

IMUNIDADE CELULAR EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA*

Maria Vitalina do Nascimento Guerra

RESUMO

Foram estudados, sob o ponto de vista da imunidade celular, 30 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 17 e 72 anos, com diagnóstico clínico e laboratorial de leishmaniose tegumentar americana. Esses doentes provenientes do Estado de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Maranhão e Mato Grosso, ficaram sob controle, durante todo o tempo da pesquisa, internados no Serviço de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.

Para avaliação da imunidade celular, foram empregadas as seguintes provas: 1) determinação qualitativa e quantitativa dos linfócitos T, T-ativos e B do sangue circulante; 2) testes de inibição da migração dos leucócitos frente a antígeno de *Leishmania*; 3) testes intradérmicos com antígeno de Montenegro, antígenos bacterianos (PPD), micóticos (oidiomicina, tricofitina) e com fitohemaglutinina; 4) Provas de sensibilização com DNCB.

Os testes com antígenos de Montenegro permitiram separar os doentes em dois grupos: 1) reatores; 2) não reatores. As provas realizadas revelaram integridade funcional da reatividade dos linfócitos T e T-ativos em todos os pacientes, apesar da linfopenia absoluta e relativa que apresentaram. Os índices de migração dos leucócitos em presença de 100 μ g do antígeno de *Leishmania*, foram significativamente inferiores nos pacientes reatores ao antígeno de Montenegro, em comparação aos dos não reatores e dos indivíduos normais. Com exceção dos testes com o PPD (2 U), os testes com antígenos micóticos, inclusive com fitohemaglutinina e DNCB, todos se revelaram semelhantes aos obtidos em indivíduos normais.

UNITERMOS: Leishmaniose. Imunidade celular. Testes intradérmicos.

* Tese apresentada ao Colegiado de Curso de Mestrado em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, realizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG e no Departamento de Imunologia e Patologia Geral do IPT-UFG.
Orientador: Atualpa P. Reis

ABREVIATURAS

- DNCB = 1 cloro, 2-4 dinitrobenzeno
 E = hemácias de carneiro
 EAC = hemácias de carneiro adicionadas de anticorpos de coelho anti-hemácias de carneiro e complemento humano
 HBSS = solução balanceada de Hanks
 LB = linfócitos timo-independentes
 LT = linfócitos timo-dependentes
 LT-a = linfócitos T-ativos
 PHA-P = fitohemaglutinina purificada
 PBS = solução fisiológica balanceada

1. INTRODUÇÃO

As leishmanias são flagelados digenéticos, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema histiocitário do hospedeiro vertebrado, sob a forma amastigota. No hospedeiro intermediário, inseto vetor (mosquito dos gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia* e *Psychodopygus*), o parasita vive na luz do intestino, onde se multiplica sob a forma promastigota.

De acordo com a distribuição geográfica e as características epidemiológicas, as leishmanias foram classificadas por LAINSON & SHAW (1972) (LUMSDEN, 1977), em quatro complexos diferentes.

Complexo *Leishmania donovani*, incluindo a *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* encontradas respectivamente, na Ásia, África, no Mediterrâneo e *L. chagasi* nas Américas Central e do Sul. São as leishmanias da leishmaniose visceral ou calazar.

Complexo *Leishmania tropica*, englobando a *Leishmania tropica minor*; *Leishmania tropica major* e *Leishmania aethiopic*, encontradas as duas primeiras na Ásia e a última na África Oriental. São as leishmanias do botão do Oriente ou leishmaniose cutânea humana.

Complexo *Leishmania mexicana*, constituído pela *Leishmania mexicana mexicana* e *Leishmania mexicana amazonensis*, encontradas nas Américas Central e do Sul, causando a leishmaniose cutânea.

Complexo *Leishmania brasiliensis*, compreendendo as espécies: *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, *Leishmania brasiliensis guyaniensis*, *Leishmania brasiliensis panamensis* e *Leishmania brasiliensis peruviana*. Encontradas na América do Sul e Central, são responsáveis pela forma cutâneo-mucosa ou leishmaniose tegumentar americana que aparece mais frequentemente no Brasil, Argentina e Paraguai.

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar foi descrita, já no período pré-hispânico, pelos Incas do Peru, embora a presença do parasita nas lesões só tenha sido descrita em 1909 (LINDENBERG E CARINI & PARANHOS). Em 1911, GASPAR VIANA deu a estes parasitos o nome de *Leishmania brasiliensis*.

Já no início do século, a presença de leishmaniose cutâneo-mucosa foi constatada em todos os estados brasileiros, onde havia penetração do homem nas matas, constituindo grave problema de Saúde Pública.

Atualmente, a leishmaniose no Brasil é causada por três espécies diferentes de *Leishmania*. A *L. mexicana amazonensis* está amplamente distribuída, principalmente na região norte e sul entre os hospedeiros selvagens. Entretanto, raramente infecta o homem porque seu hospedeiro vetor não é uma espécie antropofílica. Na região vizinha das Guianas há predominância de *L. brasiliensis guyanensis*, que causa infecção cutânea sem comprometimento das mucosas nasofaringeanas, denominada "pian bois". Casos raros de leishmaniose cutâneo-mucosa aparecem nesta região devido à presença concomitante da *L. brasiliensis brasiliensis*. Esta superposição de doenças vai aumentando à medida que se dirige para o sul, em direção ao Pará e ao Amazonas, até que o "pian bois" seja completamente substituído pela leishmaniose mucocutânea, doença infecciosa, caracterizada por lesões cutâneas limitadas, com freqüentes ocorrências de lesões mucosas na região nasofaringeana, causada pela *Leishmania brasiliensis brasiliensis* LAINSON & SHAW, 1974).

Em Minas Gerais, na Zona da Mata, ao Sul do Rio Doce, região endêmica, foram registrados, no período de 1965 a 1975, 1.584 casos de leishmaniose tegumentar (PESSOA, 1977).

Em Goiás, BARBOSA e col. (1965) apresentaram 107 casos autóctones, com maior prevalência na região Sudoeste e Norte, com focos às margens do Rio Araguaia e Tocantins. O Serviço de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da UFGO, no período de 1965 a 1967, registrou 215 casos com identificação de três surtos da doença.

A transmissão da leishmaniose tegumentar americana, zoonose própria dos roedores silvestres ou peridomésticos ao homem, ocorre quando indivíduos sensíveis invadem áreas florestais, introduzindo-se no ciclo zoonótico entre estes animais e os mosquitos. A persistência da infecção dos hospedeiros vertebrados normais, constitui o reservatório responsável pela ocorrência de epidemias.

A doença assume papel importante, considerando que atinge, principalmente, trabalhadores rurais, adultos do sexo masculino, prejudicando, assim, a fase mais produtiva do indivíduo e causando mutilações e defeitos graves,

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

muitas vezes permanentes. Não é enfermidade letal mas contribui para o aumento da mortalidade geral, como causa predisponente a outras doenças.

A leishmaniose pertence a um grupo de doenças crônicas, nas quais as reações mediadas por células são predominantes. Considera-se que as características da leishmaniose cutânea seguem padrões semelhantes a outras doenças crônicas granulomatosas, como lepra e micoses profundas.

De acordo com os aspectos clínicos e imunopatológicos, CONVIT & PINARDI (1974), propõem a seguinte classificação:

- a. pólo maligno;
- b. pólo benigno;
- c. forma intermediária.

Pólo maligno, representado pela leishmaniose cutânea difusa, na qual há invasão completa da pele, mucosa da naso-faringe e linfonodos. As lesões apresentam grande número de parasitos e não regridem com o tratamento. O teste de Montenegro é negativo. Ao estudo histopatológico, o granuloma mostra-se formado exclusivamente por macrófagos cheios de parasitos e ausência total de linfócitos.

Pólo benigno, correspondente à forma localizada da doença. As lesões apresentam poucos parasitos, melhoram com o tratamento e a reação de Montenegro é positiva. O granuloma apresenta-se epiteloide ou tuberculoide envolvido por raros linfócitos.

Forma intermediária: Nesta forma as lesões cutâneas e muco-cutâneas são localizadas, podendo apresentar metástases. O teste de Montenegro é geralmente positivo e o número de parasitos na lesão é bastante variado. O granuloma é formado principalmente por macrófagos e alguns linfócitos. Em geral a resposta ao tratamento é mais lenta.

A resposta imune do hospedeiro condiciona a forma da doença. Assim, na leishmaniose cutânea difusa, uma falha nos mecanismos de defesa do hospedeiro é responsável pelo crescimento exagerado dos parasitos. Na forma localizada da doença, os mecanismos de defesa do hospedeiro são capazes de destruir completamente os parasitos e, na forma intermediária, o parasito consegue sobreviver por muitos anos, para então vencer as barreiras de defesa e formar lesões metastáticas cutâneas ou cutâneo-mucosas.

CONVIT & PINARD (1974), estudando os mecanismos da hipersensibilidade retardada, tanto "in vivo" como "in vitro", mostram uma clara diferença de comportamento entre as três formas da doença. Nas formas do pólo maligno, tan-

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

to o teste de Montenegro como a transformação blástica são negativos, enquanto nas do pólo benigno e forma intermediária, os dois testes são positivos.

Estudando a intensidade da resposta da hipersensibilidade tardia nas leishmanioses, PRESTON & DUMONDE (1975) descreveram as formas alérgicas e anérgicas da doença. A forma alérgica é caracterizada por hipersensibilidade exagerada e imunidade protetora nula. Na forma anérgica há ausência de hipersensibilidade retardada.

