 1975; Duarte & cols., 1983; Girgla & cols., 1977; Teixeira, 1980).

O estudo da associação entre a intensidade do

parasitismo e os graus de alteração dos parâmetros morfológicos avaliados na mucosa jejunal mostram uma associação positiva. O emprego do teste do coeficiente Gama de Kruskal & Goodman mostrou índices de associação superiores a +0,97, indicando que há forte correlação positiva entre a intensidade do parasitismo e a intensidade das alterações da mucosa, ou seja o número de acordos é quase sempre 100% maior do que o número de inversões. Assim, as modificações do padrão vilositário, a atrofia das vilosidades e a intensidade da inflamação foram mais intensas nos pacientes com parasitismo mais acentuado. O conjunto destas alterações se refletiram no índice geral de alteração da mucosa, mostrando índices mais altos em associação com parasitismo mais intenso. Os pacientes com parasitismo discreto ou sem parasitas tinham alterações menos intensas.

Um dado que reforça a associação entre a intensidade do parasitismo e a intensidade das alterações da mucosa foi a observação de que nos pacientes tratados e que obtiveram boa resposta à terapia específica, a segunda biópsia mostrou alterações menos intensas que a primeira biópsia, a despeito do intervalo relativamente curto entre ambas. Por outro lado, quando encontramos alterações mais intensas em biópsias sem parasitas, estas representavam, quase na totalidade das vezes, a segunda biópsia de pacientes que na anterior tinham parasitas.

Como já tivemos oportunidade de mostrar na revisão da literatura (item 2.3) os dados relativos ao envolvimento da mucosa intestinal no curso da leishmaniose visceral são escassos. Os poucos indícios referentes a relação entre a

intensidade do parasitismo e a intensidade das alterações da mucosa, a despeito de escassos concordam com os nossos.

Os dados de necropsias mostram que quando o parasitismo é intenso ocorre alargamento e encurtamento das vilosidades (Meleney, 1925; Andrade, 1958a; Veress & cols., 1974; Coutinho, 1982). Os autores destes trabalhos não fizeram estudos sistemáticos e não mencionaram os aspectos da mucosa intestinal nos pacientes sem intenso parasitismo ou com parasitismo discreto. Chama-se a atenção para o caráter segmentar deste comprometimento e sua tendência a diminuir no sentido caudal.

Deve-se atentar para o fato de que o intestino é um órgão que sofre autólise muito precoce e além disso é sistematicamente lavado em água no curso das necropsias. Este procedimento altera profundamente a morfologia da mucosa e esta deve ser uma das causas deste órgão ser tão pouco mencionado nos estudos sobre calazar.

Em decorrência da falta de estudos sistemáticos não há conhecimento da frequência com que ocorre o parasitismo da mucosa intestinal em material de necropsia. Apesar disto, os poucos estudos oferecem algumas informações importantes que podem auxiliar a interpretação de nossos achados. A biópsia peroral retira um minúsculo fragmento da mucosa intestinal e como o comprometimento da mucosa no calazar parece ser segmentar, a frequência real deste comprometimento pode ser maior que a verificada em nosso estudo. É interessante que em um de nossos pacientes não foram demonstradas leishmânias na primeira biópsia, mas sim na segunda, feita após o tratamento, quando raros parasitas apareceram. Seguramente,

neste caso, teve-se, na primeira biópsia, um problema de amostragem. Além disso, em alguns pacientes era possível ver vilosidades deformadas contendo muitos macrófagos parasitados ao lado de outras sem parasitas e com poucas alterações. Este problema tem sido encontrado mesmo em condições nas quais o comprometimento intestinal é mais difuso (Scott & Losowsky, 1976; Shiner & cols., 1990), e para contorná-lo alguns pesquisadores têm sugerido a realização de múltiplas biópsias (Ament & Rubin, 1972; Perera & cols., 1975).

A maioria dos estudos nos quais se fez biópsia da mucosa intestinal no curso do calazar constitui relato de casos isolados de pacientes com síndrome de malabsorção que foram submetidos a biópsia intestinal por outras suspeitas e surpreenderam-se leishmânias na mucosa intestinal (Sobral & cols., 1967; Challacombe & cols., 1983; Arnaud-Battandier, 1985; Banerjee & cols., 1990). Em todos estes casos, o tratamento específico reverteu os quadros diarréicos e este fato corrobora a idéia de que a presença de parasitas na mucosa intestinal deve ser responsável por alterações não apenas morfológicas, mas também funcionais. Em algumas oportunidades os pacientes foram re-biópsiados após o tratamento clínico e demonstrou-se desaparecimento de parasitas e recuperação total ou parcial do padrão vilositário (Sobral & cols., 1967; Arnaud-Battandier, 1985). A atitude da maioria dos autores é de perplexidade diante do encontro destes parasitas em intestino e enfocam a sua importância como causa de diarréia ou chamam a atenção para o valor diagnóstico da biópsia per-oral no calazar (Arnaud-Battandier & cols., 1985).

Além de nosso estudo atual, encontramos apenas dois outros que lidam com séries de pacientes.

Na série estudada por Muigai & cols. (1983) no Quênia foram encontradas leishmânias na mucosa intestinal em 50% dos casos antes da instituição de tratamento específico. Esta série foi constituída para a realização de testes de absorção de xilose e vitamina A, afim de avaliar a função intestinal. Foram excluídas crianças pequenas, doentes graves, e portadores de giardíase e estrogiloidíase, e incluíram-se alguns adultos. Apenas um paciente tinha diarréia. Os autores não correlacionaram intensidade de parasitismo com alterações da mucosa, mas encontraram atrofia parcial da mucosa em dois casos com intenso parasitismo. Após tratamento houve desaparecimento de parasitas no intestino e reversão da atrofia. Este achado reforça a relação entre a presença de parasitas e atrofia da mucosa. Um caso de resistência ao tratamento tinha atrofia parcial das vilosidades e diarréia, mas houve reversão completa da sintomatologia e das alterações morfológicas quando se fez tratamento prolongado da parasitose. Estes autores chamam a atenção para a variação da intensidade do parasitismo entre vilosidades de um mesmo paciente, do mesmo modo que nós observamos, e sugerem que o comprometimento intestinal deve ser mais frequente que o encontrado dada a pequena representatividade das biópsias com cápsulas pediátricas.

Na série de 46 pacientes estudados por Benhassine & cols. (1986) na Argélia foram encontradas leishmânias em 36% dos casos. O estudo histológico foi feito em 36 crianças e em dez foi feito estudo citológico. A citologia permitiu o

encontro de parasitas em três casos em que a histologia foi negativa. A atrofia vilositária esteve presente em 21 dos 36 casos estudados e foi mais frequente nos casos com parasitas. Infelizmente os autores não fizeram um estudo de correlação entre intensidade do parasitismo intestinal e graus de alterações da mucosa. Apesar de diarréia estar presente em 1/3 dos casos estudados, pareceu não haver correlação entre a intensidade da atrofia e a presença de diarréia. Os autores não caracterizaram clinicamente os doentes, não ofereceram dados sobre a faixa etária, não fizeram referências a tratamento específico no momento da biópsia. Não há descrição da natureza das alterações inflamatórias.

A nossa serie é a que mostra a mais alta frequência de encontro de parasitas na mucosa intestinal. Fatores peculiares da leishmaniose visceral em nosso meio podem estar contribuindo como contribuem para conferir diferenças em certos aspectos clínicos em diferentes áreas geográficas (). Além de variações intrínsecas à doença, o fato de termos examinado múltiplas secções e de termos utilizado técnicas de imuno-histoquímica permitiram o encontro de parasitas com mais frequência que nas outras séries. A utilização de imuno-histoquímica para a detecção de leishmânias tem se mostrado muito útil e sensível no diagnóstico da leishmaniose tegumentar como descrito por Salinas & cols. (1989) e Sotto & cols. (1989), que também utilizaram, como nós, anticorpos policlonais na técnica da imunoperoxidase indireta.

É muito provável que a frequência e a intensidade do parasitismo intestinal na leishmaniose visceral sejam ainda maiores que a que nos observamos. Na maioria dos pacientes as

biópsias retiraram apenas um fragmento, e como os dados de necropsia mostram, o comprometimento intestinal é segmentar, assim, aumentando-se o número de fragmentos e variando-se o local das biópsias deve aumentar a chance de encontro de parasitas como ocorre em relação a giardíase (Hartong & cols., 1979).

Outro dado que deve contribuir para a determinação da frequência real é o momento da biópsia em relação ao tratamento específico da doença. A quase totalidade de nossos doentes estavam no curso do tratamento no momento da biópsia. Em média tinham mais de 10 dias de tratamento específico. A importância deste fator deve ser considerado com cautela pois alguns pacientes virgens de tratamento não tiveram parasitas demonstráveis enquanto outros, com parasitismo intenso, estavam em tratamento a mais tempo que a média.

O tipo do infiltrado inflamatório nos casos com moderado a intenso parasitismo deve ser considerado específico. Este infiltrado deforma e alarga o topo das vilosidades intestinais e é constituído por macrófagos densamente parasitados por formas amastigotas de leishmânia. Os parasitas podem ser demonstradas através de exame histológico, imuno-histoquímico com o uso de anticorpos anti-leishmânia, e através da microscopia eletrônica que permite a caracterização ultraestrutural das leishmânias. Nos casos com denso parasitismo o infiltrado é quase monomórfico como descrito nas formas difusas de leishmaniose tegumentar (Bryceson, 1969; Convit & cols., 1972). Nos casos de parasitismo moderado, apesar do predomínio de macrófagos densamente parasitados, as demais células inflamatórias estão

presentes em menor número, sobretudo os plasmócitos e linfócitos.

Um dado que mostra a associação deste infiltrado com as alterações da mucosa e sua especificidade é o fato de que nas crianças com denso parasitismo da mucosa intestinal que foram tratadas com sucesso, e que foram re-biopsiadas, verificou-se que, a despeito do curto espaço de tempo entre as duas biópsias, houve uma nítida mudança do padrão inflamatório, desaparecendo ou diminuindo o número de macrófagos parasitados, aumentando o número de outras células inflamatórias, e diminuindo a intensidade das alterações da mucosa. Ao contrário, o paciente com intenso parasitismo e resistente ao tratamento, persistiu com denso infiltrado de macrófagos parasitados e não houve modificações significativas nos parâmetros de avaliação da mucosa, apesar de ter permanecido por longo tempo hospitalizado, recebendo dieta alimentar adequada e tendo sido tratado das parasitoses intestinais.

