

JURANI BARBOSA

Avaliação da Imunidade Específica em Desnutridos e Efeito do Levamisole nos Linfócitos *In Vitro*

Dissertação a nível de Mestrado em
Pediatria apresentada à Universidade
Federal do Paraná.

— Departamento de Pediatria —

CURITIBA
Estado do Paraná
1981

AGRADECIMENTOS

O autor recebeu contribuições de várias pessoas e instituições para a realização deste trabalho e expressa seu agradecimento a todos e, principalmente:

ao Prof. Dr. Euripedes Ferreira

- ORIENTADOR -

ao Prof. Dr. Izrail Cat, Coordenador do Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria;

aos Profs. Dr. Dinarte José Giraldi, Dr. Noboro Miasaki e Dr. Raul Corrêa Ribeiro, pelos esclarecimentos e orientações prestados;

aos demais professores do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda e amparo proporcionados;

ao Dr. Luso Mário Silveira, Chefe do Laboratório Clínico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela receptividade;

à Direção e Corpo Clínico dos Hospitais César Pernet e Pequeno Príncipe, Pronto Socorro Infantil São Luiz e Hospital da Polícia Militar de Curitiba, pelas facilidades oferecidas na coleta do material;

ã Direção das Creches Escolinha Tia Paula, Educacional Mirian, São João Batista, Menino Jesus e Xaxim, igualmente, pelas facilidades oferecidas na colheita do material;

ao Laboratório Hyland, pela doação do *kit* utilizado na de terminação das imunoglobulinas séricas;

a Johnson & Johnson, pelo fornecimento do levamisole;

ao Dr. Antonio Franco, Dr.^a Shirley R. Rosa, Dr.^a Rosana I. S. Iorio, Dr.^a Maria Felicitas Niedfeld, Dr.^a Noemi F. Pereira, Dr.^a Lismara K. Bonfim, Dr.^a Elvira Doi e Sr.^a Maria Alice Kichel, pelo auxílio nas técnicas de laboratório;

ao Prof. Henrique Koehler, pela supervisão do trabalho es tatístico;

ao Dr. Ênio Rogacheski, pela revisão do texto;

ã Bibliotecária Suzana G. Castilho, suas auxiliares e de mais funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná;

ã Sr.^{ta} Suely Terezinha Kaminski, pelo trabalho datilogrã fico.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. IMUNIDADE CELULAR	3
2. IMUNIDADE HUMORAL	4
3. DESNUTRIÇÃO	5
3.1 Kwashiorkor	5
3.2 Marasmo	5
3.3 Kwashiorkor-marasmático	6
4. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE CELULAR	6
5. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE HUMORAL	8
6. LEVAMISOLE	8
6.1 Química, farmacologia e metabolismo	9
6.2 Modo de ação	9
6.3 Efeitos em indivíduos normais	10
6.4 Efeitos sobre neoplasias	11
6.5 Efeitos na resposta imune	11
6.6 Efeitos na desnutrição protéico-calórica	12
6.7 Efeitos colaterais no homem	12
OBJETIVOS	13
CASUÍSTICA E METODOLOGIA	15
1. CASUÍSTICA	16
2. METODOLOGIA	23
2.1 Equipamentos e reagentes	23
2.2 Preparo das soluções	24

2.3	Colheita de sangue.....	24
2.4	Testes cutâneos.....	25
2.5	Determinações hematológicas.....	26
2.6	Proteína total e albumina.....	26
2.7	Determinação das imunoglobulinas.....	26
2.8	Preparo do soro humano absorvido com hemácias de carneiro.....	27
2.9	Preparo da suspensão de hemácias de carneiro.....	27
2.10	Preparo da suspensão de linfócitos.....	27
2.11	Identificação de linfócitos T - Formação de rose tas com eritrócito de carneiro (E-roseta).....	28
2.12	Identificação de linfócitos B - Linfócitos porta dores de imunoglobulinas na superfície da membra na celular.....	28
2.13	Experimentos.....	29
2.14	Tratamento estatístico.....	30
	RESULTADOS.....	32
1.	DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE CELULAR.....	33
2.	DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE HUMORAL.....	36
3.	EFEITO DO LEVAMISOLE NA FORMAÇÃO DE E-ROSETAS.....	38
	DISCUSSÃO.....	42
	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXOS.....	65

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A imunidade compreende um conjunto de mecanismos específicos e inespecíficos, destinados a manter a integridade do organismo, cuja finalidade é a percepção e eliminação de substâncias estranhas.

A pele e as mucosas constituem a defesa inicial contra a invasão por microorganismos, atuando como uma barreira física. No sangue, encontram-se anticorpos naturais, proteína C reativa, *pro*perdina e o sistema do complemento, que, juntamente com o *inter*feron e as células que fazem a fagocitose, completam os fatores inespecíficos da imunidade ³⁶.

A imunidade específica é uma resposta a um estímulo *anti*gênico, com síntese de anticorpos específicos, desenvolvimento de linfócitos reativos específicos e aquisição de memória *imuno*lógica e tolerância. Esta imunidade é relacionada ao desenvolvimento do sistema linfóide. A dualidade deste sistema foi bem demonstrada nas aves, com a descrição de dois órgãos linfóides centrais, o timo e a *bursa* de Fabricius, cuja equivalência funcional, no homem, poderia ser atribuída ao fígado fetal e, após o nascimento, à medula óssea ^{36,87}.

As células imunologicamente competentes são os linfócitos, que se encontram divididos em, pelo menos, duas populações distintas: linfócitos T e linfócitos B. Os linfócitos T originam-se

das células-tronco da medula óssea, as quais chegam ao timo, proliferam e se diferenciam sob a influência desse órgão. Ao abandonarem o timo, essas células localizam-se na zona paracortical dos linfonodos e nas bainhas periarteriolas do baço. Os linfócitos T apresentam marcadores de membrana que os caracterizam: formam rosetas espontaneamente na presença de eritrócitos de carneiro, respondem, *in vitro*, a estímulos antigênicos e sofrem transformação blástica com fitoemaglutinina, células alogênicas e antígenos específicos ^{3,16}.

Os linfócitos B também se originam das células-tronco da medula óssea. Há multiplicação e maturação destas células no órgão equivalente à *bursa* de Fabricius; formam uma subpopulação de linfócitos que se localiza na zona medular e centros germinativos dos linfonodos e nos centros germinativos do baço. A presença de imunoglobulinas na superfície, receptores para a porção Fc do anticorpo e receptores para o terceiro componente do complemento são características dos linfócitos B ^{36,87}.

Os linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular, interagem com os macrófagos e linfócitos B na formação de uma resposta imunológica a antígenos T dependentes ^{3,16}.

1. IMUNIDADE CELULAR

As manifestações da resposta imune decorrentes do estímulo antigênico de linfócitos T sensibilizados, independentes de anticorpos circulantes, são denominadas reações de imunidade mediada por células. Seus mecanismos são responsáveis pela defesa contra antígenos inacessíveis e persistentes (intracelulares) e as reações cutâneas de hipersensibilidade tardia

são a sua expressão *in vivo*. Os linfócitos T, especificamente sensibilizados, ao entrarem em contato com o antígeno correspondente, transformam-se em células blásticas, com subsequente mitose. As células-alvo podem, então, ser destruídas por ação citotóxica direta ou por reações celulares, conseqüentes à liberação de linfocinas pelo linfócito T. As reações de imunidade celular são ainda responsáveis pela rejeição de transplantes e exercem o mecanismo de vigilância imunológica, de grande importância na imunologia dos tumores 16,36,87.

2. IMUNIDADE HUMORAL

Parte da população de linfócitos B, após apropriado estímulo antigênico, sintetizam imunoglobulinas. Sua forma mais madura é o plasmócito. Existem cinco classes de imunoglobulinas humanas, que são as proteínas efetoras da imunidade humoral: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. A IgG é a imunoglobulina predominante, atingindo concentrações significativas nos espaços intra e extravasculares. Os anticorpos da classe IgG podem exercer ação neutralizadora, reação mediada por complemento e auxiliar a fagocitose. Atravessam a placenta e o recém-nascido apresenta níveis de IgG semelhantes aos da mãe, o que lhe confere imunidade contra grande número de elementos patógenos. A IgA está presente no soro, mas seu principal papel é devido à sua presença, em altas concentrações, nas secreções externas, onde é chamada IgA secretória. A IgM é u'a macromolécula e se restringe preferencialmente ao espaço intravascular. Aparece na fase inicial da resposta imunológica e caracteriza as respostas imunes do feto e do recém-nascido. A atividade biológica específica da IgD ainda não é bem conhecida. A IgE encontra-se no soro em concentrações muito baixas e é responsável pelas manifestações alérgicas 25,26,36,78,87.

3. DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é um dos problemas de saúde mais sérios que a humanidade enfrenta. Provavelmente, mais da metade das crianças dos países em desenvolvimento sofre desnutrição moderada ou grave. Um informe recente das Nações Unidas revela que cerca de 400 milhões de pessoas, ou seja, a nona parte da população do mundo, sofrem desnutrição crônica, em graus diversos ^{61,66}.

É um fato conhecido que a desnutrição é endêmica nos países da América Latina. Apesar de não se contar com uma informação completa, o problema mais comum é a desnutrição proteico-calórica, sendo sua prevalência estimada entre 10 e 53% em crianças menores de 5 anos ⁶⁶.

3.1 Kwashiorkor

É uma forma de desnutrição primária devida, principalmente, à ingestão deficiente de proteína, com quantidade normal de hidratos de carbono na dieta. O déficit ponderal pode ser de 20-40% do peso médio esperado para a idade e a criança apresenta-se edemaciada. A maior incidência ocorre na faixa etária de 24-48 meses. Cabelos finos, despigmentados e quebradiços, hepatomegalia, lesões de pele com manchas, despigmentação e até úlceras nas dobras são outros achados clínicos. Pode ocorrer anemia e a hipoalbuminemia é um fator importante, mas não o único, na etiopatogenia do edema ^{34,43}.

3.2 Marasmo

Este termo aplica-se a crianças com desnutrição primária devida à deficiência calórica na dieta, com de

ficat de 40%, ou mais, do peso ideal para a idade e que não apresentam edema, lesões de pele nem alterações dos cabelos. Ocorre, mais freqüentemente, em crianças de até 12 meses de idade. A albumina sérica pode estar normal ou discretamente diminuída e a hemoglobina pode estar baixa pela ingestão deficiente de ferro ^{13,34}.

3.3 Kwashiorkor-marasmático

A ocorrência, freqüente, de desnutrição calórica associada à deficiência proteica resulta neste terceiro tipo de desnutrição, que é a forma clínica mista, apresentada pela maior parte dos pacientes ^{64,66}. Dependendo da presença ou ausência de edema, o déficit ponderal pode ser de 20-40% do peso médio esperado para a idade ^{13,75}.

4. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE CELULAR

SMYTHE et al., em 1971, observaram que, dos muitos fatores que podem contribuir para o estado de imunodeficiência da criança com desnutrição, a resposta imune mediada por células é, talvez, o mais importante ⁷⁴. Mais recentemente, outros autores têm salientado a importância da alteração da imunidade celular na desnutrição, destacando-a nas deficiências de proteína e ferro ^{4,7,10,15,34,47,61,62}, antes que na deficiência calórica ⁴.

A criança desnutrida apresenta uma susceptibilidade aumentada às infecções e estas, mesmo banais, têm uma gravidade maior na criança com desnutrição. Algumas alterações imunológicas já foram evidenciadas nessas crianças: anormalidade na

função fagocitária ^{4,34,54}, incapacidade para produzir imunoglobulinas circulantes por um estímulo antigênico específico ¹⁴, incapacidade para produzir IgA secretória específica em resposta à imunização ⁸, redução na população de linfócitos, particularmente daqueles derivados do timo ^{4,11,19,59,74}, e resposta diminuída tanto aos testes de estimulação de linfócitos, como aos testes cutâneos para hipersensibilidade retardada ^{4,9,11,23,30,59,79}.

A maioria destas deficiências imunológicas somente se torna funcionalmente importante em crianças com retardo severo de desenvolvimento ^{58,67}. Deve, entretanto, ser reconhecido que a diminuição da resposta imunológica na desnutrição não significa, necessariamente, que ela seja causada somente pela deficiência de proteína ou caloria na dieta. Para OLUSI & Mc FARLANE, a alimentação de animais com dieta pobre em proteína produz, principalmente, diminuição na resposta imune secundária e no peso do timo ⁶². CHANDRA mostrou que a deficiência de ferro, isolada, diminui a capacidade bactericida dos leucócitos polimorfonucleares, porém a opsonização e a fagocitose se mantêm normais no plasma ¹⁰.

Todas essas alterações da imunidade melhoram após realimentação adequada ^{4,5,8,62}. Para OLUSI et al., as severas alterações morfológicas dos órgãos linfáticos, principalmente do timo, decorrentes da desnutrição, podem ser corrigidas pela alimentação adequada num período de mais ou menos 4 meses ⁶¹. OLUSI & Mc FARLANE notaram o reaparecimento de anticorpos em resposta a um antígeno específico após 4 meses de realimentação, apesar de que a resposta imune secundária se recuperou mais tardiamente ⁶². Em crianças desnutridas, CHANDRA notou

a melhora das alterações imunológicas em 4-16 semanas de realimentação, inclusive antes de um ganho de peso significativo^{5,6,8}.

5. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE HUMORAL

Na desnutrição, a proporção de linfócitos B, geralmente, é normal⁸. A maioria das crianças desnutridas tem níveis normais ou elevados de IgA, IgM e IgG^{1,8,58,87}, embora tenham sido observados baixos níveis de IgG em lactentes com marasmo⁵⁶. A concentração de IgA secretória nas secreções de nasofaringe, lágrimas e saliva é, geralmente, baixa no kwashiorkor e marasmo⁸.