Os diversos aspectos imunológicos da leishmaniose tegumentar americana, embora objeto de estudo de várias investigações (GARNHAM & HAMPHREY, 1969; TURK & BRYCESSON, 1971; SOULSBY, 1972; BRYCESON, 1974; COHEN, 1974; MAUEL & BEHIN, 1974; ZUCHERMAN, 1975; PRESTON & DUMONDE, 1975), não estão ainda bem elucidados.

O envolvimento da imunidade humoral na leishmaniose é demonstrado pela presença de anticorpos circulantes no soro. Técnicas de imunofluorescência (BRAY & LAISON, 1965; BITTENCOURT, SODRÉ & ANDRADE, 1968; PRESTON & DUMONDE, 1972; BRYCESON, BRAY & DUMONDE, 1974; CHIARI, MAGALHÃES & MAYRINK, 1973) e por imunodifusão (BRAY & LAINSON, 1966; FARAH & MALAK, 1972) e de hemaglutinação indireta (BRAY & LAINSON, 1967; ANTUNES, REIS, TAVARES & PELLEGRINO, 1972), têm revelado títulos variáveis destes anticorpos, tanto em doentes, como em animais de experimentação.

Segundo TURK & BRYCESON (1971) e PRESTON & DUMONDE (1975), o aparecimento de anticorpos na circulação coincide com o desenvolvimento da lesão e é diretamente proporcional à dose infectante. As classes de imunoglobulinas encontradas, são, principalmente das classes de IgG, IgM e IgA.

O papel dos anticorpos na defesa do organismo contra infecção leishmaniótica está pouco esclarecido. MAUEL & BEHIN (1974), sugerem a hipótese de uma possível ação cooperativa entre anticorpos e macrófagos ativados, na destruição dos parasitos intracelulares e ressaltam a importância do fenômeno de "capping". Os parasitos, sob determinadas condições, formariam o "capping", com "seqüestro" dos anticorpos ligados à sua superfície. Sem os anticorpos na superfície, os parasitos estariam a salvo da ação dos macrófagos ativados.

FARAH, SAMRA & NUWAYRI-SALTI (1975), sugerem que os anticorpos específicos para leishmania, citofílicos para macrófagos, imobilizam os parasitos na superfície destes, impedindo o parasitismo. As leishmanias ficariam, deste modo, expostas à ação dos linfócitos sensibilizados e dos anticorpos.

A participação dos mecanismos de imunidade celular na leishmaniose foi primeiro observado por MONTENEGRO (1926), que, usando extrato alcalino de Leishmania, demonstrou a presença de hipersensibilidade retardada em reações intradérmicas.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

A associação da presença de reações de hipersensibilidade tardia e recuperação de hospedeiros infectados com várias espécies de *Leishmania*, sugere o envolvimento dos mecanismos de imunidade celular na cura e resistência do hospedeiro à leishmaniose (DUMONDE, 1973).

Usando como modelo cobaias infectadas com *L. enriettii* e/ou camundongos com *L. tropica* (SHAW & VOLLER, 1968; BRYCESON, BRAY, WOLSTENCROFT & DUMONDE, 1970; BIEWETT, KADIVAR & SOULSBY, 1971; PRESTON, CARTER, LEUCHARS, DAVIES & DUMONDE, 1972; BRYCESON, PRESTON, BRAY & DUMONDE, 1972; BEHIN, MAUEL, BIROUM-NOERJASIN & ROWE, 1975; MAUEL, BEHIN, 1974; BEHIN, MAUEL & ROWE, 1977; BRYCESON, BRAY & DUMONDE, 1974; PRESTON & DUMONDE, 1975-a; TSEGA, 1973), demonstram a importância das células derivadas do timo no desenvolvimento da resistência à infecção, caracterizada pela diminuição da extensão ulcerada e da parasitemia celular. Os linfócitos T sensibilizados podem agredir e matar macrófagos parasitados, expondo o parasito à ação dos anticorpos ou à ação dos próprios linfócitos. Com a liberação de linfocinas, os linfócitos contribuem, ainda, para o recrutamento de células inflamatórias e aumento da capacidade microbicida dos macrófagos (GODAL, REES & LAMVIK, 1971).

BLEWETT, KADIVAR & SOULSBY (1971), tendo como modelo cobaias infectadas por *L. enriettii*, evidenciaram a participação da imunidade celular por testes positivos de transformação blástica dos linfócitos do sangue periférico, inibição da migração dos macrófagos e reações cutâneas.

Durante a infecção leishmaniótica ativa, há uma fase de depressão da hipersensibilidade retardada, que é recuperada durante o processo de cura. A resistência à infecção nem sempre ocorre em paralelo com a extensão da hipersensibilidade retardada e há evidências de que a sobrevida de leishmanias, em indivíduos parcialmente imunes, pode resultar da dissociação das diferentes formas de expressão da imunidade mediada por células, segundo BRYCESON (1972).

Em pacientes com infecção cutânea localizada (TREMONTI & WALTON, 1970) e em leishmaniose cutânea curada (BRAY, 1973), também encontraram transformação blástica positiva e considerável inibição da migração dos leucócitos.

A patologia da doença é causada pela hipersensibilidade retardada, como nas formas de leishmaniose cutânea ou por falha na imunidade celular, que permite o crescimento livre dos parasitos, como na leishmaniose cutânea difusa.

Visando maiores esclarecimentos nos mecanismos imunológicos, que contribuirão significativamente para um melhor conhecimento da doença em ge-

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

ral e tendo em vista a alta prevalência da leishmaniose tegumentar americana no Brasil, decidimos realizar este trabalho de avaliação da resposta imune celular da leishmaniose tegumentar americana em casos humanos, através da:

1. Avaliação da resposta imune celular:

- a. Pela determinação qualitativa e quantitativa dos linfócitos T, T-ativos e B do sangue circulante;
- b. pelos testes de inibição da migração de leucócitos frente a antígeno solúvel de *Leishmania*;
- c. pelos testes intradérmicos com antígeno de Montenegro, antígenos bacterianos (PPD), micóticos (oidiomicina, tricoftina) e com PHA-P;
- d. pelas provas de sensibilização com DNCB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e controles

Selecionamos trinta pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana comprovada clínica e laboratorialmente. Todos os doentes achavam-se internados no Serviço de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da UFG. Em todos os pacientes, o parasito foi demonstrado no material das lesões pelo exame direto ou cultural.

Os pacientes provinham:

60% da zona rural de Goiás; 20% de Minas Gerais; e 20% dos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Mato Grosso.

Suas idades variavam de 21 a 70 anos, sendo 29 pacientes do sexo masculino e um do sexo feminino. (Figura 1).

Os doentes foram estudados logo após a internação, antes de iniciar qualquer tratamento.

Como controle foram usados trinta indivíduos normais, estudantes e funcionários do Instituto de Patologia Tropical da UFG, na faixa etária de 20 a 50 anos.

2.1. - Determinação qualitativa e quantitativa dos linfócitos do sangue circulante.

Material

Solução de bicarbonato de sódio a 5,6%

Bicarbonato de sódio p.a.	11,2 g
Água deionizada q.s.p.	200ml

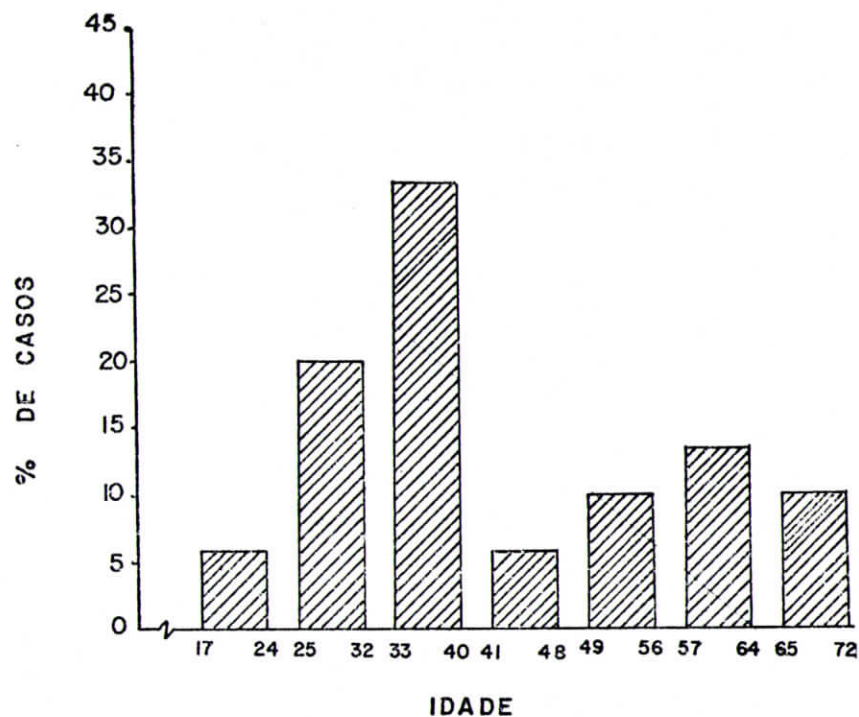


FIGURA 1 - Distribuição dos casos de leishmaniose tegumentar americana segundo o grupo etário e objeto de nossas pesquisas

Preparação

Dissolver completamente o bicarbonato em água por agitação constante ou em agitador magnético. Distribuir em tubos com tampa de rosca. Esterilizar a 120°C por 15 minutos e estocar a 4°C.

