

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

III — Patologia comparada da infecção por amostras de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania tropica*, em animais de laboratório

E. COUTINHO ⁽¹⁾ e Marcelo V. COELHO ⁽²⁾

RESUMO

No presente trabalho, faz-se um estudo comparativo da patologia da infecção experimental de animais de laboratório por diferentes amostras de *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. tropica*, isoladas de casos clínicos típicos de leishmaniose tegumentar difusa, leishmaniose cutâneo-mucosa, “úlceras de los chicleros” e botão do Oriente. As inoculações foram feitas por via subcutânea (focinho, base da cauda), intraescrotal, intraperitoneal e intraesplênica, tendo-se utilizado, em muitos animais, mais de uma via, simultaneamente. Foram empregados, ao todo, 201 animais, sendo 75 camundongos albinos, 125 hamsters dourados, de ambos os sexos e 1 macaco *Rhesus*, infetados mais ou menos aos 2 meses de idade. O tempo de infecção variou de 48 horas a 580 dias, de acordo com cada amostra considerada (Quadro I). A lesão macroscópica, do tipo nódulo-tumoral, nodular ulcerado ou úlcero-crostoso, era comum à patologia de todas as amostras estudadas, parecendo, contudo, serem as lesões úlcero-crostosas mais frequentes nas infecções pela *L. tropica*. A hepato-esplenomegalia foi de ocorrência rara, exceto nos casos de infecção por *L. mexicana* que mostraram visceralização. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a dificuldade de caracterização de espécies ou subespécies de *Leishmania*, com base, apenas, nos achados histopatológicos, porém sugerem que esse recurso permite, até certo ponto, suspeitar do agente etiológico. Vale mencionar os seguintes elementos que ajudam no diagnóstico diferencial da infecção experimental em hamsters e camundongos: 1) os infiltrados cutâneos perivascular e perineurais por células linfo-plasmocitárias, ocorrem caracteristicamente nas infecções por *L. mexicana* e *L. tropica*; 2) os extensos focos dérmicos e hipodérmicos de necrose abcedada, frequentes nas infecções pela *L. mexicana* e pela amostra n.º 4 de *L. braziliensis*, são raros nas infecções por *L. tropica*, apesar de, nestas últimas, as ulcerações superficiais serem muito mais frequentes; 3) a aparência “tuberculóide” da lesão por *L. tropica*, pelo menos na sua fase crônica, é inconfundível, permitindo distingui-la facilmente das outras formas de leishmaniose tegumentar do homem; 4) o parasitismo da epiderme e do endotélio dos pequenos vasos sanguíneos e linfáticos só parece ocorrer na infecção por *L. mexicana*; 5) a presença de gigantócitos no quadro histológico só ocorreu no parasitismo pela *L. tropica*; 6) outros aspectos, tais como a formação de nódulos histiocitários no fígado e baço, a infiltração hepática portal por células imunologicamente competentes, a deposição de substância semelhante à amilóide e a atrofia linfóide do baço, relativamente frequentes e ainda não descritos na

(1) Fundação Instituto Oswaldo Cruz — Instituto de Endemias Rurais — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Caixa Postal 459), Recife, Brasil

(2) Fundação Instituto Oswaldo Cruz — Instituto de Endemias Rurais — Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

leishmaniose tegumentar, foram surpreendidos em presença de tôdas as amostras estudadas no presente trabalho, não tendo validade, portanto, para o diagnóstico diferencial das mesmas.

As lesões cutâneas provocadas pelas três amostras de *L. braziliensis* foram semelhantes, notando-se, apenas, diferenças de ordem quantitativa em relação a alguns componentes do processo reacional.

Lesões renais sugestivas de amiloidose foram encontradas com grande frequência e em presença de tôdas as amostras estudadas.

INTRODUÇÃO

Embora seja universalmente aceito, que os protozoários do gênero *Leishmania* determinam, no homem, pelo menos três doenças distintas (Leishmaniose cutânea, Leishmaniose muco-cutânea e Leishmaniose visceral), é fora de dúvida que o assunto ainda não se acha definitivamente esclarecido.

A ocorrência de diferentes quadros clínicos e o comportamento epidemiológico variado das leishmanioses, sobretudo das suas formas tegumentares, nas Américas, sugerem a existência de variantes clínicas da doença em relação com prováveis diferentes cepas ou mesmo novas subespécies do parasito.

Esse fato ocorreu, por exemplo, com a *Leishmania mexicana*, agente causal da "úlcer de los chicleros", descrita no México^{9, 10, 11}, Guatemala e Honduras Britânica²⁴, forma de leishmaniose tegumentar clinicamente caracterizada por lesões ectimatóides preferencialmente localizadas nos pavilhões auriculares, de evolução crônica, com tendência variável à ulceração e excepcional acometimento das mucosas. A princípio considerada como subespécie de *L. tropica* ou de *L. braziliensis*, foi sugerida, posteriormente, sua especificidade como *Leishmania mexicana*^{23, 29}, em razão de suas particularidades clínicas, epidemiológicas e antigênicas³.

Aliás, a própria *Leishmania b. braziliensis*, descrita por GASPAR VIANNA em 1911⁴⁶, é considerada atualmente não mais como uma espécie isolada, mas como um complexo etiológico integrado por espécies, variedades ou raças biologicamente diferentes^{39, 30}.

Sabe-se que uma das maneiras de efetuar a separação das leishmânias do homem em espécies, subespécies, "grupos" ou raças, é

a observação de diferenças na patogenicidade para os hospedeiros naturais¹⁸. Recorre-se, ainda, às inoculações experimentais em animal suscetível, que fornecem importantes subsídios ao estudo da patogenia e do modo de transmissão das doenças em questão.

Com o intuito de obter novos dados para uma melhor caracterização e individualização das espécies de *Leishmania* que causam as formas tegumentares no homem, vimos realizando uma série de inoculações experimentais em camundongos e hamsters, com diferentes amostras de *Leishmania* oriundas de formas tegumentares humanas, a fim de apreciar o comportamento, em animais de laboratório, de cepas oriundas de casos clínicos típicos.

Em trabalhos anteriores, foram apreciados os aspectos parasitológicos e patológicos ligados à infecção de camundongos e hamsters pela *Leishmania mexicana*, agente causal da "úlcer de los chicleros"^{15, 16}.

No presente trabalho, faz-se um estudo comparativo dos aspectos histopatológicos encontrados em animais experimentalmente infectados com cepas de *Leishmania* oriundas de casos humanos de leishmaniose tegumentar difusa, leishmaniose tegumentar americana (cutâneo-mucosa), "úlcer de los chicleros" e botão do Oriente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados, ao todo, 75 camundongos (*Mus musculus* var. *albino*), 125 hamsters dourados (*Cricetus auratus*), de ambos os sexos, com aproximadamente 2 meses de idade, e 1 macaco *Rhesus*, todos procedentes da colônia do Centro de Pesquisas René

Rachou do Instituto de Endemias Rurais da FIOCRUZ (Belo Horizonte, Brasil).

A distribuição dos animais, de acordo com a cepa com que foram inoculados, achase assim discriminada:

Leishmania braziliensis (amostra n.º 4)
— 20 camundongos e 19 hamsters

Leishmania braziliensis (amostra n.º 6)
— 27 hamsters e 1 macaco *Rhesus*

Leishmania braziliensis (amostra n.º 22)
— 18 hamsters

Leishmania mexicana (amostra n.º 5)
— 55 camundongos e 34 hamsters

Leishmania tropica (amostra n.º 11)
— 9 hamsters

Leishmania tropica (amostra n.º 13)
— 2 hamsters.

Foram estudados, ainda 16 hamsters portadores de infecções mistas, por mais de uma cepa de *Leishmania*, conforme se segue: *L. mexicana* (amostra n.º 5) + *L. donovani* — 2 hamsters; *L. braziliensis* (amostra n.º 4) + *L. mexicana* (amostra n.º 5) — 5 hamsters; *L. tropica* (amostra n.º 11) + *L. mexicana* (amostra n.º 5) — 5 hamsters; *L. braziliensis* (amostra n.º 4) + *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — 1 hamster; *L. braziliensis* (amostra n.º 6) + *L. mexicana* (amostra n.º 5) — 3 hamsters.

As três amostras de *L. braziliensis* aqui utilizadas, foram isoladas de casos clínicos distintos:

— Amostra n.º 6, isolada no Estado do Ceará, em 11/11/1960, de um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa, com lesão ativa da mucosa naso-buco-faríngea;

— Amostra n.º 4, isolada na Bahia, em 11/11/1960, de um caso crônico de leishmaniose nodular difusa, com lesões cutâneas e sem comprometimento das mucosas;

— Amostra n.º 22, isolada em Belém do Pará, de um caso de leishmaniose tegumentar difusa.

