

ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO RETARDADO NA LEISHMANIOSE VISCERAL (*)

Tarcísio Matos de ANDRADE (1), Rodolfo TEIXEIRA (2), Jacy Amaral Freire de ANDRADE (1), Cândido PEREIRA (3) e Edgar Marcelino de CARVALHO FILHO (3)

RESUMO

A hipersensibilidade do tipo retardado a PPD e tricofitina, bem como a capacidade de sensibilização ao DNCB, foi estudada em 10 pacientes portadores de leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimônio pentavalente, e em 10 indivíduos que constituíram o grupo controle. Ausência de resposta aos testes intradérmicos com PPD e tricofitina foi documentada em 9 dos 10 pacientes com calazar em atividade e, somente em 2 casos, a habilidade de sensibilização com DNCB foi observada. Avaliação dos mesmos testes imediatamente após a cura da doença revelou que 5 de 7 pacientes tiveram habilidade de responder pelo menos a um dos antígenos. No grupo controle 4 de 10 pacientes tiveram uma resposta positiva a um dos antígenos inoculados e em 5 houve sensibilização com o DNCB. A elevada frequência de ausência de resposta a testes intradérmicos durante a fase ativa da leishmaniose visceral traz a possibilidade de que, aliado à desnutrição e à baixa faixa etária, fatores relacionados com a presença do parasito possam interferir na resposta imunológica do hospedeiro.

INTRODUÇÃO

Os portadores de leishmaniose visceral habitualmente apresentam-se com hipergamaglobulinemia e se mostram incapazes de responder a testes cutâneos com os antígenos de *Leishmania*^{9,13,14}. É de conhecimento mais recente, a possibilidade de haver uma depressão da imunidade celular nesses pacientes; é que se tem registrado diminuição de linfócitos em áreas T dependentes de linfonodos¹⁶, assim como baixa de resposta linfoproliferativa "in vitro" ao estímulo com a fitohemaglutinina⁶. Entretanto, o real papel da imunidade celular na leishmaniose ainda não se definiu, necessitando, pois, de melhores estudos.

No presente trabalho foram realizados testes com variados antígenos, para a determinação de hipersensibilidade do tipo retardado, em indivíduos com leishmaniose visceral, antes e imediatamente após o tratamento da doença. Estes dados foram comparados com as respostas de indivíduos que compuseram um grupo controle, e com a resposta linfoproliferativa "in vitro" à fitohemaglutinina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi fundamentado na análise de dois grupos de indivíduos: a) dez pa-

(*) Realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq — Projeto 2222.8-148/80, do National Institute of Health (AI 16282) e do CEDRE — Centro de Estudos de Doenças Regionais

(1) Médico Residente do Hospital Prof. Edgard Santos — Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

(2) Professor Titular de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

(3) Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia

cientes internados no Hospital Prof. Edgard Santos e no Hospital Martagão Gesteira, os quais apresentavam quadro clínico e laboratorial de leishmaniose visceral e em todos eles o diagnóstico foi confirmado através do encontro de leishmânias na medula óssea. Não ocorreram associações mórbidas importantes nestes pacientes. Todos eram procedentes do interior do Estado da Bahia, com idade variando de dois a 20 anos. Quatro eram do sexo masculino. Nove eram pardos e um preto. Em oito pacientes havia sinais de desnutrição. Sete nunca haviam recebido tratamento específico e três já tinham usado, irregularmente, antimonial pentavalente, sem contudo haver cura parasitológica; b) Dez pacientes internados no Hospital Edgard Santos, portadores de patologias cirúrgicas não infecciosas e que se constituiriam no grupo controle. Estes pacientes foram pareados em sexo, idade e estado nutricional aos 10 pacientes do grupo em estudo.

Visando detectar hipersensibilidade do tipo retardado procedeu-se da seguinte forma: 1) grupo de pacientes com leishmaniose visceral — estes foram testados antes e uma semana após o tratamento com o antimonial pentavalente, cujo resultado foi considerado eficaz; 2) grupo controle — testados somente uma vez.