6. LEVAMISOLE

O tetramisole é uma droga anti-helmíntica sintética, descrita, inicialmente, por THIENPONT et al., em 1966⁸⁰. É ativo contra a maioria dos nematóides dos animais e seres humanos. Em 1971, RENOUX & RENOUX demonstraram que o tetramisole aumentava o efeito protetor de uma vacina de Brucella nos camundongos⁷⁰. A partir daí, imunologistas e clínicos têm utilizado o levamisole *in vitro*^{29,53,61,65,71,81,82,85,86,88} e *in vivo*^{12,46,65,72} para estudar seus efeitos sobre o crescimento bacteriano, resistência às infecções, imunidade humoral e celular, fagocitose, secreção e motilidade celular, citotoxicidade e níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos. Com o apoio da maioria dos trabalhos, o levamisole tornou-se o primeiro membro de uma nova série de agentes simples, quimicamente definidos, com atividade estimulante sobre o sistema imune deprimido, particularmente na imunidade mediada por células^{12,69,79}.

6.1 Química, farmacologia e metabolismo

Isômero L do tetramisole, o levamisole é um pó branco, cristalino, estável, facilmente solúvel em água, com peso molecular de 240,75. É bastante estável em meio aquoso ácido, porém hidrolisa em solução alcalina (Figura 1).

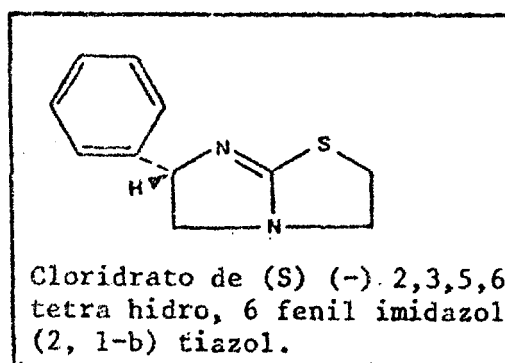


Figura 1 - Fórmula estrutural do Levamisole.

Farmacologicamente, o levamisole estimula os gânglios parassimpáticos e simpáticos e apresenta efeitos inotrópico e cronotrópico positivos⁷⁹. É rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e bem distribuído em todos os tecidos^{31,69}. Apresenta uma meia-vida plasmática de cerca de 4 horas, no homem, e é metabolizado no fígado e eliminado totalmente pelo rim em dois dias⁷⁹.

6.2 Modo de ação

Sua ação é mediada pela alteração na relação de concentrações intracelulares de guanosina-mono-fosfato (GMP) e adenosina-mono-fosfato (AMP) cíclicos. Drogas que elevam os níveis de GMP cíclico intracelular em leucócitos (efeito colinérgico) exercem uma ação estimulante sobre as funções imunológicas e inflamatórias dessas células.

las, tais como, a formação de rosetas com eritrócitos de carneiro ^{22,42}, proliferação de linfócitos ⁸⁴, inibição da migração ⁴⁰ e fagocitose ³³. Drogas que aumentam o AMP cíclico, de forma prolongada (histamina, teofilina), têm o efeito oposto e reduzem as funções do leucócito efetor; o aumento do AMP cíclico intracelular, contudo, estimula as células precursoras T e B, funcionalmente ineficazes, diferenciando-as e tornando-as ativas e possuidoras de marcadores de superfície característicos ^{39,83}.

O levamisole aumenta os níveis intracelulares de GMP cíclico em leucócitos e inverte os efeitos inibidores dos agentes que aumentam o AMP cíclico ^{28,29}. Por outro lado, induz a diferenciação das células T ⁶⁸. O levamisole parece, assim, exercer um efeito duplo, induzindo a diferenciação das células T (aparentemente, um efeito central, mediado pelo AMP cíclico) e uma função aumentada dos linfócitos efetores (aparentemente, um processo periférico, mediado pelo GMP cíclico) ^{71,79}.

Apesar do conhecimento dos parâmetros imunes influenciados pelo levamisole, seu modo de ação exato permanece desconhecido e novos estudos bem controlados serão necessários para comprovar sua eficácia em cada uma de suas indicações potenciais ⁷⁹.

6.3 Efeitos em indivíduos normais

O levamisole não tem nenhuma influência na resposta imune normal em organismos sadios ^{12,79}.

6.4 Efeitos sobre neoplasias

O levamisole não tem nenhuma atividade antitumor mas, através de seu efeito na estimulação da célula T, provavelmente, o número de células citotóxicas do organismo é aumentado ^{12,29}. Em animais, mostrou-se que, quando dado antes da terapia de redução do tumor, pode prevenir sua recidiva, desde que não esteja em estágio avançado ^{12,76}.

6.5 Efeitos na resposta imune

In vitro: Segundo CHANDRASHEKAR & CHANDRA, o levamisole aumenta a expansão citoplasmática do macrófago, a quimiotaxia, a fagocitose de bactérias e a atividade receptora para IgG e C3 em monócitos ¹². Restaura a migração de leucócitos inibida por estimulação antigênica. Aumenta a síntese de ácidos nucleicos e proteínas pelo linfócito em repouso e também pelo linfócito T estimulado ¹². Em pacientes, o levamisole pode normalizar o número de células T, que estava reduzido por diferentes causas ^{53, 65,82}. Não tem efeito algum sobre os níveis de imunoglobulinas séricas nem na produção de anticorpos específicos para um antígeno determinado, seja bacteriano, viral ou celular ¹².

In vivo: VERHAEGEN et al., em 1977, mostraram que, pacientes tratados com levamisole, apresentaram diminuição dos níveis de complemento hemolítico quando estes estavam aumentados ⁸². HUSKISSON refere a diminuição do título do fator reumatóide e dos níveis de imunoglobulinas e proteína C reativa em pacientes com artrite reumatóide ³².

6.6 Efeitos na desnutrição protéico-calórica

Para alguns autores, o levamisole, *in vitro*, aumenta, tanto a resposta dos linfócitos à estimulação por fitomitoêenos, como o número de células formadoras de rose_{ta} com eritrócitos de carneiro. O efeito na resposta à estimulação do linfócito atinge um limiar, que é menor que a resposta à suplementação nutricional. Porém, quando associado à terapia nutricional, o levamisole melhora a resposta imune celular *in vitro* e *in vivo*, antes de um ganho de peso significativo ^{9,11,12,79}.

6.7 Efeitos colaterais no homem

Para RENOUX, os efeitos colaterais do levamisole dependem, basicamente, da metodologia empregada e do tempo de tratamento. Ele tratou 238 pacientes e observou efeitos adversos em 13 (0,5%). Náusea e vômito em 11 e alergia tipo II em 2 tornaram necessária a retirada da droga ⁶⁹.

Agranulocitose foi o mais grave efeito colateral e ocorreu em pacientes que receberam levamisole para o tratamento de artrite reumatóide. Esta discrasia foi similar à agranulocitose provocada pelo uso de outras drogas anti-reumáticas e antiinflamatórias em pacientes reumáticos HLA-B27 ⁵¹. A agranulocitose induzida pelo levamisole é reversível espontaneamente com a retirada da droga. Pacientes que recebem esse tratamento devem ser monitorizados com contagens regulares de leucócitos ^{2,69}.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente estudo visa aos seguintes objetivos:

1. Determinar o número de linfócitos T e B em crianças desnutridas.
2. Avaliar a resposta a testes cutâneos para hipersensibilidade tardia em crianças desnutridas.
3. Avaliar os níveis séricos de IgG, IgA e IgM em crianças desnutridas.
4. Correlacionar os níveis séricos de proteína total e de albumina e a percentagem de peso e de estatura com resultados obtidos para linfócitos T e B.
5. Avaliar o efeito do levamisole, *in vitro*, na formação de E-roseta.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

1. CASUÍSTICA

O grupo de estudo foi constituído por 27 crianças desnutridas, da raça branca, na faixa etária de 6 meses a 4 anos, internadas em 5 hospitais de Curitiba, estado do Paraná. Foi feito o diagnóstico de kwashiorkor em 11 casos e de kwashiorkor-marasmático em 16, utilizando-se os critérios de Mc LAREN⁴⁸, aceitos pelo Grupo de Trabalho para o Estudo da Desnutrição da Sociedade Brasileira de Pediatria⁷⁵. Todas as crianças tinham história de alimentação deficiente e apresentavam 40%, ou mais, de déficit ponderal, com relação à média de peso esperada para a idade, com exceção daquelas com edema, que apresentavam entre 25 e 40% (Figuras 2 e 3). A estatura encontrava-se abaixo do segundo desvio padrão da média esperada para a idade (Figuras 2 e 3). Quanto ao perímetro cefálico, 23 crianças também apresentavam suas medidas abaixo do segundo desvio padrão da média esperada para a idade e 4 ainda mantinham estas medidas dentro da variação considerada normal (Figura 6).

Foram excluídos do estudo os pacientes com história de prematuridade ou baixo peso ao nascimento. Outros critérios de exclusão foram:

- Diagnóstico de sarampo, varicela e coqueluche até 6 meses anteriores ao estudo^{59,74}.

- Doenças crônicas associadas 59,74 .
- Queixa de diarreia ou febre com duração maior que 7 dias 59,74 .
- Estória de alergia na família 18,21 .
- Imunização nos últimos 2 meses 21,87 .

O grupo-controle, pareado por idade e sexo com os pacientes, constituiu-se de crianças da mesma classe sócio-econômica, aparentemente saudáveis, que vivem em creches, nesta Capital, de 8 a 10 horas por dia, enquanto os pais trabalham. Quanto ao peso e estatura, essas crianças apresentavam os valores na variação esperada para a idade, equivalentes ao Grupo IV de Santo André 44,45,75 (Figuras 2,3,4 e 5).

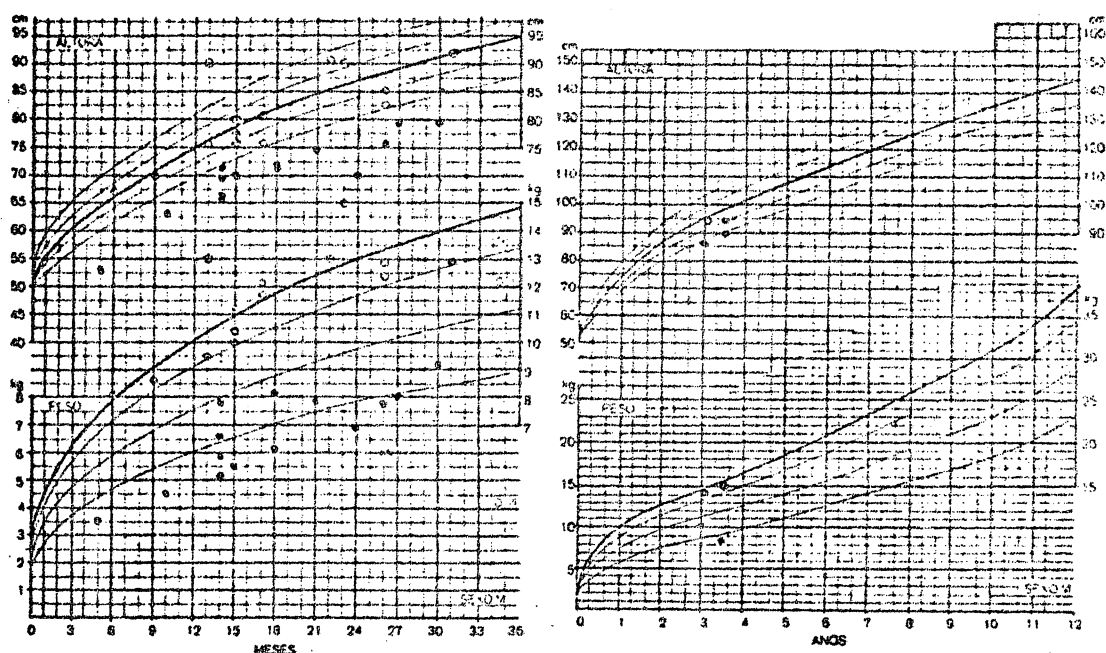


Figura 2 - Distribuição do peso, altura e idade nos dois grupos de crianças do sexo masculino (segundo YUNES & MARCONDES) ⁸⁹. As linhas cheias representam as médias aritméticas de altura e peso esperadas para cada idade cronológica. Em relação ao peso: N = normal, D-I = desnutrição de 1º grau, D-II = desnutrição de 2º grau e D-III = desnutrição de 3º grau. Em relação à altura, as linhas finas representam $\pm 1,00$ vez o desvio padrão e $\pm 1,96$ vezes o desvio padrão.

● Grupo de desnutridos

○ Grupo-controle

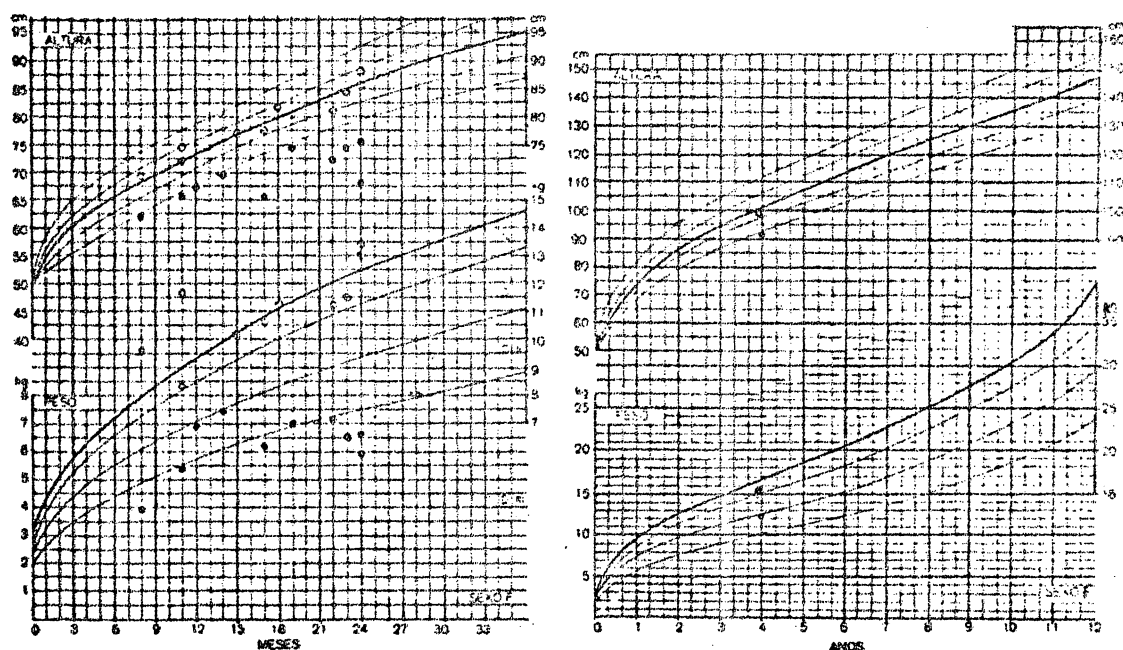


Figura 3 - Distribuição do peso, altura e idade nos dois grupos de crianças do sexo feminino (segundo YUNES & MARCONDES) ⁸⁹. As linhas cheias representam as médias aritméticas de altura e peso esperadas para cada idade cronológica. Em relação ao peso: N = normal, D-I = desnutrição de 10 grau, D-II = desnutrição de 20 grau e D-III = desnutrição de 30 grau. Em relação à altura, as linhas finas representam $\pm 1,00$ vez o desvio padrão e $\pm 1,96$ vezes o desvio padrão.