A única condição que cursa com infiltrado intenso de células macrofágicas no topo das vilosidades da mucosa intestinal além das histiocitoses, é a Doença de Whipple. Nesta condição o infiltrado também se faz no topo das vilosidades, e se constitui por macrófagos de citoplasma amplo e caracteristicamente PAS positivos, contendo grande quantidade de bactérias (Dobbins & Kawanishi, 1981; Petras, 1989; Morson & cols., 1990). É uma doença relativamente rara e que cura com o uso de antibióticos de largo espectro e nela não há leishmânias.

Os aspectos vistos no presente estudo são semelhantes aos descritos nos demais trabalhos, contudo os outros autores não fizeram referências aos aspectos da mucosa e à natureza do infiltrado nos pacientes com calazar e sem leishmânias demonstráveis na mucosa.

Nos casos com discreto parasitismo ou sem parasitas as alterações da mucosa foram menos intensas e o infiltrado inflamatório de natureza mista, formado por plasmócitos, linfócitos e poucos eosinófilos, tendo de permeio alguns macrófagos parasitados. Algumas vezes o encontro de parasitas foi possível após o exame de múltiplas secções ou com a ajuda da técnica de imuno-histoquímica, usando-se anticorpo anti-leishmânia. Em outros órgãos tem-se descrito um infiltrado inflamatório misto com muitos plasmócitos, mesmo quando é difícil a demonstração de parasitas, como ocorre no fígado, pulmão e rins (Meleney, 1925; Andrade & Andrade, 1966; Duarte & Corbett, 1987; Duarte & cols., 1983). No trato gastrointestinal, o encontro deste tipo de infiltrado inflamatório deve ser considerado inespecífico, pois têm sido descritas em outras condições como giardíase, ancilostomose, desnutrição, sprue tropical, enteropatia tropical, intolerância a proteína heteróloga e outras (Ament & Rubbin, 1972; Hartong & cols., 1979; Layrissé & cols., 1964; Tandon & cols., 1966; Baker & Mathan, 1972; Lindenbaum, 1973; Wershil & Walker, 1988).

Em nosso material comparamos as alterações intestinais de pacientes com poucas ou sem leishmânias no intestino com as observadas na mucosa intestinal de outras vinte e duas crianças na mesma faixa etária, com graus

variados de desnutrição e muitas delas com giardíase, e não notamos diferenças na natureza do infiltrado inflamatório e nas alterações morfológicas da mucosa nos dois grupos.

Um aspecto que nos chamou a atenção nos pacientes estudados foi a frequência com que detectaram-se giárdias no exame parasitológico de fezes. Dos 20 pacientes, sete tinham giardíase e destes quatro tinham quantidades moderada a intensa de leishmânias em intestino.

A infecção por giárdias pode se associar a um amplo espectro de alterações morfológicas e funcionais do intestino delgado (Brandborg & cols., 1967; Morecki & Parker, 1967; Raizman, 1976; Saha & Ghosh, 1977; Levinson & Nastro, 1978). Os dados da literatura sugerem fortemente que as alterações graves da mucosa aparecem em indivíduos com distúrbios do sistema imune e em desnutridos (Ament & Rubin, 1972; Roberts-Thomson & Mitchell, 1978; Hartong & cols., 1979; Boedeker & McQueen, 1988). Na maioria dos pacientes a mucosa tem lesões discretas e inespecíficas, caracterizada por discreto infiltrado linfo-plasmocitário com alguns eosinófilos de permeio, como ocorre nos nossos pacientes sem ou com poucas leishmânias na mucosa intestinal. Alguns pacientes do grupo controle tinham atrofia e inflamação mais intensas que os pacientes com calazar.

Há indícios de que o comprometimento prévio da mucosa intestinal por outras condições quando associado à giardíase determina infecções mais graves com sintomatologia e alterações morfológicas mais intensas (Carswell & cols., 1973).

Giardíase grave tem sido descrita em pacientes com distúrbios da imunidade humoral, sobretudo naqueles envolvendo a produção de gamaglobulina e de IgA (Sperber & Mayer, 1988; Cunningham-Rundles, 1988). Badaró (1985) mostrou, em seu trabalho de tese, que crianças que desenvolveram calazar tornaram-se portadoras de giárdias. Apesar de não encontrar diferença absoluta em relação ao grupo que não desenvolveu calazar, um dado curioso é que antes de desenvolver calazar elas não tinham giardíase. Estes dados associados aos trabalhos do mesmo grupo investigando infecções bacterianas em doentes de calazar (Guerreiro & cols., 1985 ; Andrade & cols., 1990) e que mostraram que estas crianças são significativamente mais propensas a desenvolver infecções de trato respiratório e urinário, pele e ouvido médio, sugerem a necessidade de se investigar a secreção de IgA nas mucosas destes pacientes, que além da desnutrição mostram distúrbios da imunidade celular. Não encontramos referências na literatura acerca da resposta imune humoral a novos patógenos no curso do calazar. Nós tentamos quantificar sub-populações de plasmócitos na mucosa jejunal destes pacientes, afim de testar a hipótese de uma diminuição do número de células secretoras de IgA em relação a células produtoras de IgG, mas problemas técnicos inviabilizaram a análise.

Outra condição, frequente em nossos pacientes com calazar, que pode cursar com alterações da mucosa intestinal é a desnutrição. A maioria dos pacientes tinha algum grau de desnutrição, mas em apenas um caso caracterizou-se kwashiorkor. O grupo controle, utilizado para comparar as alterações vistas nos pacientes com calazar com as observadas

em crianças com desnutrição protéico-calórica, mas sem kwashiorkor, tinham alterações inflamatórias e graus de atrofia que não diferiam, no conjunto, daquelas vistas nas crianças com calazar e com pouco ou sem parasitas na mucosa. Algumas crianças tinham atrofia completa da mucosa, como descrito no kwashiorkor, mas não foram clinicamente caracterizadas como tal. Por outro lado a única criança com calazar que tinha kwashiorkor apresentava intenso parasitismo dos macrófagos da mucosa por leishmânia e tinha atrofia vilositária parcial. Nenhuma criança com calazar e sem leishmânias na mucosa intestinal teve atrofia completa das vilosidades, a despeito de terem graus variados de desnutrição.

Na literatura há uma tendência a se separar as alterações observadas nos pacientes com Kwashiorkor das vistas nos pacientes com marasmo. As crianças com marasmo têm, em geral, diminuição da espessura da mucosa intestinal, mas a arquitetura geral está mantida, notando-se vilosidades encurtadas e criptas pouco alongadas. Em geral os pacientes têm uma atrofia parcial das vilosidades e há aumento da celularidade na lâmina própria às custas de linfócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos (Brunser & cols., 1966; Fagundes Neto & cols., 1977; Brunser, 1977; Campos & cols., 1979). No kwashiorkor as alterações são mais graves, notando-se atrofia vilositária completa, mucosa plana, e criptas alongadas com discreta diminuição do índice mitótico (Stanfield & cols., 1965; Brunser & cols., 1966; Schneider & Viteri, 1972; Lifshitz & cols., 1981). A explicação para a diferença morfológicas entre as duas condições é incompleta.

Alguns autores acham que as diferenças nos índices mitóticos resultam da carência calórica do marasmo, enquanto no kwashiorkor, como não há déficit calórico este índice estaria próximo do normal. Alguns trabalhos desenvolvidos no Brasil não mostraram grandes diferenças entre os aspectos da mucosa no marasmo e no kwashiorkor (Fagundes Neto & cols., 1977; Campos & cols., 1979). Estudos experimentais conseguem reproduzir as alterações vistas no marasmo, mas as tentativas de reprodução do kwashiorkor são menos evidentes (Hill & cols., 1968; Guiraldes & Hamilton, 1981; Lifshitz & cols., 1981) . Mesmo após a correção do estado nutricional permanecem as alterações morfológicas da mucosa, sobretudo o infiltrado inflamatório (Stanfield & cols., 1965; Schneider & Viteri, 1972). Estes dados sugerem que outros fatores como infecções parasitárias, bacterianas ou virais estejam contribuindo para o espectro morfológico das alterações (Lifshitz & cols., 1981; Gracey, 1988; Shiner & cols., 1990; Matta, 1992). Magalhães & cols. (1975) compararam os aspectos da mucosa intestinal em desnutridos com parasitose intestinal e desnutridos sem parasitose intestinal, com a mucosa de indivíduos normais e tiveram dificuldades em diferir os aspectos da mucosa intestinal dos desnutridos sem parasitose daqueles dos indivíduos normais.

Nossos pacientes eram poliparasitados e em alguns deles foram isoladas bactérias enteropatogênicas do intestino. É provável que estas associações contribuam para o estabelecimento das alterações da mucosa, tanto nos indivíduos com muitas quanto nos com poucas leishmânias no intestino. No grupo de pacientes com poucos ou sem leishmânias no intestino

a frequência de poliparasitose intestinal foi maior que no grupo com moderada a intensa quantidade de leishmânias.

Os estudos ultraestruturais mostram atrofia dos enterócitos, diminuição da altura das microvilosidades e aumento do número de autofagossomos nos desnutridos (Nassar & cols., 1980). Estes aspectos são semelhantes a atrofia celular vista em outros tecidos na desnutrição. Na lamina propria há aumento do número de células inflamatórias, e Campos & cols. (1979) descreveram plasmócitos alterados, com redução do número de cisternas do retículo endoplasmático rugoso no kwashiorkor e "inatividade" no marasmo. Em nosso material não nos detemos na análise dos enterócitos, mas os plasmócitos, ao contrário do descrito na desnutrição, mostravam retículo rugoso proeminente e muito dilatado. Este aspecto pode ser considerado a contraparte morfológica da ativação policlonal das células B vista no calazar.