As duas amostras de *L. tropica*, ambas isoladas em Israel, foram cedidas pelo Prof. Saul Adler — amostras n.º 11 e n.º 13, respectivamente nomeadas, no Departamento de

Parasitologia da Universidade Hebraica de Jerusalem, como "*L. tropica* Ein Geddi 2" e "*L. tropica* Zamira Salah", tendo sido recebidas em nosso laboratório em 24/10/1961 e 22/04/1962.

A amostra de *L. mexicana* (cepa n.º 5) foi também enviada pelo Prof. Adler, tendo sido isolada em Honduras Britânica, em 07/04/1961, pelo Prof. P. C. C. Garnham, da Escola de Medicina Tropical de Londres, de um caso humano de leishmaniose cutânea.

Os parasitos vêm sendo mantidos no Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou, do Instituto de Endemias Rurais, da FIOCRUZ, em Belo Horizonte, desde seu isolamento ou recebimento em laboratório. São cultivados nos meios de Novy — Neal — Nicolle (N. N. N.) e de ágar-sangue (meio de Adler), bem como mantidos em animais de laboratório.

As amostras de *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. mexicana* são mantidas, paralelamente, em hamsters sírios, *Cricetus auratus*, sendo feitas subinoculações bimensais. As amostras de *L. braziliensis* (amostra n.º 4) e de *L. mexicana* (amostra n.º 5), são mantidas, adicionalmente, em camundongos brancos (*Mus musculus*), sendo subinoculados com intervalos de 90 dias.

As inoculações foram feitas por via subcutânea (focinho, base da cauda), intrascrotal, intraperitoneal e intraesplênica, tendo sido diversos animais inoculados por mais de uma via, simultaneamente.

O tempo de infecção variou, em relação às diferentes cepas, conforme pode ser apreciado no Quadro I.

A patologia da infecção pela amostra n.º 5 (*L. mexicana*) já foi objeto de publicação anterior¹⁶, de modo que sua inclusão no presente trabalho foi feita, apenas, para fins comparativos.

Os animais foram sacrificados após anestesia pelo éter, sendo os seus tecidos fixados em líquido de Bouin e formol a 10%. Após inclusão em parafina, foram feitos cortes de 6 micra, tendo-se utilizado as seguintes técnicas histológicas: colorações pela Hematoxilina-Eosina, Hemalumen de Mayer, tricrômico de Mallory Russel, Benhold (amido), PAS, Hematoxilina fosfotúngstica de

QUADRO I

Distribuição dos animais em relação à cepa utilizada e ao tempo de infecção

Cepas	Tempo de infecção (dias)
I — Infecções simples:	
<i>Leishmania braziliensis</i> (amostra n.º 4)	2 a 343
<i>Leishmania braziliensis</i> (amostra n.º 6)	6 a 372
<i>Leishmania braziliensis</i> (amostra n.º 22)	16 a 278
<i>Leishmania mexicana</i> (amostra n.º 5)	80 a 580
<i>Leishmania tropica</i> (amostra n.º 11)	184 a 383
<i>Leishmania tropica</i> (amostra n.º 13)	190
II — Infecções combinadas:	
<i>L. mexicana</i> + <i>L. donovani</i> (amostras 5 + 8)	54 a 90
<i>L. braziliensis</i> + <i>L. mexicana</i> (amostras 4 + 5)	175
<i>L. tropica</i> + <i>L. mexicana</i> (amostras 11 + 5)	188
<i>L. braziliensis</i> + <i>L. braziliensis</i> (amostras 4 + 6)	2
<i>L. braziliensis</i> + <i>L. mexicana</i> (amostras 6 + 5)	30

Mallory, impregnação do retículo pelo método de Perdrau. Cortes de 10 a 15 micra foram feitos no micrótomo de congelação e corados pelo Sudam III para pesquisa de gordura.

A descalcificação do material ósseo foi realizado em ácido nítrico a 5% em álcool a 70%, durante 7 a 10 dias.

RESULTADOS

I — PATOLOGIA MACROSCÓPICA

A lesão cutânea era geralmente do tipo nódulo-tumoral, nodular ulcerado ou úlcero-crosto, independentemente da cepa utilizada.

Nos animais inoculados com *L. tropica*, contudo, parecia ser mais freqüente a ocorrência de lesões úlcero-crostoas, enquanto que nos animais infetados com *L. braziliensis* (amostras n.ºs. 4 e 6) e *L. mexicana* (amostra n.º 5), o tipo nódulo tumoral foi presenciado na maioria dos casos.

Todos os órgãos mostraram-se macroscopicamente normais. Hepatomegalia foi observada apenas em dois hamsters inoculados com *L. tropica* (amostra n.º 11) e em 90% dos animais inoculados com *L. mexicana* (amostra n.º 5). Esplenomegalia ocorreu em apenas 1 hamster infetado com *L. braziliensis* (amostra n.º 4), 2 hamsters inoculados com *L. tropica* (amostra n.º 11) e 90% dos hamsters infetados com *L. mexicana* (amostra n.º 5).

II — PATOLOGIA MICROSCÓPICA

A — Infecções isoladas:

1) PELE — Nas infecções com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis*, a lesão mais precoce foi surpreendida 48 horas após, sendo representada por pequena concentração focal de mononucleares no derma, imediatamente abaixo de uma zona de ulceração epidérmica, com presença de alguns amastigotos (leishmânias) (Fig. 1).

Esse infiltrado dérmico, às vezes acrescido de polimorfonucleares, torna-se depois, difuso.

Aos 4 meses, já se acha constituída extensa lesão granulomatosa difusa do derma, predominantemente representada por histiócitos claros, univacuolados, com parasitismo de intensidade variável (Fig. 2). Também ocorrem aumento da vascularização dérmica, embebição aquosa intersticial e fragmentação do arcabouço reticulínico, sobretudo nos animais inoculados por via escrotal.

Mononucleares, em quantidade variável, podem estar presentes, mas não assumem nenhuma distribuição sistematizada. As células gigantes são extremamente raras. São frequentes, contudo, os focos de necrose abcedada, particularmente em zonas de maior condensação parasitária, às vezes coalescendo e formando extensas áreas que se abrem para a superfície (Fig. 3). Não foi observado parasitismo da epiderme, nem comprometimento da mucosa nasal.

Em alguns casos, ocorre atrofia do epitélio ou formação de áreas de acantose.

Nas infecções com a amostra n.º 6 de *L. braziliensis*, a lesão granulomatosa, na pele do hamster, muito se assemelha àquela encontrada nas infecções com a amostra anterior (Fig. 14), inclusive nas suas fases iniciais, salvo pelo aspecto dos histiócitos, que assumem, mais comumente, o tipo esponjoso ("foam-cells"). Contudo, a ulceração, a acantose e a necrose dérmica (Fig. 15), parecem ser pouco menos frequentes; a epiderme nunca se mostra parasitada; os infiltrados cutâneos perivascularares, tão característicos das infecções com *L. mexicana*, são raramente observados; e jamais conseguiu-se surpreender parasitismo da medula dos ossos da cabeça, mesmo em animais com exuberante lesão ao nível do focinho, apesar da mesma se infiltrar pelos tecidos moles circunvizinhos, comprometendo a lâmina própria do epitélio da mucosa nasal.

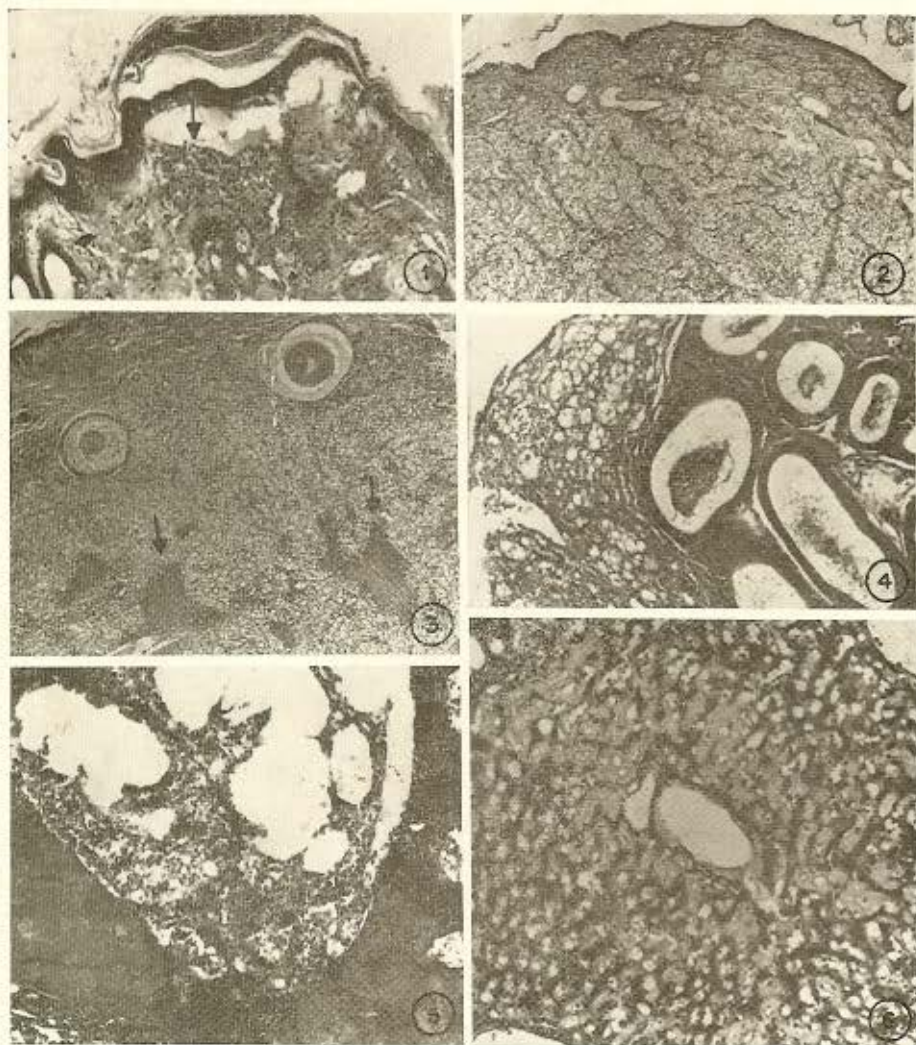
No macaco *Rhesus*, o exame de uma biopsia obtida de nódulo nasal, com 2 meses de evolução, revelou a presença, na porção profunda do derma, de numerosos granulomas concêntricos, constituídos de mononucleares, com histiócitos de citoplasma róseo, parasitos mal evidenciáveis, alguns gigantócitos e reação fibro-colágena na periferia dos mesmos, caracterizando, portanto, uma reação de tipo eminentemente produtivo, não encontrada em hamsters, mesmo em períodos mais crônicos da infecção (Figs. 19 e 20).