● Grupo de desnutridos

○ Grupo-controle

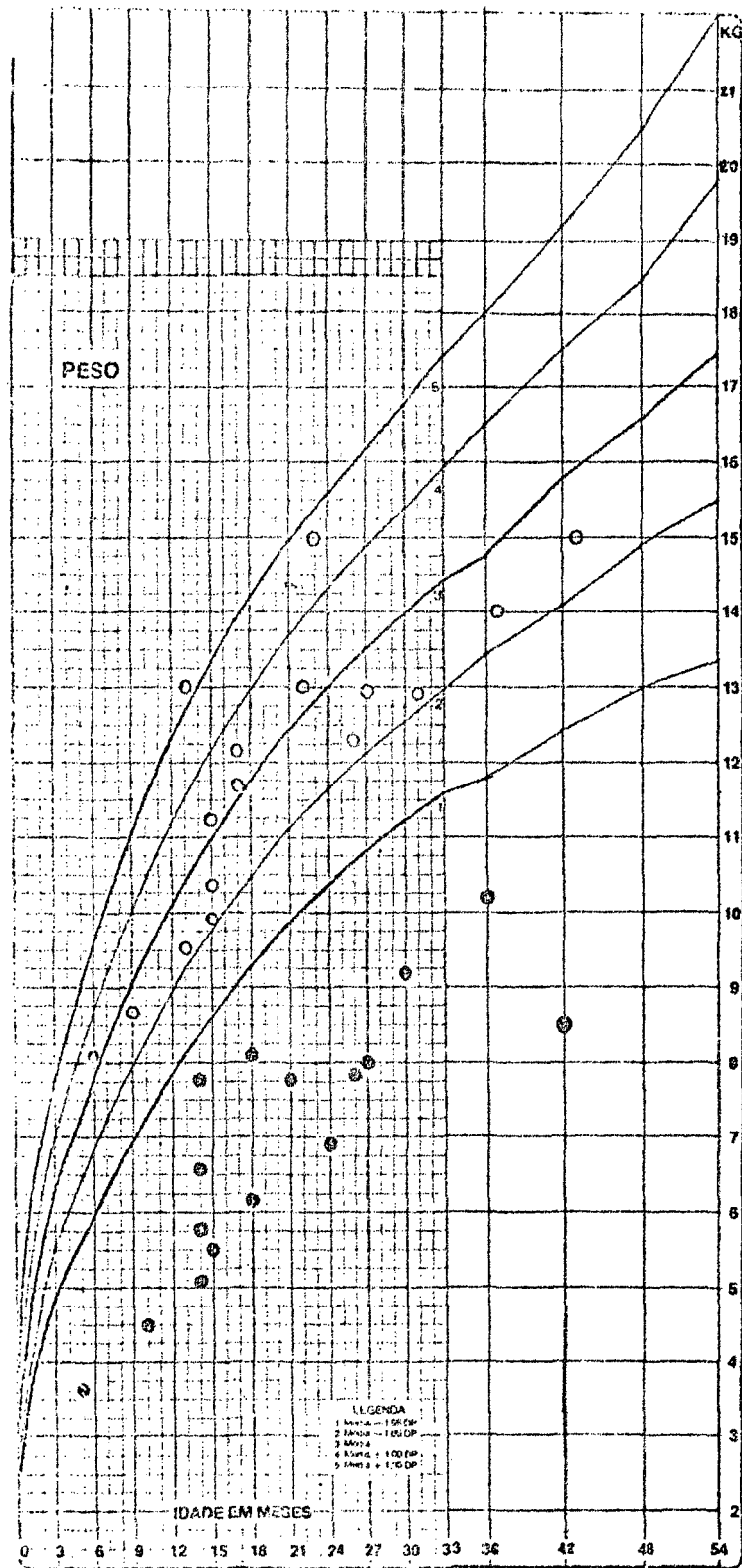


Figura 4 - Distribuição do peso e idade nos dois grupos de crianças do sexo masculino (segundo MARCONDES et al. - Grupo IV de Santo André) ^{44,45}.
 ● Grupo de desnutridos
 ○ Grupo-controle

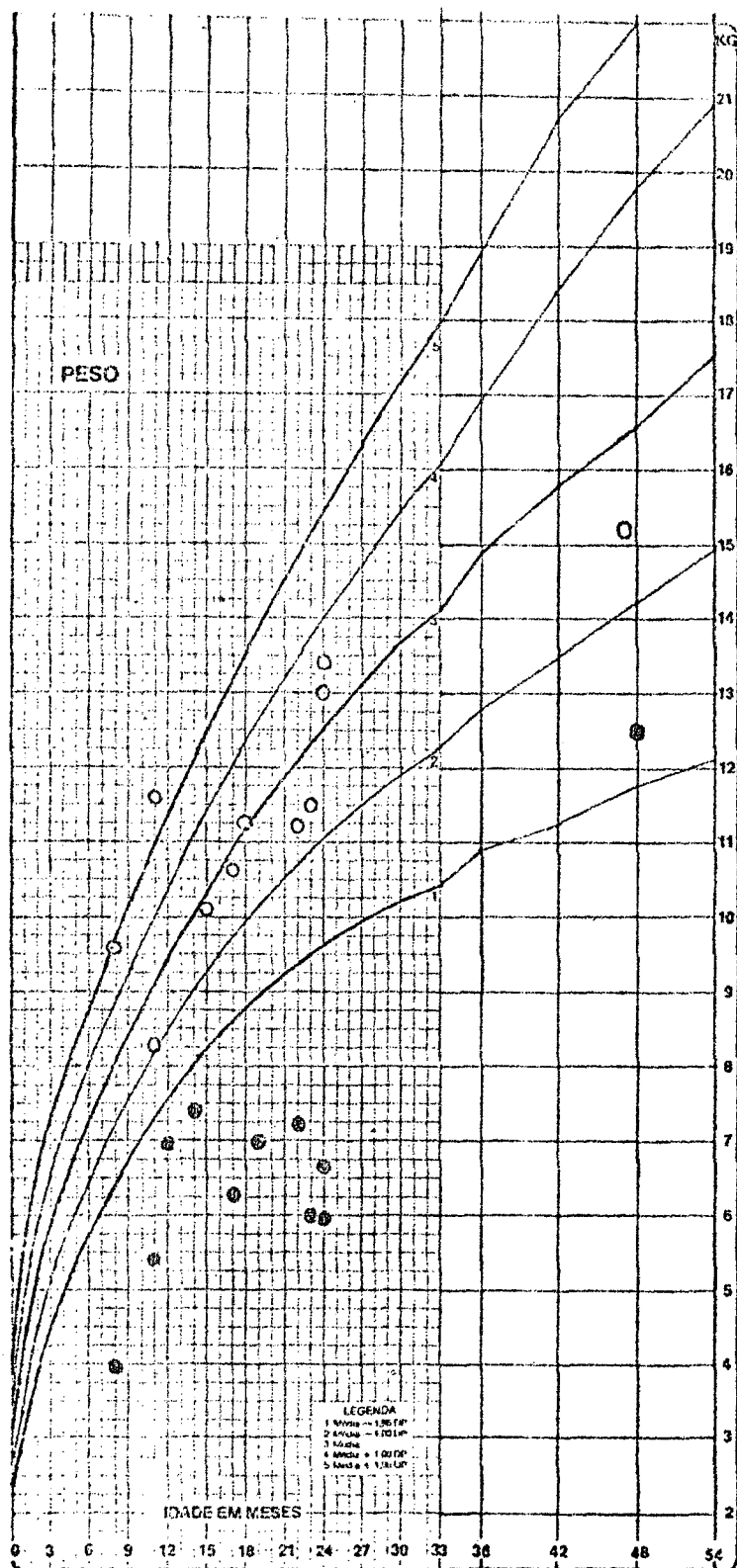
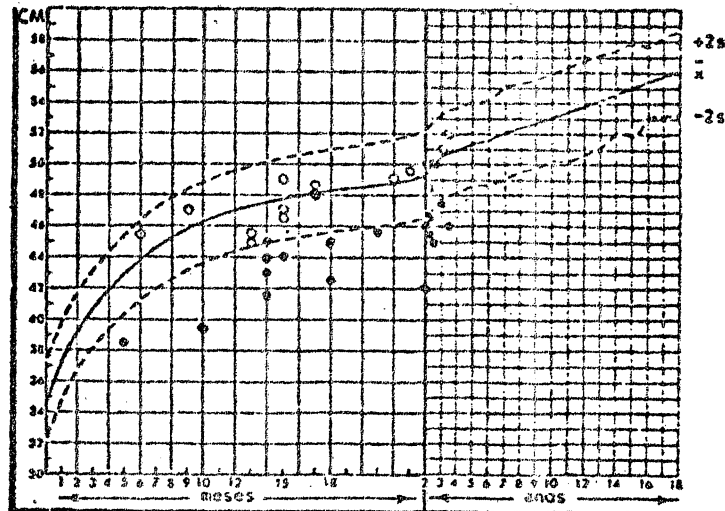


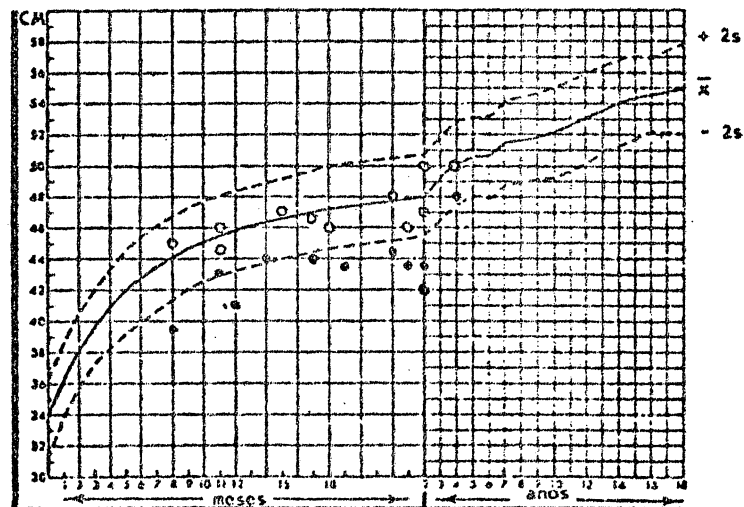
Figura 5 - Distribuição do peso e idade nos dois grupos de crianças do sexo feminino (segundo MARCONDES et al. - Grupo IV de Santo André) ^{44,45}.
 ● Grupo de desnutridos
 ○ Grupo-controle



\bar{x} : média aritmética s : desvio padrão

Figura 6 - Distribuição do perímetro cefálico e idade nos dois grupos de crianças do sexo masculino (segundo NELLHAUS)⁵⁷.

- Grupo de desnutridos
- Grupo-controle



\bar{x} : média aritmética s : desvio padrão

Figura 7 - Distribuição do perímetro cefálico e idade nos dois grupos de crianças do sexo feminino (segundo NELLHAUS)⁵⁷.

- Grupo de desnutridos
- Grupo-controle

2. METODOLOGIA

2.1 Equipamentos e reagentes

- Seringas plásticas descartáveis de 10 ml e 1 ml e agu
lhas descartáveis 30 x 8 e 10 x 4,5.
- Hemoglobinômetro, Coulter Electronics.
- Régua milimetrada transparente.
- Hemocitômetro.
- Contador automático de leucócitos, Coulter-Counter, mo
delo S, Coulter Electronics.
- Microscópio para imunofluorescência.
- Placas para imunodifusão radial, Immunoplate, Human IgG,
IgA and IgM test, Hyland Diagnostics, Illinois.
- Antígenos PPD-RT 23, diluído pelo Instituto de Tisiop
neumologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro
em convênio com a Divisão Nacional de Pneumologia Sani
tária; Candidina, *Candida albicans*, solução diagnósti
ca 1/1.000, Alergomed; Toxóide tetânico; Varidase, strep
tokinase-streptodornase, Lederle Laboratories, New York.
- Sal de levamisole, Johnson & Johnson.
- Ficoll, peso molecular de 400.000.
- Hypaque, solução a 50%.
- Solução salina isotônica.
- Tampão barbital.
- RPMI Medium 1.640, Gibco Laboratories, New York.

- Anti-soro antiimunoglobulina humana, conjugado com fluoresceína, Meloy Laboratories, Virginia, U.S.A. .
- Azida sódica, Merck.
- Suspensão de eritrócitos de carneiro.
- Soro humano absorvido com eritrócitos de carneiro.