Empregaram-se os seguintes antígenos: tricotifina, proveniente do Alergofar, Rio de Janeiro, preparado a partir do antígeno bruto numa solução 1/100 e usado na dose de 0,1 ml; antígeno contendo 5.10^6 de promastigotas de *L. braziliensis*, empregado na dose de 0,1 ml, fornecido pelo Instituto de Patologia Tropical de Goiânia; PPD Rt²³ (5μ /ml) fornecido pelo Laboratório Merck, utilizado na dose de 0,1 ml. Estes antígenos foram injetados intradermicamente na face anterior do antebraço.

Visando avaliar a capacidade de sensibilização a um novo antígeno foi utilizado o dinitroclorobenzeno (DNCB) fornecido pelo Laboratório Merck, constituído de um primeiro disco A de sensibilização, contendo 2 mg e de um disco B de resposta imune contendo 100 μ g de antígeno. Os discos foram aplicados na face interna dos braços, protegidos com esparadrapo; o intervalo de aplicação entre os discos de sensibilização e os de resposta imune foi de duas semanas. Realizaram-se as leituras 48 horas após a injeção dos antígenos.

A leitura dos resultados, no caso dos testes intradérmicos se fez através da mensuração do diâmetro transversal da pápula formada, de tal forma que considerou-se como não reator 0-4mm; como reator fraco 5 a 9 mm; e reator forte acima de 10 mm.

Com relação ao DNCB a reação cutânea local representada por eritema indicava um teste positivo qualificado em (+); eritema e pápula (++) ; eritema, pápula e vesícula (+++). O teste era negativo quando não havia reação.

A resposta linfoproliferativa "in vitro" à fitohemaglutinina foi realizada com linfócitos obtidos do sangue periférico separados através de gradiente de centrifugação usando Ficoll-hypaque⁷. Após lavagem com meio RPMI 1640 (proveniente da Grand Island Biological Company) as células eram ajustadas à concentração de 1×10^6 em RPMI suplementado com 15% de soro AB +. Para se obter as necessárias culturas, 0,2 ml contendo 2×10^5 células foram colocadas em placas de microtitulação apropriados em triplicatas. A seguir, procedeu-se ao estímulo dessas células com fitohemaglutinina (Sigma) com diluição final variando de 1:10 a 1:100. Após 72 horas, adicionava-se a H³-timidina nas últimas 4 horas da cultura e posteriormente avaliava-se a incorporação do radioisótopo em contador de cintilação.

RESULTADOS

Os achados clínicos, laboratoriais e a resposta aos testes de hipersensibilidade do tipo retardado dos dez pacientes estudados encontram-se na Tabela I.

Quando da admissão observou-se que todos os pacientes estavam anêmicos, com o hematócrito se fixando em média de 24,3%. Oito apresentavam-se leucopênicos. Hiperglobulinemia foi um achado em sete dos nove pacientes. Três enfermos não se curaram com terapia antimonial (casos 3, 4, 9). Os doentes 3 e 4 foram posteriormente tratados, com sucesso, com anfotericina B e o paciente 9 faleceu.

Durante a fase ativa da doença somente três dos dez pacientes apresentaram resposta a pelo menos um teste cutâneo. O paciente 8 respondeu ao PPD e os pacientes 4 e 7 tiveram a habilidade de serem sensibilizados com o DNCB. Nenhum dos pacientes respondeu à reação de Montenegro.