Solução de antibióticos

Penicilina potássica, cristalina 2 milhões de U
Sulfato de estreptomicina 2 g
Hanks estéril 200ml

Solução de Hanks

TC Hanks solution (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) . 99g
Água deionizada 1000ml

Preparação

Hanks 1 X 100 ml
Sol. de antibióticos 1 ml
Sol. de bicarbonato a 5,6% 0,6 ml
Ajustar o pH entre 7.2 e 7.4

Solução conservadora de Alsever (pH 6.1)

Glicose anidro p.a. 24,6 g
Citrato trissódico p.a. 96 g
Cloreto sódico p.a. 5,4 g
Água destilada deionizada 1200 ml

Autoclavar a 120°C por vinte minutos ou em vapor fluente, por três vezes durante trinta minutos.

- Solução salina a 0,85% de NaCl, na concentração de 0,15M.
- Solução de Azul de Tripán (Matheson, Colman e Bell, Norwood, Ohio, USA).
- Solução estoque do corante (1:100 em água destilada, diluir no momento de usar a 1:400 em HBSS).
- Heparina (Liquemine, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S/A, Rio de Janeiro).
- Filtro Millipore GSWP (0,22 micra e 0,45 u) (Millipore Co., Bedford, Mass., USA).
- Solução de Ficoll/Hypaque (segundo THORBSY & BRATLIE, 1970, mod.).

Preparação

a. Preparar solução de Ficoll (P M 400.000 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) a 9% em água deionizada. Deixar a solução por algumas horas a 4°C para facilitar a dissolução.

b. Misturar 10 partes de Hypaque a 75% (Wintrob Products Inc., N.Y., USA), com 12,36 partes de água deionizada, obtendo-se uma solução final a 33,9%.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

c. Misturar 10 partes da solução de Hypaque (33,9%) com 24 partes de solução de Ficoll, a 9%. A densidade da mistura deverá ficar entre 1.076 e 1.078. Quando necessário, corrigir com água deionizada. Esterilizar por filtração ou autoclavar a 120°C por vinte minutos. Conservar a 4°C.

– Hemolisina (soro de coelho anti-hemácias de carneiro). Usar diluída a 1/1.500 (Instituto Vital Brasil, Rio de Janeiro).

– Complemento humano (soro humano de doador do grupo AB), fator Rh positivo.

Métodos

Separação dos linfócitos do sangue (adaptada de THORSBY & BRATLIE, 1970)

a. Colher 10 ml de sangue periférico com heparina (10 U/ml), centrifugar por 200g durante 10 minutos.

b. Retirar 2 ml da interface (plasma e sangue) e adicionar igual volume de solução fisiológica a 0,85% homogeneizar bem.

c. Colocar lentamente a mistura sobre 3 ml da solução de Ficoll-Hypaque e centrifugar 400g, por 30 a 40 minutos, em temperatura ambiente.

d. Aspirar, com pipeta de Pasteur, o anel formado na interface, que contém as células mononucleares.

e. Lavar as células três vezes com solução de Hanks, centrifugando 200 g, durante 10 minutos.

f. Testar a viabilidade celular com solução de Azul de Tripán a 1% e contar no hemocitômetro.

Determinação dos linfócitos T formadores de rosáceas com hemácias de carneiro na forma E.

(Adaptada de LAY, MENDES, BIANCO, NUSSENZWEIG, 1971).

Preparação de hemácias a 0,5% (E)

Colher as hemácias de carneiro em solução de Alsever e guardar a 4°C. Antes do uso, lavar três vezes em Hanks e ajustar a uma concentração de 0,5% em HANKS, com pH 7.2.

Técnica

a. Ajustar a suspensão de linfócitos do sangue, separados pela técnica de Ficoll-Hypaque, para uma concentração de 2×10^6 células/ml, em Hanks.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

b. Misturar em tubo de hemólise, 0,3 ml da suspensão de linfócitos, com 0,3ml da suspensão de hemácias de carneiro, a 0,5% (E).

c. Centrifugar os tubos a 200 g, à temperatura ambiente, durante cinco minutos.

d. Incubar em banho gelo, a 4°C, por 60 minutos.

e. Ressuspender as células delicadamente e contar no hemocitômetro os linfócitos formadores de rosáceas (E). Considerar como rosáceas aqueles linfócitos com três ou mais hemácias aderidas.

f. Contar, no mínimo, duzentas células.

Determinação dos linfócitos T-ativos

(Adaptada de WYBRAN & FUNDENBERG, 1973)

a. Ajustar a suspensão de linfócitos separados pela técnica de Ficoll-Hypaque, para uma concentração de 1×10^7 células/ml, em solução de Hanks.

b. Colocar em tubo de hemólise siliconizado, 0,3 ml da suspensão de linfócitos. Incubar a 37°C em banho-maria, durante 15 minutos.

c. Adicionar 0,3 ml de eritrócitos de carneiro a 0,5% em solução de Hanks. Centrifugar a 200 g, por cinco minutos.

d. Ressuspender as células suavemente e determinar a percentagem de linfócitos formadores de rosáceas no hemocitômetro. Contar, no mínimo, duzentas células. Considerar como rosáceas aqueles linfócitos com três ou mais hemácias aderidas.

Determinação dos linfócitos B formadores de rosáceas com hemácias de carneiro na forma EAC

(Adaptada de LAY & NUSSENZWEIG, 1968).

Preparação do EAC

a. Tomar volumes iguais da suspensão de eritrócitos de carneiro, lavados a 5% e hemolisina diluída (dose subaglutinante).

b. Incubar a 37°C em banho-maria, durante 30 minutos. Centrifugar, lavar uma vez e ressuspender em 2ml de solução de Hanks.

c. Adicionar 2 ml de complemento humano diluído 1/80 (dose sublítica). Incubar a 37°C em banho-maria por minutos.

d. Centrifugar e lavar as hemácias. Diluir a suspensão a 0,5% em solução de Hanks (EAC).

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

Técnica

- a. Ajustar a suspensão de linfócitos separada pela técnica do Ficoll-Hypaque para uma concentração de 2×10^6 células/ml, em solução de Hanks, pH 7.2,
- b. Misturar 0,3 ml da suspensão de linfócitos e 0,3 ml da suspensão de hemácias de carneiro a 0,5% em tubo de hemólise e centrifugar a 200g, por cinco minutos.
- c. Incubar em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos.
- d. Ressuspender a percentagem de linfócitos formadores de rosáceas EAC. Considerar como rosáceas aqueles linfócitos com três ou mais hemácias aderidas. Contar, no mínimo, 200 células.

Todos os testes acima descritos, foram incubados em duplicata, considerando como resultado a média das contagens.

2.2. - Teste de inibição da migração dos leucócitos (Adaptado de ROSEMBERG & DAVID, 1970).

Material

- Ultracentrífuga Beckman, Mod. L3 50
- Ultra-som Bronson-Sonifier Cell Disruptor Heat Systems Ultrasonics - Plainviex, N.Y..
- Centrífuga.
- Negatoscópio estufa, Fanem.
- Microseringas - Hamilton Co., Whittier, California, USA.
- Silicone - Dow Corning Corporation, High Vacuum, Midland Michigan, USA.
- Tubos de cultura com tampa de baquelite, atarrachável, siliconizados.
- Tubos de polietileno - Ardonplast Ind. de Aparelhos Cirúrgicos Ltda., SP, PE 100.
- Câmara de acrílico tipo Mackaness.
- Seringas de plástico descartável de 50 ml e de 10 ml.

Soluções

- Solução fisiológica balanceada (PBS)

Fosfato ácido de sódio (sol. 6,9 g/l)	14 ml
Fosfato dissódico (sol. 17,9 g/l)	36 ml
Solução salina (17%)	50 ml
Água destilada.	900 ml

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

- Tampão Tris - NH_4Cl

Misturar uma parte de tampão tris pH 7.4, força iônica 0,15 M, com nove partes de NH_4Cl a 0,83% em água destilada deionizada.

- Meio de cultura

TC Medium 199 (Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA) . . . 11/g
 Água deionizada 1000 ml

- Preparação do meio

Meio 199 1 x 90ml
 Soro de cavalo descomplementado 10ml
 Ajustar o pH em 7.4, com solução de bicarbonato de sódio a 5,6%. Esterilizar em filtro Millipore 0,22 .

- Meio de cultura Barrachini modificado

- a. Colocar 750 ml de água destilada, 100 ml de coágulo de sangue bovino e 8 claras de ovos em um liquidificador e bater por 5 minutos.
- b. Autoclavar a 120°C por 40 minutos. Após a autoclavagem, filtrar em papel de filtro comum, refiltrar até se obter um filtrado transparente.
- c. Colocar 210g de Brain-Heart Infusion, 28,5g de Yeast Extract para o total de filtrado de 5700 ml.
- d. Ajustar o pH em 7.4 e distribuir em balões de 50 ml. Autoclavar a 120°C, durante 15 minutos.

- As amostras de *Leishmania* utilizadas para preparar o antígeno foram:

a. *Leishmanias* do complexo *brasiliensis*: Goiás, Alceu e Acácia, provenientes do Instituto Adolfo Lutz e mantidas no Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás, desde 1966.

6. *Leishmania* do complexo americano: Mato Grosso, isolada no Instituto de Patologia Tropical (BARBOSA e cols., 1976).

Estas amostras constam no catálogo de referência Walter Reed Army Institute of Research Washington D.C. com os seguintes números:

Goiás - 280
 Acácia - 277
 Alceu - 278
 M. Grosso - 281

Métodos

Obtenção do antígeno (Técnica de BRYCESON et alii, 1970, adaptada).