2.2 Preparo das soluções

2.2.1 Ficoll-Hypaque: Em 100 ml de água destilada foram dissolvidos 9 g de Ficoll, usando-se um agitador magnético; foi feita uma diluição de Hypaque a 50% para 34% com água destilada; para cada 24 ml da solução de Ficoll a 9%, foram adicionados 10 ml de solução de Hypaque a 34%, ajustando-se a densidade entre 1.076 e 1.079.

2.2.2 Solução de levamisole: Em condições estéreis, foi feita uma solução a 5% de levamisole em água destilada e depois diluída em RPMI para uma concentração final de 20 µg/ml.

2.3 Colheita de sangue

A colheita de 10 ml de sangue venoso em veia periférica foi feita nas primeiras 24 horas de internação, já estando a criança hidratada. Para preparar a suspensão de linfócitos, 5 ml foram colocados em frasco com heparina. O soro foi obtido de 3 ml de sangue, deixados em frasco de vidro sem anticoagulante, em banho-maria. Após a retração do coágulo, o soro foi separado por cen

trifugação, deixado 0,2 ml em geladeira (4-8°C) para dosagem de proteína total e albumina e congelado 0,2 ml a -20°C para determinação de imunoglobulinas. O restante do soro foi absorvido com hemácias de carneiro para os experimentos E.3 e E.6.

O restante do sangue colhido (2 ml) foi colocado em frasco com o anticoagulante de Paul Heller, para as determinações hematológicas, junto com duas lâminas contendo esfregaços para a contagem diferencial de leucócitos.

2.4 Testes cutâneos

Pacientes e controles foram submetidos a testes cutâneos para hipersensibilidade tardia. Para isso foram empregados 4 antígenos:

- PPD-RT 23.
- Toxóide tetânico, diluído a 1/100 com solução salina isotônica 21,87.
- Candidina.
- Varidase, diluído para 40U de estreptoquinase e 10U de estreptodornase por mililitro 18,21,87.

Os dois primeiros antígenos foram aplicados por injeção intradérmica de 0,1 ml, de cada material, no antebraço direito e os dois últimos, da mesma forma, no antebraço esquerdo.

As crianças foram observadas por 20 minutos para verificar reações do tipo imediato ou alérgico. A leitu

ra foi feita com régua milimetrada transparente após 48 horas e consideradas positivas as reações que produziram endurações maiores que 5 mm de diâmetro, independente do halo de eritema formado ^{30,36,58,87}.

2.5 Determinações hematológicas

A leucometria automática foi realizada no Contador Coulter modelo S. Para a contagem diferencial de leucócitos, as lâminas com esfregaços do sangue foram coradas com o corante de May-Grünwald-Giemsa.

O total de linfócitos obteve-se multiplicando o valor percentual de linfócitos, na contagem diferencial, pelo número de leucócitos por milímetro cúbico.

A hemoglobina foi dosada automaticamente no hemoglobímetro Coulter.

2.6 Proteína total e albumina

A proteína total foi avaliada pelo método do Biuret ²⁷ e a albumina, pelo método do Verde bromocresol ⁵².

2.7 Determinação das imunoglobulinas

As concentrações de IgG, IgA e IgM foram determinadas pelo método de imunodifusão radial, no qual a concentração de imunoglobulinas do soro testado é comparada com uma solução padrão de concentração definida ^{1,38,56,87}. Para isso foram utilizadas as placas de imunodifusão radial Hyland, já acompanhadas dos soros padrões para IgG, IgA e IgM.

2.8 Preparo do soro humano absorvido com hemácias de carneiro

Após ter sido inativado a 56°C por 30 minutos, o soro foi absorvido com igual volume de hemácias de carneiro, previamente lavadas com solução salina por 3 vezes consecutivas. Incubou-se em banho-maria por 2 horas e em seguida foi feita nova incubação a 4°C por mais 2 horas. Centrifugou-se a 300 g* para separação do soro, o qual foi distribuído em frações de 0,15 ml e congelado a -20°C. Antes do uso, o soro foi diluído em tampão barbital a 1/20.

2.9 Preparo da suspensão de hemácias de carneiro

O sangue de carneiro foi colhido em condições estéreis, em solução de Alsever e guardado em refrigerador (4°C). Antes do uso, o sangue de carneiro foi lavado 2 vezes em solução salina isotônica e uma vez em tampão barbital. Após as lavagens, as hemácias de carneiro foram ajustadas a uma concentração de 0,5% em tampão barbital 17.

2.10 Preparo da suspensão de linfócitos

Passando por uma coluna de algodão de nylon e, ao mesmo tempo, adicionando tampão barbital para diluir, o sangue foi filtrado para um tubo contendo 3 ml da solução de Ficoll-Hypaque. Foi centrifugado a 1.200 g* por 20 minutos. Os linfócitos foram removidos, com pipetas Pasteur, da interface dos líquidos e transferidos para tubos de hemólise. Foram lavados 2 vezes com tampão barbital e 2 vezes com RPMI. A concentração de células, suspensa em RPMI, foi ajustada para 2×10^6 /ml. Somente foi

aceita uma viabilidade dos linfócitos de, pelo menos, 95%, testada com o Azul de Trypan a 1% 17,37.

2.11 Identificação de linfócitos T - Formação de rosetas com eritrócitos de carneiro (E-roseta)

Em tubos de 5 x 50 mm foi colocado 0,1 ml da suspensão de linfócitos, 0,1 ml da suspensão de hemácias de carneiro e 0,1 ml de soro humano tipo AB, absorvido com hemácias de carneiro. Esta mistura foi incubada por 20 minutos a 37°C, centrifugada por 3 minutos a 100 g* e incubada a 4°C por uma hora.

Para leitura, o material foi ressuspenso delicadamente, adicionando-se uma gota de solução corante (Azul de Metileno a 1%).

Foi contado no hemocitômetro, ao microscópio, o número de E-roseta que ocorreu para, no mínimo, 200 células contadas. Foram consideradas E-rosetas os linfócitos que apresentaram 3 ou mais hemácias aderidas à sua superfície 17,20,35,36,37,50,63. O número de E-roseta foi sempre a média das contagens realizadas por, pelo menos, duas pessoas.

2.12 Identificação de linfócitos B - Linfócitos portadores de imunoglobulinas na superfície da membrana celular

Em tubos de 5 x 50 mm foi colocado 0,2 ml da suspensão de linfócitos e 1 ml de RPMI. Foram incubados a 37°C por 40 minutos e, em seguida, lavados com RPMI previamente aquecido, sendo desprezado o sobrenadante.

Foi acrescentado 0,15 ml do conjugado de anti-soro antiimunoglobulina humana e Isotiocianato de fluoresceína, que havia sido ultracentrifugado, para remoção de agregado de imunoglobulinas e diluído a 1/256.

A mistura foi deixada em repouso, no gelo, por 45 minutos e, em seguida, lavada com RPMI e azida sódica (0,1%) durante 5 minutos, 3 vezes seguidas.

Entre lâmina e lamínula, foram contados, ao microscópio de imunofluorescência, em 200 linfócitos, quantos eram fluorescentes 16,17,36,63,87.

2.13 Experimentos

- 0,3 ml da suspensão de linfócitos foi incubado na presença ou ausência de 50 µg/ml de levamisole a 37°C por 2 horas (E.1, E.4).
- A 0,3 ml da suspensão de linfócitos foi acrescentado 0,3 ml de soro homólogo, absorvido com hemácias de carneiro, e a mistura foi incubada, na presença ou ausência de 50 µg/ml de levamisole, a 37°C por 2 horas (E.5, E.2).
- A 0,3 ml da suspensão de linfócitos foi acrescentado 0,3 ml de soro autólogo, absorvido com hemácias de carneiro e a mistura foi incubada, na presença ou ausência de 50 µg/ml de levamisole, a 37°C por 2 horas (E.6, E.3).

Esta concentração da droga e o tempo de incubação foram escolhidos em virtude de se terem revelado os ideais

na atuação do levamisole sobre os linfócitos T, *in vitro*, em trabalhos anteriores ^{41,53,65,82,85,86,88}.

Ao final da incubação, a percentagem de E-roseta foi verificada, em cada um dos 6 experimentos, como descrito em 2.11.

2.14 Tratamento estatístico

Todos os dados foram perfurados em cartão para o processamento pelo computador DEC-10 da Universidade Federal do Paraná, utilizando o Pacote de Programas Estatísticos para Ciências Sociais - SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) ^{60,77}.

A comparação das médias para as diferenças intergrupos foi realizada pelo teste "t" de Student para amostras independentes.

A comparação das médias para as diferenças intragrupos, conseqüentes ao uso de levamisole ou soros, foi realizada pelo teste "t" pareado. Como foram comparadas todas as médias entre si, utilizando 21 vezes o teste estatístico, os resultados poderiam apresentar probabilidades que não expressassem a realidade. Por isso, os níveis de probabilidade encontrados foram multiplicados pelo número de comparações realizadas. Esta operação, utilizada, segundo GLANTZ ²⁴, faz com que as probabilidades encontradas se aproximem das reais.

Para a medida da associação das variáveis, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ⁷⁷. A per

centagem do peso ideal foi obtida dividindo-se o peso encontrado, pela média de peso correspondente à idade do grupo IV de Santo André, da mesma forma que a percentagem da estatura ideal.

A comparação de frequências para as respostas aos testes cutâneos foi feita pela distribuição do Qui Quadrado (χ^2), com a correção de Yates.

Considerou-se como estatisticamente significativo o nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

Nos Anexos 1 e 2, são relacionados os dados antropométricos, sinais clínicos e resultados laboratoriais para avaliação da desnutrição, bem como, os resultados das dosagens de imunoglobulinas e das determinações do número de linfócitos e suas subpopulações no sangue periférico, para cada caso estudado no grupo de desnutridos.

Para o grupo-controle, os mesmos dados, com exceção de sinais clínicos, são relacionados nos Anexos 3 e 4.

A resposta, em milímetros, aos testes cutâneos, para cada caso estudado, em ambos os grupos, encontra-se no Anexo 5.

Os números absoluto e percentual de linfócitos T após a adição de levamisole, soro homólogo ou soro autólogo, para cada caso estudado, estão relacionados no Anexo 6, para o grupo de desnutridos, e no Anexo 7, para o grupo-controle.

1. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE CELULAR

Os resultados das médias e respectivos erros padrões dos números absoluto e percentual de linfócitos T, nos grupos de desnutridos e controle, encontram-se na Tabela 1. A comparação destas médias, entre os dois grupos, mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo menores, em números absoluto e percentual, as médias de linfócitos T no grupo de desnutridos.

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE LINFÓCITOS T/mm³ E % NOS DOIS GRUPOS.

Grupos / Determinações	Desnutridos (N=27) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Controles (N=27) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\pm t_{(52)}$
Linfócitos T%	32,41 \pm 1,40	39,48 \pm 1,34	- 3,65*
Linfócitos T/mm ³	1344,34 \pm 135,24	2648,61 \pm 249,65	- 4,59*

* Significativo a nível de 5% de probabilidade

As freqüências absolutas de resposta aos testes cutâneos, em ambos os grupos de crianças, encontram-se na Tabela 2. Observou-se menor freqüência de respostas positivas no grupo de desnutridos, comparada ao grupo-controle ($p < 0,05$).

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DE RESPOSTAS AOS TESTES CUTÂNEOS NOS DESNUTRIDOS E GRUPO-CONTROLE.

Resultados / Grupos	Positivos	Negativos	Total
Desnutridos	3	24	27
Controles	22	5	27
Total	25	29	54

$\chi^2(1) \text{ corr.} = 21,56 > 6,64 \text{ } p < 0,01$

Dentre os antígenos utilizados, a Candidina foi o que provocou a maior freqüência de respostas positivas (Figura 7), em

quanto que, ao Toxóide tetânico, nenhum caso apresentou positividade de resposta.

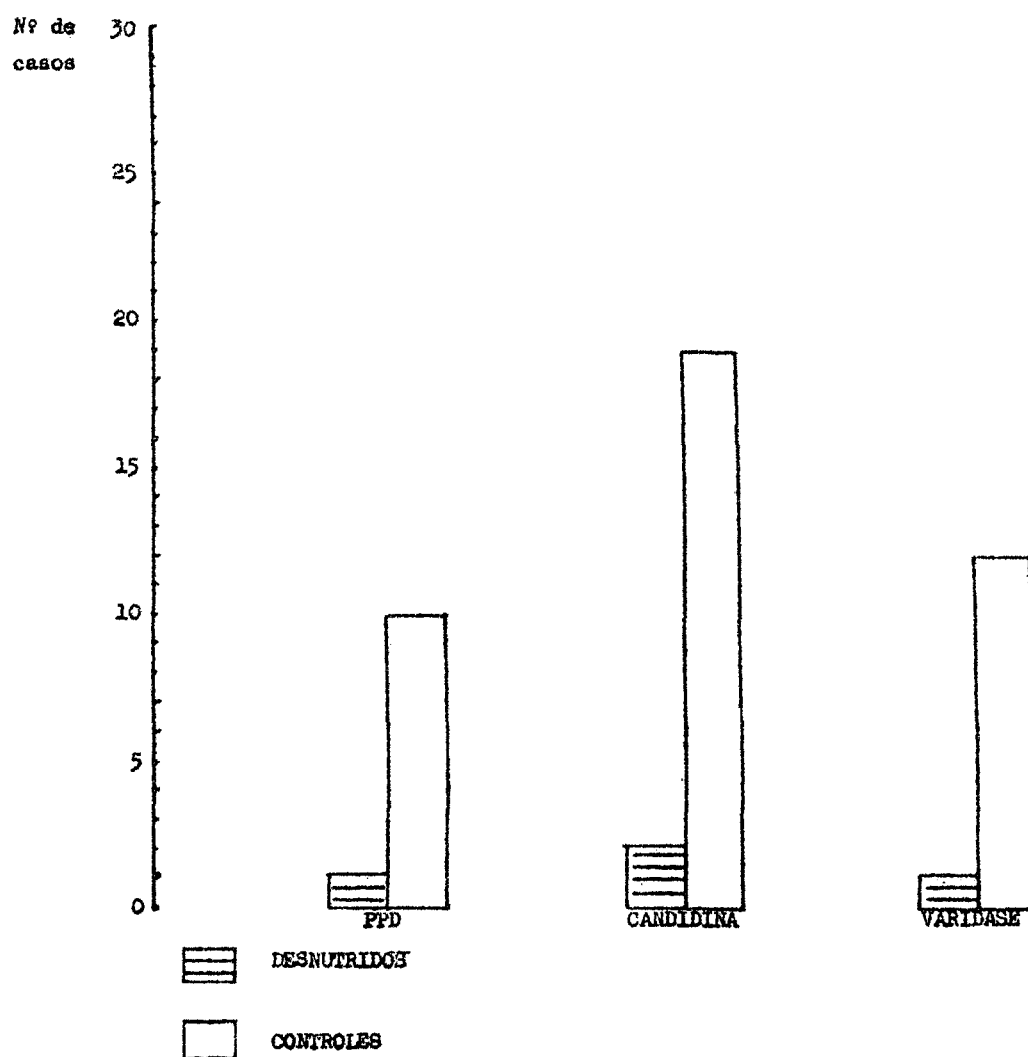


Figura 8 - Frequência absoluta de respostas positivas aos testes cutâneos nos dois grupos.