Nas infecções com a amostra n.º 22 de *L. braziliensis*, a lesão cutânea também assume características semelhantes às obtidas com a amostra n.º 4, chamando a atenção, porém, na fase crônica, a extraordinária riqueza de parasitos, ora livres ora contidos em grandes histiócitos univacuolados e a menor frequência de edema intersticial, tendo a lesão aspecto "compacto", na maioria dos casos (Figs. 21, 22 e 23).

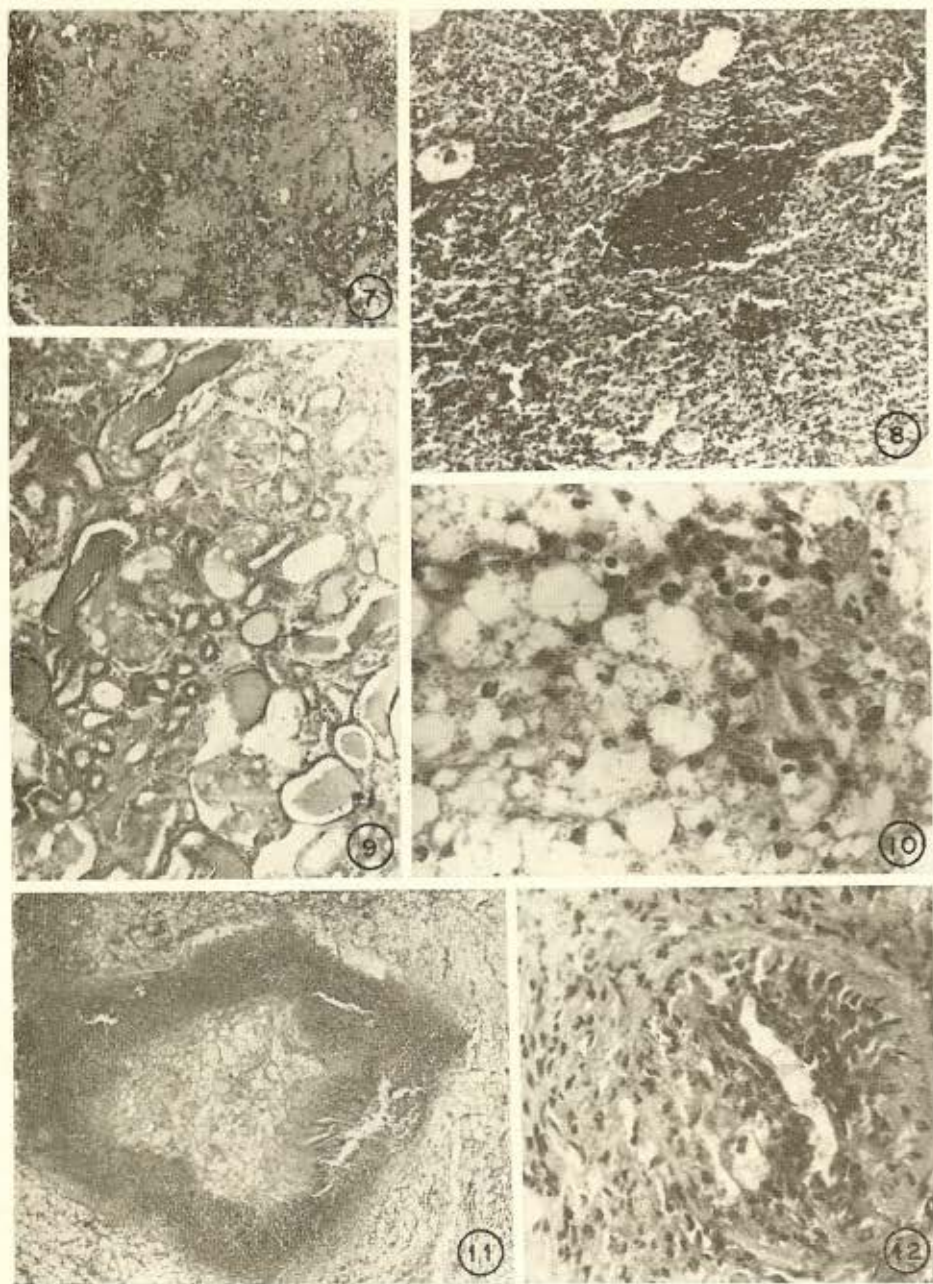
Nas infecções com a *L. mexicana*, a lesão principal localiza-se no derma e hipoderma, assumindo dois aspectos fundamentais: o tipo "compacto", (Fig. 10) onde os histiócitos são de grandes dimensões, com vacúolo citoplasmático único e amastigotos geralmente dispostos em corôa no seu citoplasma; e o tipo "frouxo", caracterizado por embebição aquosa tissular de intensidade variável, com histiócitos menores, multivacuolados ("foam cells") e fragmentação do retículo, sendo os parasitos, então, menos abundantes do que no tipo anterior.

A infiltração linfo-plasmocitária, com tendência a se concentrar em tórno de vasos e filetes nervosos locais; a frequente ocorrência de extensos focos de necrose purulenta (Fig. 11); o parasitismo e a hiperplasia endotelial de vasos sanguíneos (sobretudo capilares e veias), condicionando aspectos de flebite leishmaniótica obstrutiva ou semi-obstrutiva (Fig. 12); e a formação de "micropopolipos", às custas de aglomerações de células histiocitárias parasitadas, nas válvulas de vasos linfáticos dilatados, são, também, características do quadro histopatológico desse tipo de leishmaniose.