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

a. A massa celular foi obtida do crescimento das amostras de *Leishmania* em meio de Barrachini modificado.

b. Lavar várias vezes a massa de *Leishmania*, centrifugar a 2.000 g, por vinte minutos, em salina tamponada (PBS).

c. Ressuspender em igual volume de PBS. Levar ao ultrassom em banho de gelo. Sonicar alterando um minuto de tratamento, com três minutos de intervalo e observar ao microscópio, até a completa destruição das Leishmanias. Evitar a formação de bolhas.

d. Centrifugar a suspensão a 100.000 g, durante uma hora a 4°C. Retirar o sobrenadante e filtrar em Millipore de 0,45µ. Distribuir em pequenas alíquotas, em vidros tipo penicilina, fechar com rolhas de borracha estéreis e aro de metal. Conservar a -20°C, até o momento do uso.

e. A prova de esterilidade foi feita usando-se o meio de cultura de tioglicolato. O conteúdo protéico foi determinado pelo método de LOWRY et alii (1951). O antígeno foi padronizado fazendo-se os testes de inibição da migração de leucócitos, usando-se o antígeno em várias diluições: 200 µg, 150 µg, 100 µg e 50 µg, com células de indivíduos normais e pacientes com leishmaniose.

Prova de inibição da migração de leucócitos (Técnica de ROSEMBERG & DAVID, 1970, adaptada)

1. Colher 40 ml de sangue periférico, com 20 unidades de heparina por ml, com seringa de 50 ml descartável.

2. Sedimentar na própria seringa, inclinada a 45°C, durante uma a duas horas, a 37°C.

3. Transferir todo o plasma para um tubo de cultura com tampa, siliconizado e estéril, centrifugar a 250g, durante 20 minutos.

4. Desprezar o sobrenadante, lavar as células por duas vezes com Hanks gelado e estéril.

5. Fazer o teste de viabilidade com azul de tripan, em solução a 1% e ajustar a concentração de células para 70×10^6 por ml, com meio de cultura TC 199.

6. Encher os tubos capilares (100 mm x 1 mm) de polietileno quase totalmente.

7. Fechar a extremidade vazia do tubo em chama, com auxílio de uma pinça. Colocar os tubos capilares em tubos estéreis e centrifugar a 200g, por 10 minutos.

8. Cortar os capilares 1 mm abaixo da interface meio-células e colocar um em cada orifício da câmara, tipo Mackaness e fixá-los com graxa silicone.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

9. Encher as câmaras com meio de cultura e cobri-las com lâminulas fixadas com graxa silicone. Incubar as câmaras em placas de Petri, em câmara úmida, a 37°C, durante 18 a 24 horas.

10. Ler, colocando a câmara em microscópio projetor e desenhar as áreas de migração em papel homogêneo. Recortar os papéis, seguindo o contorno das áreas internas desenhadas e pesar em balança de precisão.

11. Calcular o índice de migração pela relação: peso do papel correspondente à área de migração na presença do antígeno / peso do papel correspondente à área de migração, na ausência do antígeno. O resultado multiplicar por 100 para transformar o índice de migração em porcentagem.

12. Para cada amostra, usar:

Três câmaras com células, meio de cultura e antígeno na concentração de 100 µg/ml.

Três câmaras com células e meio de cultura.

2.3. - Testes intradérmicos de leitura retardada com diferentes antígenos.

Material

- Antígeno de Montenegro, preparado segundo a técnica de PESSOA (1977), cedido pelo Serviço de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da UFGO.

- PPD (Derivado protéico purificado RT 23), 2 U I em 0,1 ml.

- Tricofitina (Instituto Pasteur, Paris, França), diluída a 1:100.

- Oidiomicina (Instituto Pasteur, Paris, França), diluída a 1:30, para uso intradérmico.

- Fito hemaglutinina purificada (PHA-P) (Wellcome Reagents Ltd., England), diluída a 2 µg/ml, em solução de Hanks, pH 7.2.

Preparação do antígeno de Montenegro (Técnica de PESSOA & MARTINS, 1974)

1. Emulsionar em solução de NaCl a 12% culturas com 12 a 15 dias, de *Leishmania*, em meio NNN.

2. Centrifugar, ressuspender o sedimento em solução de NaCl a 12%. Repetir esta operação 3 a 4 vezes.

3. Diluir o sedimento com solução de NaCl a 8,15% e agitar com pérolas de vidro.

4. Calcular o número de leptomas da suspensão contando em hemocitômetro.

5. Padronizar a suspensão na concentração de 5 milhões de leptomonas por ml. Conservar na estufa a 56°C, durante 3 a 4 dias. Agitar 3 a 4 dias. Agitar 2 a 3 vezes por dia.

6. Juntar à suspensão ácido fênico puro, na proporção de 0,4%, ou mercuriolo na proporção de 1:10.000. Distribuir o antígeno em vidros tipo penicilina.

7. Testar a viabilidade das leptomonas e a pureza do antígeno, aquecendo em banho-maria a 60°C, durante 30 minutos, três vezes consecutivas. Semear em meio NNN e meios bacteriológicos.

Métodos

1. Injetar 0,1 ml de cada antígeno, por via intradérmica, na face anterior do antebraço, com agulha 10x 5 montada em seringa de 1ml.

2. Proceder a leitura 48 horas após anotar, em milímetros, os diâmetros da área de induração. Considerar positivas as reações com diâmetro superior a 5 mm.

Para o teste da PHA-P, proceder à leitura ao fim de 24 horas.

2.4. Teste de sensibilização com o DNCB (Adaptado de CATALONA, TAYLOR, RABSON & CHRETIEN 1972)

Material

- DNCB (1 - chloro 2,4- dinitrobenzeno) (Matheson, Colemand and Bell, Inc., Ohio, USA), diluído em acetona a 2% e 0,1%.

Método

- Preparar solução de DNCB, com 200 µg a 100 µg em 0,1 ml de acetona. Conservar em frasco âmbar a -20°C ao abrigo da luz. Aplicar a dose sensibilizante (solução a 2%) e deixar em contato por 48 horas. Após 21 dias, aplicar o teste com solução 0,1% nas seguintes concentrações: 200 µg, 100 µg, 50 µg e 25 µg em área não utilizada para sensibilização. Deixar em contato por 48 horas.

- Ler e classificar as reações de acordo com o seguinte critério.

- Eritema e induração e/ou bolhas ou vesículas em toda a área de aplicação: (4+).

- Eritema e induração e/ou bolhas ou vesículas em 3/4 da área de aplicação: (3+).

- Eritema e induração com bolhas e vesículas em 2/4 da área de aplicação: (2+).

- Eritema e induração com bolhas e vesículas em 1/4 da área de aplicação: (1+).

- Ausência total de reação: negativo.

2.5 - Análise estatística

Na análise estatística dos resultados obtidos na determinação dos valores absolutos e no percentual dos linfócitos T, T-ativos e B e nas provas de inibição da migração de leucócitos, foi aplicado o teste "t" de Student, (com limite de confiabilidade em 95%) entre os grupos estudados.

Os resultados dos testes cutâneos foram analisados pelo teste exato de Fisher.

RESULTADOS

Da avaliação da imunidade celular dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

3.1. - Determinação quantitativa e qualitativa dos linfócitos T, T-ativos e B.

Linfócitos T

A determinação do número relativo de linfócitos T revelou as seguintes percentagens: 35,9% ± 13,4 no grupo total de doentes; 37,5 ± 14,5 no grupo de doentes reatores ao antígeno de Montenegro; 28,0 ± 10,2 no grupo de não reatores ao antígeno de Montenegro e 49,0 ± 11,0 para os indivíduos controle (pelo teste "T" evidencia-se uma diferença significativa P < 0,05) (Tabelas I e II).

O número absoluto de linfócito T alcançou as seguintes médias por mm³: grupo total, 582,8 ± 360,0; grupo reator ao antígeno de Montenegro, 638,2 ± 381,6; grupo não reator, 383,9 ± 179; para o grupo controle, 947,4 ± 309. Os pacientes mostraram números absolutos inferiores aos dos indivíduos normais ao nível de significância de p < 0,01 (Tabela I). Não houve diferença significativa entre pacientes reatores e não reatores, ao antígeno de Montenegro (Tabela III).

Linfócitos T-ativos

As percentagens obtidas dos linfócitos T-ativos foram iguais para o grupo total de doentes reatores e não reatores ao antígeno de Montenegro: 13,7 ± 7,7; 13,3 ± 8,7, 13,7 ± 2,5. Para os indivíduos normais, 30 ± 11,0. Comparadas as médias

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

percentuais dos pacientes com as do grupo controle, evidenciou-se uma diferença significativa $p < 0,05$ (Tabelas I e II).

TABELA I - Valores absolutos e relativos dos linfócitos T, T-ativos e B em pacientes com leishmaniose tegumentar americana e em indivíduos normais.

INDIVÍDUOS	Linfócitos T		Linfócitos T-ativos		Linfócitos B	
	Valores absolutos (mm ³)	Percentual	Valores absolutos (mm ³)	Percentual	Valores absolutos (mm ³)	Percentual
Com leishmaniose tegumentar (30)	582,8 ± 360	35,9 ± 13,4	233 ± 213	13,7 ± 7,7	384 ± 168	24,8 ± 8,5
Normais (30)	947,4 ± 309	49 ± 11,1	678,3 ± 291	30 ± 11,0	529 ± 188,5	27,1 ± 6,3
Probabilidade * P	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$

* Probabilidade segundo o teste "t" de Student

TABELA II - Percentagem de linfócitos T, T-ativos e B do sangue periférico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e de indivíduos normais.