Os números absoluto e percentual de linfócitos T apresentaram correlações positivas com albumina, proteína total, percentagem do peso ideal e percentagem da estatura ideal (Tabela 4), cujos coeficientes mostraram significância estatística ($p < 0,05$).

TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T% E CRITÉRIOS DE DESNUTRIÇÃO (n=54).

Critérios de desnutrição	Coefficiente (r)	Significância
Albumina (g/dl)	0,36	*
Proteína total (g/dl)	0,37	*
% Peso ideal	0,26	*
% Estatura ideal	0,27	*
Hemoglobina (g/dl)	0,15	ns

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

TABELA 4 - CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T/mm³ E CRITÉRIOS DE DESNUTRIÇÃO (n=54).

Critérios de desnutrição	Coefficiente (r)	Significância
Albumina (g/dl)	0,52	*
Proteína total (g/dl)	0,56	*
% Peso ideal	0,47	*
% Estatura ideal	0,42	*
Hemoglobina (g/dl)	0,21	ns

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

2. DESNUTRIÇÃO E IMUNIDADE HUMORAL

Os resultados das médias e respectivos erros padrões dos números absoluto e percentual de linfócitos B, bem como das deter

minações de IgG, IgM e IgA, nos grupos de desnutridos e controle, encontram-se na Tabela 6. Só existiu diferença significativa, entre os grupos, nas comparações para linfócitos B/mm³ e para IgA ($p < 0,05$), sendo esta mais elevada no grupo de desnutridos.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE LINFÓCITOS B/mm³ e %, IgG, IgM e IgA NOS DOIS GRUPOS (n=54).

Grupos / Determinações	Desnutridos (N=27) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Controles (N=27) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\pm t'_{(52)}$
Linfócitos B%	12,81 \pm 0,73	13,52 \pm 0,69	- 0,70 ^{ns}
Linfócitos B/mm ³	545,04 \pm 67,24	900,21 \pm 85,73	- 3,26*
IgG (mg/dl)	1023,33 \pm 60,63	1030,18 \pm 43,21	- 0,09 ^{ns}
IgM (mg/dl)	178,48 \pm 15,24	150,00 \pm 8,85	1,62 ^{ns}
IgA (mg/dl)	122,67 \pm 12,96	62,63 \pm 5,30	4,29*

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

O percentual de linfócitos B não apresentou correlação com nenhuma das variáveis utilizadas como critérios de desnutrição (Tabela 7).

TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS B% E CRITÉRIOS DE DESNUTRIÇÃO (n=54)

Crítérios de desnutrição	Coeficiente (r)	Significância
Albumina (g/dl)	0,08	ns
Proteína total (g/dl)	0,10	ns
% Peso ideal	0,09	ns
% Estatura ideal	0,11	ns
Hemoglobina (g/dl)	0,04	ns

ns = Não-significativo

O número de linfócitos B/mm³ correlacionou positivamente com albumina, proteína total, percentagem de peso ideal e percentagem de estatura ideal e seus respectivos coeficientes mostraram significância estatística ($p < 0,05$), conforme a Tabela 8.

TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS B/mm³ E CRITÉRIOS DE DESNUTRIÇÃO (n=54).

Critérios de desnutrição	Coefficiente (r)	Significância
Albumina (g/dl)	0,42	*
Proteína total (g/dl)	0,46	*
% Peso ideal	0,39	*
% Estatura ideal	0,34	*
Hemoglobina (g/dl)	0,10	ns

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

3. EFEITO DO LEVAMISOLE NA FORMAÇÃO DE E-ROSETAS

As médias de E-roseta nos 6 experimentos com seus respectivos erros padrões encontram-se na Tabela 9, juntamente com as comparações entre os dois grupos. Pode-se observar que, tanto o levamisole (E.1), como os soros (E.2 e E.3), aumentaram o número de E-roseta% no grupo de desnutridos, tornando-o estatisticamente igual ao do grupo-controle ($p > 0,05$).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE E-ROSETA NOS 6 EXPERIMENTOS NOS DOIS GRUPOS.

Grupos Experimentos		Desnutridos $s \pm s_{\bar{x}}$	Controles $s \pm s_{\bar{x}}$	$\pm t_{(52)}$
E.1	E-roseta%	40,70 \pm 1,98	38,63 \pm 1,42	0,85 ^{ns}
	E-roseta/mm ³	1708,25 \pm 187,02	2560,60 \pm 237,58	-2,82*
E.2	E-roseta%	37,52 \pm 1,42	37,85 \pm 1,74	-0,15 ^{ns}
	E-roseta/mm ³	1568,63 \pm 162,14	2518,48 \pm 237,49	-3,30*
E.3	E-roseta%	39,63 \pm 1,68	36,41 \pm 1,82	1,30 ^{ns}
	E-roseta/mm ³	1656,16 \pm 170,05	2425,36 \pm 234,94	-2,65*
E.4	E-roseta%	31,56 \pm 1,70	37,33 \pm 1,66	-2,43*
	E-roseta/mm ³	1309,26 \pm 139,76	2538,42 \pm 263,56	-4,12*
E.5	E-roseta%	43,56 \pm 1,98	37,78 \pm 1,89	2,11*
	E-roseta/mm ³	1826,67 \pm 202,60	2512,95 \pm 255,66	-2,10*
E.6	E-roseta%	45,78 \pm 1,85	39,37 \pm 1,39	2,77*
	E-roseta/mm ³	1921,78 \pm 217,64	2660,78 \pm 268,52	-2,14*

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

E.1 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole

E.2 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro homólogo

E.3 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro autólogo

E.4 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas

E.5 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro homólogo

E.6 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro autólogo

Este aumento é confirmado na comparação intragrupo destas três variáveis (E.1, E.2 e E.3) com o número de linfócitos T (Tabela 10). No entanto, independente do soro (E.2 *versus* E.5 e E.3 *versus* E.6), o levamisole aumentou os números absoluto e percentual de E-rosetas ($p < 0,05$) no grupo de desnutridos (Tabelas 10 e 11).

A incubação com soro homólogo ou autólogo não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$), como pode ser observado nas comparações E.2 *versus* E.3 e E.5 *versus* E.6 (Tabelas 10 e 11).

TABELA 10 - VALORES DO TESTE "t" PAREADO PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE E-ROSETA% NOS 6 EXPERIMENTOS E LINFÓCITOS T% NO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

Experimentos	E.1	E.2	E.3	E.4	E.5	E.6
Linfócitos T **	-5,97*	-5,18*	-5,01*	1,16 ^{ns}	-7,09*	-8,31*
E.1		2,26 ^{ns}	0,68 ^{ns}	7,08*	-1,84 ^{ns}	-3,64*
E.2			-1,70 ^{ns}	4,67*	-4,28*	-6,33*
E.3				4,94*	-2,46 ^{ns}	-4,70*
E.4					-6,64*	-7,99*
E.5						-1,50 ^{ns}

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

** = E-roseta no tempo zero

TABELA 11 - VALORES DO TESTE "t" PAREADO COM A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE E-ROSETA/mm³ NOS 6 EXPERIMENTOS E LINFÓCITOS T/mm³ NO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

Experimentos	E.1	E.2	E.3	E.4	E.5	E.6
Linfócitos T	-4,75*	-4,33*	-4,39*	1,04 ^{ns}	-5,26*	-5,01*
E.1		2,26 ^{ns}	0,79 ^{ns}	4,91*	-1,82 ^{ns}	-2,99 ^{ns}
E.2			-1,91 ^{ns}	3,71*	-4,01*	-4,48*
E.3				4,01*	-2,43 ^{ns}	-3,41*
E.4					-4,87*	-4,89*
E.5						-1,26 ^{ns}

* = Significativo a 5%

ns = Não-significativo

Todas as comparações realizadas para o grupo-controle foram não-significativas ($p > 0,05$), tanto em número absoluto (Tabela 12) como em percentual (Tabela 13)

TABELA 12 - VALORES DO TESTE "t" PAREADO PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE E-ROSETA/mm³ NOS 6 EXPERIMENTOS E LINFÓCITOS T/mm³ NO GRUPO-CONTROLE.

Experimentos	E.1	E.2	E.3	E.4	E.5	E.6
Linfócitos T	1,42 ^{ns}	1,27 ^{ns}	2,86 ^{ns}	1,97 ^{ns}	1,65 ^{ns}	-0,20 ^{ns}
E.1		0,35 ^{ns}	1,30 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,51 ^{ns}	-1,15 ^{ns}
E.2			0,95 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-1,09 ^{ns}
E.3				-1,47 ^{ns}	-0,85 ^{ns}	-2,46 ^{ns}
E.4					0,35 ^{ns}	-1,77 ^{ns}
E.5						-1,49 ^{ns}

ns = Não-significativo

TABELA 13 - VALORES DO TESTE "t" PAREADO PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE E-ROSETA% NOS 6 EXPERIMENTOS E LINFÓCITOS T% NO GRUPO-CONTROLE.

Experimentos	E.1	E.2	E.3	E.4	E.5	E.6
Linfócitos T	1,03 ^{ns}	1,22 ^{ns}	2,75 ^{ns}	2,32 ^{ns}	1,32 ^{ns}	0,10 ^{ns}
E.1		0,56 ^{ns}	1,58 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,63 ^{ns}	-0,61 ^{ns}
E.2			1,00 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,82 ^{ns}
E.3				-0,84 ^{ns}	-0,82 ^{ns}	-1,96 ^{ns}
E.4					-0,36 ^{ns}	-1,60 ^{ns}
E.5						-1,01 ^{ns}

ns = Não-significativo

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Desnutrição e infecção constituem o binômio responsável pelos maiores índices de morbidade e mortalidade na população infantil dos países em desenvolvimento ^{4,55,59,87}.

O presente trabalho objetivou analisar uma associação de imunidade humoral e celular com desnutrição, visando discriminar fatores contribuintes para a maior incidência de infecção.

A imunidade humoral foi analisada utilizando-se dois parâmetros: a determinação do percentual e número absoluto de linfócitos B e a dosagem de imunoglobulinas.

Observou-se que o percentual de linfócitos B não mostra diferença entre desnutridos e controles, embora o número absoluto seja diminuído nos desnutridos. NAHANI et al. ⁵⁵ também verificaram um percentual de linfócitos B igual entre desnutridos e controles. No tocante à diminuição do número absoluto, não foi encontrada nenhuma referência na literatura revisada. Esta diminuição é demonstrada, indiretamente, por SMYTHE et al. ⁷⁴, que descrevem, em necrópsias de crianças com desnutrição, uma depleção da população linfóide nos centros germinativos dos linfonodos periféricos, local claramente demonstrado como povoado por células B.

Os níveis de Imunoglobulinas G e M foram idênticos nos dois grupos de crianças estudadas. Este achado é concordante com os

descritos por ALVARADO & LUTHRINGER ¹ e KEET & THOM ³⁸. Entretanto, NEUMANN et al. ⁵⁸ relatam níveis elevados dessas imunoglobulinas.

A Imunoglobulina A se encontra significativamente aumentada no grupo dos desnutridos, o que também foi descrito por ALVARADO & LUTHRINGER ¹, KEET & THOM ³⁸ e SIRISINHA et al. ⁷³.

Este estudo não evidencia nenhum defeito da imunidade humoral, se tomarmos por base os níveis de imunoglobulinas e o percentual de linfócitos B. Os níveis elevados de IgA, concordando com as observações de outros autores ^{1,4,8,38,73,87}, seriam decorrentes das infecções de repetição, que incidem neste tipo de população. A diminuição do número absoluto de linfócitos B implica em uma análise futura de sua função no organismo desnutrido.

A deficiência de imunidade celular seria o fator responsável pelo aumento da frequência e severidade das infecções no organismo desnutrido ^{4,7,87}.

Estudos experimentais em ratos, artificialmente desnutridos, demonstraram uma redução do número de células formadoras de roseta com eritrócitos de carneiro no baço e timo. Os autores ^{47,61} concluíram que a desnutrição afeta mais a expressão dos antígenos de superfície das células que a produção de anticorpos.

CHANDRA ¹¹, em estudo de crianças desnutridas, assevera que a restrição de nutrientes impõe uma severa limitação na síntese de proteínas do organismo, com conseqüente comprometimento dos processos de reparação e da habilidade em montar uma resposta imune adequada.

FERGUSSON et al.¹⁹ entendem que a falta de aminoácidos tem papel preponderante na diminuição do número de células linfóides formadoras de roseta com eritrócitos de carneiro na destruição. Acrescentam, ainda, que outros fatores, como a deficiência de ferro, de piridoxina e de ácido fólico, poderiam contribuir para afetar a imunidade celular nestes pacientes.

O presente estudo utilizou a determinação dos linfócitos T do sangue periférico e os testes de hipersensibilidade retardada como parâmetros de análise da imunidade celular.