Outro dado interessante em nosso estudo foi a demonstração de alterações funcionais da mucosa intestinal. Este estudo não foi sistemático, mas 18 crianças foram submetidas ao menos a um teste de absorção e em 16 foram encontradas evidências de alteração. Estes testes denotam alteração nas microvilosidades dos enterócitos, local no qual se localizam as dissacaridases. As causas desta alterações devem estar associada à desnutrição de vez que a maior parte dos trabalhos mostra que estas enzimas são muito alteradas na desnutrição e se recuperam quando é corrigido o estado nutricional dos pacientes (Standfield & cols., 1965; Fagundes Neto & cols., 1977; Brunser, 1977; Lifshitz & cols., 1981). Infelizmente em nossos pacientes não foram realizadas

avaliações funcionais antes do início do tratamento e antes da alta hospitalar.

Os mecanismos desencadeadores das alterações intestinais no calazar podem ser específico apesar da resposta, sob o ponto de vista morfológico, ser inespecífica. Sabe-se que o intestino, assim como a maioria dos órgãos, responde de uma forma limitada a uma série de agressões. Em nossos pacientes é difícil determinar a causa das alterações da mucosa quando elas não estão associadas a um parasitismo moderado ou intenso por leishmânias, e mesmo nestas circunstâncias é muito provável que outros mecanismos estejam operando simultaneamente. Sob o ponto de vista metodológico é quase impossível excluir as outras possibilidades afim de se estudar apenas o fator leishmânia. Praticamente todos os pacientes referidos a hospitais com calazar são desnutridos e poliparasitados (Badaró, 1985; Cerf & cols., 1987; Pearson & cols., 1992).

Um dado interessante observado em pacientes com pouco ou sem parasitas na mucosa intestinal e que talvez contribua para a inflamação, é a presença de material marcado pela técnica da imunoperoxidase com anticorpo anti-leishmânia, no interior de macrófagos da mucosa. Este material era discretamente granuloso e aparecia no interior do citoplasma. Resultados semelhantes aos nossos foram descritos em outras formas de leishmaniose. Ridley & Ridley (1986) observaram antígenos parasitários em macrófagos e adsorvidos na membrana basal de epitélio e vasos em material de biópsia de pacientes com leishmaniose cutânea, e sugeriram que a persistência destes antígenos induziria lesão tecidual. Também Sotto &

cols. (1989) tiveram resultados semelhantes estudando a eficácia da técnica da imunomarcagem no diagnóstico de leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa, tendo encontrado antígenos parasitários em mais de 64% dos casos, presente em células fagocitárias e em membranas basais. Um dado interessante é o achado de antígenos de leishmânia no citoplasma de plasmócitos de linfonodos de área de drenagem de lesão cutânea (Sells & Goldering, 1985). Em nosso material não encontramos esta localização do antígeno. A presença de antígeno parasitário pode resultar de fagocitose de parasitas degradados ou da incorporação à membrana plasmática de macrófagos de exo-antígenos parasitários (Sells & Burton, 1981; Berman & Dwyer, 1981). Na leishmaniose visceral o encontro de antígenos parasitários nos septos alveolares pulmonares de indivíduos com pneumonite intersticial e sua ausência nos indivíduos sem pneumonite, levou Duarte & cols. (1989) a sugerirem que a inflamação com muitos plasmócitos, linfócitos e macrófagos, mas com pouco parasitas, seja induzida pela persistência dos antígenos. A análise ultraestrutural corrobora com estes achados de vez que, com frequência, foram vistos, em pacientes com poucos ou sem parasitas, macrófagos fagocitando restos de parasitas.

Outra hipótese suscitado por nossos resultados diz respeito à possibilidade de reação cruzada entre antígenos parasitários e constituintes normais dos tecidos do hospedeiro. Observamos que o anticorpo anti-leishmânia utilizado neste estudo reage com filetes nervosos da mucosa intestinal. Quando este anticorpo foi absorvido com um "pellet" de leishmânias desapareceu a reação. O estudo

ultraestrutural mostrou, por vezes, que o infiltrado inflamatório se adensava em torno de nervos, e que estes apresentavam alterações como rarefação de estruturas e intumescimento. Estudos a respeito deste fenómeno precisam ser aprofundados pois há trabalhos na literatura descrevendo alterações inflamatórias de nervos na leishmaniose tegumentar humana e em murinos, mas nos quais não há investigações acerca da patogénese (Kubba & cols., 1987; Satti & cols., 1989). Nestes estudos foram descritos, ocasionalmente, a presença de leishmânias em células de Schwann, mas não foram feitos estudos imunopatológicos.

Não há relatos na literatura sobre os aspectos ultraestruturais da mucosa intestinal na leishmaniose visceral humana. Assim, nosso relato oferece uma contribuição original que pode dar subsídios para a compreensão de aspectos da relação parasita:hospedeiro nesta doença.

As observações ultraestruturais mostram, em áreas de destruição de parasitas, que há aumento do número de linfócitos, que estes linfócitos aparecem em íntimo contacto com os macrófagos parasitados, e que nestas áreas há destruição dos macrófagos com liberação das formas amastigotas no interstício, aonde os parasitas mostram evidências de degeneração. Estes aspectos são muito interessantes e muito sugestivos de como funcionam os mecanismos leishmanicida in vivo na leishmaniose visceral. Nas áreas densamente parasitadas o número de linfócitos era pequeno, e os macrófagos, densamente parasitados não mostravam evidências de ativação.

Sabe-se que a capacidade leishmanicida dos macrófagos depende de sua ativação por linfócitos ou seus produtos (Nathan & cols., 1983). Há estudos mostrando que este processo de ativação pode depender de íntimo contacto entre macrófagos e linfócitos (Panosian & cols., 1984) e que neste processo pode ocorrer lise dos macrófagos parasitados (Pham & Mauel, 1987). Estudos *in vivo* mostram que além do aumento do número de linfócitos na lesão de indivíduos resistentes, um importante mecanismo leishmanicida é a lise dos macrófagos com liberação dos parasitas no interstício (Ridley & Ridley, 1983; Andrade & cols., 1984; Barral & cols., 1987; Pompeu, 1988; Bittencourt & cols., 1990; Pompeu & cols., 1992). Não encontramos referências acerca de mecanismos leishmanicidas *in vivo* na leishmaniose visceral humana. Nossos achados sugerem que os mesmos mecanismos que operam na leishmaniose tegumentar ocorrem na mucosa intestinal na leishmaniose visceral. O fato das crianças estarem usando medicamentos, antimonial pentavalente associado ou não ao uso de gama-interferon nos obriga a interpretar com cautela estes resultados. Apesar de muito parecidos com os descritos na doença sem tratamento específico não podemos excluir o efeito destas drogas. A observação de que ocorre aumento do número de linfócitos nas lesões de crianças com intenso parasitismo, que nas crianças com pouco parasitismo o infiltrado contém muitos linfócitos, sugerem que as drogas utilizadas operam através do sistema imune, ou que diminuindo a carga parasitária permitem a resposta imune específica.

O encontro de eosinófilos nas lesões e em associação com os focos de lise de macrófagos e parasitas, sugerem que

estas células tem algum papel na destruição parasitária. Tais células têm sido descritas em outras formas de leishmaniose tanto em indivíduos resistentes quanto em susceptíveis (Deane & Guimarães, 1938; Grimaldi & cols., 1984; Barral-Netto & cols., 1987; Pompeu & cols., 1991; Bittencourt & cols., 1992). Parecem exercer uma atividade leishmanicida através da fagocitose de parasitas, desgranulação no meio extracelular e cooperação com macrófagos (Chang, 1981; Grimaldi & cols., 1984; Pompeu & cols., 1991). Em camundongos tem-se demonstrado que a resposta imune depende de uma proporção entre linfócitos T auxiliares que são fenotipicamente distintos, produzindo citocinas diferentes e respostas imunes distintas (Mosmann & cols., 1989). Assim, linfócitos com o perfil fenotípico Th2 produzem interleucinas 4 e 5, que induzem eosinofilia. No homem ainda não foram isolados clones de linfócitos com estas características, mas a presença de eosinófilos pode decorrer de um efeito semelhante a este. Seria interessante uma caracterização fenotípica das sub-populações linfocitárias na mucosa intestinal de crianças com calazar, antes e após o tratamento específico, afim de se medir eventuais mudanças nestes perfis e se correlacionar com mudanças no padrão da resposta.

Outro dado interessante deste estudo diz respeito a resposta da mucosa intestinal ao tratamento. Dois pacientes resistentes ao tratamento tiveram três biópsias no curso da hospitalização. Nestes pacientes o "clearance" de leishmânia foi diferente do observado no baço. Apesar das punções esplênicas serem negativas eles persistiram com parasitas na mucosa intestinal. Em um deles o parasitismo diminui

significativamente, encontrando-se raras leishmãnicas, mas no outro o parasitismo permaneceu intenso. Esta criança era resistente ao tratamento, mesmo com a associação de gama-interferon, e tinha tido recidivas da doença. Estes dados, acrescido de um outro paciente no qual também se encontrou parasitas na mucosa após tratamento bem sucedido, apontam a mucosa intestinal como uma espécie de "santuário" de leishmãnicas. A razão das diferenças na velocidade do "clearance" não são conhecidas, mas deve residir em particularidades na resposta imune em diferentes órgãos e a características peculiares dos macrófagos da mucosa intestinal. Um dado que corrobora esta idéia é o bem conhecido fenômeno do "leishmanióide dérmico pós-calazar" no qual observa-se uma concentração de leishmãnicas na pele normal ou alterada de indivíduos "curados" de leishmaniose visceral (Majumdar, 1967; Girgla & cols., 1977). Prata (1957a) e Teixeira (1980) mostraram em fígado e em pele, respectivamente, a presença de leishmãnicas em pacientes tratados e tidos como curados de leishmaniose visceral. Estes dados, associados a evidências de desencadeamento de quadros de calazar em indivíduos que há muitos anos deixaram o foco endêmico sugerem que não há cura da parasitose, mas sim o estabelecimento de um equilíbrio na relação parasita-hospedeiro (Badaró & cols., 1986a). Em relação a mucosa intestinal há o relato de Arnaud-Battandier & cols. (1985) de uma paciente com punção medular negativa para leishmãnicas e sem anticorpos anti-leishmãnia cujo diagnóstico da doença foi realizado pela biópsia intestinal.