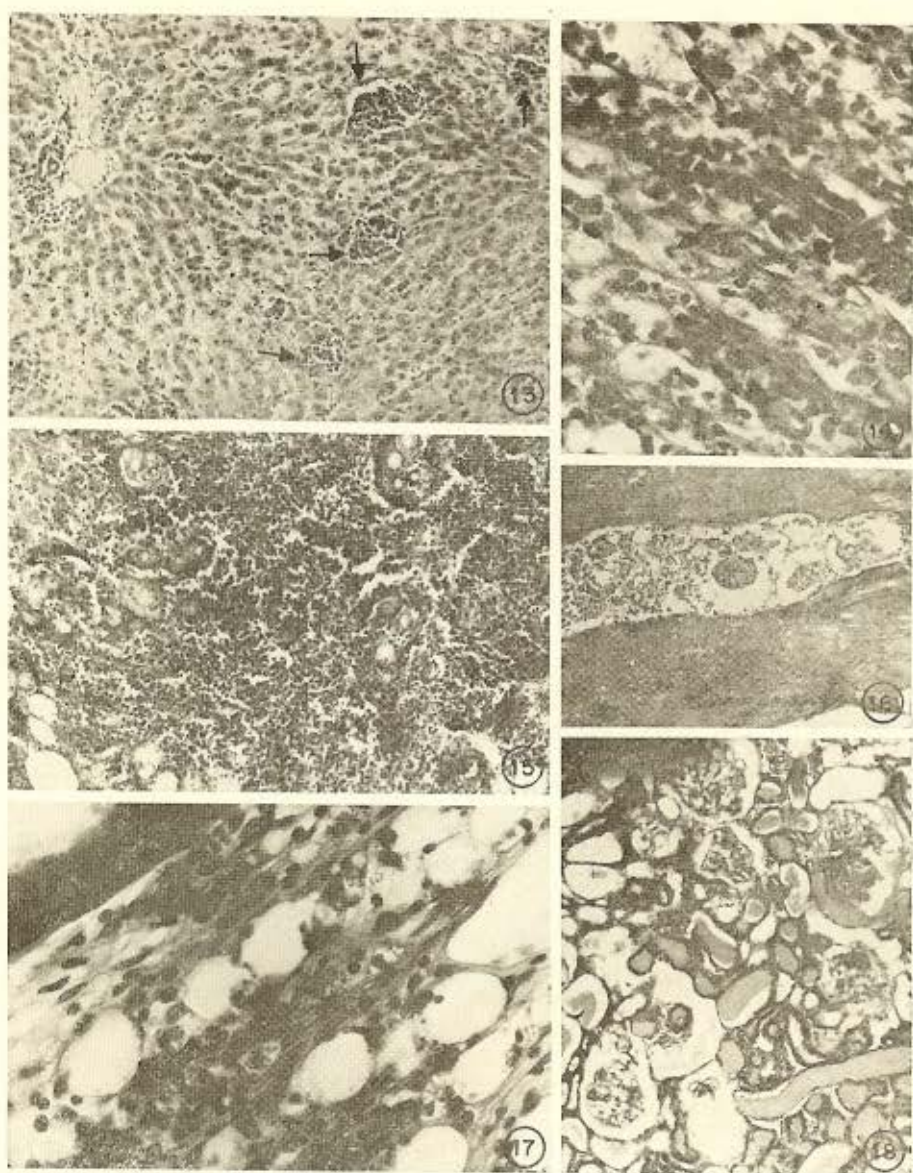
Na infecção por *L. tropica*, a lesão inicial é constituída por uma condensação de mononucleares e polimorfonucleares, no derma (Fig. 27). Em sua fase crônica, a lesão dérmica é sempre compacta, formada por conglomerados de células epitelióides contendo numerosos amastigotos e assumindo uma aparência tuberculóide (Fig. 28). Na periferia desses aglomerados celulares ocorre um infiltrado linfo-plasmocitário, com tendência a circundar vasos e filetes nervosos locais (Figs. 29 e 30). Gigantócitos podem estar presentes. Muito raramente, a lesão assume o tipo histiocitário difuso, mostrando mononucleares entremeados com histiócitos. Não foi surpreendido parasitismo do endotélio vas-



- Fig. 1 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Infiltração inflamatória focal na pele do focinho, 48 horas após a inoculação. (H. E., 40 ×)
- Fig. 2 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Aspecto geral da lesão na pele da bolsa escrotal. Ausência de perivascularites. (H. E., 10 ×)
- Fig. 3 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Derma preservada, notando-se a existência de focos de necrose no hipoderma. (H. E., 10 ×)
- Fig. 4 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Lesão granulomatosa na bolsa escrotal, envolvendo o epidídimo. (H. E., 40 ×)
- Fig. 5 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Presença de histiócitos parasitados no interior da medula de osso da pata. (H. Mayer 40 ×)
- Fig. 6 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Deposição de substância amilóide nos sinusóides hepáticos. (H. E., 40 ×)



- Fig. 7 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Intensa amiloidose do baco (H. E., 40 ×)
 Fig. 8 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Baco com atrofia dos folículos de Malpighi. (H. E., 40 ×)
 Fig. 9 — *L. braziliensis* (amostra n.º 4) — Dilatação dos túbulos renais, com deposição de substância amilóide nos glomérulos e em alguns túbulos. (H. E., 40 ×)
 Fig. 10 — *L. mexicana* (amostra n.º 5) — Aspecto da lesão na pele do focinho, observando-se intenso parasitismo das células histiocitárias. (H. E., 160 ×)
 Fig. 11 — *L. mexicana* (amostra n.º 5) — Extensa área de necrose abcedada no centro da lesão (pele do focinho). (H. E., 10 ×)
 Fig. 12 — *L. mexicana* (amostra n.º 5) — Hiperplasia e parasitismo do endotélio de uma veia (endoflebite leishmaniótica semi-obstrutiva). (H. E., 160 ×)



- Fig. 13 — *L. mexicana* (amostra n.º 5) — Conglomerados de células histiocitárias parasitadas, formando nódulos, no fígado. (H. E., 40 ×)
- Fig. 14 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Aspecto geral da lesão na pele do focinho, vendo-se numerosos histiócitos parasitados. (H. E., 160 ×)
- Fig. 15 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Infiltração inflamatória da pele do focinho, com tendência à necrose. (H. E., 64 ×)
- Fig. 16 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Presença de histiócitos parasitados na medula óssea. (H. E., 40 ×)
- Fig. 17 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Tecido granulomatoso, com numerosos histiócitos parasitados, envolvendo o epidídimo. (H. E., 160 ×)
- Fig. 18 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Dilatação tubular e presença de substância albuminóide na luz da cápsula de Bowmann e no interior dos túbulos. (H. E., 40 ×)

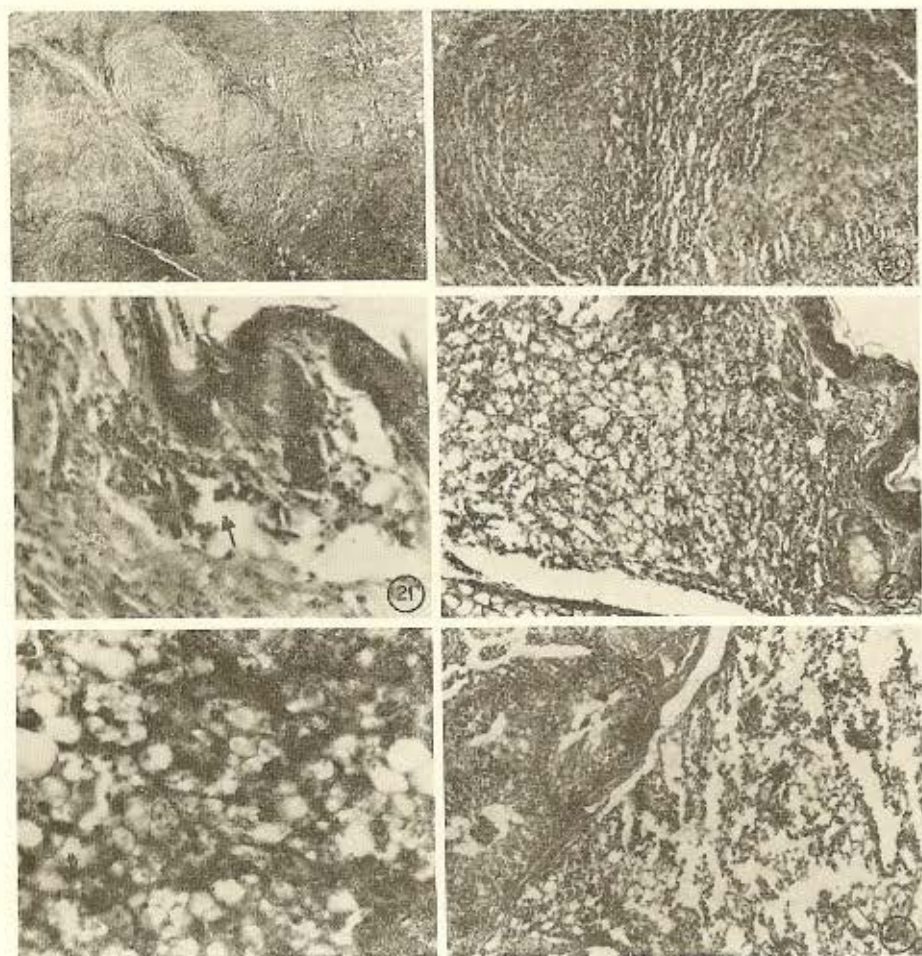


Fig. 19 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Nódulo da orelha de macaco *Rhesus* mostrando reação do tipo produtivo, tendendo a formar conglomerados celulares, de aspecto totalmente diferente do observado em camundongos e hamsters (comparar com a Fig. 14). (H. E., 10 ×)