HARLAND et al.³⁰, em 1965, já haviam mostrado que a resposta tardia ao teste tuberculínico estava alterada em crianças desnutridas. Utilizando outros antígenos, ficou evidenciada, também no presente estudo, uma diminuição da capacidade de resposta aos testes cutâneos de hipersensibilidade retardada, o que também foi comprovado por outros autores^{11,18,23,58,74}.

FRANZ et al.²¹ utilizaram, em seu estudo, o Toxóide tetânico como antígeno para o teste de hipersensibilidade tardia, concluindo ser esse um bom antígeno para a população pediátrica, em virtude da facilidade de prévio contato. No presente estudo, não foi possível concluir como aqueles autores, já que não houve resposta positiva a esse antígeno, apesar de desnutridos e controles terem sido vacinados pelo menos uma vez com Anatoxina tetânica. Uma possível explicação seria o fato de aqueles autores considerarem 2 mm de endureção como resposta positiva, enquanto que, no presente estudo, somente as endureções maiores que 5 mm foram consideradas positivas.

Quanto ao percentual de linfócitos T, evidenciou-se uma diminuição significativa nos desnutridos, resultado este, também

observado por CHANDRA ^{9,11}, REDDY ⁶⁷ e NAHANI ⁵⁵. Igualmente, o número absoluto de linfócitos T, no sangue periférico, acha-se diminuído. Esta observação somente contribui para confirmar a alteração da imunidade celular, de caráter funcional, uma vez que entre os desnutridos estudados somente um caso apresentava número de linfócitos total abaixo de 1.500/mm³, caracterizando então uma população não-lymfopênica.

Fica demonstrado, ainda, neste estudo, um paralelismo entre a diminuição de peso, de estatura, da proteína total e da albumina com o percentual e número absoluto de linfócitos T no sangue periférico. Estes achados são concordantes com aqueles observados por CHANDRA ¹¹ e NEUMANN ⁵⁸.

CHANDRA ⁷, em estudo de pacientes com deficiência de ferro, associa esta deficiência a um menor número de linfócitos formando rosetas com eritrócitos de carneiro. Utilizando os níveis de hemoglobina, não foi possível, no presente estudo, associar tais níveis com diminuição do número de linfócitos T.

Diversos são os mecanismos postulados para a diminuição de linfócitos formadores de E-roseta em desnutridos. Para FERGUSON et al. ¹⁹, os altos níveis de cortisol plasmático seriam um fator contribuinte para tal diminuição. Para CHANDRA ⁸, a elevação de IgE e de alfa-feto proteína inibiriam o processo de formação de E-roseta. Outros autores referem que a privação proteica induz uma síntese alterada de DNA, medida pela transformação blástica *in vitro* ^{11,23,58,74}.

Finalmente, diversos autores associam a deficiência proteica a uma imunodeficiência, predominantemente celular, ao demons

trarem uma atrofia tímica acentuada, perda de tecido linfóide periférico e depleção de células paracorticais profundas dos linfonodos periféricos ^{47,58,62,74}.

A complementação deste estudo objetivou analisar o efeito do levamisole, *in vitro*, na restauração da capacidade de os linfócitos formarem roseta com eritrócitos de carneiro.

Verificou-se, em experimentos de controle, que os linfócitos dos desnutridos, incubados previamente com soro autólogo ou homólogo, foram capazes de formar maior número de E-rosetas, corrigindo o percentual observado no experimento sem a adição desses soros. Nenhum achado semelhante foi observado na literatura revisada. A capacidade dos receptores para hemácias de carneiro de se desprenderem dos linfócitos T foi demonstrada, *in vitro*, pelo aquecimento desses linfócitos a 45°C. Esses receptores solúveis foram capazes de retornar à membrana celular e de propiciar, novamente, a formação de E-roseta ⁴⁹. Postulando que, normalmente, tais receptores se encontram solúveis no soro, a incubação prévia dos linfócitos com soro autólogo ou homólogo faria com que se tornassem mais capazes de formar E-rosetas. Assim sendo, um possível papel da desnutrição seria o de acelerar ou facilitar, nos linfócitos, o desprendimento dos receptores para eritrócitos de carneiro. A comprovação desta hipótese e sua possível implicação biológica merecem estudo futuro.

Vários são os trabalhos atribuindo ao levamisole a capacidade de restaurar a função biológica dos linfócitos T, seja pela maior formação de E-rosetas *in vitro*, seja pela maior resposta à transformação blástica a diferentes mitógenos ou antígenos específicos ^{41,65,81,85,86,88}. Os resultados deste estudo não di

ferem dos encontrados na literatura, uma vez que o levamisole se mostrou efetivo na restauração da capacidade dos linfócitos dos desnutridos de formar E-roseta, aumentando os números absoluto e percentual de linfócitos T, que se encontravam diminuídos.

Quando os linfócitos dos desnutridos foram tratados, concomitantemente, com soro homólogo ou autólogo e levamisole, o aumento dos linfócitos T foi acentuado. Deve ser ressaltado, entretanto, que o número absoluto de tais linfócitos, embora augmentando com o referido tratamento, não chegou a atingir os valores do grupo-controle.

Tendo em vista esses achados e os referidos anteriormente com o uso somente dos soros, pode-se aventar a hipótese de que o levamisole teria um papel facilitador na reintegração do receptor solúvel à membrana da célula por meio de um incremento na produção de uma substância normalmente responsável por tal reintegração ^{61,82,86}. Esta hipótese auxiliaria na explicação da ausência de efeito do levamisole sobre os linfócitos do grupo-controle no presente estudo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Os números absoluto e percentual de linfócitos T acham-se diminuídos em pacientes com desnutrição.
2. A frequência de positividade dos testes cutâneos acha-se diminuída nos pacientes desnutridos.
3. O número absoluto de linfócitos B encontra-se diminuído nos pacientes desnutridos, enquanto que o número percentual é igual ao do grupo-controle.
4. Os níveis séricos de IgG e IgM são iguais nos desnutridos e controles, enquanto que os de IgA se acham significativamente aumentados nos desnutridos.
5. Houve correlação positiva do percentual de peso, de estatura e dos níveis de albumina e de proteína total com o número de linfócitos T, seja absoluto ou percentual, bem como o número absoluto de linfócitos B.
6. Houve aumento da formação de E-roseta quando os linfócitos dos pacientes desnutridos foram incubados com soro autólogo ou homólogo.
7. Os linfócitos dos desnutridos, quando tratados com levamisole, *in vitro*, formaram número de E-roseta% igual ao do grupo-controle.

8. Os linfócitos dos desnutridos tratados com levamisole, *in vitro*, e na presença de soros autólogo ou homólogo, formaram maior número de E-roseta% que o grupo-controle.
9. O levamisole foi capaz de induzir um maior número de linfócitos T a expressarem receptor para hemácias de carneiro nos desnutridos.
10. O levamisole não modificou a expressão de linfócitos T no grupo-controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVARADO, J. & LUTHRINGER, D.G. Serum immunoglobulins in edematous protein-calorie malnourished children. Clin. Pediatr. 10:174-9, 1971.
2. AMERY, W.K. & VERHAEGEN, H. Effects of levamisole treatment in cancer patients. J. Rheumatol. 5(suppl.):123-35, 1978.
3. AMMANN, A.J. T cell and T-B cell immunodeficiency disorders. Ped. Clin. N. Am. 24:293-311, 1977.
4. BROWN, R.E. Interaction of nutrition and infection in clinical practice. Ped. Clin. N. Am. 24:241-52, 1977.
5. CHANDRA, R.K. Immunocompetence in Low-birth-weight infants after intrauterine malnutrition. Lancet, 2:1393-4, 1974.
6. _____. Immunocompetence in undernutrition. J. Pediatr. 81: 1194-200, 1972.
7. _____. Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. J. Pediatr. 86:899-902, 1975.
8. _____. Interactions of nutrition, infection and immune response. Acta. Paediatr. Scand. 68:137-44, 1979.

9. _____. Lymphocytes subpopulations in human malnutrition: cytotoxic and suppressor cells. Pediatrics, 59:423-7, 1977.
10. _____. Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Arch. Dis. Child., 48:864-6, 1973.
11. _____. Rosette-forming T lymphocytes and cell-mediated immunity in malnutrition. Br. Med. J. 3:608-9, 1974.
12. CHANDRASHEKAR, J.E. & CHANDRA, R.K. Levamisole: a review and some observations in its effects on immunocompetence in protein-energy malnutrition and old age. Indian J. Pediatr. 46:147-57, 1979.
13. CHASE, H.P. & O'BRIEN, D. Normal childhood nutrition and its disorders. In: KEMPE, C.H.; SILVER, H.K.; O'BRIEN, D. Current Pediatric diagnosis & treatment. 5.ed. Los Altos, Cal. Lange Medical Publications, 1978, p.88-102.
14. COOPER, W.C.; GOOD, R.A.; MARIANI, R. Effects of protein insufficiency on immune responsiveness. Am. J. Clin. Nutr. 27:647-64, 1974.
15. DALY, J.M.; DUDRICK, S.J.; COPELAND, E.M. Effects of protein depletion and repletion on cell-mediated immunity in experimental animals. An. Surg. 188:791-6, 1978.
16. DOUGLAS, S.D. Cells involved in immune responses. In: FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L.; WELLS, J.V. Basic & clinical immunology 2.ed. Los Altos, California, Lange, 1978, p.78-95.

17. DWYER, J.M. Identifying and enumerating human T and B lymphocytes. A review of techniques, problems and progress in clinical studies. Prog. Allergy, 21:178-260, 1976.
18. EDELMAN, R.; SUSKIND, R.; OLSON, R.E.; SIRISINHA, S. Mechanisms of defective delayed cutaneous hypersensitivity in children with protein-calorie malnutrition. Lancet,1:506-8, 1973.
19. FERGUSON, A.C.; LAWLOR Jr, G.J.; NEUMANN, C.G.; OH, W.; STIEHM, E.R. Decreased rosette-forming lymphocyte in malnutrition and intrauterine growth retardation. J. Pediatr. 85:717-23, 1974.
20. FLEISHER, T.A.; LUCKASEN, J.R.; SABAD, A.; GEHRTZ, R.C.; KERSEY, J.H. T and B lymphocytes sub-populations in children. Pediatrics, 55:162-5, 1975.
21. FRANZ, M.L.; CARELLA, J,A.; GALANT, S.P. Cutaneous delayed hypersensitivity in a healthy pediatric population: diagnostic value of diphtheria-tetanus toxoids. J. Pediatr. 88:975-7, 1976.
22. GALANT, S.P.; LUNDAK, R.L.; EATON, L. Enhancement of early human E-rosette formation by cholinergic stimuli. J. Immunol. 117:48-51, 1976.
23. GEEFHUYSEN, J.; ROSEN, E.U.; KATZ, J.; METZ, J. Impaired cellular immunity in kwashiorkor with improvement after therapy. Br. Med. J. 4:527-9, 1971.

24. GLANTZ, S.A. Biostatistics: how to detect, correct and prevent errors in the medical literature. Circulation, 61:1-7, 1980.
25. GOLDMAN, A.S. & GOLDBLUM, R.M. Primary deficiencies in humoral immunity. Ped. Clin. N. Am. 24:277-91, 1977.
26. GOODMAN, J.W. & WANG, A.C. Immunoglobulins: structure & diversity. In: FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L.; WELLS, J.V. Basic & clinical immunology. 2.ed. Los Altos, Cal. Lange, 1978. p.23-38.
27. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-66, 1949.
28. GRIECO, M.H.; SIEGEL, U.; GOEL, Z. Modulation of human T Lymphocyte rosette formation by autonomic agonists and cyclic nucleotides. J. Allergy Clin. Immunol. 58:149-59, 1976.
29. HADDEN, J.W.; COFFEY, R.G.; HADDEN, E. M.; LOPEZ-CORRALEZ, E.; SUNSHINE, G.H. Effect of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. Cell. Immunol. 20:98-103, 1975.
30. HARLAND, S.E.G. & BROWN, R.E. Tuberculin sensitivity following B.C.G. vaccination in undernourished children. E. Afr. Med. J. 42:233-8, 1965.
31. HOLBROOK, A. & SCALES, B. Polarographic determination of tetramisole hydrochloride in extracts of animal tissue. Anal. Biochem. 18:46-53, 1967.

32. HUSKISSON, E.C. & ADAMS, J.G. An overview of the current status of levamisole in the treatment of rheumatic diseases. Drugs, 20:100-4, 1981.
33. IGNARRO, L.J. & CECH, S.Y. Bidirectional regulation of lysosomal enzyme secretion and phagocytosis in human neutrophils by guanosine 3',5' - monophosphate and adenosine 3',5' - monophosphate (39232). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151:448-52, 1976.
34. JAMES, W.P.T. Kwashiorkor and marasmus: old concepts and new developments. Proc. R. Soc. Med. 70:611-15, 1977.
35. JOBIM, L.F.; KOTHLAR, T.; LONGONI, E. Estudo das subpopulações de linfócitos. Rev. Assoc. Med. Bras. 21:168-73, 1975.
36. JOHNSTON Jr., R.B. & AUGUST, C.S. Disorders of immune mechanisms. In: KEMPE, C.H.; SILVER, H.K.; O'BRIEN, D. Current pediatric diagnosis & treatment. 5.ed. Los Altos, Cal., Lange Medical Publications, 1978, p.424-34.
37. JONDAL, M.; HOLM, G.; WIGZELL, H. Surface marker on human T and B lymphocytes: I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. J. Exp. Med. 136:207-15, 1972.
38. KEET, M.P. & THOM, H. Serum immunoglobulins in Kwashiorkor. Arch. Dis. Child. 44:600-3, 1969.
39. KOOK, A.I. & TRAININ, N. Hormone-like activity of a thymus humoral factor on the induction of immune competence in

- lymphoid cells. J. Exp. Med. 139:193-207, 1974.
40. KOOPMAN, W.J.; GILLES, M.H.; DAVID, J.R. Prevention of MIF-activity by agents known to increase cellular cyclic AMP. J. Immunol. 110:1609-14, 1973.
41. LOMNITZER, R. & RABSON, A.R. The effect of levamisole on E-rosette formation by trypsinised lymphocytes. Clin.Exp. Immunol. 33:499-502, 1978.
42. MACHADO, J.A.N.; ANTUNES, L. J.; SILVA, E.N. "E" rosette formation in "active" T lymphocytes: phenomenon modulated by intracellular level of cyclic AMP and GMP. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. 10:241-6, 1977.
43. MARCONDES, E. Conceito e nomenclatura, classificação e etiopatogenia. In: MARCONDES, E.; MONTEIRO, D.M.; BARBIERI, D.; QUARENTEI, G.; YUNES, J.; CAMPOS, J.V.M.; SETIAN, N.; FERNANDES, W.S. Desnutrição. São Paulo, Sarvier, 1973. p.3-29, (Monografias médicas, Pediatria,7).
44. MARCONDES, E.; BERQUÕ, E.; YUNES, J.; LUONGO, J., MARTINS, J.; ZACCHI, M.A.S.; LEVY, M.S.F.; HEGG, R. Estudo antropométrico de crianças brasileiras de zero a doze anos de idade. Anais Nestlé, 84:13-200, 1971.
45. MARQUES, M.; BERQUÕ, E.; YUNES, J.; MARCONDES, E. Crescimento de crianças brasileiras: peso e altura segundo a idade e sexo - influência de fatores sócio-econômicos. Anais Nestlé, 84(suppl.2), 1974. Não-paginado.