Linfócitos	Indivíduos normais	Pacientes reatores ao antígeno de Montenegro	pacientes não reatores ao antígeno de Montenegro	Comparação entre grupos *		
				normais/ reatores	normais/ não reatores	reatores/ não reatores
"T"	49 ± 11,0	37,5 ± 14,5	28 ± 10,2	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
"T-a"	30 ± 11,0	13,3 ± 8,7	13,7 ± 2,5	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
"B"	27 ± 6,3	24,6 ± 7,2	26,3 ± 8,8	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

* Teste "t" de Student

A média dos valores absolutos dos linfócitos T-ativos foi a seguinte: para o grupo total dos pacientes, 233 ± 213; reatores ao antígeno de Montenegro, 232 ± 224; não reatores, 190,2 ± 91,9. Para o grupo controle, 678,3 ± 291. Comparados aos indivíduos normais, os doentes mostraram números significativos ($p < 0,01$) (Tabela I). Entre pacientes reatores ao antígeno de Montenegro e os não reatores, não houve diferença significativa (Tabela III).

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

TABELA III - Valores absolutos de linfócitos T, T-ativos e B de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e de indivíduos normais.

Linfócitos	Indivíduos normais	Pacientes reatores ao antígeno de Montenegro	Pacientes não reatores ao antígeno de Montenegro	Comparação entre grupos *		
				normais/ reatores	normais/ não reatores	reatores/ não reatores
"T"	947,4 ± 309 (n=30)	638,2 ± 381,6 (n=23)	389,9 ± 22,6 (n=7)	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$
"T-a"	678,3 ± 291 (n=30)	232 ± 224 (n=23)	190,2 ± 91,9 (n=7)	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$
"B"	529,3 ± 188,5 (n=30)	369 ± 135,4 (n=23)	340,8 ± 189,9 (n=7)	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$

* Teste "t" de Student

Linfócitos B

Na determinação dos linfócitos B, foram encontrados os seguintes valores: grupo total de pacientes, 24,8 ± 8,5; reatores ao antígeno de Montenegro, 24,6 ± 7,2; não reatores, 26,3 ± 8,8; grupo normal, 27,1 ± 6,3. Não houve diferença significativa entre os grupos (Tabelas I e II).

Foram os seguintes os números absolutos de linfócitos B: 384 - 168 para o grupo total; 369 ± 135,4 reatores ao antígeno de Montenegro; 340,8 ± 189,9 não reatores; 529,3 ± 188,5 para o grupo controle. Houve diferença significativa ao nível de $p < 0,01$ (Tabela I e III). Entre o grupo não reator ao antígeno Montenegro e o reator, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela III).

3.2 - Teste de inibição da migração dos leucócitos

O teste de inibição da migração dos leucócitos foi realizado em 21 dos 30 pacientes estudados. Os resultados da migração dos leucócitos do sangue periférico, realizados com antígeno protéico solúvel de leishmanias, estão representados na Figura 2. Das diversas concentrações usadas na padronização do antígeno, foi escolhida a de 100 µg, de proteína por ml do meio de cultura. Foram consideradas como inibidas as migrações com índices abaixo de 0,9%.

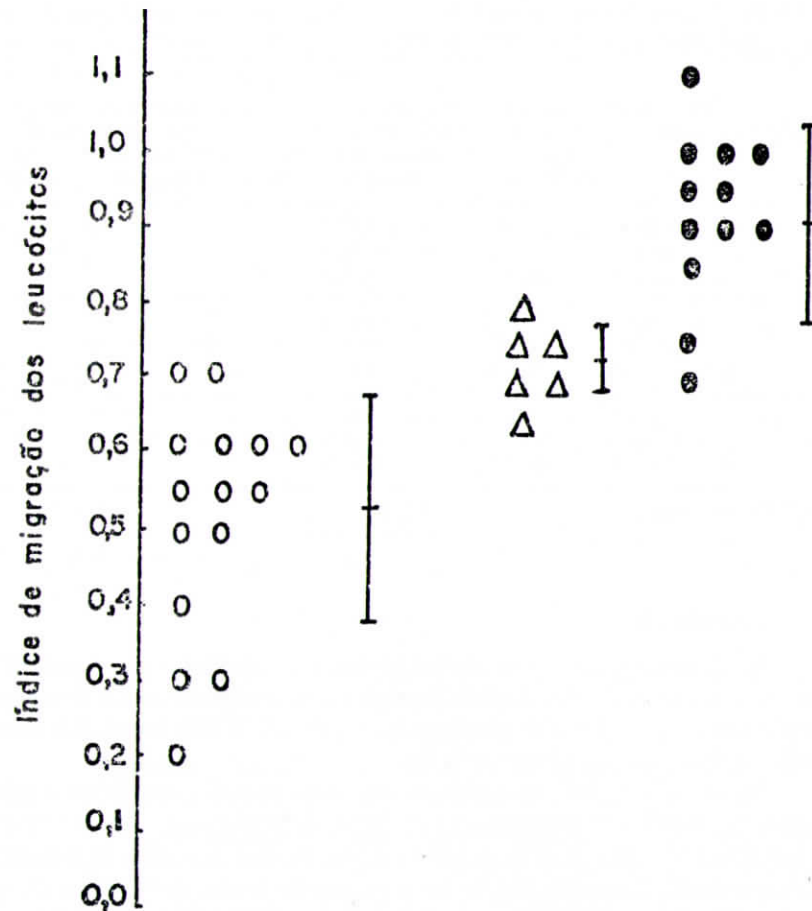


FIGURA 2 - Índice da migração dos leucócitos de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana e de indivíduos normais em presença de $100 \mu\text{g}$ de antígeno de *Leishmania*. O - Pacientes reatores ao teste de Montenegro; Δ - Pacientes não reatores ao teste de Montenegro; ● - Indivíduos normais.

Foram os seguintes os índices de migração: para o grupo de pacientes reatores ao Montenegro, $0,53 \pm 0,15$; grupo de doentes não reatores ao Montenegro, $0,73 \pm 0,04$ e indivíduos normais, $0,90 \pm 0,13$.

Comparando os índices de migração dos leucócitos obtidos nos pacientes e no grupo controle, notam-se diferenças significativas ($p < 0,01$). A diferença nos índices de migração entre os grupos reatores do antígeno de Montenegro e não reatores, alcançam também valor estatístico. (TABELA VI).

3.3 - Testes intradérmicos de leitura retardada com diferentes antígenos

Os resultados dos testes cutâneos realizados com os antígenos de Montenegro, PPD, tricofitina, oidiomicina, PHA P e teste de contato com DNCB, estão condensados na Tabela IV.

TABELA IV - Porcentagem de positividade nos testes de leitura retardada com antígeno de Montenegro, PPD, oidiomicina, tricofitina, PHA-P, DNCB, em pacientes com Leishmaniose tegumentar americana e em indivíduos normais.

Indivíduos	Antígeno de Mont.	PPD (2 U)	Oidiomicina (1:100)	Tricofitina (1:30)	PHA-P (2 g)	DNCB (2000 g)
Com leishmaniose tegumentar americana	76,6% (n=30)	41,3% (n=29)	21,7% (n=23)	50,0% (n=24)	78,2% (n=23)	69,5% (n=23)
Normais	16,6% (n=30)	73,3% (n=30)	23,3% (n=30)	56,6% (n=30)	86,6% (n=30)	88,9% (n=27)
Teste exato de Fisher	$P < 0,01$	$P < 0,02$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

PPD = Derivado protéico purificado
 PHA-P = Fitohemaglutinina pura
 DNCB = Dinitroclorobenzeno

A incidência de reações positivas ao antígeno específico de Montenegro, foi de 76% no grupo de pacientes e 16,5% no grupo controle.

Os testes cutâneos com PPD apresentam a seguinte percentagem: 41,3% nos pacientes e 73,3% nos indivíduos normais. A diferença nessa percentagem se mostra significativa ($PPP p < 0,02$). Com tricofitina e oidiomicina as porcentagens obtidas nos pacientes foram muito semelhantes às dos indivíduos normais, não apresentando diferença significativa - ($p > 0,05$) (Tabela IV).

Entre os dois grupos de pacientes, também não houve diferença significativa (Tabela V).

Os testes cutâneos com fitoemaglutinina revelaram 78,2% de reações positivas nos pacientes com leishmaniose tegumentar americana e 86,6% nos indivíduos normais. Não houve, portanto, a diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela IV).

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

TABELA V - Percentagem de positividade a testes de leitura retardada com: oidiomicina, tricofitina, PHA-P e DNCB em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, reatores e não reatores ao antígeno de Montenegro

INDIVÍDUOS	Montenegro	PPD	Oidiomicina (1:100)	Tricofitina (1:30)	PHA-P (2µg)	DNCB (2.000µg)
Reatores ao antígeno de Montenegro	100% (n=23)	45,4% (n=22)	25% (n=16)	70,5% (n=17)	94,7% (n=23)	70,5% (n=17)
Não reatores ao antígeno de Montenegro	0% (n=7)	28,5% (n=7)	15,3% (n=7)	0% (n=7)	0% (n=7)	50% (n=67)
Teste exato de Fisher	p ← 0,01	p → 0,04	p → 0,05	p ← 0,02	p ← 0,01	p → 0,05

PPD = Derivado protéico purificado

PHA-P = Fitohemaglutinina

DNCB = Dinitroclorobenzeno

A positividade à reação com PHA-P no grupo de pacientes com teste de Montenegro positivo foi de 94,7%, sendo nula no grupo não reator. Essa diferença foi altamente significativa ($p < 0,01$) (Tabela V).

Com o DNCB a incidência de reações positivas foi de 69,5%, sendo que para o grupo controle a literatura apresenta 88,9% seg. MUSSATTI, MENDES & MENDES (1971). A diferença nestas percentagens não foi significativa: ($p > 0,05$). Nos pacientes que não reagem ao antígeno de Montenegro, a percentagem de sensibilização foi de 50% (Tabela V).