T A B E L A I

Hipersensibilidade do tipo retardado em pacientes portadores de Calazar antes e após o tratamento com antimomial

Paciente	Idade/Sexo	Hipersensibilidade do tipo retardado					
		antes			após		
		PPD	TRIC.	DNCB	PPD	TRIC.	DNCB
1	4/F	—	—	—	—	—	—
2	9/F	—	—	—	—	—	—
3	5/F	—	—	—	não realizado	—	—
4	3/M	—	—	+++	”	”	—
5	20/M	—	—	—	—	RF*	—
6	11/M	—	—	—	—	—	+++
7	6/M	—	—	+++	—	—	+++
8	4/M	RF*	—	—	RF**	—	+++
9	10/M	—	—	—	não realizado	—	+++
10	1/F	—	—	—	—	RF*	+

* Reator fraco

** Reator forte

Após a cura parasitológica houve resposta em cinco dos sete pacientes estudados. Pacientes 5 e 10 que não responderam à tricofitina se tornaram reatores fracos, e os pacientes 6 e 8 que não foram sensibilizados pelo DNCB antes do tratamento, tiveram respostas equivalentes a três cruzes após o tratamento. O paciente 7 conservou a resposta obtida antes do tratamento.

Os resultados da hipersensibilidade do tipo retardado no grupo controle encontram-se na Tabela II. Sete dos dez pacientes deste grupo

PPD; e o 1 e o 5, reatores fortes. Quanto à resposta da tricofitina, apenas o doente 4 apresentou fraca reatividade.

Em cinco pacientes portadores de calazar e em três do grupo controle procedeu-se ao teste de transformação linfoblástica utilizando como estimulante a fitohemaglutinina (Tabela III). Exceto o paciente 9 que veio a falecer sem ter acontecido cura parasitológica, todos os outros doentes tiveram uma resposta significativa a este mitógeno, com o índice de estimulação variando de 52 a 163.

T A B E L A II

Hipersensibilidade do tipo retardado em pacientes internados no Hospital Prof. Edgard Santos (Grupo controle)

Paciente	Idade/Sexo	Hipersensibilidade do tipo retardado		
		PPD	TRIC.	DNCB
1	4/F	RF**	—	—
2	9/M	RF*	—	—
3	5/F	—	—	+++
4	3/M	—	RF*	++
5	20/M	RF**	—	++
6	11/M	—	—	—
7	5/F	—	—	+++
8	4/F	—	—	—
9	7/M	—	—	++
10	1/F	—	—	—

* Reator fraco

** Reator forte

responderam a pelo menos um dos testes cutâneos. Cinco foram sensibilizados pelo DNCB; nos casos 3 e 7 verificou-se resposta equivalente a três cruzes; e nos casos 4, 5 e 9 a duas cruzes. O paciente 2 se mostrou reator fraco ao

T A B E L A III

Resposta linfoproliferativa à fitohemaglutinina em portadores de leishmaniose visceral

Paciente	Incorporação de H ³ timidina (CPM)	
	sem estimulação	PHA
3	461 ± 103	26082 ± 1265
4	265 ± 156	43295 ± 1355
5	556 ± 114	28691 ± 1439
7	631 ± 84	45760 ± 1230
9	398 ± 116	1014 ± 480
Controles		
6	117 ± 15	36730 ± 2135
7	434 ± 165	63885 ± 6441
9	257 ± 15	44869 ± 1213

DISCUSSÃO

A observação de que nove dos dez pacientes com leishmaniose visceral não apresentaram hipersensibilidade do tipo retardado aos diferentes antígenos que são habitualmente capazes de induzirem esta reação e que somente dois de dez pacientes tiveram a capacidade de sen-

sibilização a um novo antígeno demonstra a existência de uma depressão da resposta a testes cutâneos em portadores de calazar.