46. MARTINEZ, D. & ZAIAS, N. Levamisole as adjunct to dapsone in leprosy. Lancet, 2:209-10, 1976.
47. McFARLANE, H. & HAMID, J. Cell mediated immune response in malnutrition. Clin. Exp. Immunol. 13:153-64, 1973.
48. McLAREN, D.S. A simple scoring system for classifying the severe forms of protein-calorie malnutrition of early childhood. Lancet, 1:533-5, 1967.
49. MENDES, N.F.; SARAIVA, P.J.; SANTOS, O.B.O. Restorative effect of normal human serum, transfer factor and thymosin on the ability of heated human lymphocytes to form rosettes with sheep erythrocytes. Cell. Immunol. 17:560-6, 1975.
50. MENDES, N.F.; TOLNAI, M.E.A.; SILVEIRA, N.P.A.; GILBERTSEN, R.B.; METZGAR, R.S. Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) lymphocytes. J. Immunol. 111: 860-7, 1973.
51. MIELANTS, H. & VEYS, E.M. A study of the hematological side effects of levamisole in rheumatoid arthritis with recommendations. J. Rheumatol. 5:77-83, 1978.
52. MIYADA, D.S.; BAYSINGER, V.; NOTRICA, S.; NAKAMURA, R.M. Albumin quantitation by dye binding and salt fractionation techniques. Clin. Chem. 18:52-6, 1972.
53. MONCADA, G.B.; RODRIGUES-ESCOBEDO, L.; CASTANEDO DE ALBA, J.P. Effect of levamisole on E-rosettes. N. Engl. J. Med. 295:230, 1976.

54. MUNSON, D.; FRANCO, D.; ARBETER, A.; VELEZ, H.; VITALE, J. J. Serum levels of immunoglobulins, cell mediated immunity and phagocytosis in protein-calorie malnutrition. Am. J. Clin. Nutr. 27:625-8, 1974.
55. NAHANI, J.; NIK-AEEN, A.; RAFII, M.; MOHAGHEGHPOUS, N. Effect of malnutrition on several parameters for the immune system of children. Nutr. Metab. 20:302-6, 1976.
56. NAJJAR, S.S.; STEPHAN, M.; ASFOUR, R.Y. Serum levels of immunoglobulins in marasmic infants. Arch. Dis. Child. 44:120-3, 1969.
57. NELLHAUS, G. Head circumference from birth to eighteen years. Pediatrics 41:106-14, 1968.
58. NEUMANN, C.G.; LAWLOR Jr, G.J.; STIEHM, E.R.; SWENDSEID, M. E.; NEWTON, C.; HERBERT, J.; AMANN, A.J.; JACOB, M. Immunologic responses in malnourished children. Am. J. Clin. Nutr. 28:89-104, 1975.
59. NICHOLS, B.L. Nutrition and infection. South. Med. J. 71:705-8, 1978.
60. NIE, N.H.; HULL, C.H.; JENKINS, J.G.; STEINBRENNER, K.; BENT, D.H. SPSS: Statistical package for the social sciences. 2 ed. Mc Graw-Hill. New York, 1978. 675 p.
61. OLUSI, S.O.; JESSOP, W.J.; SHOROYE, A. Effects of levamisole on the immune responses of experimentally malnourished rats. Pediatr. Res. 13:1237-9, 1979.

62. OLUISI, S.O. & Mc FARLANE, H. Effects of early protein-calorie malnutrition on the immune response. Pediatr. Res. 10: 707-12, 1976.
63. PAPAMICHAIL, M.; HOLBOROW, E.J.; KEITH, H.I.; CURREY, H.L.F. Subpopulation of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. Lancet, 2:64-6, 1972.
64. QUARENTEI, G. Quadro clínico e evolução. In: MARCONDES, E.; MONTEIRO, D.M.; BARBIERI, D.; QUARENTEI, G.; YUNES, J.; CAMPOS, J.V.M.; SETIAN, N.; FERNANDES, W.S. Desnutrição. São Paulo, Sarvier, 1976. p.43-65. (Monografias médicas, Pediatria, 7).
65. RAMOT, B.; BINIAMINOV, M.; SHOHAN, C.; ROSENTHAL, E. Effect of levamisole on E-rosette-forming cells in vivo and in vitro in Hodgkin's disease. N. Engl. J. Med. 294:809-11, 1976.
66. READ, M.S. & FELSON, D. Prevalencia de la desnutricion. In _____. Nutricion, aprendizaje y comportamiento, Washington, Organizacion Panamericana de la Salud, 1977. p.7-12. (Publicacion cientifica, 352).
67. REDDY, V.; JAGADEESAN, V.; RAGHARAMULU, N.; BHASKARAM, C.; SRIKANTIA, S.G. Functional significance of growth retardation in malnutrition. Am. J. Clin. Nutr. 29:3-7, 1976.
68. RENOUX, G. Modes d'action de l'levamisole. Nouv. Presse Med. 6:3552, 1977.

69. _____. The general immunopharmacology of levamisole. Drugs, 20:89-99, 1981.
70. RENOUX, G. & RENOUX, M. Effet immunostimulant d'un imidothiasole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. C.R. Acad. Sci. 272D:349, 1971.
71. _____. Immunostimulation par le lēvamisole: cycles et mēcanismos. Nouv. Presse Med. 7:197-201, 1978.
72. ROSENTHAL, M. Levamisole increase activated T lymphocytes. Lancet, 2:665, 1977.
73. SIRISINHA, S.; SUSKIND, R.; EDELMAN, R.; ASVAPAKA, C.; OLSON, R.E. Secretory and serum IgA in children with protein calorie malnutrition. Pediatrics, 55:166-70, 1975.
74. SMYTHE, P.M.; BRERETON-STILES, C.G.; GRACE, H.J.; MAFOYANE, A.; SCHONLAND, M.; COOVADIA, H.M.; LOENING, W.E.K.; PARENT, M.A. Thymolymphatic deficiency and depression of cell mediated immunity in protein-calorie malnutrition. Lancet, 2:939-47, 1971.
75. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Grupo de Trabalho para o Estudo da Desnutrição. Nomenclatura e classificação da desnutrição. J. Pediatr., Rio de Janeiro, 41:13, 1976.
76. SPREAFICO, F. Use of levamisole in cancer patients. Drugs, 20:105-16, 1981.

77. STEEL, R.G. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill, 1960. 481 p.
78. STIEHM, E.R. & FUDENBERG, H.H. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. Pediatrics, 37: 715-27, 1966.
79. SYMOENS, J. & ROSENTHAL, M. Levamisole in the modulations of the immune response: Current experimental and clinical state. J. Reticuloendothel. Soc. 21:175, 1977.
80. THIENPONT, D.; VANPARIJS, O.F.J.; RAEYMAEKERS, A.H.M.; VANDENBERK, J.; DEMOEN, P.J.A.; ALLEWIJN, F.T.N.; MARSBOOM, R.P.H.; NIEMEGERES, C.J.E.; SCHELLEKENS, K.H.L.; JANSEN, P.A.J. Tetramisole (R8299), a new, potent broad spectrum anthelmintic. Nature, London, 209:1084-6, 1966.
81. VERHAEGEN, H.; DE COCK, W.; DE CREE, J. The effects of azathioprine and levamisole on rosette-forming cells of healthy subjects and cancer patients. Clin. Exp. Immunol. 29:311-5, 1977.
82. VERHAEGEN, H.; DE CREE, J.; DE COCK, W.; VERBRUGGEN, F. Restoration by levamisole of low E-rosette forming cells in patients suffering from various diseases. Clin. Exp. Immunol. 27:313-8, 1977.
83. WATSON, J.; EPSTEIN, R.; COHN, M. Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen-sensitive cells. Nature, London, 246:405, 1973.

84. WEINSTEIN, Y.; CHAMBERS, D.A.; BOLRNE, H.R.; MELMON, K.L.
Cyclic GMP stimulates lymphocytes nucleic acid synthesis.
Nature, London, 251:352, 1974.
85. WHITCOMB, M. The effect of levamisole on lymphocyte protein
synthesis in vitro. Cell. Immunol. 29:66-71, 1977.
86. WHITCOMB, M.; MERLUZZI, V.J.; COOPERBAND, S.R. The effect
of levamisole on human lymphocyte mediator production in
vitro. Cell. Immunol. 21:272-7, 1976.
87. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunodeficiency. Clin. Immunol.
Immunopathol., 13:297-359, 1979.
88. WYBRAN, J. & GOVAERTS, A. Levamisole and human lymphocyte
surface markers. Clin. Exp. Immunol. 27:319, 1977.
89. YUNES, J. & MARCONDES, E. Classificação da desnutrição.
Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, 30:484-9, 1975.

ANEXOS

ANEXO 1 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS E SINAIS CLÍNICOS DAS CRIANÇAS DO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

N	IDADE (meses)	SEXO	PESO (g)	% PESO IDEAL	ESTATURA (cm)	% ESTATURA IDEAL	PERÍMETRO CEFÁLICO(cm)	EDEMA	LESÕES DE PELE	ALTERAÇÃO DE FÂNEROS	HEPATOMEGALIA
01	05	M	3.630	49	53,0	81	38,5	Não	Não	Sim	Sim
02	11	F	5.400	59	66,0	91	43,0	Não	Não	Sim	Sim
03	22	F	7.200	59	72,0	85	44,5	Sim	Não	Sim	Sim
04	12	F	6.950	73	67,5	92	41,0	Sim	Não	Sim	Não
05	14	F	7.400	73	69,0	90	44,0	Sim	Sim	Sim	Sim
06	14	M	5.100	47	66,0	85	41,5	Sim	Não	Sim	Sim
07	19	F	7.000	61	74,5	92	43,5	Sim	Não	Sim	Sim
08	48	F	12.500	75	92,0	90	48,0	Sim	Não	Sim	Não
09	24	F	6.650	53	75,5	87	43,5	Não	Não	Sim	Não
10	14	M	6.600	61	66,0	85	43,0	Sim	Não	Sim	Sim
11	08	F	3.950	49	62,0	91	39,5	Sim	Não	Sim	Não
12	14	M	5.800	54	69,0	89	45,0	Não	Não	Sim	Não
13	21	M	7.800	62	74,5	87	45,5	Sim	Não	Sim	Não
14	24	F	5.950	47	66,5	77	42,0	Não	Não	Sim	Sim

ANEXO 1 (CONT.) - DADOS ANTROPOMÉTRICOS E SINAIS CLÍNICOS DAS CRIANÇAS DO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

N	IDADE (meses)	SEXO	PESO (g)	% PESO IDEAL	ESTATURA (cm)	% ESTATURA IDEAL	PERÍMETRO CEFÁLICO(cm)	EDEMA	LESÕES DE PELE	ALTERAÇÃO DE FÂNEROS	HEPATOMEGALIA
15	27	M	8.000	59	79,5	89	45,5	Não	Não	Sim	Sim
16	42	M	8.500	54	90,0	91	46,0	Não	Não	Sim	Não
17	17	F	6.300	57	66,0	83	44,0	Sim	Não	Sim	Sim
18	18	M	8.100	68	72,0	87	45,0	Sim	Não	Sim	Sim
19	15	M	5.500	49	70,0	88	44,0	Sim	Não	Sim	Sim
20	10	M	4.500	47	63,0	87	39,5	Sim	Sim	Sim	Sim
21	30	M	9.170	65	79,0	86	45,0	Sim	Sim	Sim	Sim
22	24	M	6.900	53	70,0	80	46,0	Sim	Sim	Sim	Sim
23	36	M	10.200	68	86,0	90	47,5	Sim	Não	Sim	Não
24	18	M	6.100	51	72,0	87	42,5	Sim	Sim	Sim	Sim
25	26	M	7.840	58	76,0	85	46,5	Sim	Não	Sim	Sim
26	14	M	7.780	72	71,5	92	44,0	Sim	Sim	Sim	Não
27	23	F	6.000	48	74,0	87	43,5	Sim	Não	Sim	Não