Neste trabalho foi possível demonstrar o frequente comprometimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral. A presença de parasitas e sua intensidade se correlacionaram com a intensidade das alterações estruturais do órgão e frequentemente as crianças tinham diarréia e alterações das provas funcionais do intestino delgado. Este comprometimento deve contribuir com a desnutrição apresentada pelos pacientes com calazar e ter importância no binômio desnutrição-infecção, que como visto em outras condições deve ser encarado como multifatorial em sua gênese.

Além destes dados imediatos, estes resultados oferecem subsídios para futuras investigações. É necessária a realização de estudos melhor controlados, visando a determinação da frequência do comprometimento intestinal em populações expostas à infecção e seu significado prognóstico. As biópsias devem ser realizadas em pacientes livres de qualquer tratamento e devem ser relacionadas com provas de função intestinal, e repetidas após o tratamento. Os pacientes que persistirem com parasitas no intestino devem ser acompanhados para uma compreensão do significado biológico e clínico deste fenômeno. A biópsia intestinal poderá oferecer importantes subsídios à compreensão da relação parasita-hospedeiro, na medida em que, devido a facilidade de acesso, pode permitir o conhecimento da cinética, *in situ*, da resposta do hospedeiro, através da conjugação de métodos morfológicos e imunológicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALENCAR, J. E. - Aspectos clínicos do calazar americano. Rev. bras. Malariol. D. trop., 11:19-45, 1959.

_____, ARAGÃO, T. C. A. - Leishmaniose visceral no Ceará. sintomas observados em 174 casos. Publi. med., 28:3-12, 1955.

AMENT, M. E.; RUBIN, C. E. - Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterol., 62:216-26, 1972.

ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. - Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. J. infect. Dis., 162:1354-9, 1990.

ANDRADE, T. M.; TEIXEIRA, R.; ANDRADE, J. A. F.; PEREIRA, C.; CARVALHO, E. M. - Estudo da hipersensibilidade do tipo retardado na leishmaniose visceral. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 24:298-302, 1982.

ANDRADE, Z. A. - A patologia da leishmaniose visceral (calazar). Salvador, 1958a. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

_____- A patologia da leishmaniose visceral (calazar). Arg. bras. Med. nav., 19:79-204, 1958b.

_____- Pneumonite intersticial no calazar. O Hospital, 55:371-81, 1959.

_____; ANDRADE, S. G. - Alguns novos aspectos da patologia do calazar. (Estudo morfológico de 13 casos necropsiados). Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 8:259-66, 1966.

_____; IABUKI, K. - A nefropatia do calazar. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 14:51-4, 1972.

_____; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. - Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. Am. J. Pathol., 144:137-48, 1984.

ARNAUD-BATTANDIER, F.; BIGEL, P.; VILLAIN, E.; LAGARDERE, B. - La biopsie d'intestin grêle peut-elle être un moyen diagnostique des leishmanioses viscérales? La Presse Méd., 14:792, 1985.

BACELAR, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M. - Gamma-interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. Braz. J. Med. Biol. Res., 24:791-5, 1991.

BADARÓ, R. - Epidemiologia da leishmaniose visceral. Estudo prospectivo de infecção e doença na área endêmica de Jacobina-

Bahia (1980-1984). Salvador, 1985. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

_____; CARVALHO, E. M.; DRGE, M. G. O.; TEIXEIRA, R.; ROCHA, H. - Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. Rev. Soc. bras. Med. trop., 18:77-83, 1985.

_____; _____; ROCHA, H.; QUEIROZ, A. C.; JONES, T. C. - *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. Lancet, 1:647-8, 1986a.

_____; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. - New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J. infect. Dis., 154:1003-8, 1986b.

_____; JONES, T. C.; LORENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. - A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. J. infect. Dis., 154:639-49, 1986c.

_____; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. - Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. Am. J. trop. Med. Hyg., 32:480-4, 1983.

BAMBIRRA, E. A.; TAFURI, W. L.; RASO, P. - Alterações ultra-estruturais do fígado na leishmaniose visceral (calazar). Estudo de três casos. Rev. goiana Med., 26:47-54, 1980.

BANERJEE, M.; PAL, A.; GHOSH, S.; MAITRA, T. K. - Small intestinal involvement in visceral leishmaniasis. Am. J. Gastroenterol., 85:1433-4, 1990.

BAKER, S. J. - Geographical variations in the morphology of the small intestinal mucosa in apparently healthy individual. Path. microbiol., 39:222-37, 1973.

_____; MATHAN, V. I. - Topical enteropathy and tropical sprue. Am. J. Clin. Nutri., 25:1047-55, 1972.

BARRAL-NETTO, M. - Imuno-supressão mediada por soro na leishmaniose visceral. Salvador, 1988. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

_____; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R. P.; SANTOS, S. B.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; FALCOFF, E.; FALCOFF, R. - Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. J. infec. Dis., 163:853-7, 1991.

_____; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A. W.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. - Transforming growth factor-B in leishmanial infection: A parasite escape mechanism. Science, 257:545-8, 1992.

_____: _____; SANTOS, S. F.; CARVALHO, E. M.; BADARO, F.; REED, S. G.; REED, S. G.; JENNINGS, W. D. Jr. - Soluble 10-11 kDa protein as an agent of serum mediated suppression in human visceral leishmaniasis. J. Immunol., 147:103-4, 1991.

_____: FREITAS, L. A. R.; ANDRADE, Z. A. - Histopathological changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. Am. J. Pathol., 127:271-8, 1987a.

_____: ROTERS, S. B.; SHERLOCK, I.; REED, S. G. - Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes by normal human serum. Am. J. Trop. Med. Hyg., 37:53-6, 1987.

BERIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, E. - *Leishmania tropica*: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. Exp. Parasitol., 48:81-91, 1975.

BENBASLINE, M. L.; BOUARI, T.; BENYAHIA, B.; BENDISSARI, K.; KEDDARI, M.; KHATI, B. - Apporte de la biopsie duodenale dans le diagnostic du Kala-azar. Arch. Inst. Pasteur Alger., 55:125-30, 1986.

BERENQUER, J.; MORENO, S.; CERDENADO, E.; QUIRÓS, J. C. L.; FUENTE, A. G.; BOUZA, E. - Visceral leishmaniasis in patients with human immunodeficiency virus (HIV). Ann. Inter. Med., 111:129-32, 1989.

BENNETT, M. K.; SACHDEV, G. K.; JEWELL, D. P.; ANAND, B. S. - Jejunal mucosa morphology in healthy north Indian subjects. J. clin. Pathol., 38:368-71, 1985.

BERMAN, J. D.; DWYER, D. M. - Expression of Leishmania antigen on the surface membrane of infected human macrophages in vitro. Clin. exp. Immunol., 44:342-8, 1981.

BHAT, P.; SHANTAKUMARI, S.; RAJAN, D.; MATHAN, V. I.; KAPADIA, C. R.; SWARNABAI, C.; BANER, S. J. - Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern indian control subjects and patients with tropical sprue. Gastroenterol., 62:11-21, 1972.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C.; BADARÓ, F.; BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L. A. R. - Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. Intern. J. Dermatol., 31: 568-70, 1992.

_____; FREITAS, L. A. R.; POMPEU, M. L.; VIEIRA, M. L.; BARRAL, A. - Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85:53-9, 1990.

_____; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C.; BADARÓ, F.; BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L. A. R. - Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. Inter. J. Dermatol., 31:368-70, 1992.

BLANCHOT, M.; SLAVOV, R.; RHALY, A. AG.; DIGOUTTE, P. - Tentative d'évaluation de la validité des méthodes

immunochimiques d'enquête de la leishmaniose. Dakar med.,29:149-59, 1984.

BLACHWELL, J. M.; EZEROWITZ, R. A. B.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM, R. B.; GORDON, S. - Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. J. exp. Med.,162:324-31, 1985.

BOEDEKER, E.; McQUEEN, C. E. - Intestinal immunity to bacterial and parasitic infections. Immun. All. Clin. N. Am.,8:393-422, 1988.

BOGLIOLO, L. - Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência à fibrose hepática leishmaniótica. O Hospital,1:392-440, 1956.

BRADLEY, D. J. - Genetics of resistance to infection with special reference to leishmaniasis. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,76:143-6, 1982.

BRANDBORG, L.; TANKERSLEY, C. B.; GOTTLIEB, S.; BARANCIK, M.; SARTOR, V. E. - Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterol.,52:143-50, 1967.

BRANDONISIO, O.; CECI, L.; CEDOLA, M. C.; CARETTO, G.; ANTONACI, S.; JIRILLO, E. - Phagocytosis of *Leishmania infantum* promastigotes by monocytes isolated from *Leishmania* infected dogs. Microbiologica,9:173-8, 1986

BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; AMATO NETO, V.; DUARTE, 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.,24:9-18, 1975.

BRUNSER, O.- Effects of malnutrition on intestinal structure and function in children. Ci. Gastroenterol.,6:341-53, 1977.

_____; EIDELMAN, S.; KLIPSTEIN, F. A. - Intestinal morphology of rural haitians. A comparison between overt tropical sprue and asymptomatic subjects. Gastroenterol.,58:655-68, 1970.

_____; REID, A.; HÜNCKEBERG, F.; MACCIONI, A.; CONTRERAS, I.- Jejunal biopsies in infant malnutrition: with special reference to mitotic index. Pediatrics,38:605-12, 1966.

_____; _____; _____; _____; _____ - Jejunal mucosa in infant malnutrition. Am. J. clin. Nutri.,21:976-83, 1968.

BRYCESON, A. D. M. - Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. Clinical and histological features of the disease. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,64:369-93,1970.

CAHILL, K. M. - Field techniques in the diagnosis of Kala-azar. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,64:107-10, 1970

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. - Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18:500-5, 1969.

CAMPOS, J. V. M.; FAGUNDES NETO, U.; WEHBA, P. J.; CARVALHO, A. A.; SHINER, M. - Jejunal mucosa in marasmic children. Clinical, pathological, and fine structure evaluation of the effects of protein-energy malnutrition and environmental contamination. Am. J. clin. Nutr., 32:1575-91, 1979.