TABELA VI - Percentagem da migração dos leucócitos de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana e de indivíduos normais em presença de antígeno solúvel de Leishmania.

Antígeno Solúvel de Leishmania	Indivíduos normais	Pacientes reatores ao antígeno de Montenegro	Pacientes não reatores ao antígeno de Montenegro	Comparação entre grupos *		
				normais/reatores	normais/não reatores	reatores/não reatores
100 µg/ml	90,5 ± 13,0	53,0 ± 15,2	73,0 ± 4,7	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01

* Teste "t" de Student

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

DISCUSSÃO

Tendo por base a resposta aos testes intradérmicos, com antígeno de Montenegro, nossos pacientes puderam ser divididos em dois grupos: 1) com reações positivas; 2) com reações negativas. Os pacientes do primeiro grupo eram portadores de lesões cutâneas ou cutâneo-mucosas; muitos deles com lesão única. Dentre eles, apenas um era portador de lesões cutâneas disseminadas, que, tratado desde o início da doença, evoluiu rapidamente para a cura. Os pacientes do segundo grupo também apresentavam lesões cutâneas e/ou cutâneo-mucosas, mas com evolução mais prolongada (2 a 10 anos). Dois deles acusaram lesões cutâneas disseminadas, na fase inicial da doença.

Determinação qualitativa e quantitativa dos linfócitos T, T-ativos e B

A determinação dos linfócitos T, T-ativos e linfócitos B, do sangue periférico dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana, quando comparada com a obtida em indivíduos normais, mostra uma diferença significativa para menos nos números absolutos dos linfócitos (Tabelas I e III). Esta mesma diferença foi também observada nos valores percentuais dos linfócitos T e T-ativos, mas não dos linfócitos B (Tabela I e II).

Apesar de a leishmaniose tegumentar americana ser tida como uma doença em que a imunidade celular esteja normal ou ativada, é interessante registrar essa baixa dos linfócitos T e T-ativos. Teriam esses linfócitos migrado para a área cutânea afetada? Estaria ocorrendo uma linfocitólise mediada por fenômenos primariamente tóxicos ou imunológicos? Até o momento não se pode responder a essas indagações.

A diminuição dos valores relativos dos linfócitos T já fora consignada em várias doenças acompanhadas de depressão de imunidade celular, como na lepra lepromatosa (MENDES, KOPERSZTYCH e MOTA, 1974), na Blastomicose Sul-americana (MUSATTI, REZKALLAH, MENDES e MENDES, 1976), no Pênfigo foliáceo Sul-americano (GUERRA, REIS e GUERRA) e no Lupus eritematoso sistêmico (MASSUDA, ROCHA FERREIRA, BERNHADSORTER, OLIVEIRA LIMA & SETTE CÂMARA, 1974) e estados imunodepressivos (WYBRAN & FUDENBERG, 1973). Chama a atenção o fato de não ter sido significativa a diferença entre as contagens de linfócitos circulantes dos doentes que apresentavam reação de hipersensibilidade retardada ao teste de Montenegro daqueles em que a reação fora negativa (Tabelas II e III).

Teste de inibição de migração dos leucócitos

Os fenômenos mediados por fatores solúveis podem ser estudados "in vitro" pela ação de antígenos específicos sobre linfócitos sensibilizados. Uma das linfocinas que resulta desta interação, é o fator inibidor da migração de leucócitos, que pode ser facilmente evidenciado pelos testes recomendados por SOBORG & BENDIXEN (1967), ROSENBERG & DAVID (1970).

A inibição da migração dos leucócitos, usando antígeno solúvel obtido de uma mistura de várias espécies de *Leishmania*, apresentou resultado estatisticamente significativo em relação à dos indivíduos normais (Tabela VI).

Em sete pacientes que não apresentaram reação cutânea ao antígeno de Montenegro, não houve redução específica da migração dos leucócitos, confirmando assim, a correlação entre os testes de inibição de migração dos leucócitos e hipersensibilidade cutânea retardada "in vivo".

Foi também demonstrado por ZELEDON (1977), usando as técnicas de THOR (1971) e ROCLIN & DAVID (1971), em quatro pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, estreita correlação entre a reação de Montenegro e a produção do fator inibidor da migração de macrófagos.

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com BRAY (1973 b), no estudo de diversas formas de leishmaniose humana, empregando vários testes para avaliação da imunidade mediada por células. Foi relatada inibição da migração de leucócitos nos casos de leishmaniose cutânea já curadas e pouca ou nenhuma inibição nos casos de leishmaniose cutânea em atividade.

Em trabalhos experimentais, BRYCESON, WOLSTENCROFT e DUMONDE (1970) e BLEWETT, KADIVAR, SOULSBY (1971), empregando antígenos solúveis de *L. enriettii*, conseguiu evidenciar a hipersensibilidade retardada através da transformação blástica dos linfócitos e da inibição da migração dos leucócitos, em cobaias infectadas por *L. enriettii*.

Testes intradérmicos de leitura retardada com diferentes antígenos

A reatividade cutânea a vários antígenos microbianos e micóticos, vem sendo largamente usada na avaliação da memória imunológica do indivíduo em inúmeras condições imunopatológicas. Os resultados negativos podem demonstrar uma deficiência imune ou significar apenas a ausência de sensibilização.

Os resultados dos testes intradérmicos com antígenos bacterianos e micóticos realizados em nossos pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, mostraram, de um modo geral, boa relação com a função imunitária avaliada pela inibição da migração dos leucócitos. A resposta individual dos pacientes aos vários testes de avaliação da hipersensibilidade retardada, apresentou-se bastante

heterogênea, variando desde pacientes totalmente anérgicos até doentes nos quais não se observou depressão da resposta imune celular "in vivo".

Os pacientes reatores ao teste intradérmico com antígeno específico, teste de Montenegro, sempre responderam a mais de duas provas cutâneas. Já entre os 7 pacientes Montenegro negativos, apenas um acusou reatividade a três antígenos e três deles responderam só ao DNCB.

A sensibilização ao DNCB avalia a capacidade do indivíduo de responder a estímulos novos, constituindo um método de grande eficiência para quantificação da resposta imunocelular. Aproximadamente 90% da população normal é capaz de se sensibilizar ao DNCB (CATALONA, TAYLOR, RABSON, CHRETIEN, 1972), quando exposta a teores em torno de 2.000 μ g. A incidência de sensibilização ao DNCB em nossos pacientes, não apresentou diferenças significativas quando comparadas à dos indivíduos normais. Nossos resultados, apresentando 69,5% de positividade ao DNCB, são semelhantes aos encontrados na lepra lepromatosa (68,9%) (MENDES, RAPHAEL, MOTA e MENDES, 1974) e diferentes dos valores encontrados na Blastomicose Sul-americana, 27,4% (MENDES & RAPHAEL, 1971).

As reações cutâneas com PHA-P, assemelham-se às reações clássicas de hipersensibilidade retardada, embora seja histologicamente diferente e de aparecimento mais rápido (24 horas).

O grupo de pacientes que apresentou reação de hipersensibilidade retardada ao antígeno de Montenegro e inibição da migração dos leucócitos, também reagiu positivamente aos testes cutâneos com 2 μ g de fitohemaglutina, dose capaz de produzir 100% de positividade na população normal (BONFORTE, TOPILSKY, SILTZBACH & GLADE, 1972). Os pacientes não reatores ao antígeno de Montenegro, também não reagiram à fitohemaglutinina, mas apresentaram inibição parcial da migração dos leucócitos. Não houve diferença significativa entre as percentagens de positividade à fitohemaglutinina dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana (78,2%) e a do grupo de controle (86,5%). (Tabela IV).

Chama atenção o fato de termos encontrado 7 pacientes (23,4%) com reações ao teste de Montenegro negativas (reações, ao fim de 48, horas com menos de 5 mm de diâmetro) entre 30 pacientes com forma ativa comprovada de leishmaniose tegumentar americana. Todavia, como se poderá notar em nossos resultados, esses pacientes anérgicos ao Montenegro não apresentaram quadro definido de imunodepressão evidenciável pelos testes intradérmicos com antígenos bacterianos e com DNCB.

Neste particular, esse grupo de pacientes se comporta como na lepra lepromatosa, onde pode ocorrer reação de Mitsuda negativa, ao lado de reações cutâneas positivas para outros antígenos bacterianos.

A observação do aspecto clínico dos pacientes com leishmaniose cutânea ou cutâneo-mucosa, apresentando lesões metastáticas, que aparecem muitas vezes após anos, leva-nos a indagar de que modo os parasitos persistem nos tecidos, apesar das reações de hipersensibilidade retardada, da inibição da migração dos leucócitos e da presença de linfócitos timo-dependentes no sangue circulante. Segundo FARAH, SAMRA, NUWAYKI-SALTI (1975), os parasitos ficariam indiferentes à resposta imune, protegidos pelo macrófago em seu "habitat" natural.

Evidências experimentais sugerem que a morte dos parasitos liberados por destruição do macrófago, em consequência de parasitismo muito intenso, ou por outra causa qualquer, possa ser mediada por linfócitos e macrófagos em cooperação com anticorpos através de dois mecanismos da imunidade protetora: 1) os macrófagos parasitados poderiam promover a imunogenicidade dos produtos da leishmania, sensibilizando os linfócitos que se tornariam cicotóxicos para os macrófagos. Mortos, estes liberariam os amastigotos, expondo-os à ação de anticorpos líticos ou aglutinantes; 2) os linfócitos sensibilizados poderiam também ativar os macrófagos pelo contacto ou por liberação de linfocinas e estes, uma vez ativados, matariam os parasitos intracelulares. Em ambos os mecanismos de morte dos parasitos, pela interação linfócitos macrófagos, a colaboração dos anticorpos é bem definida (PRESTON & DUMONDE, 1975). REES (1966), já havia sugerido que só o mecanismo mediado por células pode ser insuficiente para conter a disseminação da infecção, sendo necessária a cooperação dos anticorpos.