ANEXO 2 - EXAMES LABORATORIAIS DAS CRIANÇAS DO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

N	PROTEÍNA TOTAL (g/dl)	ALBUMINA (g/dl)	GLOBULINA (g/dl)	HEMOGLOBINA (g/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)	LINFÓCITOS /mm ³	LINF.T (%)	LINF.T /mm ³	LINF.B (%)	LINF.B /mm ³
01	4,67	3,09	1,58	9,6	1050	423	96	5670	24	1361	9	510
02	5,00	3,39	1,61	5,3	990	147	134	2697	35	944	10	270
03	6,40	3,06	3,34	7,7	1460	303	178	4153	42	1744	8	332
04	6,20	3,45	2,75	10,2	1075	130	26	8360	33	2759	14	1170
05	3,37	2,35	1,02	9,5	765	147	86	3876	18	698	9	349
06	3,60	2,34	1,26	11,9	890	122	161	3420	12	410	8	274
07	4,38	3,15	1,23	10,9	835	172	96	2160	26	562	15	324
08	3,87	2,87	1,00	8,2	1130	201	280	3432	29	995	12	412
09	4,00	2,80	1,20	10,5	1020	250	119	1890	32	605	12	227
10	3,40	2,59	0,81	9,9	625	92	62	3000	31	930	8	240
11	2,17	1,87	0,30	11,0	650	139	82	1920	40	768	8	154
12	3,51	2,90	0,61	10,8	1050	130	70	3880	35	1358	12	466
13	2,54	1,50	1,04	8,7	890	201	128	2400	36	864	9	216
14	6,30	3,30	3,00	9,9	1690	210	232	3683	24	884	11	405

ANEXO 2 (CONT.) - EXAMES LABORATORIAIS DAS CRIANÇAS DO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

N	PROTEÍNA TOTAL (g/dl)	ALBUMINA (g/dl)	GLOBULINA (g/dl)	HEMOGLOBINA (g/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)	LINFÓCITOS /mm ³	LINF.T (%)	LINF.T /mm ³	LINF.B (%)	LINF.B /mm ³
15	3,25	2,09	1,16	10,4	915	292	74	6138	44	2701	15	921
16	3,08	2,46	0,62	9,4	1020	92	166	4000	41	1640	15	600
17	3,71	2,96	0,75	11,8	1160	182	91	5684	30	1705	12	682
18	2,98	2,12	0,86	10,2	1130	303	74	1494	32	478	15	224
19	4,28	3,12	1,16	8,5	475	105	74	3968	30	1190	15	595
20	4,76	2,84	1,92	6,9	605	85	100	9063	31	2810	19	1722
21	3,48	1,91	1,57	9,7	1620	182	324	4636	40	1854	16	742
22	3,25	1,45	1,80	8,5	915	201	134	3740	37	1384	16	598
23	3,89	2,41	1,48	11,4	650	130	91	4095	30	1228	21	860
24	4,09	2,45	1,64	9,0	1020	123	128	7729	32	2473	12	927
25	5,96	3,30	2,66	9,2	1160	201	119	3420	40	1368	20	684
26	4,30	2,64	1,66	10,5	1160	130	128	4796	37	1774	9	432
27	3,06	1,35	1,71	6,0	1680	126	59	2380	34	809	16	381

ANEXO 3 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS DAS CRIANÇAS DO GRUPO-CONTROLE.

N	IDADE (meses)	SEXO	PESO (g)	% PESO IDEAL	ESTATURA (cm)	% ESTATURA IDEAL	PERÍMETRO CEFÁLICO(cm)
01	06	M	8.120	103	67,0	101	45,5
02	11	F	11.600	127	74,0	102	46,0
03	22	F	11.200	92	81,0	96	48,0
04	11	F	8.270	90	72,0	100	44,5
05	15	F	10.100	97	77,0	100	47,0
06	13	M	13.000	124	90,0	118	45,5
07	18	F	11.250	101	82,0	102	46,0
08	47	F	15.200	92	99,5	98	50,0
09	24	F	13.000	103	88,0	102	50,0
10	15	M	10.350	94	80,0	101	46,5
11	08	F	9.600	119	69,5	102	45,0
12	13	M	9.580	91	75,5	99	45,0
13	22	M	13.000	103	91,0	107	49,0
14	24	F	13.400	107	86,0	100	47,0
15	26	M	12.900	96	85,0	95	48,5
16	43	M	15.000	94	94,0	94	52,0
17	17	F	10.620	97	77,5	98	46,5
18	17	M	12.150	105	81,0	100	48,0
19	15	M	9.950	90	77,5	98	47,0
20	09	M	8.650	95	70,0	98	47,0
21	31	M	12.900	91	92,0	100	50,0
22	23	M	15.000	117	90,0	104	49,5
23	37	M	14.000	93	94,5	98	51,0
24	17	M	11.700	101	76,0	93	48,5
25	26	M	12.300	92	82,5	93	50,0
26	15	M	11.230	102	76,0	96	49,0
27	23	F	11.500	93	84,0	98	46,0

ANEXO 4 - EXAMES LABORATORIAIS DAS CRIANÇAS DO GRUPO-CONTROLE.

N	PROTEÍNA TOTAL(g/dl)	ALBUMINA (g/dl)	GLOBULINA (g/dl)	HEMOGLOBINA (g/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)	LINFÓCITOS /mm ³	LINF.T (%)	LINF.T /mm ³	LINF.B (%)	LIN.B /mm ³
01	7,61	4,83	2,78	11,4	1045	172	54	12008	57	6844	18	2161
02	6,89	4,71	2,18	11,8	890	201	54	8556	35	2995	17	1454
03	6,67	5,23	1,44	9,1	860	139	25	4346	42	1825	15	652
04	5,87	4,61	1,26	10,0	1160	211	134	7467	40	2987	13	971
05	7,61	4,83	2,78	9,8	670	182	62	10404	47	4890	10	1040
06	7,58	5,42	2,16	10,2	1430	201	109	6419	36	2311	19	1220
07	6,88	4,91	1,97	9,5	1430	230	114	12726	35	4454	12	1527
08	6,43	4,50	1,93	11,6	835	123	66	3608	59	2129	16	577
09	6,76	4,91	1,85	12,2	1100	172	74	3600	40	1440	13	468
10	7,01	5,05	1,96	9,8	860	71	55	7923	40	3169	12	951
11	7,14	4,84	2,30	10,3	740	155	59	6400	30	1920	11	704
12	7,00	5,08	1,92	9,5	1075	130	50	9548	38	3628	14	1337
13	6,93	4,79	2,14	10,5	860	99	91	3200	30	960	18	576
14	7,40	5,25	2,15	11,5	1320	156	8	4972	42	2088	11	547

ANEXO 4 (CONT.) - EXAMES LABORATORIAIS DAS CRIANÇAS DO GRUPO-CONTROLE.

N	PROTEÍNA TOTAL(g/dl)	ALBUMINA (g/dl)	GLOBULINA (g/dl)	HEMOGLOBINA (g/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)	LINFÓCITOS /mm ³	LINF.T (%)	LINF.T /mm ³	LINF.B (%)	LINF.B /mm ³
15	7,13	4,81	2,32	9,8	1245	155	78	7320	29	2123	22	1610
16	6,40	4,60	1,80	11,3	1045	147	78	4704	41	1929	11	517
17	6,14	4,71	1,43	9,9	1020	220	62	3900	42	1638	14	546
18	7,82	4,98	2,84	10,8	810	123	44	8804	41	3610	10	880
19	6,41	4,62	1,79	10,9	1215	99	37	6063	39	2364	11	667
20	7,27	4,90	2,37	13,0	580	51	25	4290	38	1630	15	643
21	6,98	4,85	2,13	11,7	940	114	66	4730	42	1987	8	378
22	6,98	4,99	1,99	10,5	860	130	66	3174	30	952	9	286
23	6,50	4,85	1,65	14,2	1045	92	62	10890	38	4138	12	1307
24	7,09	4,81	2,28	11,5	1305	172	50	7245	34	2463	12	869
25	6,33	4,90	1,43	11,4	1045	201	78	5700	40	2280	20	1140
26	7,39	5,23	2,16	11,8	1290	178	55	7344	39	2864	10	734
27	7,66	5,14	2,52	12,6	1140	126	35	4509	42	1894	12	541

ANEXO 5 - RESPOSTA EM MILIMETROS AOS TESTES CUTÂNEOS.

N	DESNUTRIDOS				CONTROLES			
	PPD	TOXÓIDE TETÂNICO	CANDIDINA	VARIDASE	PPD	TOXÓIDE TETÂNICO	CANDIDINA	VARIDASE
01	0	0	0	0	6	0	2	0
02	0	0	0	0	2	1	7	0
03	0	2	2	2	4	0	7	9
04	0	0	2	0	4	2	9	8
05	0	0	7	0	4	0	7	0
06	0	0	0	0	3	0	5	1
07	0	0	0	0	6	0	12	7
08	0	3	0	0	0	0	3	0
09	0	0	0	0	7	0	7	6
10	2	0	3	2	3	0	0	0
11	0	0	0	0	7	0	10	7
12	0	0	0	2	3	0	5	1
13	0	0	0	0	3	3	9	7
14	0	0	0	0	6	0	9	7
15	0	0	2	0	0	4	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	7
17	2	0	0	0	7	0	5	4
18	0	0	0	0	3	0	10	3
19	0	0	0	0	7	0	9	0
20	0	0	0	0	4	0	9	3
21	0	0	2	0	0	0	9	0
22	0	0	0	0	3	0	7	6
23	6	0	0	0	4	0	7	0
24	0	0	9	8	9	0	6	6
25	4	0	1	5	4	0	6	3
26	2	0	4	3	10	0	10	9
27	0	0	0	0	9	0	9	9

ANEXO 6 - E-ROSETA NOS 6 EXPERIMENTOS DO GRUPO DE DESNUTRIDOS.

N	E.1		E.2		E.3		E.4		E.5		E.6	
	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³
01	31	1758	39	2211	45	2552	12	680	49	2778	40	2268
02	46	1241	38	1025	45	1214	36	971	55	1483	50	1348
03	70	2907	45	1869	60	2492	43	1786	63	2616	63	2616
04	54	4514	44	3678	47	3929	31	2592	56	4682	66	5518
05	28	1085	21	814	21	814	15	581	25	969	36	1395
06	30	1026	24	821	28	958	15	513	35	1197	38	1300
07	35	756	33	713	26	562	25	540	30	648	35	756
08	38	1304	38	1304	40	1373	30	1030	38	1304	42	1441
09	43	813	46	869	44	832	27	510	53	1002	51	964
10	22	660	35	1050	38	1140	22	660	40	1200	41	1230
11	41	787	34	653	40	768	34	653	49	941	49	941
12	35	1358	35	1358	44	1707	33	1280	30	1164	44	1707
13	45	1080	36	864	40	960	36	864	52	1248	54	1296
14	26	958	33	1215	45	1657	25	921	34	1252	48	1768
15	51	3130	48	2946	48	2946	48	2946	61	3744	51	3130
16	52	2080	54	2160	53	2120	44	1760	44	1760	57	2280
17	42	2387	34	1932	34	1932	30	1705	40	2274	41	2330
18	38	568	36	538	38	568	33	493	46	687	42	627
19	39	1548	29	1151	40	1587	35	1389	30	1190	27	1071
20	38	3444	39	3534	39	3534	30	2719	42	3806	52	4713
21	55	2550	48	2225	46	2132	44	2040	60	2782	61	2828
22	50	1870	39	1459	43	1608	36	1346	33	1234	53	1982
23	34	1392	33	1351	30	1228	29	1188	38	1556	34	1392
24	34	2628	30	2319	30	2319	29	2241	40	3092	32	2473
25	44	1505	45	1539	26	889	39	1334	44	1505	41	1402
26	38	1822	38	1822	41	1966	38	1822	45	2158	42	2014
27	40	952	39	928	39	928	33	785	44	1047	46	1095

E.1 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole

E.2 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro homólogo

E.3 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro autólogo

E.4 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas

E.5 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro homólogo

E.6 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro autólogo

ANEXO 7 - E-ROSETA NOS 6 EXPERIMENTOS DO GRUPO-CONTROLE.

N	E.1		E.2		E.3		E.4		E.5		E.6	
	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³	%	/mm ³
01	59	7085	43	5163	48	5764	57	6844	56	6724	58	6965
02	33	2823	33	2823	34	2909	35	2995	36	3080	35	2995
03	40	1738	41	1782	41	1782	40	1738	39	1695	43	1869
04	38	2837	38	2837	39	2912	40	2987	26	1941	37	2763
05	39	4058	54	5618	49	5098	52	5410	54	5618	51	5306
06	39	2503	27	1733	30	1926	36	2311	33	2118	35	2247
07	30	3818	36	4581	30	3818	32	4072	28	3563	34	4327
08	58	2093	66	2381	64	2309	60	2165	64	2309	40	1443
09	35	1260	36	1296	32	1152	34	1224	44	1584	44	1584
10	48	3803	43	3407	34	2694	40	3169	45	3565	43	3407
11	27	1728	28	1792	26	1664	31	1984	30	1920	30	1920
12	38	3628	44	4201	45	4297	42	4010	38	3628	42	4010
13	30	960	30	960	33	1056	26	832	30	960	29	928
14	40	1989	41	2038	41	2038	40	1989	39	1939	43	2138
15	30	2196	25	1830	30	2196	28	2050	21	1537	28	2050
16	43	2023	29	1364	42	1976	30	1411	33	1552	44	2070
17	40	1560	42	1638	46	1794	43	1677	42	1638	42	1638
18	32	2817	37	3257	40	3522	32	2817	40	3522	35	3081
19	38	2304	36	2183	35	2122	40	2425	39	2364	40	2425
20	35	1502	30	1287	19	815	22	944	38	1630	31	1330
21	42	1987	39	1845	39	1845	31	1466	20	946	40	1892
22	42	1333	43	1365	30	952	32	1016	43	1365	41	1301
23	33	3594	28	3049	30	3267	34	3703	30	3267	45	4900
24	37	2681	48	3478	20	1449	33	2391	35	2536	25	1811
25	39	2223	28	1596	30	1710	38	2166	39	2223	45	2565
26	38	2791	36	2644	35	2570	40	2938	39	2864	40	2938
27	40	1804	41	1849	41	1849	40	1804	39	1758	43	1939

E.1 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole

E.2 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro homólogo

E.3 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com soro autólogo

E.4 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas

E.5 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro homólogo

E.6 - Linfócitos incubados a 37°C por 2 horas com levamisole e soro autólogo