Vários fatores tais como idade, estado nutricional, infecções virais, doenças consumptivas e uso de drogas imunossupressoras são capazes de afetarem as respostas às reações intradérmicas^{3,4,8,18}. No calazar alguns destes fatores estão presentes como a baixa faixa etária dos doentes e a deficiência nutricional. Estas variáveis devem ter desempenhado grande importância nos resultados obtidos e também influenciando a baixa frequência (40%) de positividade da reação intradérmica à PPD e tricofitina no grupo controle que foi pareado pela idade e estado nutricional com os portadores de leishmaniose visceral. Todavia, quando comparados os dois grupos, fica evidente que a resposta a testes cutâneos foi mais deprimida nos portadores de calazar. Este fato levanta a possibilidade de que outros fatores relacionados com a doença possam ter interferido na resposta a estes testes. É bem documentada a capacidade que tem anticorpos⁵, globulinas outras¹⁰, e complexos imunes¹¹ de suprimir a resposta imunológica. Hipergamaglobulinemia é achado comum na leishmaniose visceral, e nós temos observado complexos imunes circulantes em grande frequência nestes pacientes².

O fato de que 5 dos 7 pacientes avaliados após o tratamento com antimonial responderam a pelo menos um dos testes cutâneos é de grande interesse. Esta rápida reversão na depressão da hipersensibilidade de tipo retardado na leishmaniose visceral¹⁵ reforça a possibilidade de que a cura parasitológica possa, ainda de uma forma não explicada, restaurar a habilidade de reagir a testes cutâneos. O argumento, entretanto, de que a reversão da resposta poderia estar na dependência somente de uma recuperação da deficiência proteíno-calórica em virtude da administração de dieta balanceada durante a internação e do desaparecimento da condição consumptiva não pode ser afastada. Todavia, vale ressaltar que em um dos nossos casos, a despeito de suplementação proteíno-calórica e de tratamento com antimonial, que não resultou em cura parasitológica, os testes cutâneos foram negativos. Este paciente após o uso de nova série de antimonial com cura parasitológica reverteu a resposta.

Alguns Autores têm sugerido a ocorrência de uma deficiência imunológica grave em por-

tadores de leishmaniose visceral^{6,13,16} e este distúrbio poderia por si só explicar os achados do presente estudo. Entretanto, estes dados não têm sido comprovados. Nós temos avaliado a resposta proliferativa a mitógenos, células alogênicas e antígeno de leishmânia em pacientes com calazar, bem como quantificadas as populações de linfócitos nestes pacientes¹. Embora uma diminuição de linfócitos T tenha sido verificado em 25% dos pacientes estudados, as respostas "in vitro" a mitógenos e células alogênicas estão preservadas. Este fato, juntamente com a demonstração de que quatro dos cinco pacientes no presente estudo responderam normalmente à fitohemaglutinina, discorda da observação feita por GHOSE⁶ e não comprova a existência de um amplo defeito na imunidade celular destes doentes¹.

No presente trabalho foi documentado que na leishmaniose visceral a hipersensibilidade do tipo retardado a vários antígenos e a capacidade de se tornar sensibilizado a um novo antígeno está deprimida¹. Embora hipersensibilidade do tipo retardado possa refletir "in vivo" a imunidade celular^{12,17} a importância desta reação no mecanismo de defesa contra leishmânia não é conhecida. Como o calazar acomete principalmente crianças e tem um caráter consumptivo, a idade e o estado nutricional devem se constituir os principais responsáveis por estes achados. A possibilidade de que outros fatores envolvidos na resposta imunológica e relacionados com a presença do parasito no hospedeiro, estejam alterando a resposta celular "in vivo" não pode, no entanto, ser afastada.

SUMMARY

Study of delayed hypersensitivity in visceral leishmaniasis

Delayed hypersensitivity to recall antigens and ability to become sensitized to DNCB was evaluated in patients with visceral leishmaniasis before and after treatment with pentavalent antimonial therapy. Intradermal response to PPD and tricophitin was observed in only 1 of 10 patients with visceral leishmaniasis and only 2 of 10 were sensitized by DNCB. Evaluation of some of these subjects immediately after successful treatment with pentavalent antimonial showed that in 5 out of 7 a positive response was observed. Delayed type hypersensitivity to the