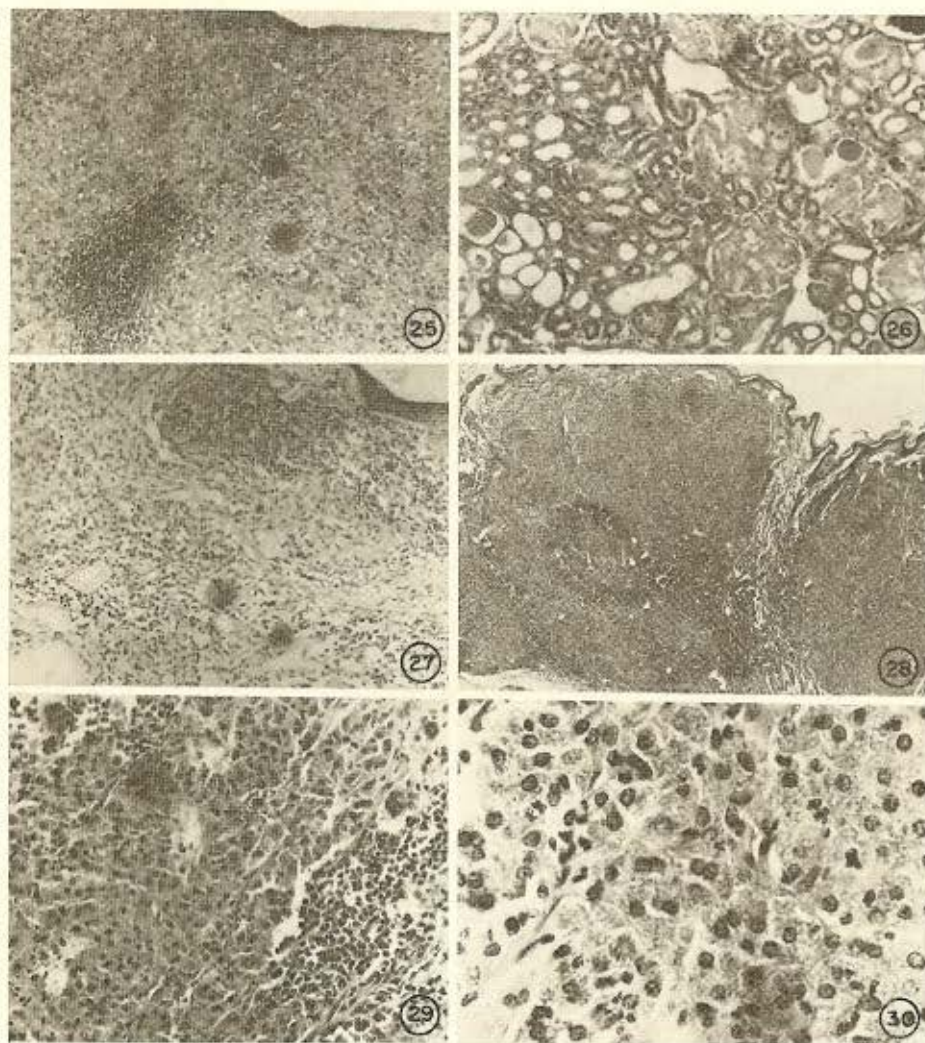
Fig. 20 — *L. braziliensis* (amostra n.º 6) — Mesma lesão anterior, observada com maior aumento. (H. E., 40 ×)

Fig. 21 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — Lesão inicial, na pele da bolsa escrotal, representada por discreto acúmulo de células predominantemente linfoplasmocitárias. (H. E., 64 ×)

Fig. 22 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — Aspecto geral da lesão na pele da orelha. (H. E., 40 ×)

Fig. 23 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — A mesma lesão observada com maior aumento, notando-se a riqueza de parasitos. (H. E., 160 ×)

Fig. 24 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — Granuloma parasitário envolvendo o testículo. (H. E., 40 ×)



- Fig. 25 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — Amiloidose do baço. (H. E., 40 ×)
 Fig. 26 — *L. braziliensis* (amostra n.º 22) — Amiloidose dos glomérulos renais. (H. E., 40 ×)
 Fig. 27 — *L. tropica* — Lesão inicial na pele do focinho, representada por condensação de células inflamatórias no derma. (H. E., 40 ×)
 Fig. 28 — *L. tropica* — Lesão antiga na pele do focinho, notando-se o arranjo do tipo "tuberculóide". (H. E., 10 ×)
 Fig. 29 — *L. tropica* — A mesma lesão observada com maior aumento, notando-se o citoplasma compacto das células parasitadas e infiltrados inflamatórios com tendência a envolver vasos locais e filetes nervosos. (H. E., 40 ×)
 Fig. 30 — *L. tropica* — Detalhe da figura anterior, mostrando a abundância de amastigotos e o aspecto das células parasitadas. (H. E., 160 ×)

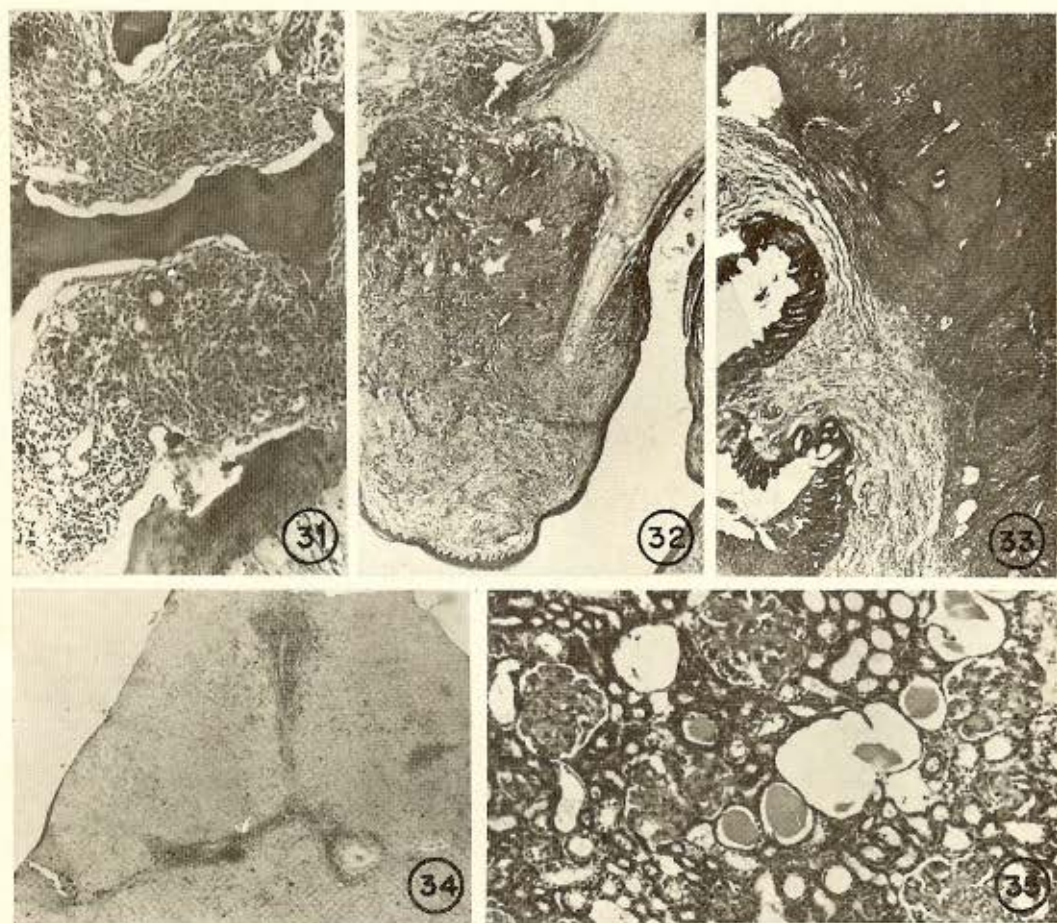


Fig. 31 — *L. tropica* — Medula de osso da cabeça invadida por tecido granulomatoso parasitado. (H. E., 40 ×)

Fig. 32 — *L. tropica* — Relações da lesão granulomatosa da pele do focinho com o tecido cartilaginoso subjacente, que é inteiramente respeitado. (H. E., 10 ×)

Fig. 33 — *L. tropica* — Granuloma parasitário envolvendo o reto (inoculação por via escrotal). (H. E., 10 ×)

Fig. 34 — *L. tropica* — Intensa amiloidose esplênica. (H. E., 10 ×)

Fig. 35 — *L. tropica* — Amiloidose dos glomérulos, dilatação tubular e presença de cilindros nos túbulos renais. (H. E., 40 ×)

cular nem da epiderme. Esta, freqüentemente sofre ulceração, mas a acantose da epiderme, bem como o comprometimento da medula dos ossos da cabeça, não parecem ser comuns.

2) FÍGADO — Infiltração portal de grau variável, geralmente discreta ou moderada, pode ocorrer em qualquer tipo de leishmaniose tegumentar.

Esse infiltrado é representado por linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares. Deposição de substância amilóide, tanto na parede dos vasos portais como dos sinusóides, também ocorreu nas infecções com as amostras n.º 4 (Fig. 6) 6 e 22 de *L. braziliensis*, com a amostra n.º 11 de *L. tropica* e, principalmente, com a *L. mexicana* (32,7% dos camundongos e 23,5% dos hamsters). Um grau maior ou menor de atrofia das lâminas hepáticas ocorria em relação com a quantidade de substância amilóide depositada, sendo mais acentuada nos animais parasitados pela *L. mexicana*.