CARSWELL, F.; GIBSON, A. A. M.; McALLISTER, T. A. - Giardiasis and coeliac disease. Arch. Dis. Child., 48:414-8, 1973.

CARTWRIGHT, G. E.; HUI-LAN CHUNG, A. U. S.; CHANG, A. - Studies on the pancytopenia of kala-azar. Blood, 3:249-75, 1948.

CARVALHO, E. M - Imunidade celular na leishmaniose visceral. Salvador, 1985. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

_____; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M.; ROCHA, H. - Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. Am. J. trop. Med. Hyg., 32:61-8, 1983.

_____; BACELLAR, D. - Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. Braz. J. med. biol. Res., 16:35-41, 1983.

_____; _____; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; JOHNSON, W. D. Jr. - Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. J. clin. Invest., 83:860-4, 1989.

_____; BACELLAR, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; ROCHA, H. - Visceral leishmaniasis: A disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. Braz. J. med. biol. Res., 21:85-92, 1988.

_____; BADARÓ, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, W. D. Jr. - Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. J. clin. Invest., 76:2066-9, 1985.

_____; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M. - Immunology of human visceral leishmaniasis and perspective of the use of immunomodulators. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82 (suppl.II):137-46, 1987.

_____; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D. Jr. - Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. J. infect. Dis., 165:535-40, 1992.

_____ ; D'OLIVEIRA Jr, A.; QUEIROZ, A. C. - Imunopatologia do baço na leishmaniose visceral. Rev. Soc. bras. Med. trop.,15:109-112, 1980.

_____ ; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D. Jr. - Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. Infec. Immun.,33:498-502, 1981.

CASTANET, J.; TAILLAN, B.; GARNIER, G.; VINTI, H.; FUZIBET, J. G.; DUJARDIN, P. - Syndrome d'hémophagocytose au cours d'une leishmaniose viscérale. La presse méd.,19:1906, 1990.

CERF, B. J.; JONES, T. C.; BADARÓ, R.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. Jr. - Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. J. infec. Dis.,156:1030-3, 1987.

CERF-BENSUSSAN, N.; GUY-GRAND, D.; GRISCELLI, C. - Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterisation and study of natural killer activity. Gut,26:81-8, 1985.

CHALLACOMBE, D. N.; WHEELER, E. E.; PHILLIPS, M. J.; EDEN, D. B. - Clinical curio: Leishmania-Donovan bodies in the duodenal mucosa of child with kala-azar. Br. med. J.,286:789, 1983.

CHANG, K. P. - Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani* human phagocyte interactions in vitro. Am. J. trop. Med. Hyg.,30:334-9, 1981.

_____ ; DWYER, D. M. - Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. Science,193:678-80, 1976.

CHAVES, J.; FERRI, R. G. - Immunoglobulins in visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo,8:225-6, 1966.

CHULAY, J. D.; BRYCESSON, A. D. M. - Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. Am. J. trop. Med. Hyg.,32:475-9, 1983.

CHUNG, H-L.; CHANG, N-C. - A Kala-azar complement fixation test; its diagnostic and prognostic value. Chin. med. J.,69:3-18, 1951.

COCCO, A. E.; DOHRMANN, M. J.; HENDRIX, T. R. - Reconstruction of normal jejunal biopsies: three-dimensional histology. Gastroenterol.,51:24-31, 1966.

COOK, G. C.; KAJUBI, S. K.; LEE, F. D. - Jejunal morphology of the african in Uganda. J. Pathol.,98:157-69, 1969.

COOPER, C. R.; REIN, C. R.; BEARD, J.W. - Electrophoretic analysis of Kala-azar human serum. Hypergammaglobulinemia associated with seronegative reaction for syphilis. Proc. Soc. exp. Biol. Med.,61:179-83, 1946.

CORAZZA, G. R.; BONVICINI, F.; FRAZZONI, M.; GATTO, M.; GASCIBARRINI, G. - Observer variations in assessment of jejunal biopsy specimens. A comparison between subjective criteria and morphometric measurement. Gastroenterol.,**83**:1217-22, 1982.

CORAZZA, G. R.; FRAZZONI, M.; DIXON, M. F.; GASCIBARRINI, G. - Quantitative assessment of the mucosal architecture of jejunal biopsy specimens: a comparison between linear measurement, stereology, and computer aided microscopy. J. clin. Pathol.,**38**:765-70, 1985.

CORHILL, N. L. - The activation of latent Kala-azar in relation to protein metabolism. Am. trop. Med. Parasitol.,**43**:261-7, 1949.

COUTINHO, E. M. - Contribuição para o estudo anátomo-patológico da leishmaniose visceral do Brasil. Recife, 1982. Tese. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco.

CONVIT, J.; PINARD, M. E.; RONDON, A. J. - Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,**66**:603-10, 1972.

CROSBY, W. H.; KUGLER, H. W. - Intraluminal biopsy of the small intestine. The intestinal biopsy capsule. Am. J. Dig. Dis.,**2**:236-41, 1957.

CUNHA, R. H.; CHAVES, J.; IRULEGNI, I.; VAZ, C. A. P. - Ativação da via alternativa do complemento pelas promastigotas de *Leishmania donovani*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo,**23**:161-6, 1981.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C. - Selective IgA deficiency and gastrointestinal tract. Immun. All. clin. N. Am.,**8**:423-434, 1988.

DANESHBOD, K. - Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in Iran: A pathologic and electron microscopic study. Am. J. clin. Pathol.,**57**:156-66, 1972.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. - Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani*, no Ceará. Hospital,**45**:703-7, 1954.

_____; GUIMARÃES, F. N. - Aspectos interessantes de fagocytose observados na leishmaniose visceral e na malária. Mem. inst. Oswaldo Cruz,**33**:263-79, 1938.

DOBBINS, W. O. - Human intestinal intraepithelial lymphocytes. Gut,**27**:972-85, 1986.

_____; KAWASNISHI, H. - Bacillary characteristics in Whipple's disease: An electron microscopic study. Gastroenterol.,**80**:1468-75, 1981.

DUARTE, M. I. S. - Análise subcelular qualitativa e morfológica dos hematócitos e da região sinusoidal na leishmaniose visceral humana. São Paulo, 1987. Tese. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

_____; CORBETT, C. E. P. - Histopathological patterns of the liver in visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo,29:131-136, 1987.

_____; 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.,83:73-6, 1989.

_____; SILVA, M. R. R.; GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; AMATO NETO, V. - Interstitial nephritis in human kala-azar. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,77:531-7, 1983.

DUNNILL, M. S.; WHITEHEAD, R. - A method for the quantitation of small intestinal biopsy specimens. J. clin. Pathol 25:243-6, 1972.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; CARVALHO, E. M.; RODRIGUES, L. E.; BRITO, E.; ROCHA, H. - Renal involvement in visceral leishmaniasis. Am. J. kidney Dis.,6:22-7, 1985.

FAGUNDES-NETO, U.; WEHBA, J.; PATRÍCIO, F. R. S.; MACHADO, N. - Morphologic and functional study of the small intestine in marasmic patients. Arg. Gastroenterol. São Paulo,14:241-8, 1977.

FERGUSON, A. - Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. Gut,18:921-37, 1977.

_____; SUTHERLAND, A.; MacDONALD, T. T.; ALLAN, F. - Technique for microdissection and measurement in biopsies of human small intestine. J. clin. Pathol:30:1068-73, 1977.

FERNANDEZ-GUERRERO, M. L.; AGUADO, J. M.; BUZÓN, L.; BARROS, C.; MONTALBAN, C.; MARTÍN, T.; BOUZA, E. - Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. Am. J. Med.,83:1098-102, 1987.

GALVÃO-CASTRO, B.; FERREIRA, J. A. S.; MARZOCHI, K.F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. - Polyclonal cell activation, circulating immune complex and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. Clin. exp. Immunol.,56:58-66, 1984.

GARCIA, J. M. A.; GUERRERO, M. L. F.; ARNAL, P.; FERNANDEZ, J. L. D.; HUELGAS, R. G.; CURIEL, M. D.; HERNANDEZ, G. M.; VILLALOBOS, E.; FAYOS, J. S. - Kala-azar en el adulto. A propósito de once observaciones. Rev. Clin. espan.,171:119-23, 1983.

GIRGLA, H. S.; MARSDEN, R. A.; SINGH, G. M.; RYAN, T. J. - Post-Kala-azar dermal leishmaniasis. Br. J. Dermatol.,97:307-11, 1977.

GERSON, C. D.; KENT, T. H.; SAHA, J. R.; SIDDIQI, N.; LINDENBAUM, J. - Recovery of small-intestine structure and function after residence in the tropics. II. Studies in Indians and Pakistanis living in New York city. Ann. intern. Med., 75:41-8, 1971.

GOLDER, J. P.; DOE, W. F. - Isolation and preliminary characterization of human intestinal macrophages. Gastroenterol., 84:795-802, 1983.

GOLDGAR, C. M.; VANDERHOOF, J. A. - Lack of correlation of small bowel biopsy and clinical course of patients with intractable diarrhea of infancy. Gastroenterol., 90:527-31, 1986.

GRACEY, M. - Gastrointestinal aspects of malnutrition in children. Paed. indones., 28:85-96, 1988.

GRIMALDI, G. Jr.; McMAHON-PRATT, D. - Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: An overview. In. SUN, T. (Ed). Progress in Clinical Parasitology. Philadelphia. Field & Wood Medical Publishers. 1991, pp.73-118.

_____; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. - A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am. J. trop. Med. Hyg., 41:687-725, 1989.

_____; SOARES, M. J.; MORIEARTY, P. L. - Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana*-eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol., 6:397-408, 1984.

GREENWOOD, J. H.; AUSTIN, L. L.; DOBBINS, W. O. - In vitro characterization of human intestinal intraepithelial lymphocytes. Gastroenterol., 85:1023-35, 1983.

GUIRALDES, E.; HAMILTON, J. R. - Effect of chronic malnutrition on intestinal structure, epithelial renewal, and enzymes in suckling rats. Pediatr. Res., 15:930-4, 1981.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; McAULIFFE, J. F.; SOUZA, M. A. - Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. Am. J. trop. Med. Hyg., 47(Suppl.1):28-35, 1992.