Os resultados obtidos dos pacientes portadores de lesões cutâneo-mucosas e lesões cutâneas disseminadas, correlacionam com estudos experimentais de BRYCESON, BRAY e DUMONDE (1974), quando demonstraram que aumentando a dose do inóculo, ocorria depressão da hipersensibilidade retardada com aparecimento de lesões metastáticas, sugerindo que alta carga antigênica induz a depressão da imunidade mediada por células. Também SOUZA (1978), demonstrou a presença de hipersensibilidade retardada em camundongos leishmanióticos com lesões reduzidas e localizadas e não naqueles com lesões bem desenvolvidas e metástases.

A análise dos resultados obtidos nos pacientes com leishmaniose tegumentar americana, acompanhada da presença da hipersensibilidade retardada aos testes cutâneos, sensibilização ao DNCB, a significativa inibição da migração de leucócitos, mesmo com expressiva diminuição dos números absolutos e percentuais de linfócitos T e T-ativos, sugere integridade da imunidade celular nesta leishmaniose.

CONCLUSÕES

1. No estudo da imunidade celular de 30 pacientes com leishmaniose tegumentar americana, foram encontrados 7 com reação ao antígeno de Montenegro.
2. Nos 23 pacientes reatores ao antígeno de Montenegro, todos apresentavam integridade da imunidade celular evidenciável pelas determinações dos linfócitos do sangue circulante, pela prova de inibição da migração dos leucócitos e pelos testes de sensibilidade cutânea a antígenos bacterianos, micóticos e ao DNCB.
3. Nos 7 pacientes não reatores ao antígeno de Montenegro, os resultados das provas de imunidade celular, embora aparentemente inferiores, não falam a favor de imunodepressão, estatisticamente significativa.
4. Os teores absolutos e relativos dos linfócitos T e T-ativos dos pacientes reatores e não reatores ao antígeno de Montenegro, mostram-se significativamente inferiores aos dos indivíduos normais. Já com os linfócitos B, somente os valores absolutos é que se mostraram também inferiores.
5. Os índices de migração dos leucócitos do sangue circulante em presença do antígeno de *Leishmania*, oscilaram entre 0,2 e 0,7 nos 16 pacientes reatores ao antígeno de Montenegro e entre 0,6 e 0,8 nos pacientes não reatores.
6. A diferença entre os índices de migração dos leucócitos dos pacientes reatores e não reatores ao antígeno de Montenegro, se mostrou significativa em nível de 5%.
7. Os testes intradérmicos com o antígeno de Montenegro, revelaram positivos em 76,5% dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana e em 16,5% dos indivíduos aparentemente normais.
8. A capacidade reacional dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana frente aos antígenos bacterianos e micóticos, se revelou semelhante à dos indivíduos normais. Apenas com o PPD de 2 Unidades é que ocorreu uma hiporeatividade significativa em nível de 2%. (Tabela IV).
9. Também a reatividade ao DNCB dos doentes com leishmaniose tegumentar americana se comportou semelhantemente à dos indivíduos normais.

SUMMARY

Cellular immunity in American Tegumentary Leishmaniasis

There have been studied 30 patients of both masculine and feminine sexes, of age between 17 and 72, whose clinical and laboratory diagnosis had revealed American tegumentary leishmaniasis as in order to consider cellular immunity.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

These patients, from the State of "Goiás, Minas Gerais, Bahia, Ceará, Maranhão" and "Mato Grosso", were during all the time of the research interns in the Department of Parasitological Diseases of the Institute of Tropical Pathology of the Federal University of Goiás.

To evaluate the cellular immunity there have been used the following tests:

- 1 - Qualitative and quantitative determination of the T, T-active and B lymphocytes of the circulating blood;
- 2 - Test of in vitro of the leukocytes in the presence of the Leishmania antigen;
- 3 - Intradermic tests with Montenegro antigen, bacterial antigen (PPD) fungal (trichophyton, candidin and with phytohemagglutinin);
- 4 - Test of sensibilization with DNCB.

The test with the Montenegro antigen made possible the separation of the patients in two groups: 1) reactors, 2) non-reactors. The tests carried out revealed functional integrity of the reactivity of the T and T-active lymphocytes in all patients despite the absolute and relative lymphopenia which they showed.

The indices of the leukocytes' migration in the presence of 100 μ g of the Leishmania antigen, were significantly inferior on the reactor type patients compared to those of the type non-reactor and to normal individuals as well. Excepted the tests with the PPD (2 UI), tests with the fungal antigen including phytohemagglutinin and DNCB all revealed results similar to those obtained with the normal individuals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; TAVARES, C. A. P.; PELEGRINO, J. Dosagem das imunoglobulinas e reação de hemaglutinação passiva em pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 14(3): 203-06, 1972.
- BARBOSA, W.; MOREIRA, M. C.; SOUZA, J. M.; RASSI, D. M.; GERAIS, B. B. & OLIVEIRA, R. L. Note on the classification of the *Leishmania sp* responsible for cutaneous leishmaniasis in the East central Region. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 70(4): pag. 389-99, 1976.
- BARBOSA, W.; SILVA, M. R. & BORGES, R. C. Informe preliminar sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana em Goiás. Rev. Goiana Med. 11: 1-9, 1965.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Pat. Trop. 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

- BEHIN, R.; MAUEL, J.; BIROUM-NOERJASIN & ROEW, D. S. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. II - selective destruction of different leishmania species in activated guinea-pig and mouse macrophages. Clin. Exp. Immunol. 20: 352-58, 1975.
- BEHIN, R.; MAUEL, J. & ROEW, D. D. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. III - Inhibition of leishmanial lesion in the guinea pig by delayed hypersensitivity reaction to unrelated antigens. Clin. Exp. Immunol. 29: 320-25, 1977.
- BITTENCOURT, A. L.; SODRÉ, A.; ANDRADE, Z. A. Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10: 247-52, 1968.
- BLEWETT, T. M.; KADIVAR, D. M.; SOULSBY, E. J. L. Cutaneous leishmaniasis in the guinea-pig. Delayed type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20(4): 546-49, 1971.
- BONFORTE, R. J.; TOPILSKY, M.; SILTZBACH, L. E.; GLADE, R. R. Phytohemagglutinin skin test: a possible in vivo measure of cell mediated immunity. J. Pediatr. 81: 775-80, 1972.
- BRAY, R. S. Immunodiagnosis of leishmaniasis. In: COHEN, S. & SADUN, E. H. Immunology of parasitic infection. Oxford, Blackwell Scientific, 1976. Cap. 6, p. 65-75.
- BRAY, R. S. Immunological facts in leishmaniasis. Ethip. Med. J. 11(2): 198, 1973.
- BRAY, R. S. Leishmaniasis epidemiology. Ethip. Med. J., 11(2): 197-98, 1973a.
- BRAY, R. S. In vitro correlates of delayed hypersensitivity in human leishmaniasis. In: Proc. Int. Cong. Parasitol. Section A 15 (21) 257, 1973b.
- BRAY, R. S. Leishmania. Annu. Rev. Microbiol., 28: 189-217, 1974.
- BRAY, R. S. & LAINSON, R. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 59: 535, 1965.
- BRAY, R. S. & LAINSON, R. The immunology and serology of Leishmaniasis. IV. Results of Ouchterlony Double Diffusion tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60(5): 6059, 1966.
- BRAY, R. S. & LAINSON, R. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V. The use of particles as vehicles in passive agglutination tests. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 61: 490, 1967.
- BRYCESON, A. D. The immune response to parasitic infection. Trop. Doct. 4(3): 99-103, 1974.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Pat. Trop.* 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

BRYCESON, A. D. M.; BRAY, R. S.; WOLSTENCROFT, R. S.; DUMOND, D. C. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 301-41, 1970.

BRYCESON, A. D. M.; BRAY, R. S.; DUMOND, D. C. Experimental cutaneous Leishmaniasis. IV. Selective suppression of cell-mediated immunity during the response of guinea-pig to infection with *L. enriettii*. *Clin. Exp. Immunol.* 16: 189-202, 1974.

BRYCESON, A. D. M.; PRESTON, P. M.; BRAY, R. S.; DUMONDE, D. C. Experimental cutaneous Leishmaniasis. II. Effects of immuno-suppression and antigenic competition on the course of infection with *L. enriettii* in the guinea pig. *Clin. Exp. Immunol.* 10: 305-35, 1972.

CARINI & PARANHOS, 1909. Apud: PESSOA, B. S. & MARTINS, V. A. Trypanosomatidae. In: *Parasitologia Médica*. 10a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. Cap. 7, p. 77-115.

CASTRO, R. M.; NANNI, M. E. N.; ERMETICCE, L. E. N.; TOYODA, K. The positivation of the Montenegro test during the treatment muco-cutaneous Leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 14(5): 338-39, 1972.

CATALONA, W.; TAYLOR, P. T.; RABSON, A. S.; CHRETIEN, P. B. A method for dinitrochlorobenzene contact sensitization. *N. Engl. J. Med.*, 286(8) 399-402, 1972.

CHIARI, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; MAYRINK, W. Pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência, em soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana apresentando lesões cutâneas recentes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 15(5): 304-09, 1973.