same antigens was also observed in 7 of 10 controls paired by age, and nutritional status. The Authors suggest that besides malnutrition which is observed in patients with Kala-Azar, factors related to the disease may inhibit "in vivo" host immunological responses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. & JOHNSON, E. S. — Cell mediated immunity in visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect. Imm.* 33: 498-502, 1981.
2. CARVALHO, E. M.; ANDREWS, B. S.; MARTINELLI, R.; DUTRA, M. & ROCHA, H. — Circulating immune complexes in visceral leishmaniasis and schistosomiasis. Submetido à publicação no *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*
3. COOVADIA, H. M.; PARENT, M. A.; LOENING, W. E. K.; WESLEY, A.; BORGESS, B.; HALLOT, F.; BRAIN, P.; GRACE, J.; NAIDD, J.; SMITH, P. M. & VOS, G. H. — An evaluation of factors associated with the depression of immunity in malnutrition and in measles. *Amer. J. Clin. Nutr.* 27: 665-669, 1974.
4. FAUCI, A. S.; DALE, D. C. & BALOW, J. E. — Glucocorticosteroid therapy. Mechanisms of action and clinical considerations. *Ann. Int. Med.* 84: 304-315, 1976.
5. FITCH, F. E. — Selective suppression of immune response. Regulation of antibody formation and cell mediated immunity by antibody. *Prog. Allergy* 19: 195-237, 1975.
6. GHOSE, A. C.; HALDAR, J. P.; PAL, S. C.; MISHRA, B. P. & MISHRA, K. K. — Phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation test in Indian Kala-Azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 725-728, 1979.
7. HORWITZ, D. A. & GARRET, A. A. — Distinctive functional properties of human blood lymphocytes. A comparison with T lymphocyte, B lymphocytes & monocytes. *J. Immunol.* 118: 1712-1721, 1977.
8. HURD, E. R. — Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of cyclophosphamide, azathioprine and methotrexate. *Arthritis Rheum.* 16: 84-91, 1973.
9. MANSON-BAHR, P. E. C. — Immunity in Kala-Azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55: 550-555, 1961.
10. MENOZIAN, J. O.; NIMBERG, R. D.; COOPERBANAL, S. R.; SCHNID, K.; SAPOSCHATZ, I. & MAN-NICK, J. A. — Regulation of T lymphocyte function by immuno regulatory alphaglobulin (IRA). *J. Immunol.* 113: 266-277, 1974.
11. MORGAN, E. L. & TEMPLIS, C. H. — The requirements for the Fc portion of antibody in antigen-antibody complex-mediated suppression. *J. Immunol.* 120: 1669-1671, 1978.
12. OPPENHEIN, J. J. — Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hipersensitivity in guinea-pigs and man. *Fed. Proc.* 27: 21-29, 1968.
13. REZAI, H. R.; ARDEHALI, S. M.; AMIRHAKIMI, G. M. & KHARAZMI, A. — Immunological features of Kala-Azar. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1079-1083, 1978.
14. TURK, J. L. & BRYCESON, A. D. M. — Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.* 13: 209-266, 1971.
15. UGAZIO, A. G.; MARCHI, A. & MONAFO, V. — Rapidly reversible depression of delayed hipersensitivity in two children with visceral leishmaniasis. *Infection* 3: 231-233, 1975.
16. VERESS, B.; OMER, A.; SATU, A. A. & EL HASSAN, A. M. — Morphology of the spleen and lymphnodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology* 33: 605-610, 1977.
17. WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O. & COWAN, R. B. T. — Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hipersensitivity. *Amer. J. Path.* 51: 735-748, 1967.
18. WING, E. G. & REMINGTON, J. S. — Delayed hipersensitivity and macrophage functions. In: *Basic and Clinical Immunology*. 3rd Ed., Fudenberg, H. H. Stites, D. P., Caldwell, J. L. & Wells, J. V., Los Autos, Lange Medical Publications, Cap. 9, pp. 129-143, 1980.

Recebido para publicação em 30/7/1981.