GUERREIRO, J.; RIBEIRO, S.; CARVALHO, E. M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H. - Infecção bacteriana em pacientes portadores de leishmaniose visceral. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80:447-52, 1985.

HANDEMAN, E.; GODING, J. W. - The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. EMBO J., 4:329-36, 1985.

- HARTONG, W. A.; GOURLEY, W. K.; ARVANITAKIS, C. - Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural abnormalities of the small intestinal mucosa. Gastroenterol.,77:61-9, 1979.
- HASHEMI-NASAB, A.; ZADEH-SHIRAZI, H. - Visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fars Province, Iran: study of 130 cases. J. trop. Med. Hyg.,83:119-22, 1980.
- HINDLE, W.; CREAMER, B. - Significance of a flat small-intestinal mucosa. Br. Med. J.,2:455-8, 1965.
- HO, E.; SOONG, T-H.; LI, Y. - Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,41:629-36, 1948.
- HO, J. L.; BADARó, R.; SCHWARTZ, A.; DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A.; SOBEL, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; REED, S. G.; JOHNSON, W. D. Jr. - Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor during acute visceral leishmaniasis. J. infect. Dis.,165:1094-102, 1992.
- HO, M.; SIONGOK, T. K.; LYERLY, W. H.; SMITH, D. H. - Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,76:741-6, 1982.
- HO, M.; KOECH, D. K.; IHA, D. W.; BRYCESON, D. M. - Immunosuppression in Kenyan visceral leishmaniasis. Clin. exp. Immunol.,51:207-14, 1983.
- HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. - The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann. trop. Med. Parasitol.,72:213-8, 1978.
- HOOGSTRAAL, H.; HEYNEMAN, D. - Leishmaniasis in the Sudan Republic. Am. J. trop. Med. Hyg.,18:1091-210, 1969.
- JAMES, S. P.; GRAEFF, A. S.; ZEITZ, M. - Predominance of helper-inducer T in mesenteric lymph nodes and intestinal lamina propria of normal non-human primates. Cell Immunol.,107:372-83, 1987.
- _____ ; ZEITZ, M.; KANOF, M.; KWAN, W, C. - Intestinal lymphocyte populations and mechanisms of cell-mediated immunity. Immun. All. clin. N. Am.,8:369-92, 1988.
- JARECKI-BLACK, J. C.; GLASSMAN, A. B.; JAMES, E. R. - Adoptive transfer of vaccine-induced resistance to *Leishmania donovani*. Am. J. trop. Med. Hyg.,34:1095-7, 1985.
- KINGSTON, D.; PEARSON, J. R.; PENNA, F. J. - Plasma cell counts of human jejunal biopsy specimens examined by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques: a comparative study. J. clin. Pathol.,34:381-5, 1981.

MIRI, R. - Studies in leishmaniasis in the Anglo-Egyptian Sudan. VI. The evolution of leishmania infections in man. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., XXXVIII:61-70, 1944.

KNIGHT, R.; WOODRUFF, A. W.; PETTIT, L. E. - The mechanisms of anaemia in kala-azar. A study of 2 patients. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 61:701-5, 1967.

KLEIN, J. - Mucosal immune system. In. KLEIN, J. (Ed). Immunology. Boston. Blackwell Scientific Publications. 1990, pp.376-82.

KNOWLES, R. - A study of kala-azar. Part IV. Experimental work and possible methods of transmission of kala-azar. Ind. J. med. Res., VIII:186-209, 1920.

LAINSON, R. - The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 77:569-96, 1983.

KURBA, R.; EL-HASSAN, A. M.; AL-GINDAN, Y.; OMER, A. H. S.; BUSHRA, M.; KUTTY, M. K. - Peripheral nerve involvement in cutaneous leishmaniasis (Old World). Inter. J. Dermatol., 26:527-31, 1987.

LAPLACE, M.; PAMPIGLIONE, S.; BORGATTI, M.; ZERBINI, M. - Complement fixation and intradermal skin test with partially purified "proteic" and "polysaccharidic" antigens from *Leishmania donovani*. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 69:396-8, 1975.

LAYRISSE, M.; BLUMENFIELD, N.; CARBONELL, L.; DESENNE, J.; ROCHE, M. - Intestinal absorption tests and biopsy of the jejunum in subjects with heavy hookworm infection. Am. J. trop. Med. Hyg., 13:297-305, 1964.

LAZANAS, M.; PERRONNE, T.; LOMVERDOS, D.; GALARIOTIS, C.; ARAPAKIS, G.; VILDE, J. L. - Leishmaniose viscéral révélee par une histiocytose avec érythrophagocytose. La presse méd., 19 (16), 1990.

LEE, T. D. G.; SWIETER, M.; BEFUS, D. - Mast cells, eosinophils, and gastrointestinal hypersensitivity. Immuno. All. clin. N. Am., 8:469-83, 1988.

LEVIN, J. - Tomada de decisões. Correlação. In. LEVIN, J. (Ed). Estatística aplicada a ciências humanas. Haper and Row do Brasil. 1978, pp.236-9.

LEVINSON, J. D.; NASTRO, L. - Giardiasis with total villous atrophy. Gastroenterol., 74:271-5, 1978.

LIFSHITZ, F.; TEICHBERG, S.; WAPNIR, R. A. - Malnutrition and the intestine. In TSANG, R. C. & NICHOLS, B. L. ed. Nutrition and Child health: Perspectives for the 1980s. New York. 1981, pp.1-24.

- LINDENBAUM, J. - Tropical enteropathy. Gastroenterol.,64:637-52, 1973.
- _____ ; GERSON, C. D.; KENT, T. H. - Recovery of small-intestine structure and function after residence in the tropics. I. Studies in peace corps volunteers. Ann. inter. Med.,74:218-22, 1971.
- _____ ; HARMON, J. W.; GERSON, C. D. - Subclinical malabsorption in developing countries. Am. j. clin. Nutri.,25:1056-61, 1972.
- LIPKIN, M. - Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells. Physiol. Rev.,53:891-915, 1973.
- MAGALHÃES, A. F.; TREVISAN, M. A. S.; PEREIRA, A. S. - Jejunal biopsies in protein-calorie malnutrition and intestinal parasitic infestation in Brazil. Am. J. Gastroenterol.,64:472-77, 1975.
- MAJUMDAR, T. D. - Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Dermatol. intern.,6:174-7, 1967.
- MANUEL, P. D.; WALKER-SMITH, J. A.; FRANCE, N. E. - Patchy enteropathy in childhood. Gut,20:211-5, 1979.
- MANSON-BAHR, P. E. C. - A primary skin lesion in visceral leishmaniasis. Nature,175:433-4, 1955.
- _____ - East African kala-azar with special reference to the pathology, prophylaxis and treatment. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,53:123-36, 1959.
- _____ - Immunity in kala-azar. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,55:550-5, 1961.
- _____ - Leishmanin skin testing in the western and lake regions of Tanzania. East Afr. med. J.,44:183-5, 1967.
- _____ - Cryptic infections of humans in an endemic kala-azar area. East Afr. med. J.,44:177-82, 1977.
- _____ ; HEISCH, R. B. - Studies in leishmaniasis in East Africa. III. Clinical features and treatment. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,50:465-71, 1956.
- MARTINS, J. M.; ALENCAR, J. E.; MAGALHÃES, V. B. - The anemia of Kala-azar. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo,7:47-64, 1965.
- MARU, M. - Clinical and laboratory features and treatment of visceral leishmaniasis in hospitalized patients in Northwestern Ethiopia. Am. J. trop. Med. Hyg.,28:15-18, 1979.
- MATTA, L. - Diarrheal diseases as a cause of malnutrition. Am. J. trop. Med. Hyg.,47(Suppl.1):16-27, 1992.
- MAUEL, J.; BUCHMULLER-ROULLER, Y. - Effect of lipopolysaccharide on intracellular killing of *Leishmania*

enriettii and correlation with macrophage oxidative metabolism. Eur. J. Immunol.,17:203-8, 1987.

MAGRINI, W.; MAGALHAES, P. A.; BATISTA, S. M.; COSTA, D. A. - Diagnóstico do calazar. II- Estudo do teste de Montenegro e pesquisa de *Leishmania* em material de pele proveniente de pacientes portadores de calazar, antes e após terapêutica antimonial. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo,13:268-71, 1971.

MELNEY, H. E. - The histopathology of kala-azar in the hamster, monkey, and man. Am. J. Pathol.,1:147-68, 1925.

MENGESHA, B.; ABUHOY, M. - Kala-azar among labour migrants in Metema-Humera region of Ethiopia. Trop. geo. Med.,30:199-206, 1978.

MESTECKY, J.; MCGHEE, J. R.; ELSON, C. - Intestinal IgA system. Immun. All. clin. N. Am.,8:349-68, 1988.

MONTALBAN, C.; MARTINEZ-FERNANDEZ, R.; CALLEJA, J. L.; GARCIA-DIAZ, J.; RUBIO, R.; DRONDA, F.; MORENO, S.; YEBRA, M.; BARROS, C.; COBO, J.; MARTINEZ, M. C.; RUIZ, F.; COSTA, J. R. - Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. Rev. infec. Dis.,11:655-60, 1989.

MORECKI, R.; PARKER, J. G. - Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. Gastroenterol.,52:151-64, 1967.

MORSON, B.; DAWSON, I. M. P.; DAY, D. W.; JASS, J. R.; PRICE, A. B.; WILLIAMS, G. T. - Normal small intestine. In MORSON, B.; DAWSON, I. M. P.; DAY, D. W.; JASS, J. R.; PRICE, A. B.; WILLIAMS, G. T. (ed). Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1990, pp.197-215.

_____ ; _____ ; _____ ; _____ ; _____ ; _____ - Malnutrition, maldigestion and malabsorption. In MORSON, B.; DAWSON, I. M. P.; DAY, D. W.; JASS, J. R.; PRICE, A. B.; WILLIAMS, G. T. (ed). Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1990, pp.303-33.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. - The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. Nature,327:329-31, 1987.

MOSSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. - Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immunol.,46:111-47, 1989.

MOST, H.; LAVIETES, P. H. - Kala azar in American military personnel. Report of 30 cases. Medicine,26:221-84, 1947.

MUIGAI, R.; GATEI, D.; SHAUNAK, S.; WOZNIAK, A.; BRYCESON, A. D. M. - Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. Lancet,2:476-9, 1983.

- MURRAY, H. W. - Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. J. exp. Med.,153: 1302-15, 1981.
- MURRAY, H. W. - Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. J. Immunol.,129:351-7, 1982.
- NACY, C. A.; FORTIER, A. H.; MELTZER, M. S.; BUCHMEIER, N. A.; SCHREIBER, R. D. - Macrophage activation to kill *Leishmania major*: Activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon gamma and non interferon lymphokines. J. Immunol.,135:3505-12, 1985.
- _____ ; FORTIER, A. H.; PAPPAS, M. G.; HENRY, R. R. - Susceptibility of inbred mice to *Leishmania tropica* infection: Correlation of susceptibility with in vitro defective macrophage microbicidal activities. Cell Immunol.,77:298-307, 1983.
- _____ ; MELTZER, M. S.; LEONARD, E. J.; WYLER, D. J. - Intracellular replication and lymphokine-induced destruction of *Leishmania tropica* in C3H/HeN mouse macrophages. J. Immunol.,127:2381-6, 1981.
- NADIM, A.; NAVID-HAMIDID, A.; JAVADIAN, E.; BIDRUNI, T.; AMINI, H. - Present status of kala-azar in Iran. Am. J. trop. Med. Hyg.,27:25-8, 1978.
- NANDY, A.; CHOWDHURY, A. B. - Lymphadenopathy in Indian kala-azar. Ann. trop. Med. Parasitol.,78:331-2, 1984.
- NAPIER, L. E. - Kala-azar. In. NAPIER, L.E. (Ed). The principles and practice of tropical medicine. New York. The Mac.Millan Co. 1946, pp.135-77.
- _____ ; Das GUPTA, C. R. - A clinical study of post-kala-azar dermal leishmaniasis. J. trop. Med. Hyg.,33:196, 1930.
- _____ ; KRISHNAN, K. V. - A theory of the aetiology and epidemiology of kala-azar in India. Indian med. Gaz., 66:603-9, 1931.
- NASSAR, A. M.; EL TANTAWY, S. A.; KHALIFA, S.; FATTAH, S. A.; HAMID, J. A. - Ultrastructural changes in the mucosa of the small intestine due to protein-calorie malnutrition. J. trop. Pediatr., April:62-72, 1980.
- NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. - Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. J. exp. Med.,158:670-89, 1983.
- NEAFIE, R.; CONNOR, D. H. - Visceral leishmaniasis. In BINFORD, C. H.; CONNOR, D. H. (Eds). Pathology of tropical and

extraordinary diseases. An atlas. Armed Forces Institute of Pathology. Washington D.C. 1976, pp.265-72.

PAMPIGLIONE, S.; LA PLACE, M.; SCHILICI, G. - Studies on Mediterranean leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in northern Italy. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,68:349-59, 1974.

_____; MANSON-BAHR, P. E. C.; GIUNGI, F.; GIUNTI, G.; PARENTI, A.; CANESTRI TROTTI, G. - Studies on Mediterranean leishmaniasis. II. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.,68:447-53, 1974.

PANDSIAN, C. B.; SYPEK, J. P.; WYLER, D. J - Cell contact-mediated macrophage activation for anti leishmanial defense. I. Lymphocyte effector mechanism that is contact dependent and noncytotoxic. J. Immunol.,133:3358-65, 1984.

PARKER, F. G.; BARNES, E. N.; KAYE, G. I. - The pericryptal fibroblasts sheath. IV. Replication, migration, and differentiation of the subepithelial fibroblasts of the crypt and villus of the rabbit jejunum. Gastroenterol.,67:607-21, 1974.

PATRI, F. R. S. - Morfologia da mucosa jejunal. In. PENNA, F. J.; WEHEBA, J.; FAGUNDES NETO, U. (Eds) Gastroenterologia Pediátrica. Rio de Janeiro. MEDSI. 1983, pp.608-15.

PEARSON, R. D.; COX, G.; JERONIMO, S. M. B.; CASTRACANE, J.; DREW, J. S.; EVANS, T.; ALENCAR, J. E. - Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced caquexia. Am. J. trop. Med. Hyg.,47(Suppl.1):8-15, 1992.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. - Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. J. Immunol., 125: 2195-201, 1980.

PENNA, F. J.; HILL, I. D.; KINGSTON, D.; ROBERTSON, K.; SLAVIN, G.; SHINER, M. - Jejunal mucosal morphometry in children with and without gut symptoms and in normal adults. J. clin. Pathol.,34:386-92, 1981.

_____; MOTA, J. A. C.; BAMBIRRA, E. A. - Biópsia jejunal. In. PENNA, F. J.; WEHEBA, J.; FAGUNDES NETO, U. (Eds) Gastroenterologia Pediátrica. Rio de Janeiro. MEDSI. 1983, pp.596-605.

PERERA, D. R.; WEINSTEIN, W. M.; RUBIN, C. E. - Small intestinal biopsy. Hum. Pathol.,6:157-217, 1975.

PERRY, H. M. - Some observations on the occurrence of *Leishmania* in the intestinal tissue in Indian kala-azar, on the pathological changes occasioned by their presence, and on their possible significance in this situation. J. roy. Army Med. Corps.,39:323-9, 1922. Apud. MELENEY, H. E. - The histopathology of kala-azar in the hamster, monkey, and man. Am. J. Pathol.,1:147-68, 1925.

- PETRAS, R. E. - Non-neoplastic intestinal diseases. In STERNBERG, S.S. (Ed) Diagnostic Surgical Pathology. New York. Raven Press Ltd. 1989, pp.967-1014.
- PETERS, B. S.; FISH, D.; GOLDEN, R.; EVANS, D. A.; BRYCESON, A. D. M.; PINCHING, A. J. - Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: Clinical features and response to therapy. Quart. J. Med., **283**:1101-11, 1990.
- PETERSEN, E. A.; NEVA, F. A.; BARRAL, A.; CORREA-CORONAS, R.; BOGAERT-DIAZ, H.; MARTINEZ, D.; WARD, F. E. - Monocytes supression of antigen-specific lymphocytes responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. J. Immunol., **132**:2603-6, 1984.
- PHAM, T. V.; MAUEL, J. - Studies on intracellular killing of *Leishmania major* and lysis of host macrophages by immune lymphoid cells in vitro. Parasite Immunol., **9**:721-36, 1987.
- PHILLIPS, A. D.; FRANCE, N. E.; WALKER-SMITH, J. A. - The structure of the enterocyte in relation to its position on the villus in childhood: an electron microscopical study. Histopathol., **3**:117-30, 1979.
- PIPPARD, M. J.; MOIR, D.; WEATHERALL, D. J.; LENICKER, H. M. - Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. Ann. trop. Med. Parasitol., **80**:317-23, 1986.
- POMPEU, M. L. - Análise imunopatológica do curso da infecção por *Leishmania mexicana amazonensis* em camundongos BALB/c imunizados. Salvador, 1988. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.
- _____; FREITAS, L. A.; SANTOS, M. L. V.; KHOURI, M.; BARRAL-NETTO, M. - Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. Acta Trop., **48**:185-93, 1991.
- _____; _____; SANTOS, M. L. V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. - *Leishmania amazonensis* infection: A comparison of in vivo leishmanicidal mechanisms between immunized and naive and naive infected BALB/c mice. Exp. Parasitol., **74**:169-76, 1992.
- PONTES DE CARVALHO, L. C.; BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; LANNES-VIEIRA, J.; VINHAES, L.; ORGE, G.; MARSOCHI, M. C. A.; GALVÃO-CASTRO, B. - Nature and incidence of erythrocyte-bound IgG and some aspects of the physiopathogenesis of anaemia in American visceral leishmaniasis. Clin. exp. Immunol., **64**:495-502, 1986.
- ROTTEN, C. - Kinetics and possible regulation of crypt cell populations under normal and stress conditions. Bull. Cancer, **62**:419-30, 1975.
- PRATA, A. - Estudo clínico e laboratorial do calazar. Salvador, 1957a. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

_____; PIVA, N. - Presença de leishmânias em pele aparentemente normal de pacientes com calazar. O Hospital,XLIX:481-5, 1956.

_____; DOMINGUES, A. - Leishmanoide dérmico. O Hospital,L:541-57, 1956.

_____- Cura parasitológica do calazar. O Hospital,51:572-77, 1957b.

PUENTES, S. M.; SACKS, D. L.; SILVA, R. P.; JOINER, K. A. - Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. J. exp. Med.,167:887-902, 1988.

RASS, P.; SIQUEIRA, J. T. - Subsídio ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral, com especial referência às lesões pulmonares e cardíacas. O Hospital,65:1291-309, 1964.

RAIZMAN, R. C. - Giardiasis: An overview for the clinician. Diq. Dis.,21:1070-4, 1976.

REED, S. G.; BADARÓ, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E. M.; LOURENÇO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. Jr.; JONES, T. C. - Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. Am. J. trop. Med. Hyg.,35:79-85, 1986.

REIS, M. G.; ROTERS, S. B.; BARRAL-NETTO, M. - Immune serum from both susceptible and resistant strains of mice increases phagocytoses of *Leishmania mexicana amazonensis* by macrophages. Acta Trop.,44:339-42, 1987.

REY, L. - O complexo "*Leishmania donovani*" e a leishmaniose visceral. In REY, L. (Ed) Parasitologia. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1991, pp.215-26.

REZAI, H. R.; ARDEHALI, S. M.; AMIRHAKIMI, G.; KHARAZMI, A. - Immunological features of kala-azar. Am. J. trop. Med. Hyg.,27:1079-83, 1978.

RIDLEY, D. S. - Histopathogenic mechanisms in leishmaniasis. Pathologica,75:471-9, 1983.

RIDLEY, M. J.; RIDLEY, D. S. - The evolution of the lesions in cutaneous leishmaniasis. J. Pathol.,141:83-96, 1983.