COHEN, S. The immune response to parasites. In: *Ciba Foundation Symposia*, 25, London 1973. Parasites in the immunized host mechanisms of survival. Amsterdam, Elsevier, 1974, p. 3-17.

CONVIT, J. & PINARDI, M. E. Cutaneous Leishmaniasis. In: *Ciba Foundation Symposia*, 20, London, 1974. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Amsterdam, Elsevier, 1974, p. 159-69.

CURTIS, J. E. & HERSEN, E. M. Cellular Immunity in man: correlation of leukocyte migration inhibition factor formation and delayed hypersensitivity. *Cell. Immunol.* 8: 55-61, 1973.

DUMONDE, D. C. WOLSTENCROFT, R. A.; PANAYI, G. S.; MATTHEW, W. MORLEY, J. & HOWSON, W. T. "Lymphonines". Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature (Lond)* 24, 38, 1969.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Pat. Trop.* 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

DUMONDE, D. C. Immunological Theory in leishmaniasis. *Ethiop. Med. J.* 11(2): 199, 1973.

FARAH, F. S.; LAZARY, S.; D. E. WECH, A. The effect of *Leishmania tropical* on stimulation of lymphocytes with phytohaemagglutinin. *Immunol.* 30: 629-34, 1976.

FARAH, F. A. & MALAK, J. A. Cutaneous leishmaniasis. *Arch. Dermatol.* 103: 300, 1972.

FARAH, F. S.; SAMRA, S. A.; NUNAYRI-SALTI. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunol.* 29(4): 755, 1975.

FAVA NETTO, C. & RAPHAELA, A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis* na blastomicose sul-americana. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 3: 161-65, 1951.

GARNHAM, P. C. C. & HUMPHREY, J. H. Problems in Leishmaniasis related to Immunology. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 48: 29-42, 1969.

GODAL, T.; REES, R. J. W.; LAMVIK, J. Lymphocyte mediated modification of blood derived macrophage function in vitro; inhibition and growth of intracellular mycobacteria with lymphokines. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 625, 1971.

GUERRA, H. A.; REIS, A. P.; GUERRA, M. V. N. T and B lymphocytes in South American *Pemphigus foliaceus*. *Clin. Exp. Immunol.* 23: 477-08, 1976.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *Br. Med. Bull.* 28: 44-8, 1972.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Las Leishmanias y la Leishmaniasis del Nuevo Mundo, com particular referencia al Brasil. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 93(2): 93-114, 1974.

LAY, W. H. & NUSSENZWEIG, V. Receptor for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.*, 128: 991-1009, 1968.

LAY, W. H.; MENDES, N. F.; BIANCO, C.; NUSSENZWEIG, V. Bindings of sheep lymphocytes. *Nature*, 230: 532, 1971.

LINDENBERG, 1909. Apud: PESSOA, B. S. & MARTINS, B. A. Trypanosomatidae. In: *Parasitologia Médica*. 10a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. Cap. 7. p. 77-115.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.

LUMDSEN, W. R. H. Leishmaniasis and Trypanosomiasis: the causative organisms compared. In: *Ciba Foundation Symposia*, 20, London, 1974. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. Amsterdam. Elsevier. 1974. p. 3-21.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Pat. Trop.* 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

- MAUEL, J. & BEHIN, R. Cell mediated and humoral immunity to protozoan infections. *Transplant. Rev.* 19: 121-46, 1974.
- MAUEL, J.; BEHIN, R.; BIROUM-NOERJASIN; ROWE, D. S. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous Leishmaniasis of the guinea-pig. I. Lack of effects of immune lymphocytes and of activated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 20: 339-50, 1975.
- MASSUDA, H. K.; FERREIRA, G. G. R.; BERNAHARDSGRUTER, B.; OLIVEIRA LIMA, A. O.; SETTE CÂMARA, D. C. T and B lymphocytes in Systemic Lupus Erythematosus. *Rev. Bras. de Pesq. Med. Biol.* 7(3): 279-81, 1974.
- MENDES, E. & RAPHAELA, A. Impaired delayed hypersensitivity in patients with south American blastomycosis. *J. Allergy* 47(1). 1722, 1971.
- MENDES, E.; RAPHAELA, A.; MOTTA, N. G. S.; MENDES, N. F. Cell-mediated immunity in leprosy and transfer of delayed hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 53: 223-29, 1974.
- MUSATTI, C. C.; REZKALLAH, M. T.; MENDES, E.; MENDES, N. F. "In vivo" and "in vitro" evaluation of cell-mediated immunity in patients with Paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 24: 365-78, 1976.
- NASPITZ, C. K. & RICHTER, M. The action of phytohaemagglutinin in vivo and in vitro, a review. *Prog. Allergy* 12: 1-85, 1968.
- PESSOA, S. B. & MARTINS, A. V. Trypanosomatidae - gênero *Leishmania*. in *Parasitologia Médica*. 10a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. Cap. 7. p. 77-115.
- PRESTON, P. M. Immunology in cutaneous Leishmaniasis. *Proc. R. Soc. Med.* 66: 776-77, 1973.
- PRESTON, P. M.; CARTER, R. L.; LEUCHARS, E.; DAVIES, A. J. S.; DUMONDE, D. C. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of thymectomy on the course of infection of C. B. A. mice with *L. tropica*. *Clin. Exp. Immunol.* 10: 307-57, 1972.
- PRESTON, P. M. & DUMONDE, D. C. Experimental cutaneous Leishmaniasis protective immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 22: 126-38, 1975 a.
- PRESTON, P. M. & DUMONDE, D. C. Immunology of clinical and experimental leishmaniasis. In: COHEN, S. & SADUN, E. H. *Immunologia of parasitic infection*. Oxford, Blackwell Scientific, 1975. Cap. 15 p. 167-202.
- REES, R. J. W. Enhanced susceptibility of thymectomized and irradiated mice to infection with *Mycobacterium leprae*. *Nature (Lond.)* 211: 657, 1966.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Pat. Trop.* 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

- ROSENBERG, S. A. & DAVID, J. R. Inhibition of leukocyte migrations: an evaluation of this "in vitro" assay of delayed hypersensitivity in man to a soluble antigen. *J. Immunol.* 105(6): 1447-51, 1970.
- ROCLIN, R. E. & DAVID, J. R. Method of the production of MIF by human blood lymphocytes. In: B. R. Bloom & P. R. Glade (eds) *In vitro methods in cell-mediated immunity*. New York, Academic Press, p. 281-7, 1971.
- SHAW, J. J. & LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X - Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 60(3): 323-35, 1975.
- SHAW, J. J. & OLIVEIRA, A. Observations on the susceptibility of white mice to infection with *Leishmania mexicana* following whole body X. irradiation. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 62: 174, 1968.
- SIEGEL, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw Hill Company, 1956, p. 106-80.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. *Statistical Methods*. 9th. ed. Iowa USA. Iowa State Univ. Press, 1967.
- SOBORG, M. & BENDIXEN, G. Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta Med. Scand.* 181: 247-56, 1967.
- SOULSBY, E. J. L. Cell-mediated immunity responses in parasitic infections. In: Ed. *Immunity to animal parasites*. New York, Academic Press, 1972. p. 58-65.
- SOUZA, M. C. M. Estudo da evolução da *Leishmania mexicana amazonensis* em camundongos albinos e dos efeitos da *Herpetomonas samuelpessoai* sobre o curso clínico, histopatológico e imunológico da infecção experimental. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da Univ. Fed. do Rio de Janeiro, p. 105, 1978, Tese de Doutorado.
- THOR, D. E. The capillary tube migration inhibition technique applied to human peripheral a lymphocytes using the guinea pig peritoneal escudate as the indicator cell population. In: B. R. Bloom S. P. R. Glade (eds) *In vitro methods in cell-mediated immunity* New York: Academic Press, p. 273-280, 1971.
- THROSBY, E. & BRATLIE, A. A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. In: TERASAKI, P. I. *Histocompatibility testing*. Copenhagen, Munksgaard, 1970, p. 655.
- TREMONTI, L. & WALTON, B. C. Blast transformation and migration inhibition in toxoplasmosis and leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 49-56, 1970.

GUERRA, M. V. N. Imunidade celular em Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Pat. Trop.* 20(2): 173-206, jul./dez. 1991.

- TSEGA, E. The effect with leishmania tropical mayor. *Ethiop. Med. J.* 11(2): 155-61, 1973.
- TURK, J. L. & BELEHV, A. Mechanisms of survival in the immunological spectra in infections diseases. In: Ciba Foundation Simposia, 25. London, 1973. Parasites in the immunized host mechanisms of survival. Amsterdam, Elsevier, 1974, p. 70-85.
- TURK, J. L. & BRYCESON, A. D. M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.* 13: 209-66, 1971.
- WYBRAN, J.; CARR, M. C.; FUDENBERG, H. H. The human rosetteforming cell as a marker of a population of thymus derived cells. *J. Clin. Invest.* 51: 2537-43, 1972.
- WYBRAN, J. & FUNDENBERG, H. H. Thumus-Derived Rosette-Forming cells in various Human Disease States: Cancer, Lymphoma, Bacterial and Viral Infections, and other Diseases. *J. Clin. Invest.* 52: 1026-32, 1973.
- ZELEDON, R.; PONCE, E.; PONCE, C. The Montenegro and MIF test in three crued and one chronic case of human leishmaniasis (Letter). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70(5/6): 536-7, 1977.
- ZUCKERMAN, A. Parasitological Review Current status of the Immunology of blood and Tissue Protozoa. I. Leishmania. *Exp. Parasitol.* 38: 370-400, 1975.