Aglomerados de células linfo-histiocitárias, com ou sem parasitos, formando nódulos, foram vistos em alguns animais inoculados com as amostras n.º 4 e 22 de *L. braziliensis* e com a amostra n.º 11 de *L. tropica*, e ainda, em 52 dos 89 animais infetados com *L. mexicana* (52,7% dos camundongos e 70,5% dos hamsters) (Fig. 13).

3) BAÇO — Atrofia dos folículos linfóides de Malpighi foi observada, em graus variáveis, em animais inoculados com todas as amostras de leishmaniose tegumentar referidas no presente trabalho, mostrando-se os folículos mal delimitados, sem centros reacionais aparentes e, nos casos mais intensos, reduzidos a acúmulos focais de células linfóides em torno da arteríola centro-folicular (Fig. 8).

Amiloidose esplênica, do tipo difuso, foi presenciada em animais inoculados com as amostras n.º 4 (Fig. 7) 6 e 22 de *L. braziliensis*, (Fig. 25) com a amostra n.º 11 de *L. tropica* (Fig. 34) e com a *L. mexicana*, com uma intensidade que variou desde a presença de pequenos depósitos em torno dos folículos de Malpighi até à ocorrência de uma amiloidose maciça, no seio da qual ficavam soterrados os remanescentes do tecido linfóide.

A presença de nódulos de histiocitose parasitados foi surpreendida no baço de seis hamsters inoculados com *L. mexicana* e que mostraram visceralização do parasito, e em 2 animais infetados com a amostra n.º 22 de *L. braziliensis*.

Lesões de periesplenite foram encontradas em apenas um animal inoculado com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis*. Hiperplasia linfóide difusa foi vista em animais inoculados com as amostras n.º 4 e 6 de *L. braziliensis*, com a amostra n.º 11 de *L. tropica* e com a *L. mexicana*.

4) RIM — Deposição de substância semelhante à amilóide, ocorreu, em grau variável nos animais inoculados com todas as amostras de todas as espécies estudadas (Figs. 9, 26 e 35).

Essa substância era vista, principalmente, nos capilares do novelo glomerular e parede dos vasos renais, e, nos casos mais intensos, também no tecido intersticial. Era PAS positiva, porém não metacromática, tomando o vermelho congo.

Outras alterações observadas no rim, consistiam na presença de áreas de fibrose focal, com atrofia de glomérulos e dilatação dos túbulos renais, em cuja luz eram vistos numerosos cilindros de aspecto celóide (amostras n.º 4, 6 e 22 de *L. braziliensis*) (Fig. 18). Infiltrados perivascularares do tipo linfo-plasmocitário, ocorreram em animais infetados com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis* e com a *L. mexicana*.

5) MEDULA ÓSSEA — A invasão da medula óssea por histiócitos contendo amastigotos foi também presenciada, em grau variável, em animais inoculados com praticamente todas as amostras de leishmânias cutâneas estudadas no presente trabalho (Fig. 16), com exceção da amostra n.º 13 de *L. tropica*. Os ossos comumente atingidos eram aqueles da abóbada craneana (Figs. 31 e 32), subjacentes à lesão de inoculação (fofinho).

Em apenas um animal infetado com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis* foi surpreendida metástase no derma profundo de uma das patas, com penetração de histiócitos parasitados para dentro da medula óssea (Fig. 5).

QUADRO II

Aspectos patológicos diferenciais, encontrados na infecção experimental de camundongos e hamsters, por diferentes amostras cutâneas de *Leishmania*

Amostras de <i>Leishmania</i>	Achados patológicos principais						
	Hepato-esplenomegalia	Abscessos dérmicos ou hipodérmicos	Lesão de aspecto "tuberculóide"	Infiltrados cutâneos perivascularres e perineurais	Presença de gigantócitos	Parasitismo do endotélio vascular	Parasitismo da medula óssea
<i>L. braziliensis</i> (n.º 4)	-	+	-	-	Raros	-	Raro
<i>L. braziliensis</i> (n.º 6)	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. braziliensis</i> (n.º 22)	-	-	-	-	-	-	Raro
<i>L. mexicana</i> (n.º 5)	++	++	-	+	-	++	+
<i>L. tropica</i> (n.º 11)	-	Raros	++	+	+	- -	Raro
<i>L. tropica</i> (n.º 13)	-	Raros	++	+	+	-	Raro

6) INTESTINO — Em um animal inoculado com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis* e em outro inoculado com a amostra n.º 11 de *L. tropica* (Fig. 33), foi surpreendida a presença de tecido granulomatoso parasitado na lâmina própria da mucosa e ao nível da submucosa retal (animais inoculados por via escrotal). Deposição de substância semelhante a amilóide, ao nível do córion das vilosidades intestinais, foi encontrada, também, nos mesmos animais.

7) OUTROS ÓRGÃOS — Discretos focos de miocardite foram surpreendidos em alguns animais inoculados com as amostras n.º 4 de *L. braziliensis* e n.º 11 de *L. tropica*, porém jamais foram encontrados nesse órgão, parasitos livres ou macrófagos parasitados.

Em alguns animais inoculados no focinho com a amostra n.º 4 de *L. braziliensis*, observou-se metástase para o escroto (Fig. 4); e quando a inoculação era feita no escroto, lesão metastática também ocorreu no focinho. Metástases, foram igualmente encontradas, nas infecções com as amostras n.º 6 (orelha, focinho) e n.º 22 (pata) de *L. braziliensis* (Figs. 17 e 24). Outras lesões, tais como, necrose hepática focal, esplenite aguda, pneumonite, broncopneumonia, hemorragia intra-alveolar, ocorriam menos frequentemente e em presença de qualquer das amostras utilizadas.

B — Infecções associadas

Nas infecções associadas, onde um mesmo animal era simultaneamente infetado por mais de uma amostra de *Leishmania*, observou-se, sempre, uma predominância de lesões atribuíveis à *L. mexicana*, nos animais que eram também infetados com essa espécie; e uma superposição de aspectos histológicos comuns, naqueles infetados com amostras diferentes de *L. braziliensis*.

Os aspectos patológicos diferenciais, observados na infecção experimental de camundongos e hamsters, pelas diferentes amostras cutâneas de *Leishmania*, acham-se sumarizados no Quadro II.

DISCUSSÃO

O grande número de classificações propostas para as leishmanioses cutâneas e de formas clínicas descritas nas Américas^{21, 20, 24}, estão a indicar a necessidade de novas pesquisas para se chegar a uma conclusão definitiva, a respeito da unicidade ou pluralidade dos parasitos envolvidos na produção dos vários tipos de leishmaniose tegumentar.

Sabe-se que a diferenciação das várias espécies de *Leishmania* pode ser feita com os resultados das culturas, infecções em hamsters e em flebótomos. Para ADLER², por

exemplo, o índice de infecção em flebótomos alimentados em hamster infetado, forneceria um dos meios de diferenciar, até mesmo, cepas de *L. donovani*, agente causal do Calazar.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a dificuldade de caracterização de espécies ou subespécies de *Leishmania* com base, apenas, nos achados histopatológicos, porém sugerem que esse recurso permite, até certo ponto, suspeitar do agente etiológico. As lesões cutâneas provocadas pelas três amostras de *L. braziliensis* foram semelhantes, notando-se, apenas, diferenças de ordem quantitativa em relação a alguns componentes do processo reacional.

Assim, no parasitismo da pele pelas amostras n.º 4 e n.º 6 de *L. braziliensis* não ocorre infiltração perivascular por células redondas (linfoplasmocitárias), como é característico nas infecções experimentais pela *L. mexicana*¹⁶ e pela *L. tropica*^{35,26}, e em pacientes humanos portadores de leishmaniose cutâneo-mucosa¹².

O comprometimento da medula dos ossos próximos à lesão de inoculação, relativamente freqüente nos animais infetados com *L. mexicana*, é visto esporadicamente nas infecções pelas amostras de *L. braziliensis* e *L. tropica*. O comprometimento da mucosa nasal, já relatado no parasitismo do cobaio por *L. enriettii*^{36,37}, de camundongos e hamsters por *L. mexicana*¹⁶, e de casos humanos infetados por *L. braziliensis*⁴⁷, não foi encontrado em presença de nenhuma outra amostra de *Leishmania* aqui estudada.

Os extensos focos dérmicos e hipodérmicos de necrose abcedada, freqüentes nas infecções pela *L. mexicana*, e pela amostra n.º 4 de *L. braziliensis*, são raros nas infecções por *L. tropica*, apesar de, nestas últimas, as ulcerações superficiais serem muito mais freqüentes.

A lesão granulomatosa difusa, com embebição aquosa intersticial, provocada nos tecidos do hamster pela amostra n.º 4 de *L. braziliensis* assemelha-se, de certo modo, àquela determinada pelas amostras n.º 6 e n.º 22 do referido parasito, a à variante "frouxa" da lesão encontrada em animais infetados com *L. mexicana*¹⁶, não sendo jamais observada nas infecções por *L. tropica*. Aliás, a histopatologia da infecção por *L.*

tropica, estudada em hamsters e apenas em sua fase crônica, ou seja, após 180 dias, assumiu características semelhantes àquelas descritas por DOSTROVSKY¹⁹ e outros Autores.