- Monocyte recruitment, antigen degradation and localization in cutaneous leishmaniasis. Br. J. exp. Pathol.,67:209-18, 1986.

ROBERTS-THOMSON, I.; MITCHELL, G. F. - Giardiasis in mice. I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. Gastroenterol.,75:42-6, 1978.

RODRIGUES DA SILVA, J. - Leishmaniose visceral (calazar). Rio de Janeiro, 1977. Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil.

ROITL, I. - Mucosal-associated lymphoid tissue. In: ROITL, I. (Ed). Essential Immunology. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1985. p.67.

SARIN, T. K.; GHOSH, T. P. - Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterol., 72:402-5, 1977.

SALIKAO, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAVIA, M. G. - Detecção de amastifotas em leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de inmuoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con metodos convencionales de diagnostico. Mer. Inst. Oswaldo Cruz, 84:53-60, 1989.

SATTI, M. B.; EL-HASSAN, A. M.; AL-BINDAN, Y.; OSMAN, M. A.; AL-SHAIBANI, M. - Peripheral neural involvement in cutaneous leishmaniasis. A pathologic study of human and experimental lesions. Intern. J. Dermatol., 28:243-7, 1989.

SCHENK, E. A.; SAMLOFF, M. - Interpretation of jejunal biopsies. Am. J. clin. Pathol., 49:263-4, 1968.

_____; _____ - Clinical and morphologic changes following gluten administration to patients with treated celiac disease. Am. J. Pathol., 52:579-85, 1968.

_____; _____; KLIPSTEIN, F. A. - Morphological characteristics of jejunal biopsies in celiac disease and tropical sprue. Am. J. Pathol., 47:765-77, 1965.

_____; _____; _____ - Morphology of small bowel biopsies. Am. J. clin. Nutri., 21:944-61, 1968.

_____; _____; _____ - A protocol for the evaluation of small bowel biopsies. Am. J. clin. Nutri., 25:1108-17, 1972.

SCHNEIDER, R. E.; VITERI, F. - Morphological aspects of the duodenajejunal mucosa in protein-calorie malnourished children and during recovery. Am. J. clin. Nutri., 25:1092-102, 1972.

SCOTT, P.; JAMES, S.; SHER, A. - The respiratory burst is not required for killing of intracellular and extracellular parasites by a lymphokine-activated macrophage cell line. Eur. J. Immunol., 15:553-9, 1985.

SCOTT, B. B.; LOSOWSKY, M. S. - Patchiness and duodenal-jejunal variation of the mucosal abnormality in coeliac disease and dermatitis herpetiformes. Gut, 17:984-92, 1976.

SELBY, W. S.; JANOSSY, G.; JEWELL, D. P. - Immunohistological characterisation of intraepithelial lymphocytes of the human gastrointestinal tract. Gut, 22:169-76, 1981.

_____ ; _____ : Goldstein, G.; JEWELL, D. P. - T lymphocyte subsets in human intestinal mucosa: the distribution and relationship to MHC-derived antigens. Clin. exp. Immunol., 44:453-8, 1981.

_____ ; POULTER, L. W.; HOBBS, S.; JEWELL, D. P.; JANOSSY, G. - Heterogeneity of HLA-DR-positive histiocytes in human intestinal lamina propria: a combined histochemical and immunohistological analysis. J. clin. Pathol., 36:379-84, 1983.

SELLS, P. G.; BURTON, M. - Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 75:461-8, 1981.

_____ : GOLDRINE, O. L. - Plasma cells in draining lymph nodes of cutaneous leishmaniasis patients contain *Leishmania* antigens. Ann. trop. med. Parasitol., 79:215-9, 1985.

SENDINO, A.; BARBADO, F. J.; MOSTAZA, J. M.; FERNANDEZ-MARTIN, J.; LARRAURI, J.; VAZQUEZ-RODIGUEZ, J. J. - Visceral leishmaniasis with malabsorption syndrome in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med., 89:673-5, 1990.

SEN GUPTA, P. C.; BHATTACHARJEE, B. - Histopathology of post-kala-azar dermal leishmaniasis. J. trop. Med. Hyg., 56:110-6, 1953.

_____ ; CHAKRAVARTY, N. K.; DAS GUPTA, B. - The liver in kala-azar. Ann. trop. med. Parasitol., 50:252-9, 1956.

SHERLOCK, I. A. - Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. IV. Variações horárias e estacional do *Phlebotomus longipalpis*. Rev. bras. Malariol. D. trop., 21:715-27, 1969.

SHINER, M. - Duodenal biopsy. Lancet, 1:17-9, 1956.

_____ ; PUTMAN, M.; NICHOLS, V. N.; NICHOLS, B. L. - Pathogenesis of small-intestinal mucosal lesions in chronic diarrhea of infancy: I. A light microscopic study. J. pediatr. Gastroenterol., 11:455-63, 1990.

_____ ; NICHOLS, V. N.; BARRISH, J. P.; NICHOLS, B. L. - Pathogenesis of small-intestinal mucosal lesions in chronic diarrhea of infancy: II. An electron microscopic study. J. pediatr. Gastroenterol., 11:464-80, 1990.

SHORTT, H. E.; SMITH, R. O. A.; D'SILVA, H. A. H.; SWAMINATH, C. S. - *Leishmania donovani* in human faeces in Indian kala-azar. Ind. J. med. Res., 17:644-7, 1929.

SIEVER, R. T.; PEDREIRA, L.; KORNGOLD, L.; ENGLE, R. L. - Studies of serum protein abnormalities in kala azar. Proc. Soc. exp. biol. Med., 106:365-8, 1961.

SLAVIN, G.; SOWTER, C.; ROBERTSON, F.; McDERMOTT, S.; PATON, F. - Measurement in jejunal biopsies by computer-aided microscopy. J. Clin. Pathol., 37:254-61, 1984.

SOLRAI, I. T.; PÓRTO, J. A. F.; BARRETO NETTO, M. - Intestinal infection and malabsorption in a case of visceral leishmaniasis. O Hospital, 71:191-86, 1967.

SOLBACH, W.; GRIEL, J.; ROLLINGHOFF, M. - Anti-infectious responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice injected with recombinant colony-stimulating factor. Ann. Inst. Pasteur Immunol., 178:759-62, 1987.

SOTTO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; MATTA, V. L. R.; BRITO, T. - Cutaneous leishmaniasis of the New World: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. Acta Trop., 46:121-30, 1989.

SPERB, K. E.; MAYER, L. - Gastrointestinal manifestations of common variable immunodeficiency. Immun. Aller. clin. N. Am., 8:423-34, 1988.

STANFIELD, J. P.; HUTT, M. S. R.; TUNNICLIFFE, R. - Intestinal biopsy in Kwashiorkor. Lancet, 2:519-23, 1965.

STONE, H. H.; TOOL, C. D.; PUGSLEY, W. - Kala-azar (visceral leishmaniasis): report of a case with 34 month incubation period and positive Doan-Wright test. Ann. int. Med., 36:686-93, 1952.

SYPEK, J. P.; WYLER, D. J. - Cell contact-mediated macrophage activation for antileishmanicidal defence: mapping of the genetic restriction to the I region of the MHC. Clin. exp. Immunol., 62:449-57, 1985.

TANDON, B. N.; DAS, B. C.; SARAYA, A. K.; DEO, M. G. - Functional and structural studies of small bowel in ankylostomiasis. Br. Med. J., 1:714-6, 1966.

TEIXEIRA, R. - Experiências vividas com a leishmaniose visceral 1954-1980. (Aspectos epidemiológicos, sorológicos e evolutivos). Salvador, 1980. Tese. Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

TRIER, J.; RUBIN, C. E. - Electron microscopy of the small intestine: a review. Gastroenterol., 49:574-603, 1965.

VERESS, B.; MALIK, M. D. A.; SATIR, A. A.; EL HASSAN, A. M. - Morphological observations on visceral leishmaniasis in the Sudan. Trop. geogr. Med., 26:198-203, 1974.

_____; OMER, A.; SATIR, A. A.; EL HASSAN, A. M. - Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. Immunol., 33:605-10, 1977.

WEIGER, S.; RAIMPAL, F. - Une cause originale et méditerranéenne de leishmaniose. Bull. Soc. Pathol. ex., 76:369-376, 1983.

WU, H. L. - A review of leishmaniasis in China from 1947 to 1974. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 76:531-7, 1982.

YAMR, I. S.; LAWYER, F. G. - New world vector of the leishmaniasis. In: HARRIS, R. F. (Ed). Current topics in vector research. New York: Springer-Verlag, 1987, pp.27-71.

WISNIEWSKI, J. P.; PINTO, A.; VELAZQUEZ, A.; BRONSTEIN, I.; DEBBARD, J. J.; DOQUE, J. F.; MOUTENESSER, J.; TAPANI, P.; FOUSESE, A. F. - Clinical and histological kidney involvement in human kala azar. Am. J. trop. Med. Hyg., 27:357-9, 1978.

WESS-HIL, B. K.; WALKER, A. W. - Milk allergies and other food allergies in children. Immun. All. clin. N. Am., 8:489-503, 1988.

WOLGA, J. I.; STAHL, J. P.; GAILLAT, J.; RIBEIRO, O. D.; MICOUD, M. - Manifestation immunes et autoimmunes au cours d'une leishmaniose viscérale autochtone avec attent hépatique, rénale et vasculaire. Bull. Soc. Pathol. ex., 76:369-376, 1983.

WOOD, I. J.; DOIG, R. K.; MOTTERAM, R.; HUGHES, A. - Gastric biopsy. Report on fifty-five biopsies using a new flexible gastric biopsy tube. Lancet, 1:18-21, 1949.

ZEITZ, M.; GREEN, W. C.; PEFFER, N. J.; JAMES, S. P. - Lymphocytes isolated from the intestinal lamina propria of normal non-human primates have increased expression of genes associated with T-cell activation. Gastroenterol., 94:647-55, 1988.

ZIA, L. S.; FORKNER, C. F. - The syndrome of acute agranulocytosis and its occurrence as a complication of kala-azar. Am. J. med. Sci., 188:624-39, 1934.