Nos animais infetados com a amostra n. 6 de *L. braziliensis*, a necrose e as ulcerações parecem ser pouco menos freqüentes do que nos animais infetados com *L. mexicana* e com a amostra n.º 4 de *braziliensis*.

Células gigantes podem aparecer no quadro histológico cutâneo nas infecções por *L. tropica*, em hamsters. Foram raramente observadas nas infecções pelas três amostras de *L. braziliensis*, ao contrário do que tem sido referido, em casos humanos^{38,40,12}. O parasitismo do endotélio dos vasos sanguíneos (veias e capilares), relatado por MIGONE^{33,34} e por PESSÔA & BARRETTO³⁸, bem como a hiperplasia e estenose no lumen de vasos de calibre médio, observadas por ADAMS & MAECRAITH¹ no botão do Oriente e por KERDEL-VEGAS & ESSENFELD-JAHR²⁷, em indivíduos com leishmaniose cutâneo-mucosa, em nosso material só foi presenciado nos animais infetados com a amostra de *L. mexicana*.

A presença de macrófagos parasitados na epiderme, relativamente freqüente nas infecções por *L. mexicana* tanto no homem²⁹, como em animais de laboratório¹⁶, não foi encontrada em nenhum dos casos inoculados com as outras amostras.

Nódulos histiocitários sem parasitos, foram observados em fígados de alguns animais infetados por *L. braziliensis* (amostra n.º 4) e *L. tropica* (amostra n.º 11) e nos casos visceralizados inoculados com *L. mexicana* (amostra n.º 5). Nódulos semelhantes foram descritos em cães com infecção natural por *L. donovani*^{42,5} e até mesmo no homem^{13,6,7}.

Representam, provavelmente, uma reação imunoalérgica do SRE frente a substâncias antigênicas liberadas após destruição dos parasitos¹⁰. No baço, as referidas estruturas só foram encontradas em animais infetados com *L. mexicana*, particularmente nos casos de visceralização, e com a amostra n.º 22 de *L. braziliensis*.

A infiltração de células imunologicamente competentes (linfócitos e plasmócitos) nos espaços-porta do fígado, uma das ca-

racterísticas da patologia do Calazar tanto no homem^{12, 43, 6}, como em animais de laboratório^{22, 16}, também ocorreu, em grau variável, nas infecções por tôdas as amostras de *Leishmania* aqui estudadas, porém sempre com menor intensidade do que no Calazar. Observação idêntica, aliás, fôra feita por BEZERRA COUTINHO⁸, em necropsia de indivíduo portador de leishmaniose cutâneo-mucosa.

Deposição de substância lembrando amilóide ocorreu freqüentemente no fígado, baço e rim de animais infetados com *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. braziliensis*, principalmente em relação com a primeira.

É interessante enfatizar a grande freqüência de alterações renais encontradas nos animais portadores dos diversos tipos de leishmaniose tegumentar aqui estudados. Tais alterações, também presentes no Calazar humano e experimental, consistiam principalmente, na deposição de uma substância rósea, hialina, lembrando amilóide.

Lesões renais por amiloidose foram, já, presenciadas na infecção de hamsters com *L. donovani*²⁵, e com *L. mexicana*¹⁶. UEBEL⁴⁵, faz referência a alterações “glomérulo-nefróticas” na Leishmaniose visceral humana e BOGLIOLO¹⁴ comparou as lesões renais glomerulares vistas nessa condição patológica, àquelas presenciadas no lupus (lesão em “alça de arame”). ANDRADE & ANDRADE⁷, em 13 casos de Calazar humano, estudaram detidamente êsses aspectos, sendo de opinião que as lesões glomerulares representam, apenas, manifestações localizada de um fenômeno generalizado, relacionado com um fator estimulante geral, que condicionaria a tumefação e proliferação endotelial difusas, simulando espessamente hialino da membrana basal do glomérulo. Embora a existência dessas lesões e de alterações funcionais decorrentes⁴¹ não possam mais ser postas em dúvida, no caso da leishmaniose visceral, novos estudos fazem-se necessários para um melhor esclarecimento de suas características e significação nos portadores de leishmanioses tegumentares.

Atrofia linfóide, particularmente evidente no baço, e anteriormente relatada apenas em casos de Calazar^{32, 22, 44}, foi por nós surpreendida em tôdas as formas de leishmaniose tegumentar, principalmente na infecção pela *L. mexicana*¹⁶.

A presença de tecido granulomatoso parasitado com leishmânias ao nível do intestino grosso, parece ter ocorrido por propagação, uma vez que os animais em que foi feito tal achado tinham sido inoculados por via escrotal. Sabe-se, contudo, que tanto a *L. braziliensis*³¹ como a *L. tropica*^{28, 4}, podem, eventualmente, dar lesões à distância do ponto de inoculação.

Embora CUNHA¹⁷ não tenha conseguido diferenciar as espécies de Leishmânia por aglutinação sorológica, ADLER³, utilizando técnicas imunológicas mais modernas, chegou à evidência de que *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. mexicana* possuem antígenos específicos distintos, embora possuindo, em comum, alguns antígenos de grupo.

É possível, pois, como sugerem LAINSON & STRANGWAYS-DIXON³⁰, que numerosas diferentes espécies de *Leishmania* possam existir nas florestas do Novo Mundo, como parasitos naturais de animais silvestres, os quais, infetando acidentalmente o homem, provocariam a variedade de quadros clínicos observados nas Américas e rotulados, devido à dificuldade ainda existente na conceituação específica desses protozoários, sob a designação comum de “leishmaniose tegumentar americana”.

SUMMARY

Experimental cutaneous leishmaniasis

III — Comparative pathology of the infection of laboratory animals by different strains of *L. braziliensis*, *L. mexicana* and *L. tropica*.

The pathology of experimental *Leishmania* infection in laboratory animals using strains of the etiologic agents, *L. braziliensis*, *L. mexicana* and *L. tropica* which were isolated from typical human clinical cases of diffuse cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, “ulcera de los chicleros”, and “Oriental Sore”, was presented.

The animals were inoculated subcutaneously in the nose (snout) and base of tale, intrascrotally, intrasplenically. Several were infected simultaneously by more than one route.

A total of 213 two month old male and female mice and hamsters were inoculated, as well as 1 *Rhesus* monkey.

The duration of infection varied between 48 hours and 580 days in accord with the species and strains of *Leishmania* employed.

The gross aspect of the lesion demonstrated tumor-like nodules, ulcerated nodules, and ulcerations with crusts. These characteristics were common to all material examined regardless of species infection, though ulceration with crusts appeared more frequently in *L. tropica* (Oriental sore) infections.

Hepato-splenomegaly was rarely noted, except in visceralized animals infected with *L. mexicana*.

The results of this study reaffirm the difficulty of characterizing *Leishmania* species and subspecies solely on histopathological grounds yet suggest histopathology as an aid in the identification of the parasite involved.

The following characteristics are useful in the different diagnosis of *Leishmania* infection in hamsters and mice: 1.º) The cutaneous inflammatory infiltrates by lymphocytes and plasma cells around small vessels and local nerves, are characteristic of infections with *L. mexicana* and *L. tropica*; 2.º) The extensive foci of purulent necrosis in the dermal and subcutaneous layers, frequently seen in infections with *L. mexicana* and *L. braziliensis* (strain n.º 4), are quite rare in infections with *L. tropica*, although, in these, ulcerations of the covering epithelium are very commonly seen; 3.º) The "tuberculoid-like" microscopical appearance of the lesion by *L. tropica*, at least in its chronic phase, is quite characteristic and enables very easily its differentiation from other types of human cutaneous leishmaniasis; 4.º) The parasitism of the epidermal layer, the smaller blood vessels endothelium (venules and capillaries) and the lymphatic vessels apparently occurs in the hamster only when infected by *L. mexicana*; 5.º) The presence of giant cells in the histological picture was only observed in infections with *L. tropica*; 6.º) Other aspects, such as the formation of nodules of histiocytosis in the liver and spleen, the infiltration of immunologically competent

cells in the portal tracts of the liver, the deposition of an amyloid-like substance and the lymphoid atrophy of the spleen, which were relatively frequent and not yet described in cutaneous leishmaniasis, were detected in infections with all the strains reported in the present investigation, and consequently are of no value in distinguishing them.

The skin lesions produced by the three strains of *L. braziliensis* were very similar, and only quantitative differences related to certain components of the histopathological picture could be seen.

Renal lesions suggestive of amyloidosis were frequently observed in infections of all strains employed in the study.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADAMS, A. R. D. & MAEGRAITH, B. G. — *Clinical Tropical Diseases*. 3rd edition. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1964.
2. ADLER, S. — The behaviour of Sudan strain of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus papatasi*. A comparison of strains of *Leishmania*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 40:701-712, 1947, (Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 44:983, 1947).
3. ADLER, S. — Differentiation of *Leishmania braziliensis* from *L. mexicana* and *L. tropica* (Abstract presented to the 8 th International Congresses on Tropical Medicine and Malaria, Rio de Janeiro, Brazil, September 1st. to 11th 1963).
4. ADLER, S. — *Leishmania* — In: *Advances in Parasitology*. Edited by BEN DAWES, Vol. 2. New York, Academic Press, 1964.
5. ALVARENGA, R. J. de — Histopatologia da moléstia de Chagas e do calazar em cães naturalmente infectados. *Hospital (Rio)* 57: 23-40, 1960.
6. ANDRADE, Z. A. — A patologia da leishmaniose visceral (Calazar). *Arq. Brasil. Med. Naval* 19:79-204, 1958.
7. ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — Alguns novos aspectos da patologia do Calazar. (Estudo morfológico de 13 casos necropsiados). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:259-266, 1966.
8. BEZERRA COUTINHO, A. — Contribuição à patologia da Leishmaniose Americana. *An. Fac. Med. Recife* 2:14-21, 1935.

COUTINHO, E. & COELHO, M. V. — Leishmaniose tegumentar experimental. III — Patologia comparada da infecção por amostras de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania tropica*, em animais de laboratório. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:12-29, 1972.

9. BIAGI F., F. — Síntesis de 70 histórias clínicas de leishmaniasis tegumentaria de México (úlceras de los chichleros). *Medicina (México)* 33:385-396, 1953a.
10. BIAGI F., F. — Algunos comentarios sobre las leishmaniasis y sus agentes etiológicos. *Leishmania tropica mexicana*, nueva subespecie. *Medicina (México)* 33:401-406, 1953b.
11. BIAGI F., F. — *La leishmaniasis tegumentaria mexicana y algunos datos médico-estadísticos de Escárcega, Camp. (Cutaneous leishmaniasis and other Medical data in Escárcega, México)*. Thesis. *Trop. Dis. Bull.* 51:558-560, 1954.
12. BITTENCOURT, A. L. & ANDRADE, Z. A. — Aspectos imunopatológicos na leishmaniose cutâneo-mucosa. *Hospital (Rio)* 71:975-984, 1967.
13. BOGLIOLO, L. — Sobre a anatomia patológica da leishmaniose visceral (a *Leishmania donovani*). *Hospital (Rio)* 20:591-610, 1941.
14. BOGLIOLO, L. — Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência à fibrose hepática leishmaniótica. *Hospital (Rio)* 50:393-440, 1956.
15. COELHO, M. V. & COUTINHO-ABATH, E. — Experimental cutaneous leishmaniasis. I — Infection of albino mice and Syrian hamsters by *Leishmania mexicana*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:136-144, 1965.
16. COUTINHO-ABATH, E. & COELHO, M. V. — Experimental cutaneous leishmaniasis. II — The pathology of leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:145-155, 1965.
17. CUNHA, A. M. da — A soro aglutinação das leishmanias. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 37:35-76, 1942.
18. DEANE, L. M. — Leishmaniose visceral no Brasil. (Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará). *Monografia do Serviço Nacional de Educação Sanitária* (Rio de Janeiro, Brasil), 1956.
19. DOSTROVSKY, A. — Early and late leishmaniasis. *Harefuah* (Jerusalém) 50:165-167, 1956. (Resumo em: *Trop. Dis. Bull.* 53:1108, 1956).
20. FLOCH, H. — *Leishmania tropica guyanensis* n. sp. agent de la leishmaniose tégumentaire des Guyanes et de l'Amérique Centrale. *Arch. Inst. Pasteur Guyane Française. Publ. no. 328*, 1954. (Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 52:1178, 1955).
21. FLOCH, H. & SUREAU — Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 51:524, 1954.
22. FULTON, J. D. & NIVEN, J. S. F. — Studies on Protozoa Part. III — Visceral Leishmaniasis in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 44:717-728, 1951.
23. GARNHAM, P. C. C. — Apud LAINSON, R. & STRANGWAYS-DIXON, J. — 1963.
24. GARNHAM, P. C. C. & LEWIS, D. J. — Parasites of the British Honduras with special reference to Leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 53:12-40, 1959.
25. GELLHORN, A.; van DYKE, H. B.; PYLES, W. J. & TUPIKOVA, N. A. — Amyloidosis in hamsters with Leishmaniasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 61:25-30, 1946.
26. KAPINA, S. K. — Histopathology of cutaneous leishmaniasis. In "Problems of Cutaneous Leishmaniasis". *Ashkhabad*, pp. 188-191, 1941. In Russian, with French summary, p. 305.
27. KERDEL-VEGAS, F. & ESSENFELD-JAHR, H. — Histopatología de la leishmaniasis americana. *Medicina Cutánea* 1:267-275, 1966. (Resumo em *Trop. Dis. Bull.* 65:760, 1968).
28. KOJEVNIKOV, P. V., DOBROTVORSKAYA, N. V.; SOKOLOVA, A. N. & SCHAKHOVA, A. A. — Experimental cutaneous leishmaniasis in white mice. In "Problems of Cutaneous Leishmaniasis". *Ashkhabad*, pp. 249-262, 1941. (In Russian, with French Summary p. 304). (Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 41:341, 1944).
29. LAISON, R. & STRANGWAYS-DIXON, J. — *Leishmania mexicana*: the epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 57:242-265, 1963.
30. LAISON, R. & STRANGWAYS-DIXON, J. — The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras: Part II. Reservoir hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 58:136-153, 1964.
31. MEDINA, R. & ROMERO, J. — Estudio clínico y parasitológico de una nueva cepa de *Leishmania*. *Arch. Venezol. Med. Trop. y Parasit. Méd.* 3:298-326, 1959.
32. MENON, T. B. — The splenic reaction in Kala-Azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 33:75-86, 1939.
33. MIGONE, L. E. — La buba du Paraguay, Leishmaniose américaine. *Bull. Soc. Path. Exot.* 6:210-218, 1913a.

COUTINHO, E. & COELHO, M. V. — Leishmaniose tegumentar experimental. III — Patologia comparada da infecção por amostras de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania tropica*, em animais de laboratório. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:12-29, 1972.

34. MIGONE, L. E. — La buba del Paraguay. *An. Inst. Nac. Parasitol.* 1:255-267, 1913b.
35. MILLS, E. A.; MACHATTIE, C. & CHADWICK, C. R. — The histopathology of Oriental sore with special reference to its natural occurrence in the dog. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 24:67-74, 1930.
36. PARAENSE, W. L. — Infection of the nasal mucosa in guinea pig leishmaniasis. *An. Acad. Brasil. Ciências* 24:307-310, 1952.
37. PARAENSE, W. L. — The spread of *Leishmania enriettii* through the body of the guinea pig. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* 47:556-560, 1953.
38. PESSOA, S. B. & BARRETTO, M. P. — *Leishmaniose tegumentar americana*. Monografia, 1 vol., 327 pp. Rio de Janeiro, Brasil, Ministério da Educação e Saúde, 1944.
39. PIFANO, C. F. — Algunos aspectos de la patología comparada geográfica de la leishmaniasis tegumentaria en el tropico americano. *Bull. Soc. Path. Exot.* 53:510-517, 1960.
40. PIFANO, C. F.; MEDINA, R.; FEBRES, M. M. & ROMER, M. — La Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Rev. Sanidad y Asist. Social* 19:403-423, 1954.
41. PRATA, A. — *Estudo clínico e laboratorial do Calazar*. Tese. Salvador, Bahia, 1957.
42. REDAELLI, P. — Studio anatomo-patologico della leishmaniosi visceral spontanea del cane. *Bolletino della Società Médico Chirurgica di Catania* 1:225-318, 1933.
43. SEN GUPTA, P. C.; CHAKRAVARTY, N. K.; RAY, H. N. & DAS GUPTA, B. — The liver in Kalazar. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.* 50:152-259, 1956.
44. SEN GUPTA, P. C. & CHATTERJII, A. — Histopathology of the spleen in drug resistant Kala-Azar. *J. Indian Med. Ass.* 34:81-84, 1960. (Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 57:1035, 1960).
45. UEBEL, H. — Über eiweissstoffwechselerungen bei infantiler visceraler Leishmaniose unter besonderer Berücksichtigung der pathologisch-anatomischen Veränderungen. *Z. Tropenmed. Parasit.* 2:327-337, 1951.
46. VIANNA, G. — Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). *Brazil Médico* 25:411, 1911.
47. VILLELA, F.; PESTANA, B. R. & PESSOA, S. B. — Presença de "*Leishmania braziliensis*" na mucosa nasal sem lesão aparente, em casos recentes de leishmaniose cutânea. *Arq. Hig. Saúde Pública (São Paulo)* 5:23-30, 1940. (Abstracted in *Trop. Dis. Bull.* 39:610-611, 1942).

Recebido para publicação em 14/5/1971.